

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18227

研究課題名(和文)代償性肺成長の予測・促進因子の検討～bFGFはそのKeyと成りうるか～

研究課題名(英文)Examination of prediction and promotion factors of compensatory lung growth ~ focus on bFGF~

研究代表者

藤原 敦史 (Fujiwara, Atsushi)

香川大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00748642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：COVID-19流行により予定していたラットCT画像評価が困難となった。新たな代償性肺成長(CLG)の指標として、「右肺重量/体重比(以下LBR)」を使用した。CLGモデルでは、肺切除を行っていないラットと比較しLBRは大きい傾向が見られCLGモデル作成は予定通り可能であった。作成したCLGモデルを「CLG良好群」と「CLG不良群」にわけ、血中・気管支肺胞洗浄液中のbFGF濃度と摘出肺の組織学的所見を検討項目としCLGとbFGFの関連性を検討している。また現在、ラット肺気腫モデルを作成しており今後bFGF投与群/非投与群間でCLG発現に有意な差異があるか検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

検査技術が発達した現在においても、肺切除後の術後肺機能を正確に予測する方法は構築されておらず、その確立が強く望まれている。本研究を継続しbFGFと代償性肺成長の関連が明らかになることで術後肺機能や合併症リスクが正確に予測できると同時に、代償性肺成長を促し術後肺機能が改善することで低肺機能のために標準手術を断念していた患者への手術適応を拡大させることに寄与できる可能性があると考えている。今後まだまだ罹患患者数や死亡者数が増加すると予測される肺癌手術の発展の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The planned rat CT image evaluation could not be performed due to the COVID-19 pandemic.

The "right lung weight / body weight ratio (LBR)" was used as a new index of compensatory lung growth (CLG). In the CLG model, the LBR tended to be larger than that in the rat without lung resection, and it was possible to create the CLG model as planned. The created CLG model was divided into a "CLG good group" and a "CLG poor group", and the relationship between CLG and bFGF is currently examined using the bFGF concentration in blood and bronchoalveolar lavage fluid and the histological findings of the removed lung. In addition, we are currently preparing a rat emphysema model and plan to investigate whether there is a significant difference in CLG expression between the bFGF-administered group and the non-bFGF-administered group in the future.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：代償性肺成長

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

背景1: 肺切除後の肺機能予測と肺切除領域の決定

肺切除術の切除領域は、術前肺機能検査から術後予測1秒量を算出し、決定する。しかしながら申請者は、術前の予測算出値と術後の呼吸機能に大きく乖離がある症例を経験してきた。つまり術後残存する肺の機能を正確に推測するためには、現在の算出項目だけでは不十分であり、新たな要素を考慮に入れ評価を行う必要がある。

背景2: 代償性肺成長(Compensatory Lung Growth: CLG)

術後の予想外の肺機能回復/低下の一因として、代償性肺成長(compensatory lung growth: CLG)が関与していると考えられている。代償性肺成長とは、一定量の肺を切除した際に、損失分を代償するように残存肺の容量や重量が増加する事象である。つまり代償性肺成長の程度により、肺切除後の肺機能は大きく変わると考えられる。代償性肺成長に関連する要素を解明する事で、より正確な術後肺機能の予測が出来る他、代償性肺成長を誘導する事で術後肺機能の向上が期待できると考えられる。

背景3: 塩基性線維芽細胞増殖因子(Basic Fibroblast Growth Factor: bFGF/FGF2)

線維芽細胞増殖因子 (FGF)は、血管新生、創傷治癒、胚発生に関係する成長因子の一種であり、広範囲な細胞や組織の増殖や分化の過程において重要な役割を果たしている。申請者は、創傷治癒の初期段階において、傷の空間を埋める肉芽組織を形成することが報告されている塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF/FGF2) に着目した。bFGFは、血管新生促進作用 線維芽細胞増殖促進作用を有することが解明されている。申請者が所属する研究室では、bFGF徐放物質をイヌの肺動脈内に投与し、組織学的に肺胞様構造の再生や肺胞間距離の縮小が見られたことをすでに報告している(Mori et al., ASAIO journal 2008)。以上から、bFGFは、術後の破壊された肺胞構造を再生させる代償性肺成長を促進する因子であると予想している。

2. 研究の目的

<目的1> 術前 bFGF 測定が代償性肺成長の予測因子となり得るか

術前検査は、非侵襲的かつ簡便なことが求められる。肺癌術前にはほとんどの症例で行われる。本研究では、これら術前検査(採血検査及び気管支鏡検査(肺組織の生検・気管支肺胞洗浄液(BAL)の採取))で得られることが想定されるサンプル(将来臨床に適応する上でも患者への追加侵襲を要しない)を用いて bFGF の発現を測定し、画像評価・組織評価と合わせて術後代償性肺成長との相関関係について検証を行う。

<目的2> 術後 bFGF 投与が代償性肺成長の促進因子となり得るか

申請者が所属する研究室では、bFGF を約2週間徐放する径100 μ mのゼラチンマイクロスフェアを京都大学再生医科学研究所との共同研究にて開発してきた。本研究では、これまで開発してきた方法にて bFGF 投与を行い、代償性肺成長の程度について検証を行う。

