

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659629

研究課題名(和文) 肺胞再生サイトカインを産生する細胞シートの開発、および肺気腫に対する治療への応用

研究課題名(英文) Lung Regenerative Therapy Using Cell Sheets Releasing Cytokines for COPD Patients

研究代表者

奥村 明之進 (Meinoshin, Okumura)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40252647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、肺気腫をはじめとする閉塞性肺疾患COPDの患者は増加しており、慢性呼吸不全に対する新たな治療戦略の構築が必要である。脂肪細胞特異的発現蛋白であるアディポネクチンAPNがCOPDの病因にアディポネクチン発現の低下が関連することを報告した。実際、APNノックアウトマウスでは、肺気腫を併発することを証明した。このマウスに対して、ワイルドタイプの脂肪補充によって、肺気腫の進行を抑制できる可能性を示した。さらに、組織中のAPN発現を上昇させる薬剤として、PGI2アナログに注目し、同薬剤の投与によりAPNを通して肺再生を促すことができた。本研究により臨床応用につながる解析であると考えている。

研究成果の概要(英文)：COPD is a major cause of chronic morbidity and mortality worldwide, and there is a need to develop more effective therapeutic strategies to replace specialized treatment such as lung transplantation. Adiponectin (APN) is a unique adipokine with multiple salutary effects such as antiapoptotic, anti-inflammatory, and anti-oxidative activities in numerous organs and cells and mice lacking APN spontaneously develop a COPD-like phenotype with extrapulmonary effects. Transplanted adipose tissue from wild type mice attenuated COPD-like changes in mice lacking APN. ONO-1301 is a synthetic prostacyclin analog characterized by chemically stable structure and enhances the secretion of adipocyte derived APN. These data suggested that APN is an intriguing candidate as a promotive agent for compensatory lung regeneration in COPD patients and prostacyclin analog enhanced alveolar cell proliferation, and induce lung regeneration through APN.

研究分野：肺再生医療

キーワード：肺再生医療 閉塞性肺疾患 アディポネクチン PGI2アナログ

1. 研究開始当初の背景

現代医療の限界である重症臓器不全に対する治療としては、臓器移植置換型治療が最も有効である。しかしながら脳死ドナー数は限られており、脳死体からの臓器移植の機会は未だ数少ない。近年、肺気腫をはじめとする閉塞性換気障害の患者は増加しており、2020年には全世界の死亡原因の第3位になることが予測されている。したがって慢性呼吸不全に対する新たな治療戦略の構築が必要である。我々は慢性呼吸不全に対する治療手段の可能性の一つとして再生医療に注目してきた。その結果、(1)ラットを用いた左肺全摘モデルにおける代償性肺再生には肝細胞成長因子 HGF が関与していること、(2)ラット肺気腫モデルにおいて HGF の外的補充が肺胞・肺血管の再生をもたらすこと、(3)肺気腫モデルにおいて肺容量減少手術に脂肪組織由来幹細胞を投与することで肺胞が再生すること、を明らかにした。このように、動物実験レベルでは肺再生医学の可能性を証明してきたが、肺実質へどのように再生因子を誘導するかなどの問題から、いまだ臨床応用には至っていない。心臓外科領域では、筋芽細胞シートによる心筋再生効果を示し、細胞シートから産生される HGF が重要であることを解明し、臨床の場で使用されている。一方、当院内内分泌代謝内科が同定した脂肪細胞特異的発現蛋白であるアディポネクチンが心筋再生機能を有し、また呼吸器内科が COPD の病因にアディポネクチン発現の低下が関連することを報告した。

2. 研究の目的

アディポネクチンなどの新規肺胞再生因子の候補を探索し、効率的な投与方法を検証することを目的として、COPD 肺を対象とした肺再生医学を開発することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

アディポネクチン産生能を有する細胞群の探索：肺胞上皮細胞（標的細胞）増殖に適した共培養条件を探索する。候補細胞として、筋芽細胞株や脂肪由来幹細胞、マウスから得た骨格筋筋芽細胞、皮下脂肪由来線維芽細胞および脂肪細胞を得て使用した。

肺再生マウスモデルの作成：当初豚豚エラストラーゼ気管内投与による COPD 誘発を検討したが、肺胞構造の破壊変化が高度であり、治療対象にできなかった。そこで、左全摘モデルを使用した。イソフルランの吸入麻酔により十分な抑制状態が得られた後、気管に挿管し、人工呼吸器で呼吸管理した。左開胸とし、左肺門を一括処理し、左肺を摘出し、閉鎖した。同モデルでは、1 週間の間に対側肺の肺再生を評価した。また、同様の手技で、COPD モデルとしてアディポネクチン・ノックアウトマウス（COPD 発症マウス）を使用

