

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791315

研究課題名（和文）臓器固有幹細胞による術後肺再生療法の開発

研究課題名（英文）The development of regenerative medical treatment after lung resection

研究代表者

和田 啓伸 (Hironobu Wada)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90514604

研究成果の概要（和文）：代償性肺成長（compensatory lung growth：CLG）の分子機序を明らかにし、II型肺胞上皮細胞（AT II）を用いて術後肺の再生を導くことを目的とした。成熟ラットの左肺全摘後には、残存肺は過膨張となり、間質組織の増生が主体で肺胞の新生は認めなかったが、AT II（ 2.5×10^6 個）を全摘後翌日に経気道的に補充することで、移入細胞が生着し、残存肺において肺胞の新生がおきることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to clarify the cellular and molecular mechanisms that regulate the process of CLG and investigate the influence of transplantation of alveolar type II cells (AT IIs) on CLG. Dynamic regeneration and remodeling process of interstitial tissues but not pulmonary alveoli may be the primary response of CLG. Engraftment of the transplanted cells was proven and the density of alveoli was improved. We postulate that alveolar septation requires supplementation of AT IIs in the remnant lung after pneumonectomy in mature individuals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺の再生は他臓器と比較すると大幅に遅れている。その理由として肺は気管から肺胞まで多様な組織から成り、かつ効率よくガス交換を行うために複雑な構造をとることが挙げられる。さらに肺発生メカニズム、傷害後の修復メカニズム、そして肺組織幹細胞の存在など、いまだ不明な点が数多く存在することも重要な要因となっている。しかし肺の再生が限局的にでも実現すれば、肺気腫や肺

線維症に対して肺移植に代替する治療法となり、かつ低肺機能症例における外科治療の適応拡大につながる可能性を秘めており、肺再生医療はニーズの大きい分野である。

肺の再生医学の源流である代償性肺成長（CLG）は約100年以上前から研究されている [Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol, 1892]。実験動物においては、肺切除後残存肺の経時的変化として、気道の過膨張だけでなく、肺血流の増加、新しい肺胞形成に寄与する AT II

の増殖、線維芽細胞や内皮細胞などの間葉系細胞の増加などが起きていることが報告されている。また、肺切除により生じる機械的牽引、肺環流血流量の増加や低酸素刺激などがトリガーとなり、年齢、ホルモンおよび肺切除量などに影響を受ける [J Appl Physiol, 2004]。さらに、Hepocyte growth factor[Am J Respir Cell Mol Biol, 2002]、Keratinocyte growth factor[Circulation, 2002]、および Retinoic acid[Ann Thorac Surg, 2001]など様々な成長因子が CLG を促進することが報告されている。しかしこの現象は動物種により大きく異なり、かつ成熟した個体では起こりにくく、その分子機序については不明な点が多く残されている。

近年、ラット AT II の一部に損傷された組織の修復・再生に関わる前駆細胞が存在することが報告された[Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004]。マウスにおいては気管支肺胞道接合部に、AT II と Clara 細胞の特性を兼ね備えた Bronchioalveolar stem cells と呼ばれる細胞群が同定され、肺の再生や癌化に関わることが示唆されており[Cell, 2005]、今後の肺再生医療の発展に貢献するものと期待されている。AT II を用いた細胞治療に関しては、ラットのブレオマイシン傷害肺に対して同種ラットの AT II を気管内注入することで肺修復が促進されることが報告されており[Am J Respir Crit Care Med, 2007]、新たな治療法として期待されている。

2. 研究の目的

- 1) ラット左肺全摘モデルにおいて残存右肺の形態・遺伝子発現変化を調べ、開胸のみの Sham operation 群と比較することで、代償性肺成長(CLG)の機序を明らかにすること
- 2) 肺胞領域の組織幹細胞を内包するとされる AT II を、術翌日に気管内移入し CLG に及ぼす影響を調べる

3. 研究の方法

実験1：術後残存肺(右肺)にける形態学的解析および遺伝子発現解析

- 1) 7-8 週齢の Wister rat(雄性)に対してインフルラン吸入による全身麻酔下に気管内挿管を施し人工呼吸管理を行う。左第4肋間で開胸し、左肺門一括処理により左肺を切除する全摘群を作成する。摘出した左肺は凍結標本として保存する。開胸時にシリコンチューブを胸腔内に留置し、閉胸後に吸引し胸腔内に陰圧(機械的牽引)を加えた後で抜去する。
- 2) Sham operation 群では同様の手法で開胸まで行い、肺は切除せずに閉胸する。閉胸時には同様にシリコンチューブを留

