

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 年 ～ 2012 年
 課題番号：22591570
 研究課題名（和文） 自家骨髄由来幹細胞と bFGF 徐放ゼラチンビーズによる肺気腫の新しい治療の研究
 研究課題名（英文） The novel therapy for pulmonary emphysema which uses autologous bone marrow-derived stem cells and the slowly released bFGF gelatin microspheres.
 研究代表者
 垂水 晋太郎（TARUMI SHINTARO）
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：30550082

研究成果の概要（和文）：イヌ肺気腫モデルを確立し、対象のイヌから自家骨髄由来幹細胞を分離・培養することに成功した。bFGF 徐放ゼラチンビーズと自家骨髄由来幹細胞を同時に静脈から投与し、肺気腫治療を試みた。投与 1 か月後の血液ガス検査で酸素化の改善傾向を認めたが、肺機能検査では有意な改善は認められなかった。今後投与方法の改善、骨髄細胞のアポトーシス抑制などを検討していく。

研究成果の概要（英文）：We successfully established the canine total emphysema model and cultivated autologous bone marrow-derived stem cells. We tried a novel therapy for pulmonary emphysema through the intravenous administration of the slowly released bFGF gelatin microspheres and autologous bone marrow-derived stem cells. After a month of administration, blood gas parameters were improved.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |

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：肺気腫 骨髄由来幹細胞 bFGF

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は喫煙と深く関係しており高齢者に多い疾患である。本邦では今後ますます進む高齢化と高い喫煙率により肺気腫患者の増加が見込まれる。しかし肺気腫に対する従来の治療には限界がある。たとえば気腫化した肺を切除する肺容量減少手術は耐術年齢の制限や約 5 年で手術の効果が減弱するなどの問題がある。また、肺移植は耐術年齢、ドナー不足などの問題から今後も劇的な件数の増加は望みにくい。以上のことから、侵襲が少なく

て高齢者にも施術可能であり、手術とは異なり必要に応じて繰り返すことのできる新しい治療が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺気腫において、肺動脈系毛細血管および肺胞上皮の再生により呼吸機能の改善を図ることである。イヌの自家骨髄から幹細胞を分離・培養できることと、bFGF 徐放ゼラチンビーズと自家骨髄由来幹細胞の投与を組み合わせることにより、肺胞の再生

および肺機能の改善が可能であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 自家骨髄からの幹細胞の分離・培養

全身麻酔下にイヌの腸骨から骨髄液を採取する。採取した骨髄液を洗浄・遠沈後、培養液中で培養する。継代することで幹細胞のプロパティを持つ細胞を分離する。分離した細胞は、フローサイトメーターにて発現している表現マーカーを解析し、幹細胞の確認を行う。また、分離した幹細胞を使用し、特殊な条件下で培養することで分化を誘導し、幹細胞のプロパティを持っていることを確認する。

(2) FGF 徐放ビーズの作成

酸性ゼラチンを 40°C の蒸留水に溶解し、攪拌中のオリーブオイル油中に滴下する。10 分間攪拌した後、冷却する。冷却したアセトン溶液でオリーブ油を計 3 回、遠心洗浄する (5000rpm、10 分間)。遠心洗浄後アセトンに懸濁し、200um と 100um のふるいにかけて、100 ~ 200um 径のゼラチンビーズを選択する。0.1% Tween80 と 25% グルタルアルデヒド混合溶液に浸漬し、24 時間留置し化学架橋する。グリシン処理した後、蒸留水で遠心洗浄 (5000rpm、10 分間) し、凍結乾燥させてゼラチンビーズを作成する。EOS ガス滅菌したゼラチンビーズに、2ug/uL の basic FGF 溶液を 24 時間浸漬させ、bFGF 徐放ゼラチンビーズを作成する。bFGF 徐放ゼラチンビーズは、生理食塩水 5ml で懸濁して実験に使用する。

(3) 肺気腫モデルイヌの作成

イヌの肺区域気管支を、気管支鏡のチャンネル孔を介して挿入したバルーン付きカテーテルで閉塞した後、5ml の蒸留水に希釈したブタ膵臓由来エラスターゼ 300IU/Kg をカテーテルより注入、5 分間気管支を閉塞する。注入後 4 週間後には、注入した肺区域に肉眼的・組織学的肺気腫が完成する。この処置を繰り返し、全肺気腫を作成する。

