

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791254

研究課題名 (和文) 気管支肺胞幹細胞を用いた胎仔肺細胞移植の試み

研究課題名 (英文) Fetal lung cell implantation with bronchioalveolar stem cells

研究代表者

鳥羽 博明 (TOBA HIROAKI)

徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：40403745

研究成果の概要 (和文)：胎仔肺組織移植では移植片の生着・分化を安定して捉えることができた。その生着メカニズムについては、胎仔肺組織が持つ特徴に加えて、胎生期における肺の形態形成に関わる様々な転写因子が大切な役割を果たしている。なかでも TTF-1 の役割が非常に重要で、正常の肺の形態形成を模した形で分化していつていることがうかがわれた。一方で、気管支肺胞幹細胞の単離含めた細胞移植に関しては、未だ試行錯誤中である。

研究成果の概要 (英文)：In our fetal lung implantation, donors could certainly survive and differentiate. Concerning the mechanism of survive of donors, the characteristics of fetal lung tissue and various transcriptional factor play important roles in embryonal lung morphogenesis. We demonstrated that TTF-1 plays a good role among them and donors can differentiate tracing normal lung morphogenesis. In contrast, cell implantation including the isolation of bronchioalveolar stem cells is on going project.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで肺実質の再生は、その構造の複雑さなどから非常に困難とされ、否定的な見解が多く見られていた。

(2) 様々な方法が試みられる中で、われわれのグループでは、肺胞領域の再生へのアプローチとして、胎仔肺組織をそのソースとして用い、成体肺で生着・分化することを証明した。(Kenzaki K et al, J Thorac Cardiovasc Surg 2006;131:1148-1153)

(3) そこで、さらにその研究を進めて、ブレオマイシン誘導肺線維症モデルを作成し、胎仔肺組織移植を行い、同様に病的肺においても生着し、形態的には肺胞構造に分化することを示し、病的肺においても応用可能であることを証明した。

(4) 胎仔肺組織をソースとして選択した理由は以下の通りであった。

①肺としての分化がある程度方向付けられていること。

②分化・増殖能が旺盛な組織であること。
③足場としての間葉系組織が存在すること。
この現象には胎仔肺組織の特徴が大いに寄与していることが考えられるが、その詳しいメカニズムについては明らかにすることはできていなかった。

(5) 一方で、これまでの研究で胎仔肺の発達において関与する重要な転写因子が多数報告されている。特に呼吸に関与する肺胞上皮細胞の形態形成においては、TTF-1・FOXA2・NFATC3・C/EBP α といった因子が調節し合い、I型肺胞上皮細胞への分化やII型肺胞上皮細胞のサーファクタント分泌という機能獲得に導くことが示唆されている。他にも多数の因子が関与していることが分かっている。

(6) そのように発生学的に非常に複雑な肺を再生するという点において、iPS細胞も肺胞領域を再生できるまでには至っていない。一方で分化していったII型肺胞上皮細胞投与が線維化肺を改善させたとの研究もあり、有用な source の一つと思われる。しかし、培養が非常に困難とされており、ドナーを増やすという役割を担うには適していない。

(7) そこでこれまでの知見に基づき、今回I型・II型肺胞上皮細胞・クララ細胞の前駆細胞で、気管支肺胞境界領域にある気管支肺胞幹細胞：bronchioalveolar stem cells (BASCs)に着目した。

2. 研究の目的

今回の実験では、

(1) 様々な分子マーカーを用いて免疫組織学的に胎仔肺組織の生着・分化メカニズムを解明し、BASCsが関与していることを証明する。

(2) 胎仔肺組織から表面マーカーを用いて増殖能の旺盛な胎仔BASCsを単離した後に移植し、生着・分化することを確認する。

(3) 生着・分化した移植片のTTF-1やerbB1/2/3/4の発現などの分化マーカーを用いて免疫組織染色を行い、諸家の*in vitro*での結果との整合性を検討し、そのメカニズムを解明し、ドナーを増やすことが可能かどうか確かめる。