3. 研究の方法

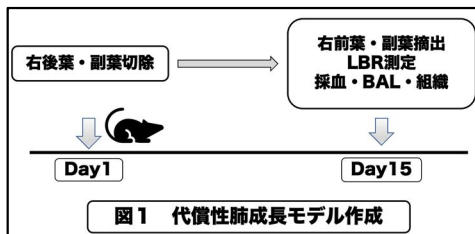
<実験1> bFGFの代償性肺成長予測因子としての有用性の検討

1. ラット代償性肺成長モデルの作成

(当初計画) 全身麻酔・右開胸下で右後葉及び副葉の摘出を行い右前葉及び中葉の代償性肺成長を促す。代償性肺成長はCTによる残存肺の肺体積・仮想肺重量を用いて評価をする。術前・術後1週間・術後2週間の段階でCTを撮像し、残存肺の肺体積・仮想肺重量を計算する。手術2週間後に右前葉・中葉を摘出し合わせて組織学的な面からも代償性肺成長の程度を確認する。

(当初計画からの変更点)

代償性肺成長モデルの作成において、当初は小動物用CTを用いた肺体積・仮想肺重量を用いて評価を行うことで代償性肺成長の評価を行うこととしていたが、代表研究者が2019年度に所属施設を異動し、異動先の施設では小動物用CTがない状態であった。COVID-19流行に伴い研究期間県外への移動が制限される状況となり、異動前施設での頻回のCT撮像は困難であった。以上2点の理由によって小動物用CTを用いた画像評価は断念した。新たな指標として、摘出後右肺重量と摘出時体重の比を肺重量評価として用いることとした。右肺重量/体重比(以下LBR)を用い、代償性肺成長モデルの作成を行った。

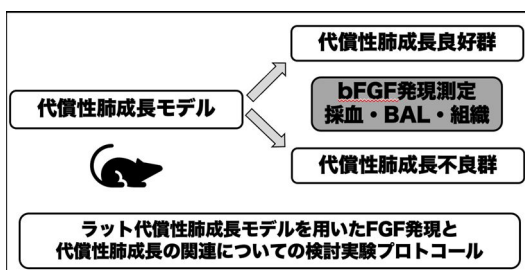


2. ラット代償性肺成長モデルを用いたFGF発現と代償性肺成長の関連についての検討

(当初計画) スケジュールに沿って採血・気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取し、それぞれbFGFの定量(遺伝子発現、タンパク発現)を行う。加えて組織では抗FGF抗体を用いた免疫染色を行い評価する。画像・組織所見から判断した代償性肺成長の程度と、定量されたbFGFとの相関関係を検討し、bFGFが代償性肺成長を予測する因子として有用か検討を行う。

(当初計画からの変更点)

予め作成した代償性肺成長モデルを、LBR値を基準に「代償性肺成長良好群」と「代償性肺成長不良群」の2群に割り付けし、肺摘出時に採取された血中および気管支肺胞洗浄液・肺組織内のbFGF発現を比較・評価することで、代償性肺成長とbFGFの関連を検討することとした。



<実験2> 術後bFGF投与による代償性肺成長促進効果の検討

1. ラット肺気腫モデルの作成

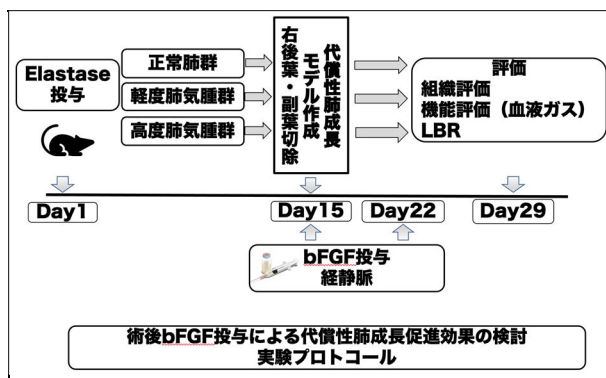
ラット気管内にエラストラーゼ(豚膵臓由来)を投与し肺気腫モデルを作成する。肺気腫重症度を規定する目的でエラストラーゼは軽度肺気腫群(50IU/kg)、高度肺気腫群(500IU/kg)の2群に分けて投与を行う。CTを撮像し、仮想肺重量・肺体積・気腫化によって生じた肺内低吸収領域(LAA)の体積を計測し、肺気腫の重症度も確認する。加えて組織学的に、気腫肺の程度の評価として一般的な平均肺胞間距離(Lm)や血管新生の評価も行い、肺気腫モデル作成および肺気腫重症度の層別化を行う。

(当初計画からの変更点) 肺気腫モデル作成にあたっては、画像評価は行わず組織学的評価を中心に行うこととした。

2. ラットを用いた術後bFGF投与による代償性肺成長促進効果の検討

エラスターゼ投与2週間後にと同様代償性肺成長モデルを作成する。正常肺群・軽度肺気腫群・高度肺気腫群に対してそれぞれ摘出術直後・手術1週間後にbFGFの投与を行う。手術2週間後の時点でCT、残存右前葉及び中葉の酸素化能の測定(血液ガス)、組織の摘出を行い、肺胞構造の再生および代償性肺成長の程度の検討を行う。

(当初計画からの変更点) 肺気腫モデル作成にあたっては、画像評価は行わず組織学的評価および機能評価(血液ガス)を中心に行うこととした。



4. 研究成果

(研究の全体としての進捗状況)

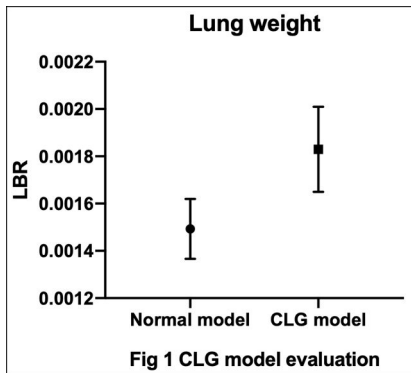
上記のごとく、当初は小動物用CTを用いた肺体積・仮想肺重量を用いて評価を行うことで代償性肺成長の評価を行うこととしていたが、代表研究者が2019年度に所属施設を異動し、異動先の施設では小動物用CTがない状態であった。COVID-19流行に伴い2020年、2021年と県外への移動が大幅に制限される状況となってしまったため、異動前施設での頻回のCT撮像は困難であった。加えて施設の異動に伴い本研究以外の業務内容が大きく変わったことから、当初予定していた本研究に割くべきエフォート通りの時間確保が困難となった。このため全体として研究の進捗はやや遅れたという状況であった。後述するが、昨年度を持って科学研究費としての補助期間は終了したが、本研究は可能な限り実験計画通りに遂行予定としている。

<実験1> bFGFの代償性肺成長予測因子としての有用性の検討

1. ラット代償性肺成長モデルの作成

前述の方法の通り、ラット代償性肺成長モデルの作成を行った。

代償性肺成長モデル群(CLG group)では、右肺重量/体重比(以下LBR)が非切除群(Normal Group)より大きい傾向が見られた。この結果を持って、プロトコール上の方法で代償性肺成長モデルは作成できていると考えられた。(Fig1)



2. ラット代償性肺成長モデルを用いた FGF 発現と代償性肺成長の関連についての検討
 上記の方法を用いて安定して代償性肺成長モデルが作成可能となったため、作成した代償性肺成長モデルを、それぞれ「代償性肺成長良好群」と「代償性肺成長不良群」の2群に割り付けし、肺摘出時に採取された血中および気管支肺胞洗浄液・肺組織内の bFGF 発現の評価・解析を現在鋭意行っている。代償性肺成長の程度と bFGF 発現の間に正の相関関係があれば代償性肺成長において、bFGF を測定することで術後代償性肺成長の程度を予想することが可能になると考えられる。

< 実験2 > 術後bFGF投与による代償性肺成長促進効果の検討

1. ラット肺気腫モデルの作成

上記プロトコルを用い、ラット肺気腫モデルの作成を行っている。当方が行った高度肺気腫群 (500IU/kg) については、エラスターゼの気管内投与後高度の炎症が惹起され 2 週間生存する率がやや低い傾向が見られた。現状は安定してモデル作成が可能と思われる軽度肺気腫群を作成しており、組織学的に肺気腫の有無や程度に関して解析を行っている。

(今後継続して行う予定の研究に関して)

2. ラットを用いた術後bFGF投与による代償性肺成長促進効果の検討

エラスターゼ投与 2 週間後・肺気腫モデル作成後にこれまでと同様の方法で代償性肺成長モデルを作成する。正常肺群・軽度肺気腫群・高度肺気腫群に対してそれぞれ摘出術直後・手術 1 週間後に bFGF (経静脈的) の投与を行う。手術 2 週間後の時点で残存右前葉及び中葉の酸素化能の測定 (血液ガス)、組織の摘出を行い、肺胞構造の再生および代償性肺成長の程度の検討を行う予定である。

(本研究の意義および研究全体の総括)

本研究を継続し bFGF と代償性肺成長の関連が明らかになることで術後肺機能や合併症リスクが正確に予測できると同時に、代償性肺成長を促し術後肺機能が改善することで低肺機能のために標準手術を断念していた患者への手術適応を拡大させることに寄与できる可能性があると考えている。今後まだまだ罹患者数や死亡者数が増加すると予測される肺癌手術の発展の一助となる可能性がある。今回、科学研究費基金の援助を頂き、大型の高額機器の購入等、本研究を遂行するためのラットの全身麻酔や肺切除手術、その後の評価を行うだけのシステムを構築することができ大変感謝しております。諸般の事情によって全体として進捗が遅れていた経緯はあるが、着実に実験計画に沿って研究が遂行されていると考える。科学研究費補助期間は終了するが、今後も可能な限り本研究を継続し、結果を公表・還元できるようにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------