

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K19940
研究課題名(和文) 間葉系幹細胞シートを利用した分泌因子のパラクライン効果による術後肺再生への挑戦

研究課題名(英文) Challenge for pulmonary reproduction after lung resection by the paracrine effect of growth factors secreted from mesenchymal stem cell sheets

研究代表者
村上 順一 (MURAKAMI, Junichi)
山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10725683
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、片肺切除後の代償性肺成長に関連する増殖因子を分泌していると考えられる間葉系幹細胞に着目し、その性状解析を行ったところ、ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞は、骨分化能、軟骨分化能、脂肪分化能を有していることが明らかになった。低酸素プレコンディショニング処理(2%酸素)は、間葉系幹細胞シートのVEGF分泌量を増加させた。さらに、その培養上清は、血管内皮細胞の管形成能を増加させ、心臓線維芽細胞の遊走能を減少させた。

研究成果の概要(英文)：We focused on mesenchymal stem cells seem to secrete growth factors related to compensatory growth of the remaining lung after pneumonectomy and analyzed the characteristics of them. Consequently, it was shown that rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells possessed the capacity to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes lineages. Hypoxic preconditioning (2% O₂) increased secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mesenchymal stem cell sheets. Furthermore, the conditioned medium augmented tube formation of human vascular endothelial cells and decreased cardiac fibroblast migration.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：代償性肺成長 間葉系幹細胞 低酸素プレコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

片肺切除後に残存肺が成長し、呼吸機能改善を伴う代償性肺成長(肺再生)が生じることが知られているが、そのメカニズムは明らかになっていない。そのメカニズムが明らかになれば、より効果的に肺再生を促すことに繋がるため、その解明が必要である。

2. 研究の目的

片肺切除後の呼吸機能改善を伴う代償性肺成長(肺再生)が生じるメカニズムを解明するため、肺再生に関連する増殖因子を分泌していると考えられる間葉系幹細胞シートを作製し、その肺再生効果を検証すること。

3. 研究の方法

肺切除症例における術前の臨床データ(年齢、性別、喫煙歴、併存疾患などの患者背景、CT volumetry による術前肺容積値や spirometry による呼吸生理検査値等)と術後の臨床データ(術後6ヶ月ごと)を収集し、亜区域計算法で算出された術後予測肺容積・呼吸機能を術後6ヶ月の実測値が大きく上回った症例を真の肺再生が起きた症例と診断した。

温度応答性細胞培養容器を利用したウサギの骨髄由来の間葉系幹細胞シートを作製し、ウサギ肺切除モデルの残存肺に貼付し、肺再生が促進されるかどうか検証する。

4. 研究成果

肺切除症例における術前の臨床データ(年齢、性別、喫煙歴、併存疾患などの患者背景、CT volumetry による術前肺容積値や spirometry による呼吸生理検査値等)と術後の臨床データ(術後6ヶ月ごと)を収集し、亜区域計算法で算出された術後予測肺容積・呼吸機能を術後6ヶ月の実測値が大きく上回った症例を真の肺再生が起きた症例と診断したところ、その規定因子は、若年者、女性、喫煙歴がない、切除肺容量、2期的手術であった。

次に、ウサギの骨髄由来の間葉系幹細胞シートの作製に向けて、骨髄由来の間葉系幹細胞の性状解析を行った。まず、細胞培養ディッシュに対する接着能に基づいて骨髄由来の間葉系幹細胞を単離し、培養した。Fig.1の様に、紡錘体様の間葉系幹細胞が観察された。

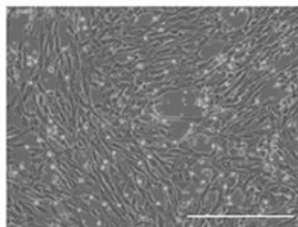


Fig. 1. ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞の形態写真

また、ウサギの骨髄由来間葉系幹細胞の細胞表面マーカーである CD44 の発現も確認された (Fig. 2)。

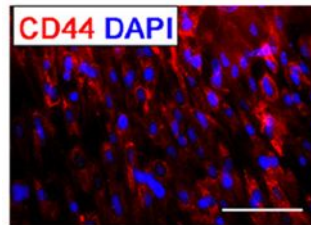


Fig. 2. ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞における CD44 の発現

骨髄由来の間葉系幹細胞を骨分化誘導培地で培養し、アルカリホスファターゼ活性を測定したところ、通常条件下で培養した骨髄由来の間葉系幹細胞に比べ高活性を示した。このことから、骨髄由来の間葉系幹細胞は骨分化能を有していると考えられる (Fig. 3)。