(4) 胎仔由来BASCsを用いた移植を病的肺である肺線維症モデルにも応用する。
以上の点を解明することを目的として、研究を進めた。

3. 研究の方法

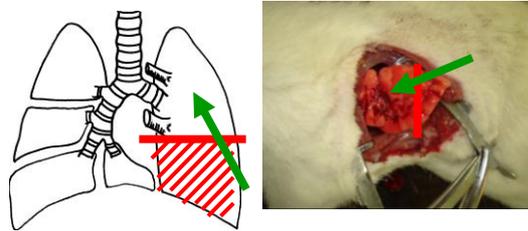
(1) 正常成体肺に胎仔肺組織移植し、移植片において増殖している細胞について検討する。

①胎仔肺組織移植

SPF雄性LEWラット(8~12週)をレシピエントとし、同系胎齢17日のラットをドナ

ーとする。吸入麻酔下に妊娠ラットから胎仔を取り出し、顕微鏡下に両肺を摘出、DMEM培地内で細切する。

レシピエントは挿管し人工呼吸下に左開胸し、胎仔の移植肺片は0.25ccの注射器内にDMEMごと吸引し、レシピエント肺に0.1cc注入する。左肺の左肺静脈流入部より尾側を結紮切除する。



②胎仔肺移植片の免疫組織染色による検討

胎仔肺移植後、1・2・4・8・12週後の時点で犠牲死させ、肺を生食灌流後、心肺同時摘出して標本を作成する。

FISH assayを用いてY染色体を同定し、ドナー由来の組織片であることを確認する。

H-E染色とCSA法による肺胞・気管支上皮マーカー(TTF-1, proSP-C, FGFR2, CCSP)・血管内皮マーカー(CD34)・白血球マーカー(CD45)・リンパ管マーカー(D2-40)による免疫組織染色を行い、ドナーの経時変化を組織学的に検討する。

フローサイトメトリーにて表面マーカー(proSP-C, CCSP, Sca-1, CD34)に関しさらに分析する。

(2) 胎仔BASCsを単離し、正常成体肺に移植し、分化・増殖について検討する。

①BASCsの単離

胎齢17日の胎仔の両肺を摘出し、1mm³に細切し、20 μ g/mlのDNaseと0.25%トリプシンHBSSのなかで37 $^{\circ}$ C10分間分離させる。10%FCSを加えたDMEM液にて分離を止めた後、45 μ mのメッシュで濾し、遠心分離させる。

(650 \times g, 4 $^{\circ}$ C10分間)フローサイトメトリーにて表面マーカーを分析し、proSP-C(+)/CCSP(+)¹の細胞をBASCsとする。その後、マトリジェル上で培養する。

fibroblastを分離するために、20%FCSを加えたDMEM内で再度浮遊させ、125mm²のペトリ皿の上で37 $^{\circ}$ C60分間細胞培養し単離する。
②胎仔BASCsの正常成体肺への移植と移植片の免疫組織染色による検討

レシピエントには同週齢のSPF-LEWラットを用い、これまでの胎仔肺組織移植の方法に準じて行う。2.5 \times 10⁶ cellsを生食0.4mlに懸濁し、レシピエント左肺に注入する。

胎仔BASCsを移植後、3日/1週/2週/4週/8週後の時点で同様の方法で犠牲死させ、標本を作成する。同様にFISH assayにてドナー由来の組織片であることを確認する。

H-E染色とLSAB法によるTTF-1, proSP-C,

CCSP, Sca-1, CD34, CD45, BrdU の免疫組織染色を行い、ドナーのレシピエント肺内での分化・増殖について経時的に検討する。

(3) 胎仔 BASCs の成体肺内での分化・増殖メカニズムの解明し、グラフト量を増やす。上述の方法で胎仔 BASCs を単離し、成体正常肺に移植したモデルを使用する。