- 置するが、陰圧は加えず脱気のみとする。
- 3) 全摘群および Sham 群を術後3日、7日、1か月、3か月、6か月後に、胸部レントゲンを撮影した後に犠牲死させ、肺湿重量、肺容量を測定し2群間で比較する。また、病理検体を用いて HE 染色を行い、肺胞壁間距離を測定し肺胞腔の大きさを比較する。
- 4) 全摘群の右肺切片より RNA を抽出し、マイクロアレイにより 26,208 個の遺伝子発現に関して、先に切除していた左肺をコントロールとして網羅的遺伝子発現解析を行う。
- 5) 2倍以上あるいは半分以下に発現が変化した遺伝子をリストアップし、Gene set enrichment analysis を行い、どのような遺伝子群の発現が有意に変化していたかを解析する。

実験2：II型肺胞上皮細胞の分離および気管内移入

- 1) 7-8 週齢の Wister rat(雄性)より両側肺および気管を一塊として摘出し、気管気管支洗浄を行い気道内のマクロファージを除去する。
- 2) 0.25%トリプシンにて蛋白分解した後に1mm角に細かく分割し、DNase (7500U/100ml)に溶解する。これを75μmのフィルターにかけ、濾過液を遠心(200g, 20分, 10°C)する。
- 3) ペレットを DNase(2000U/100ml)で溶解し再度同条件で遠心する。残ったペレットを培養液で懸濁し、40μmのフィルターにかけた後、2時間培養を行い浮遊している細胞を得る。
- 4) 得られた細胞は、AT II の特異的マーカーである Surfactant protein C (SP-C)による蛍光染色と、透過性電子顕微鏡所見により、AT II であることを証明する。
- 5) AT II を分離する前日に左肺全摘および Sham operation を行っておき、術翌日に 2.5×10^6 個の AT II を経気道的に注入する。

実験3：II型肺胞上皮細胞移入ラットにおける代償性肺成長の解析

- 1) 術後7日、1か月、3か月に犠牲死させて、実験1と同様に右肺の湿重量・容積を測定し、固定標本(HE染色)を作成する。病理標本より肺胞壁間距離を測定し、重量・容積とともに既に得られている全摘群・Sham operation 群のデータと比較する。
- 2) 移入した細胞は雄をドナー、雌をレシピエントとする sex-mismatch model を作成し、Y染色体を識別する Y-FISH で確認し、Y染色体上の Sry をプライマーとす

- るリアルタイム PCR で定量する。
- 3) AT II の補充が細胞増殖に与える影響を、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) による免疫組織化学染色にて確認する。

4. 研究成果

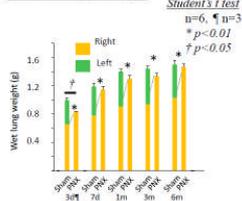
結果 1 : 左肺全摘後残存右肺の形態学的変化

全摘群(P 群)と Sham 群(S 群)において体重は各期間において有意差は認めなかった。左肺全摘後 7 日で縦隔は左へシフトし、残存右肺は Sham と比較して大きく膨張していた。術後 6 ヶ月まで同様の所見だった。

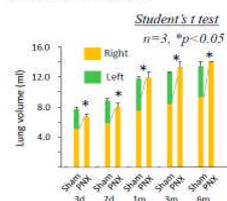
左肺全摘後の右肺容積は S 群の右肺と比較して有意に大きく、S 群の両肺容積とほぼ同等となっていた(* P<0.05)。また、左肺全摘後の右肺湿重量も S 群と比較して有意に大きく、両肺とほぼ同等となっていた(* P<0.01)。肺容積に比べ肺湿重量は遅れて代償される傾向があり、術後 3 日の右肺容積に差を認めなかったが、右肺湿重量は S 群が有意に大きかった(† P<0.05)。

HE 染色における肺胞壁間距離では S 群に比べ P 群で大きい傾向があり、P 群の方が S 群と比較して肺胞腔が拡大していた。

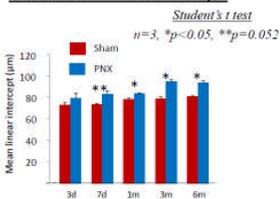
Wet lung weight



Lung volume



Mean linear intercept



結果 2 : 左肺全摘後残存肺における遺伝子発現解析

左肺に対して右肺で 2 倍以上に増加した遺伝子に対して、各期間において GSEA (gene set enrichment analysis) を行ったところ、cell proliferation, cell division, cell cycle などの細胞増殖に関わる遺伝子群が術後 7 日までに大きく変化したが、術後 1 ヶ月以降はほとんど変化を認めなかった。

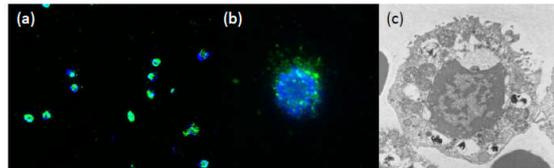
GSEA にて Angiogenesis に属する遺伝子群は術後 1 ヶ月で有意に増加し、Inflammatory response に属する遺伝子群は術後 6 ヶ月まですべての期間で有意に増加していた。神経・血管・胸膜などの発生・分化に関わる遺伝子発現が増加していたのに対し、Lung alveolus

development など肺胞の分化に関わる遺伝子群は変化していなかった。

結果 3 : ラット II 型肺胞上皮細胞の分離

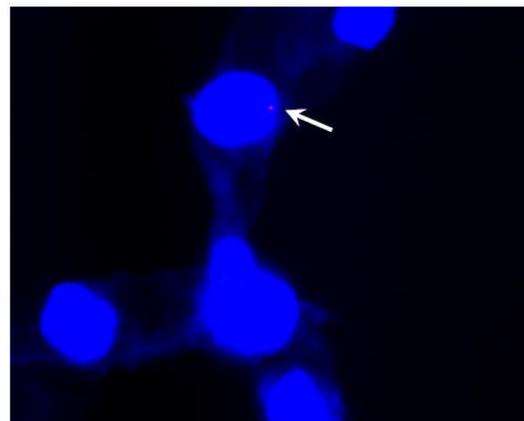
これまでの文献を参考にしてラット肺より AT II を分離することに成功した。Purity: 84%(n=4)、Viability: 90%であった。

a) 蛍光免疫染色弱拡、青: DAPI、緑: SP-C (x100)、b) 強拡 (x630)、c) 透過型電子顕微鏡写真、矢頭: Lamellar body、矢印: microvilli、Bar: 2µm

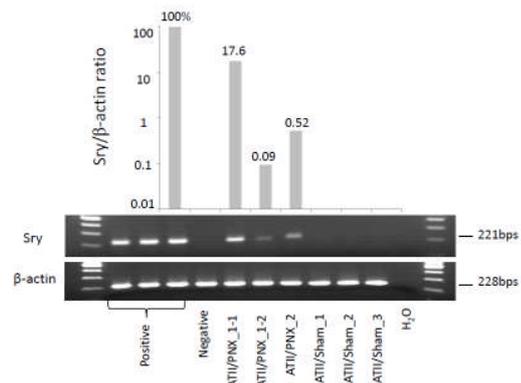


結果 4 : 気道内移入した II 型肺胞上皮細胞の生着

Y 染色体プローブを用いた Y-FISH にて、雌肺の肺胞構造の一部に、雄細胞を認め、移入した細胞が生着していることが示された。



さらに Y 染色体上の Sry 遺伝子をプライマーとする Real-time PCR を施行したところ、雄肺や全摘後に AT II s を注入したラット(AT II /PNX)では、バンドが出ているのに対し、雌肺や Sham に注入した肺(AT II /Sham)ではバンドは認めなかった。移入した雄細胞は雄肺組織の約 0.09~17.6%を占めることが示された。以上より全摘という要素が AT II の生着に重要であることが示唆された。