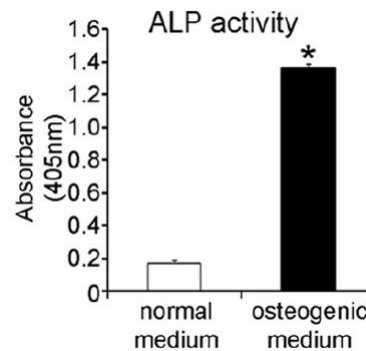


Fig. 3. 通常の培地と骨分化誘導培地で培養されたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞におけるアルカリホスファターゼ活性

次に、骨髄由来の間葉系幹細胞を脂肪分化条件下で培養し、脂肪滴のマーカーであるオイルレッドOで染色を行ったところ、染色された。このことから、骨髄由来の間葉系幹細胞は脂肪分化能を有していると考えられる (Fig. 4)。

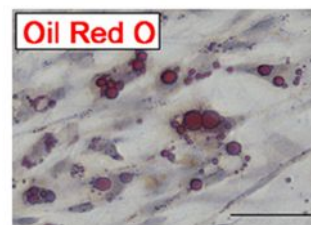


Fig. 4. オイルレッドO染色によるウサギ骨髄由来間葉系幹細胞における脂肪滴の蓄積

さらに、骨髄由来間葉系幹細胞を軟骨分化誘導培地で培養し、軟骨分化のマーカーである酸性ムコ多糖の培養液中の濃度を測定したところ、通常条件下で培養した骨髄由来間葉系幹細胞に比べ高濃度を示した。このことから、骨髄由来間葉系幹細胞は軟骨分化能を有していると考えられる (Fig. 5)。

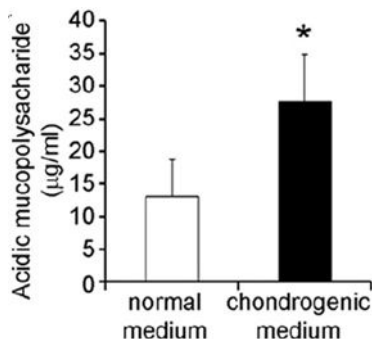


Fig. 5. 通常の培地と軟骨分化誘導培地で培養されたウサギ骨髄由来間葉系幹細胞におけるアルカリホスファターゼ活性

細胞シートの機能増強や生着率の向上を目的として、骨髄由来間葉系幹細胞シートに対し低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理を行い、その培養上清を用いて、分泌された VEGF 量 (Fig. 6) を測定したところ、48 時間処理で最も分泌された VEGF 量が多かった。

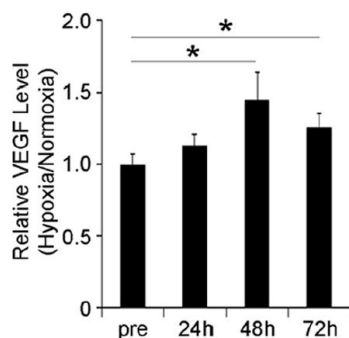


Fig. 6. 低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理後のウサギ骨髄由来間葉系幹細胞シートから分泌された VEGF 量

また、骨髄由来間葉系幹細胞シートに対し低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理を行い、その培養上清を用いて、血管内皮細胞の管形成能を検討したところ、低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理群において最も管形成能が高かった (Fig. 7)。

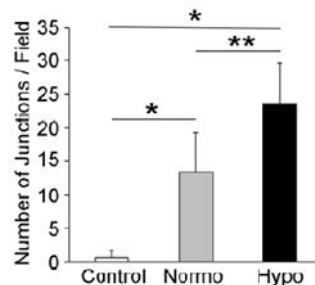


Fig. 7. 骨髄由来間葉系幹細胞シートに対し低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理を行い、その培養上清を用いた血管内皮細胞の管形成能

さらに、心臓線維芽細胞に対し低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理を行い、その遊走能を検討したところ、低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理群において最も遊走能が低かった (Fig. 8)。

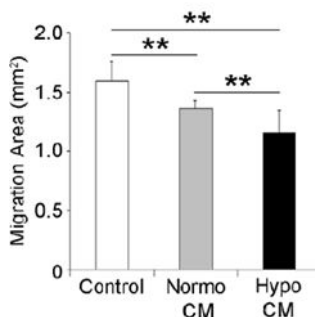


Fig. 8. 骨髄由来間葉系幹細胞シートに対し低酸素プレコンディショニング (2%酸素) 処理を行い、その培養上清を用いた心臓線維芽細胞の遊走能

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 1 件)

村上順一、吉田久美子、佐野史歩、林雅太郎、田中俊樹、上田和弘、濱野公一

「両側肺、2 期にわたる解剖学的肺切除後に代償性肺成長 (肺代償性反応) は生じるか？」

第 33 回日本呼吸器外科学会総会
2016 年 5 月 12 日～2016 年 5 月 13 日 京都
国際会議場（京都府京都市）

〔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

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~surg-1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 順一（MURAKAMI, Junichi）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10725683

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究分担者

なし