①レシピエント肺内でのドナーの proSP-C, CCSP, Sca-1, CD34, TTF-1, erbB1/2/3/4 などの発現を 3 日・1 週・2 週・4 週・8 週と経時的に免疫組織染色にてそれぞれ検討する。

②グラフト量を増やす

上述の方法で生着分化させるのに成功した BASCs を中心としたソースを培養し、レシピエント肺に多数ヶ所移植する。経時的に組織学的に検討し、生着していることを確認する。

(4) 胎仔 BASCs の肺線維症モデルへの応用

①肺線維症モデルの作成

LEW ラット (10 週齢) に経気道的にブレオマイシン 4.5mg/kg を投与し、投与後 1 ヶ月のものをレシピエントとする。

②肺線維症モデルへの胎仔 BASCs の移植

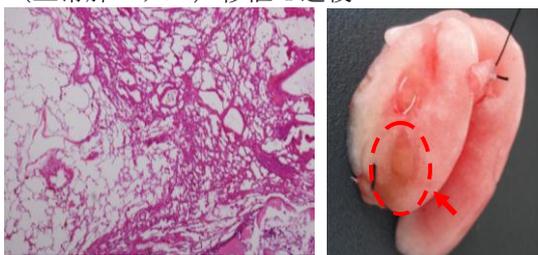
胎仔 BASCs を用いた正常成体肺への移植方法に準じて行う。移植後 3 日/1 週/2 週/4 週/8 週後の時点で同様の方法で犠牲死させ、標本を作成する。FISH assay と CSA 法による免疫組織染色は上述と同様に行う。

4. 研究成果

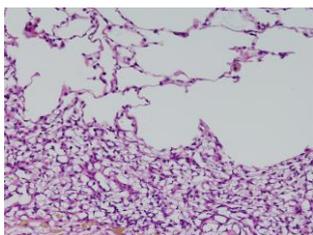
(1) 胎仔肺組織移植

まず、これまでの方法同様に胎仔肺組織移植を行った。これに関しては、われわれのグループにおける方法は確立されており、モデルの作成は容易であった。まずはこれまで通り正常肺で行い、それに加えてブレオマイシン誘導肺線維症モデルにおいても同様に移植モデルを作成することができた。

(正常肺モデル) 移植 4 週後



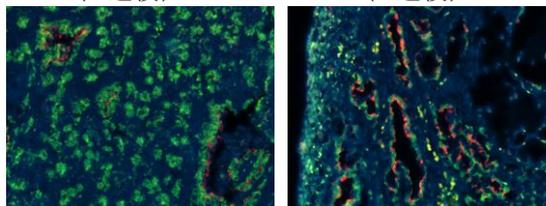
(肺線維症モデル) 移植 4 週後



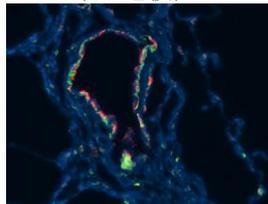
(2) 胎仔肺組織移植片の免疫組織染色による検討

1/2/4/8/12 週後に犠牲死させて TTF-1・CCSP・FGFR2 について免疫組織学的に検討した。

①TTF-1 (緑) と CCSP (赤) の免疫組織染色 (1 週後) (4 週後)



(12 週後)

