

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390332

研究課題名(和文)再生医療を応用した乳幼児肺移植技術の開発

研究課題名(英文)Development of infant lung transplantation technology applying regenerative medicine

研究代表者

横見瀬 裕保 (Yokomise, Hiroyasu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80231728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：成犬より取り出した左肺下葉を子犬の左胸腔内に移植し、移植後肺動脈内にサイトカイン徐放ゼラチンビーズを投与する実験を行った。移植後の薬剤投与スケジュールを変更し、高い確率で長期生存が可能となった。CTでの画像的評価を行ったが、移植肺そのものは一部器質化は見られるものの順調に生着していると考えられた。ただし健側肺の過膨張がいずれのモデルにも見られており、それによって移植肺の成長や膨張が妨げられていると考えられた。当研究はいったん終了となる。本方法が確立され、臨床応用されれば小児肺移植の常識を大幅に変える可能性を持っていると考えている。今後も当研究を継続していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The left lower lobe removed from the adult dog was transplanted into the left thoracic cavity of the puppy, and after the transplantation, cytokine sustained release gelatin beads were administered in the pulmonary artery. Changing the drug administration schedule after transplantation, it became possible for long-term survival with high probability. Although image evaluation was done with CT, the transplanted lungs were thought to be steadily engrafted although some organizing segment was seen. However, overexpansion of the healthy lung was seen in both models, and it seemed that growth and expansion of the transplanted lung were hindered. Although this study is terminated once. If this method is clinically applied there is a possibility that common sense of childhood lung transplantation can be changed drastically. I would like to continue this research in the future.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 サイトカイン徐放

1. 研究開始当初の背景

2010年7月17日に脳死移植法が改正され、15歳未満の者から脳死下での臓器提供が可能となった。この改正によって約10倍の頻度で脳死患者からの臓器提供が行われるようになったが、その後も乳幼児からの臓器提供は極めて少なく状況である。重篤な疾患を持つ乳幼児に対する肝臓移植においては、移植された肝臓が細胞レベルで再生、成長するため、生体肝移植が頻繁に行われている。しかし肺は再生能力に劣っており、乳幼児に対する成人からの生体肺移植は行われていない。

一方我々は、従来治療が困難とされてきた気管支支化症、膿胸、肺気腫などの難治性呼吸器疾患に対する新しい治療法開発のために、生体内吸収材料から各種の増殖因子を徐放することで気管軟骨、胸腔内線維組織、肺胞などの再生・誘導を試みている。これまで使用してきたサイトカインであるbFGF(fibroblast growth factor)はフィブラスプレートに、BMP(bone morphogenic protein)はInfuse Bone Graftにすでに臨床応用されている。

また他方で我々は大動物における肺気腫モデルを開発し、このイヌ肺気腫モデル肺気腫領域を灌流する肺動脈内にbFGF徐放ゼラチンビーズを投与し肺胞の再生を試みた。多様な成熟細胞に分化する能力を持つ未分化間葉系細胞が肺の間質で確認されている。またbFGFは胎生期の肺胞の分化、血管新生に強く関与しており、前述の実験において、bFGFの局所投与により肺間質内未分化間葉系細胞にゆっくりと作用させ肺胞再生や血管新生を誘導することが可能となった。さらに肺機能・酸素化能の低下した全肺肺気腫モデルに同様の治療を行うことによって肺機能・酸素化能の改善が認められた。

これらの背景やこれまでの当科の実績をもとに、本研究を着想し開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的では成犬ビーグルから子犬ビーグルに移植された移植肺が、肺動脈内に投与されたサイトカイン徐放ゼラチンビーズによって「成長」することを確認する。我々はbFGF徐放ゼラチンビーズにより気腫肺に細血管、肺胞が再生され酸素化能・呼吸機能が改善することを法億している。また低分子ヘパリン徐放ゲルを局所投与することにより、周囲の細胞からHGFが放出されアポトーシスの抑制、細胞の遊走の促進を確認している。さらにGCSFの局所投与は骨髄幹細胞への局所へのリクルートを促進する。

すなわち

- ・bFGFによる細血管肺胞の再生
- ・低分子ヘパリンによるapoptosisの抑制
- ・GCSFによる骨髄幹細胞の局所へのリクルート

この3点を発現させるべく、実験群ではグラフト内にbFGF徐放ビーズ、低分子ヘパリン徐放ビーズ、GCSF徐放ビーズを打ち込み、移植肺の成長を促す。

3. 研究の方法

(1)子犬ビーグル犬に対する部分肺移植モデルの作成

[全身麻酔法]

全ての実験動物は必要に応じて全身麻酔下で処置を行い、全てヒトに準じた全身麻酔を行って常時監視し、各種侵襲的手術および侵襲的検査(内視鏡、血管造影)を行う。硫酸アトロピン0.25mg、ケタミン10mg/kg、セラクトール4mg/kgの筋肉注射で導入し気管内挿管の上、GOS(セボフルレン1-3%吸入)で麻酔を維持する。

[手術手順と術後処置]

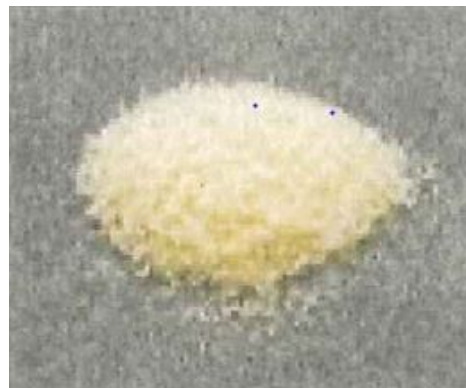
全身麻酔下に成犬から左肺S6を摘出し(ドナー肺)、ET-Kyoto液(臓器・組織保存液)で灌流する。ドナー成犬の安楽死にはペントバルビタールの静脈注射を用いる。

レシピエントである全身麻酔下の幼犬の左肺を全摘し、ただちに成犬から摘出しておいた左肺S6の同種移植を行う。手術後の免疫抑制はFK506(0.1mg/kg/day)筋注で行う。

(後述の通り、実験開始後、グラフトは左下葉に変更とし、また術後の免疫抑制に際してはmPSL静注/筋注を、感染コントロール目的に抗生剤投与を追加した)

(2)bFGF、低分子ヘパリン、GCSF徐放ゼラチンビーズの作成

ゼラチン水溶液をオリーブ油中に滴下後氷冷シアセトン溶液で遠心洗浄後、100-200 μ g径のゼラチンビーズを選択する。グルタルアルデヒド化学架橋後、凍結乾燥しbFGF溶液、低分子ヘパリン、GCSFを浸漬する。





(3) 増殖因子徐放ゼラチンビーズ肺動脈内注入

移植手技が安定した後、実験群のモデル作成にはいる。(1)と同様の移植手技を行った後、移植肺の肺動脈本幹よりサイトカイン徐放(b-FGF 1mg, 低分子ヘパリン 500 単位, GCSF 0.5 μg)ゼラチンビーズ懸濁液(n=10)を注入する。これまでの報告では肺動脈幹からの投与で急性期、晩期の呼吸障害、組織学的障害は観察されていない。

(4) 肺移植、サイトカイン導入後の機能検査
実験群、コントロール群で胸部 CT、肺機能検査(プレスチモグラフィ)、血液ガス分析を行う。

(5) 治療後の肺の組織学的検討

肺移植後 6 か月の時点で機能検査後、前述のごとく犠牲死せしめた後、移植肺組織の HE 染色、免疫組織染色(血管内皮細胞の確認のため第 因子の染色)を行う。

4. 研究成果

(1) 子犬ビーグル犬に対する部分肺移植モデルの作成

当初グラフトは左下葉 S6 区域としており、移植手技そのものは可能であったため、移植モデルを作成することは可能であった。しかしながら移植後の胸腔内死腔の増大に伴う術後急性期の胸腔内出血や貯留した術後胸水への早期の感染合併が見られ、長期生存が困難な状態であった。

このためまずグラフトを成犬の左下葉とし、胸腔内の死腔を減少させることに成功した。死腔が減少することによって、致命的な急性期の胸腔内出血は防ぐことが出来るようになった。移植後の免疫抑制剤や副腎皮質ステロイド、抗生剤(セフメタゾール) の薬剤投与スケジュールを大幅に変更することで術後貯留した胸水への感染をコントロールすることが可能となった。

これによって高い確率で長期生存が可能となり、安定して肺移植モデルを作成するこ

とに成功した。

(2) bFGF、低分子ヘパリン、GCSF 徐放ゼラチンビーズの作成

我々の施設ではすでにサイトカイン徐放ゼラチンビーズの作成はこれまでも成功しており、そのノウハウを生かし bFGF、低分子ヘパリン、GCSF 徐放ゼラチンビーズの作成を行った。