(4) bFGF 徐放ゼラチンビーズ肺動脈内注入

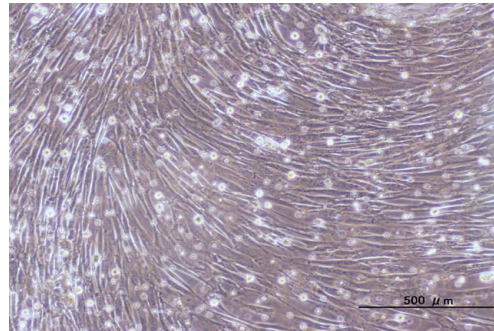
自家骨髄由来の幹細胞と FGF 徐放ゼラチンビーズを大腿静脈から投与する。投与後 1 か月後に肺を摘出し組織学的検討を行う。また注入前、注入直後、1、2、3 日、0.5、1 か月で呼吸機能の分析 (血液ガス分析、PowerLab による呼吸機能検査) も行う。

4. 研究成果

(1) 自家骨髄からの幹細胞の分離・培養

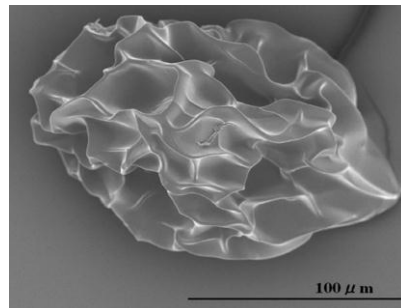
全身麻酔下に骨髄穿刺針を用いてイヌ腸骨から骨髄液を採取した (全 4 頭; 平均 10cc)。有核細胞を分離し、血清入り α MEM 培地で培

養し、継代した。実験には最も増殖能が盛んと考えられる 1~2 継代後の細胞を使用した。分離・培養した骨髄細胞の顕微鏡写真を示す。

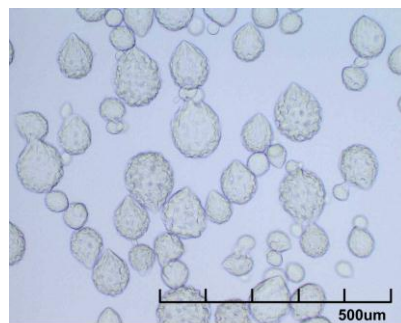


(2) FGF 徐放ビーズの作成

プロトコルに従い bFGF 徐放ゼラチンビーズを作成した。ゼラチンビーズの電子顕微鏡写真を示す。

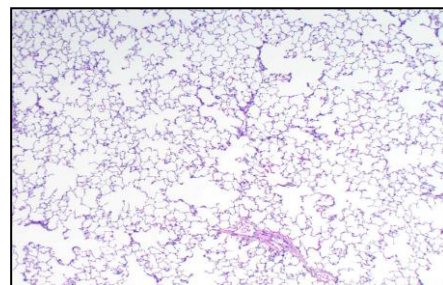


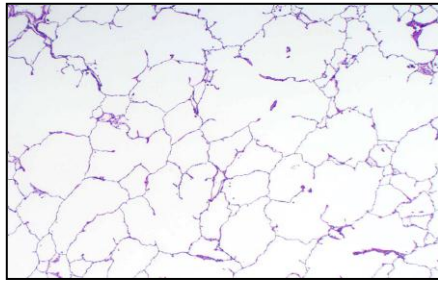
生理食塩水に懸濁した bFGF 徐放ゼラチンビーズの顕微鏡写真を示す。



(3) 肺気腫モデルイヌの作成

プロトコルに従い、全 4 頭に肺気腫を作成した。同一イヌで正常肺と肺気腫作成後の肺を生検して組織学的に検討し、問題なく作成されていることを確認した (上: 正常肺 下: 気腫肺)。





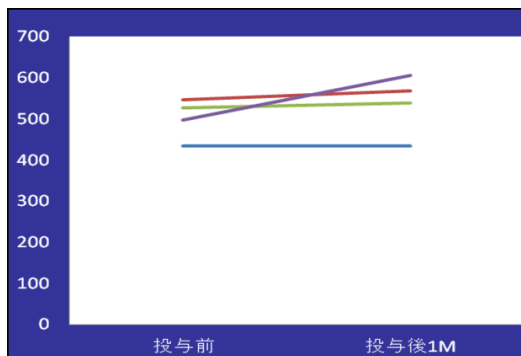
(4) bFGF 徐放ゼラチンビーズ肺動脈内注入
作成した 4 頭の肺気腫イヌそれぞれにおいて、全身麻酔・人工呼吸管理下、一定条件下に行った (FiO2:1.0 TV:350ml RR:16)。大腿静脈にルートを確認し、bFGF 徐放ゼラチンビーズと培養した骨髄細胞を投与した (細胞数は下記)。なお、投与前後で血液ガスの悪化やバイタルサインの変化は認めなかった。投与前と投与 1 か月 (M) 後に血液ガスと PowerLab による肺機能検査を行った結果を示す。

| イヌ | 細胞数 (×10 ⁶) |
|----|-------------------------|
| 1 | 38.4 |
| 2 | 33 |
| 3 | 11.3 |
| 4 | 16.7 |

| イヌ | pO2 | | pCO2 | |
|----|-------|-------|------|------|
| | 投与前 | 1M 後 | 投与前 | 1M 後 |
| 1 | 434.6 | 434.6 | 35.9 | 34.1 |
| 2 | 545.9 | 568.3 | 33.5 | 22.2 |
| 3 | 527.5 | 539.3 | 24.6 | 26.1 |
| 4 | 496.8 | 605.6 | 22.3 | 22.7 |