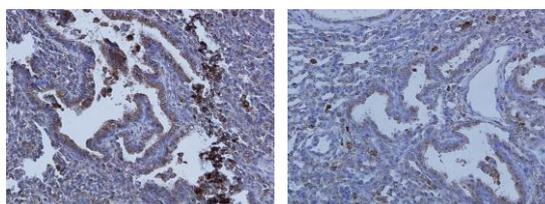


胎仔肺の発達に重要とされる TTF-1 について免疫組織学的に検討した。TTF-1 は肺形成初期の肺芽期に気管や気管支になる領域の表皮に発現しはじめ、肺の形態形成において重要な因子である。SP-B や CCSP など肺胞上皮細胞や気管支上皮細胞などのマーカーの発現にも重要な役割を果たしていることが知られている。H-E 染色では、1 週後は腺様期の形態に加えて一部管状期の形態を示した。しかし、4 週後では、肺胞腔の拡大を伴った肺胞形態の形成が認められていた。TTF-1 の免疫染色では、比較的大きな管腔の気管支上皮や終末細気管支芽が染まった導管では全体的に染色され、肺胞道では、先端部分が染色された。しかし、4 週後では、肺胞上皮では染色されず、気管支上皮の一部に染色された。12 週後では、さらに TTF-1 の発現は低下し、太い気管支上皮にのみ同時に CCSP が染色されていた。以上の結果から、4 週後から 12 週後では、形態的に肺胞への分化がより進んでいるために、分化誘導因子である TTF-1 の発現が低下していることが示唆された。また、1 週後では、分化能の旺盛な細胞の多くに TTF-1 が染色され、肺胞道の先端部では、TTF-1 が発現しており、この部分が分化誘導に重要な働きを持つと考えられた。われわれが行っている胎仔肺組織移植においても肺胞の形態形成に TTF-1 が重要な分化誘導因子であることが示唆された。

②FGFR2 の免疫染色

(2 週後)

(4 週後)



FGFR2 は肺の形態形成において、発生初期に気道全体の上皮細胞に分布しているが、次第に末梢部に限局していくとされている。そして、Spry2、Shh、BMP 4 などのシグナルを活性化し、気道の分枝形成が起こることが知られている。今回の結果で、2 週間には気道上皮に一樣に発現し、4 週間では先端部に偏った発現に変わってくる。

これらの免疫染色の結果から、肺の発生段階より様々な転写因子が関与しているとされるが、その正常な形態発生の過程を模倣するような現象が胎仔肺組織移植片でも起こっていることが示唆された。

(3) BASCs の単離と細胞移植

上述した方法でまずはこれまで胎仔肺組織移植で用いていた胎齢 17 日の BASCs の単離を試みた。

しかし、相当量の胎齢 17 日の胎仔肺を用いて単離を試みるも、proSP-C(+)/CCSP(+) の細胞を集塊することはできなかった。その要因としては組織量の少なさがまず考えられた。

そこで、続いて新生仔肺を用いることとした。同様の方法で肺を採取し、単離を試みたが、double positive の細胞を得ることはできなかった。さらに生後 3 日・7 日においても行ったが、結果は同様で BASCs を得ることはできなかった。

現在は、まずは成体肺における BASCs の単離を目指して、処理方法やフローサイトメトリーの設定、抗体の濃度など、いろいろな設定条件を変えながら、試行錯誤している途中である。

これまでに胎仔肺組織の生着・分化には様々な細胞や転写因子が関与して成立することが明らかになっていたことから、純度の高い BASCs の単離を目指しつつも、それよりもより組織に近い形での移植として、取り出した肺を同様に処理し、フローサイトメトリーでソーティングする前の胎仔肺細胞を使った細胞移植も試みた。これに関しては、組織移植とは異なり、組織移植のような生着、分化を示すことはなかった。

これまでの結果から、われわれの行っている胎仔肺を用いた肺の再生医療に関しては、胎仔肺組織そのものの移植のみが成功している。要因として、やはり複雑な形態形成を要する肺という組織の特性を表現することが非常に困難であることをうかがわせるものであった。

当初の目的であった BASCs を用いた移植は、その単離を含め、さらなる工夫を必要とする段階であるといえる。

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 2 件)

①胎仔肺組織移植により移植したグラフト内での TTF-1 発現の検討

鳥羽博明

第 63 回日本胸部外科学会総会

2010 年 10 月 25 日

大阪国際会議場(大阪市)

②ブレオマイシン誘導肺線維症モデルに対する胎仔肺組織移植

第 26 回日本呼吸器外科学会総会

鳥羽博明

2009 年 5 月 14 日

北九州国際会議場(北九州市)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥羽 博明 (TOBA HIROAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・

助教

研究者番号: 40403745

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: