

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591608

研究課題名 (和文) インターロイキン 10 遺伝子導入血管内皮前駆細胞移植による移植肺機能不全の治療

研究課題名 (英文) Treatment for primary lung graft dysfunction by transfusion of endothelial progenitor cells transferred with intreleukin-10 gene.

研究代表者

岡田 克典 (OKADA YOSHINORI)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：90323104

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は、ラット肺移植モデルにおいて、1. レシピエント由来の細胞による移植肺血管内皮細胞再生が観察されるかどうか、2. 同系ラットの骨髄から採取し培養によって誘導した血管内皮前駆細胞をレシピエントラットに静脈内投与 (細胞移植) することで、肺血管内皮細胞の再生が促進され得るかを検討することである。まずラット肺は大動物に比べ虚血・再灌流への感受性が強く、6～12 時間の保存で著明な肺水腫を呈することを観察した。次いで、SD ラットをドナー、GFPtgSD ラットをレシピエントとする左肺同所性移植を行い、移植肺に GFP (+)、CD31 (+) の細胞、つまりレシピエント由来の肺血管内皮細胞が移植肺内に存在することを発見した。同じ目的で、雌性 Lew ラットをドナー、雄性 Lew ラットをレシピエントとする同系肺移植を行い、移植肺内に抗 CD31 抗体 (+)、Y 染色体 (+) の細胞がみられるか否かについて検討を試みたが、FISH の手技を確立するに至らなかった。GFPtgSD ラットを用いたモデルで、レシピエント骨髄の移植によりレシピエント由来の肺血管内皮細胞の増加がみられるか否か、そしてこれが移植肺の虚血・再灌流傷害を抑制し得るかにつき研究を継続していく予定である。一方、肺組織からの幹細胞の分離を試み、それに成功した。この際に肺組織を保存するのに用いる肺保存液の組成によって、分離される幹細胞の数に違いがあることを発見し、成果を発表した。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this research project was to examine whether regeneration of pulmonary vascular endothelial cells that are derived from recipient cells can be observed in the rat lung in a rat model of lung transplantation, and whether transplantation of endothelial progenitor cells derived from bone marrow can facilitate regeneration of pulmonary endothelial cells. We performed rat lung transplantation from the SD rat donor to the GFPtg SD rat recipient and observed GFP(+), CD31(+) cell in the lung isograft, suggesting regeneration of endothelial cells derived from recipient cells occurs. We are planning recipient bone marrow cell transplantation to examine whether it can facilitate regeneration of pulmonary endothelial cells and also reduce ischemia-reperfusion injury of the lung isograft.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺移植，血管内皮前駆細胞，インターロイキン-10，GFPラット

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期肺疾患患者に対する有効な治療法として確立しているが、術後1ヶ月以内の死亡が10%にのぼるリスクの大きな手術である。移植後の早期死亡の原因として最も頻度が高いのは、primary graft dysfunctionであり、虚血・再灌流傷害がその主たる原因であると考えられている。虚血・再灌流傷害の病態には肺血管内皮細胞傷害が大きく関与していることから、治療としては肺血管内皮細胞傷害の軽減を目的とするステロイド投与などの抗炎症療法が行われてきた。しかし、治療効果には限界があり救命できない症例も多い。虚血・再灌流傷害の治療においては、肺血管内皮細胞再生の概念を取り入れた新しい治療の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット肺移植モデルにおいて、1. レシピエント由来の細胞による移植肺血管内皮細胞再生が観察されるかどうか、2. 同系ラットの骨髄から採取し培養によって誘導した血管内皮前駆細胞をレシピエントラットに静脈内投与（細胞移植）することで、肺血管内皮細胞の再生が促進され得るか、さらにこれが移植肺虚血・再灌流傷害を軽減することができるか 3. 炎症抑制性サイトカイン IL-10 を血管内皮前駆細胞に遺伝子導入した後に細胞移植を行うことで、虚血・再灌

流傷害の軽減に上乘せ効果を期待できるか否か、について検討することである。

3. 研究の方法

(1) 移植肺虚血・再灌流モデルの作成

ドナー肺を摘出後、肺保存液（EP-TU solution）を用いて設定した時間冷却保存する。左肺同系同所性片肺移植は、これまで我々が報告してきた方法で、microsurgical technique を用いて行う。再灌流傷害の程度は、生理学的指標として、移植肺への血流比、対側肺動脈結紮後の血液ガス、移植肺の増加重量および湿乾重量比を用いる。分子生物学的指標として、移植肺内の炎症性サイトカイン（TNF- α , IL-8）の発現を定量 RT-PCR法で解析する。合わせて、移植肺の病理学的検索する。

(2) 骨髄細胞由来の肺血管内皮細胞再生の評価

Green fluorescent protein (GFP) ラットをレシピエント、Wild type ラットをドナーとする組み合わせで肺移植を行う。肺移植後、経時的（6時間、24時間、3日、7日）に肺を摘出する。摘出肺を、凍結あるいはパラホルムアルデヒドで固定し、CD34、CD45に対する抗体を用いた免疫蛍光多重染色を行い、GFP+CD34+CD45-の細胞がどの程度存在するかを定性的、定量的に評価することで、レシピエント由来の血管内皮前駆細胞が肺血管内皮細胞に分化していることを確認すると

ともに、肺毛細血管への定着、分化の経時的な変化を観察する。

(3) 骨髄細胞移植による虚血・再灌流傷害抑制効果の検討

Green fluorescent protein (GFP) ラットの大腿骨髄から細胞を吸引によって採取し、differential endothelial cell culture medium で7日間培養し、血管内皮前駆細胞様細胞を得る。この細胞の一部を、パラホルムアルデヒドで固定後、Sca-1 および Flk-1 に対する抗体を用いて免疫染色を行うことで、Sca-1+Flk-1+細胞（血管内皮前駆細胞）の誘導を確認する。同系移植による移植肺虚血・再灌流モデルで再灌流直後に、 1×10^8 個（投与細胞数は予備実験を行って決定）の血管内皮前駆細胞を静脈内投与する。コントロール群には、培養液のみを投与し、骨髄細胞投与による虚血・再灌流傷害抑制効果を検討する。さらに、血管内皮前駆細胞に IL-10 遺伝子を導入した後に細胞移植を行う群を作成し検討する。

4. 研究成果

(1) 移植肺虚血・再灌流モデルの作成

ラット肺は大動物に比べ虚血・再灌流への感受性が強く、6～12 時間の保存で著明な肺水腫を呈することを観察した。また、移植肺内においては、炎症性サイトカインの mRNA の発現が増強することを確認した。

(2) 骨髄細胞由来の肺血管内皮細胞再生の評価

SD ラットをドナー、GFPtgSD ラットをレシピエントとする左肺同所性移植を行い、移植肺に GFP (+)、抗 CD31 抗体 (+) の細胞、つまりレシピエント由来の肺血管内皮細胞が存在することを観察した。同じ目的で、雌性 Lew ラットをドナー、雄性 Lew ラットをレシピエントとする同系肺移植を行い、移植肺内に抗 CD31 抗体 (+)、Y 染色体 (+) の細胞がみられるか否かについて検討を試みたが、FISH の手技を確立するに至らなかった。

今後は、GFPtgSD ラットを用いたモデルで、レシピエント骨髄から誘導した血管内皮前駆細胞の移植によりレシピエント由来の肺血管内皮細胞の増加がみられるか否か、また

これが移植肺の虚血・再灌流傷害を抑制し得るかにつき研究を継続していく予定である。

一方、肺組織からの幹細胞の分離を試み、それに成功した。この際に肺組織を保存するのに用いる肺保存液の組成によって、分離される幹細胞の数に違いがあることを発見し、成果を 2009 年 5 月の American Thoracic Society で発表した。

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 2 件)

1. Oishi H, Okada Y, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Sado T, Noda M, Endo C, Sakurada A, Matsumura Y, Kondo T: Transbronchial human interleukin-10 gene transfer reduces acute inflammation associated with allograft rejection and intragraft interleukin-2 and tumor necrosis factor- α gene expression in a rat model of lung transplantation. J Heart Lung Transplant 29 : 360-367, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. Suzuki T, Kubo H, Fujino N, Hegab AE, He M, Okada Y, Yamaya M, Kondo T. Preservation Solution for Endogenous Tissue Stem Cells. Am J Respir Crit Care Med 179: 1997. American Thoracic Society, San Francisco, May 18, 2009. (査読あり)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 克典 (OKADA YOSHINORI)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：90323104

(2) 研究分担者

久保 裕司 (KUBO HIROSHI)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20332504

佐渡 哲 (SADO TETSU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20396485

星川 康 (HOSHIKAWA YASUSHI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90333814

近藤 丘 (KONDO TAKASHI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：10195901

(2) 連携研究者

なし