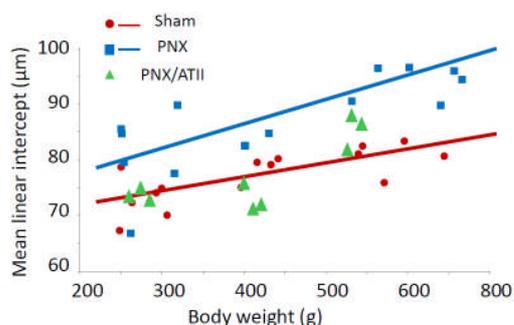
結果5：II型肺胞上皮細胞が代償性肺成長に与える影響

P群・S群ともに体重が増加するにつれて肺胞腔が拡大しており、Lmと体重は強い正の相関を認めた。S群の回帰直線は通常の成熟過程における肺胞の成長を示している。全摘後に肺胞の新生が起きて、肺胞が密になるならば、広がった肺胞腔はいずれShamに近づくことが予測されるが、術後6ヶ月までの長期観察において再生の要素は認められなかった。

AT II 移入ラットはP群と比較してLmが有意に減少し(P=0.0004)、S群と同等となっており、新たな肺胞の新生が示唆された。

HE染色ではAT II 移入ラットにおいて肺胞密度の増加を認めた。

PCNAを用いた免疫染色の解析では、AT II 移入ラットにおいてPCNA陽性細胞が最も多く認められ、細胞増殖が誘導されたことが示唆された。



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 Wada H, Yoshida S, Ishibashi F, Mizobuchi T, Moriya Y, Hoshino H, Okamoto T, Suzuki M, Shibuya K, Yoshino I. Granulocyte-colony stimulating factor producing pleomorphic carcinoma of lung: report of a case, Surg Today, 査読有, 2011, in press.
- ② Wada H, Nakajima T, Yasufuku K, Fujiwara T, Yoshida S, Suzuki M, Shibuya K, Hiroshima K, Nakatani Y, Yoshino I. Lymph node staging by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in patients with small cell lung cancer, Ann Thorac Surg, 査読有, vol90, 2010, 229-234

[学会発表] (計9件)

- ① 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎,

本橋新一郎, 河村大輔, 横井左奈, 吉野一郎. 代償性肺成長の増殖期にII型肺胞上皮細胞を補充することで肺胞の再生が起きる, 第10回日本再生医療学会総会, 2011/3/1, 新宿.

- ② 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 河村大輔, 横井左奈, 吉野一郎. II型肺胞上皮細胞を用いた肺再生療法の開発—代償性肺成長モデルによる基礎実験—, 第27回肺および心肺移植研究会, 2011/1/29, 岡山.
- ③ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 河村大輔, 横井左奈, 吉野一郎. II型肺胞上皮細胞を用いた肺再生療法の開発—代償性肺成長モデルによる基礎実験—, 第1221回千葉医学会, 2011/1/22, 千葉.
- ④ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 鎌田稔子, 石橋史博, 田村創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 吉野一郎. 肺切除後の代償性肺成長における遺伝子プロファイル解析, 第63回日本胸部外科学会定期学術集会. 2010/10/25, 大阪.
- ⑤ Wada H, Yoshida S, Suzuki H, Sakairi Y, Yoshino I. Gene expression profile of compensatory lung growth after left pneumonectomy in rats. ATS2011, 2010/5/18, New Orleans.
- ⑥ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村創, 芳野充, 守屋康充, 溝渕輝明, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 鈴木実, 吉野一郎. 肺切除後の代償性肺成長における遺伝子プロファイル解析. 第27回日本呼吸器外科学会総会. 2010/5/14, 仙台.
- ⑦ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 高橋亮, 石橋史博, 田村創, 芳野充, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 鈴木実, 渋谷潔, 吉野一郎. ラットを用いた肺切除後代償性肺成長における分子機序の解明. 第110回日本外科学会総会. 2010/4/9, 名古屋
- ⑧ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村創, 芳野充, 守屋康充, 溝渕輝明, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 鈴木実, 吉野一郎. ラット左肺全摘後代償性肺成長における遺伝子プロファイルの解析. 第9回日本再生医療学会総会. 2010/3/19, 広島.
- ⑨ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村創, 芳野充, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本

橋新一郎, 鈴木実, 吉野一郎. 肺切除後の代償性肺成長における遺伝子プロファイル解析. 第 1199 回千葉医学会. 2010/1/23, 千葉

[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

和田 啓伸(WADA HIRONOBU)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90514604

(2)連携研究者

吉野 一郎(YOSHINO ICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 40281547

吉田 成利(YOSHIDA SHIGETOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 90334200