した。

マウスモデルへの細胞局所移植：モデルに対して、左肺切除後に左胸腔内へ、犠牲死させた他マウスの皮下脂肪を移植した。術後一週間目に呼吸機能検査（FVC、FEV₁）組織検査（HE 染色、Ki67 免疫染色）を行った。

組織中のアディポネクチン発現を上昇させる薬剤として、PGI₂ アナログ（ONO-1301）に注目し、同薬剤の皮下投与により組織中のアディポネクチン濃度または mRNA 発現を解析し、呼吸機能検査、組織検査を行った。

4. 研究成果

これまでの報告通り、アディポネクチンは脂肪細胞より発現されていた。さらに、マウス皮下脂肪より、脂肪幹細胞を分離し、脂肪細胞への分化を誘導することで、アディポネクチン発現は有意に上昇した。また、脂肪幹細胞を脂肪組織に添加して移植する方が、脂肪組織の生着率を上昇させることが判明した。以上より、脂肪組織または脂肪幹細胞を分離し、組織（細胞）移植を行うことで、臨床応用が可能であることが示唆された。

左肺全摘モデルでは、術後 3 日で、肺胞細胞 Ki67 染色 Index が上昇し、肺胞の再生がピークになった。同変化と 2 週間目のマウス肺機能、血液ガス（paO₂）は関連しており、また肺内の HGF 発現（mRNA レベル）にも関連を認めた。以上より、マウス左肺全摘モデルは、肺再生モデルとして使用できると考えた。また、アディポネクチン・ノックアウトマウスでは、同手技による肺再生を認めず、肺再生にはアディポネクチンが必要であると考えられた。

左肺全摘モデルに対する脂肪注入によって、呼吸機能の改善は明らかではなかったが、組織内の肺胞再生（Ki67 染色 Index）は、非注入群に比して上昇する傾向があった。アディポネクチン・ノックアウトマウスに対しても、ワイルドタイプの脂肪注入によって、同傾向を認めた。

PGI₂ アナログ（ONO-1301）皮下投与により組織中のアディポネクチン mRNA 発現は上昇し、また肺再生の指標は有意に上昇した。この効果は、脂肪移植を行ったマウスで有意に見られ、脂肪補充に加えて、PGI₂ アナログを投与することで肺再生を相乗的に誘導する可能性があり、いずれも臨床応用につながる解析であると考えている。

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 3 件)

Tsujino K, Takeda Y, Shintani Y, Inagaki R, Saiga H, Iwasaki T, Tetsumoto S, Jin Y, Ihara S, Minami T, Suzuki M, Nagatomo I, Inoue K, Kida H, Kijima T, Ito M, Kitaichi M, Inoue Y, Tachibana I, Takeda K, Okumura M, Hemler ME, Kumanogoh A. Tetraspanin CD151 protects against pulmonary fibrosis by maintaining epithelial integrity. Am J Respir Crit Care Med. 186: 170-180, 2012

Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, Inoue M, Iwakura Y, Miyoshi S, Okumura M, Hirano T, Murakami M. IL-6 Amplifier, NF- κ B-Trigged Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses. J Immunol 89: 1928-1936,2012

Lee J, Nakagiri T, Kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, Shintani Y, Inoue M, Miyoshi S, Morii E, Hirano T, Murakami M, Okumura M. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. International Immunology 25: 319-332,2013

〔学会発表〕(計 3 件)

Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Kimura A, Sakai Y, Miyagawa S, Sawa Y, Okumura M. Sustained-release delivery of prostacyclin analogue(ONO-1301) enhances lung regeneration after pneumonectomy in mice. American thoracic society Interenational conference 2014/5/16, San Diego

舟木 壮一郎、川村 知裕、別所 俊哉、新谷 康、井上 匡美、南 正人、酒井 芳紀、宮川 繁、澤 芳樹、奥村 明之進 プロスタサイクリンアゴニスト ONO-1301 による肺再生治療の可能性。第 67 回日本胸部外科学会 2014/10/1 福岡

舟木 壮一郎、川村 知裕、別所 俊哉、新谷 康、井上 匡美、南 正人、酒井 芳紀、宮川 繁、澤 芳樹、奥村 明之進 プロスタサイクリンアゴニスト ONO-1301 による肺再生治療の可能性。第 41 回日本臓器保存生物医学会学術集

会 2014/11/28 大阪

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40252647

(2) 研究分担者

南 正人 (Masato Minami)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10240847

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10379232

澤端 章好 (Noriyoshi Sawabata)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50403184
(平成 25 年度まで分担者として参画)

中桐 伴行 (Tomoyuki Nakagiri)
大阪大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号：70528710

新谷 康 (Yasushi Shintani)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：90572983

川村 知裕 (Tomohiro Kawamura)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30528675
(平成 26 年度より分担者として参画)

(3)連携研究者
()

研究者番号：