(3) 増殖因子徐放ゼラチンビーズ肺動脈内注入

(1)での移植手技が安定した後、実験群のモデル作成を行った。(1)と同様の移植手技を行った後、移植肺の肺動脈本幹よりサイトカイン徐放(b-FGF 1mg, 低分子ヘパリン 500 単位, GCSF 0.5 μg)ゼラチンビーズ懸濁液(n=10)を注入した。肺動脈幹への投与後、急性期、晩期の呼吸障害は観察されておらず、全モデル術後抜管し室内気で呼吸状態は安定していた。

(4) 肺移植、サイトカイン導入後の機能検査

肺機能検査

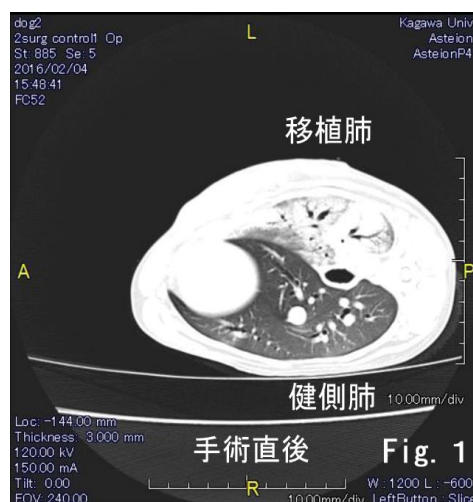
肺機能検査に関しては、当科で現有するプレスチモグラフィ/呼吸機能解析装置を用いて肺機能検査を行う予定であったが、呼吸機能解析装置の発売元/サポート元が変更となっている状況であった。

装置そのもののアップデートが国外の装置が必要であったため、現予算内での施行は困難と判断し、画像的評価を優先する方針とした。

画像的評価

長期生存が得られるようになったところでグラフトの CT での画像的評価を行った。

以下に、移植後にサイトカイン徐放ビーズを肺動脈より注入したモデルの術直後及び術 1 ヶ月後の胸部 CT 写真を示す(Fig.1、Fig2)。





移植肺そのものは一部器質化は見られるものの順調に生着していると考えられた。ただし健側肺の過膨張がいずれのモデルにも見られており、それによって移植肺の成長や膨張が妨げられていると考えられた。

このため、対照群(移植手技を行ったのみ)と、サイトカイン徐放ゼラチンビーズ投与群の間の肺成長の2群間の差として明らかなものは見られなかった。今後は健側肺の過膨張をコントロールし正確な肺成長の評価方法の確立が望まれる。

血液ガス分析の評価
 両群、手術1か月後の血液ガス分析の結果に大きな差は見られなかった。これは術後の換気が、健側肺に大きく依存していたためと考えられ(理由に関しては、健側肺の過膨張によるものと考えられる)た。
 純粋な移植肺の呼吸機能評価は、健側肺の肺動脈や気管支の結紮・閉鎖が必要となるため、非常に侵襲的な処置となる。
 血液ガス分析の評価方法に関しても今後の検討課題と考えている。

(5)治療後の肺の組織学的検討

こちらに関しては現在検討を行っている。

(6)研究成果の総括

これまでの結果として、
 子犬ビーグルの肺部分移植モデルを作成
 治療介入としてのサイトカイン徐放ゼラチンビーズの局所投与
 までは順調に経過した。しかしながら健側肺の過膨張などの要因によって正確なグラフト肺の画像評価は未だ確立されたとはいえない状況である。このため本研究の目的である「成犬ビーグルから子犬ビーグルに移植さ

れた移植肺が、肺動脈内に投与されたサイトカイン徐放ゼラチンビーズによって「成長」することを確認する」という目的の達成はまだ得られていない。

しかしながら前述のごとく、本方法は従来臨床応用されている安全な生体材料、サイトカインを用いた肺胞再生を応用した新しい肺移植方法であると確信している。本方法が臨床応用された暁には、従来渡航移植しか方法がなかった重症乳幼児肺疾患患者にとっての福音となる大きな可能性を秘めており、これまでの結果をもとにさらに創意工夫を重ねながら本研究を継続していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

横見瀬 裕保 (YOKOMISE Hiroyasu)

香川大学医学部 教授

研究者番号：80231728

(2)研究分担者

松浦 奈都美 (MATSUURA Natsumi)

香川大学医学部附属病院・助教

研究者番号：20572853

劉 大革 (LIU Dag)

香川大学医学部・助教

研究者番号：30314941

呉 哲彦 (GO Tetsuhiko)

香川大学医学部附属病院・講師

研究者番号：50313658

藤原 敦史 (FUJIWARA Atsushi)

香川大学医学部・助手

研究者番号：00748602

垂水 晋太郎 (TARUMI Shintaro)

香川大学医学部・助教

研究者番号：30580082

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()