(単位: mmHg)

●PaO₂ の変化 (投与前→1 か月後): 3 頭において軽度の改善を認めた。



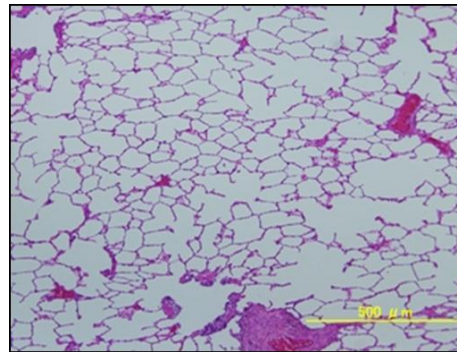
●肺機能検査 (投与前→1 か月後): PowerLab を用いて計測した一秒率を示す。今回の実験では有意な改善は認められなかった。

| イヌ | 投与前 | 1M 後 |
|----|-------|-------|
| 1 | 54.7 | 53.96 |
| 2 | 41.2 | 46.36 |
| 3 | 33.06 | 39.1 |
| 4 | 40.25 | 35.2 |

(単位: %)

●組織学的検討

気腫肺の指標とされる肺胞間距離 (Lm) では一部に改善を認めたものの有意な変化は認めなかった。



bFGF は線維芽細胞の増殖因子として発見されており、現在は様々な組織および臓器において、平滑筋細胞成長、創傷治癒、組織修復、造血、神経細胞分化などの多岐にわたる機能を有することが分かっている。最も強力な血管新生因子の一つであり、血管内皮細胞の増殖促進・管腔形成を促進する。さらに、他の間葉系細胞の増殖活性作用を有することも分かっている。しかし bFGF の半減期は短く、生体内ではすぐに活性を失ってしまうため、bFGF を徐放する生体吸収性のゼラチンマイクロ粒子を用いた。これにより、局所で有効な濃度を保ち続けることが可能となった。我々はこれまで bFGF 徐放マイクロ粒子の血管内投与を試みてきたが、今回はそこへさらに骨髄細胞を加えて実験を行った。間葉系幹細胞の機能は多岐にわたっており様々な報告があるが、未だ不明な点が多く、幹細胞そのものが組織の再生に直接的に役立つだけでなく、損傷組織の修復や再生に必要な不可欠な増殖因子や組織幹細胞の分泌や増殖を促進するとも言われている。また、炎症や損傷部位へ集積していくことも分かっている。

今回の実験では、イヌからの骨髄液採取と、骨髄細胞の分離・培養が安定して行えるということが分かった。また、末梢からの投与で投与後に有害な反応を惹起しないことを確認できた。しかし、結果として酸素化はやや改善を認めたものの、肺機能や組織学的検討では有意な改善は認められなかった。その要因

としては、体外から投与した骨髄細胞は大半がすぐにアポトーシスに陥っているとの報告があり、今回投与した骨髄細胞も体内で大多数がアポトーシスに陥り期待した効果を発揮できなかった可能性があること、投与方法に問題のあった可能性があること、などが考えられる。今後は、骨髄細胞を体外から投与する際にアポトーシスを抑制するような処置を施すことや投与方法の変更（肺血管への直接投与など）を検討していきたい。また、内因性の骨髄細胞は肺損傷の際の修復に必要不可欠であり、それは外因性の投与において増補される可能性がある。体外からの投与に加えて、内因性の骨髄細胞を局所へ誘導することも検討していきたい。骨髄細胞の体内での活性を高めることができれば、さらに改善が期待でき、新しい肺気腫治療となり得ると考えている。

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)

[学会発表] (計1件)

張 性洙、松浦 奈都美

イヌ肺気腫モデルにおける bFGF 徐放ゼラチンマイクロスフェアおよび間葉系幹細胞の肺動脈内投与による肺気腫治療の試み

2010年10月25日 第63回日本胸部外科学会定期学術集会 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垂水 晋太郎 (TARUMI SHINTAROU)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30550082

(2) 研究分担者

松浦 奈都美 (MATSUURA NATSUMI)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20572853

(3) 研究分担者

呉 哲彦 (GO TETSUHIKO)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50313656

(4) 研究分担者

横見瀬 裕保 (YOKOMISE HIROYASU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80231728

(5) 研究分担者

後藤 正司 (GOTOH MASASHI)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40398029

(6) 研究分担者

横田 直哉 (YOKOTA NAOYA)

香川大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10636492