

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 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012 年度

課題番号：22791319

研究課題名（和文）

徐放化 basic-FGF 製剤の胸腔内投与による肺気腫の再生医療

研究課題名（英文）

Intrapleural administration of gelatin-embedded sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphysematous lungs in rats

研究代表者

中村 理恵（NAKAMURA RIE） 和歌山県立医科大学 医学部 学内助教

研究者番号：70405447

研究成果の概要（和文）：肺気腫に対する再生医療は動物実験レベルでは既の実現されており、気道内および肺動脈内への徐放化 basic-FGF 製剤の投与により肺胞隔壁の修復が生じることが確認されている。しかし、これらの経路での投与は少なくとも一時的に肺機能を障害する可能性があるため臨床応用に至っていない。我々は呼吸機能障害の可能性がより少ない投与経路として胸腔内への徐放化 basic-FGF 製剤の投与を検討した。14 週齢の Sprague-Dawley ラットを用いて気道内へのエラスターゼを注入により肺気腫モデルを作成した。このモデルの胸腔内へ徐放化 basic-FGF 製剤を注入し、14 日後に肺を摘出して組織学的に評価した。肺の mean linear intercept は、治療側が $65.1 \pm 7.0 \mu\text{m}$ で非治療側の $114.4 \pm 7.5 \mu\text{m}$ に比べ有意 ($p=0.0005$) に短く、胸腔内への徐放化 basic-FGF 製剤の投与により肺胞の再生が生じることが確認された。

研究成果の概要（英文）：Intra-airway and intra-arterial administration of gelatin-embedded sustained-release basic fibroblast growth factor (SRBF) have been shown to stimulate regeneration of emphysematous lungs in animal experiments, but these routes of administration may also cause harm. This study investigated the effectiveness of intrapleural administration of SRBF. Pulmonary emphysema was induced in Sprague-Dawley rats using porcine elastase. SRBF was administered via the left pleural cavity. The rats were divided into a group that received SRBF (FGF+ group), and a group that did not (FGF- group). Animals were sacrificed after 14 days, and the results were evaluated by histological examination. In the FGF+ group, the mean linear intercept value of the alveolar septa was significantly shorter on the treated side than on the untreated side ($65.1 \pm 7.0 \mu\text{m}$ vs $114.4 \pm 7.5 \mu\text{m}$, $P = .0005$). There was no significant difference in the mean linear intercept value between the treated and untreated sides in the FGF- group. Intrapleural administration of SRBF factor induced lung regeneration in rats with elastase-induced pulmonary emphysema.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000 円	660,000 円	2,860,000 円
2011 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
2012 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
総計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

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：basic-fibroblast growth factor, 再生医療, 気胸, 肺気腫

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は本邦においては、年間6万人以上が罹患しており、死亡原因の上位を占める疾患である。肺気腫は病理学的にみると肺の不可逆的な破壊であり、治癒は望めない。臨床において現在行われている薬物療法は呼吸困難に対する対象療法のみである。外科治療として、lung volume reduction surgery は、呼吸機能を改善させることができることが示されているが、生存期間の延長を証明することはできず、薬物療法を上回るものとはなっていない。肺移植は根本的に機能改善を得ることのできる唯一の治療であるが、ドナー肺の供給量の不足、拒絶反応の存在、免疫抑制剤の使用による副作用などから、一般的な医療として行われているとはいえない。このような現状の中で、再生医療が注目されている。

肺気腫に対する再生医療は動物実験レベルでは既に実現されている。肺胞内への骨髄細胞の注入、HGF の注入、retinoic acid の投与で肺胞の再生が確認されている。また、我々の使用したものと同一の薬剤である、徐放化 basic-FGF 製剤も、肺胞内投与、肺動脈内投与にて肺胞を再生する効果が確認されている。

一方、肺気腫患者に実際にこれらの薬剤を投与して肺胞の再生を確認した臨床試験は報告されていない。これまでに2件の臨床試験が行われている。1件は retinoic acid の投与であり、もう1件は mesenchymal cell の投与である。これらの2件については既に結果が報告されており、いずれも negative study であった。現在のところ、肺気腫に対する再生医療は臨床では成功していない。

2. 研究の目的

basic-FGF は組織を修復する作用を持ち、現在既に褥瘡の治療薬として実臨床で使用されている。本薬剤は半減期が短いため、体内への単回の投与では治療効果を発揮しない。それゆえに、体内での分解速度を調節して徐放化したゼラチンハイドロゲルに結合させる形で投与される。この徐放化 basic-FGF 製剤は、複数の領域で既に臨床試験が行われており、安全性と有効性が確認されている。肺気腫に対して治療効果を発揮するためには肺全体に本薬剤を均等に分布させて投与する必要があるため、まず肺胞内投与が、引き続き肺動脈内投与の動物実験が報告された。いずれの投与経路においても、肺胞の再生は確認され、放化 basic-FGF 製剤には破壊された肺胞の修復を促進する機能があることが証明された。しかし、実臨床に応用する

ことを考えた場合、肺胞内投与では、少なくとも一時的に呼吸に関与する肺胞面積の低下を来すことがあきらかである。また、肺動脈投与の場合、微小な肺梗塞巣が肺全体に形成されることになる。再生医療の対象となる肺気腫患者は高度な呼吸不全状態にある。肺胞内投与および肺動脈内投与はこのような患者に対して、呼吸機能をさらに障害する可能性が高いため、実際の臨床応用はされていない。

肺気腫患者では高率に気胸を発生し、しかもその気胸は難治性であることが多い。当研究室では、このような難治性気胸に対する希釈フィブリン糊胸腔内大量注入療法を開発し、その有用性を報告してきた。この手技は、フィブリン糊を希釈することで、粘稠度を適切に調整し、胸腔内に均等に分布させることを可能にした。本手法を用いれば、臓側胸膜表面に限られるが、徐放化 basic-FGF 製剤を肺全体に均等に分布させることができる。さらに、肺胞内投与や肺動脈内投与とは異なり、肺機能を阻害する可能性に乏しい。この研究では、肺気腫ラットの胸腔内へ徐放化 basic-FGF 製剤を投与してフィブリン糊で臓側表面へ均等に固着させ、肺胞の修復が生じるかどうかを調べるものである。

3. 研究の方法

14週齢の Sprague-Dawley ラットを16匹を用いた。本研究は、当研究機関の動物実験倫理審査により審査され、承認を受けて施行された。(承認番号 No. 363)。

ラットは次の4群に分けた。

- ① 無処置群 (n=2): 全く無処置で10週間の経過観察とした。
- ② エラスターゼ群 (n=2): エラスターゼの気道内投与により肺気腫を作成し、10週間経過観察とした。
- ③ 徐放化 basic-FGF 製剤投与群 (n=7): エラスターゼ投与8週後に徐放化 basic-FGF 製剤を胸腔内投与した。
- ④ コントロール群 (n=7): エラスターゼ投与8週後に basic-FGF を含まないゼラチンハイドロゲルのみを胸腔内投与した。

【肺気腫モデルの作成】

無処置群を除く16匹を isoflurane 吸入により麻酔して頸部を切開。頸部気管を穿刺して 250 U (total 500 μ L) のエラスターゼ (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を気道内に注入した。ラットは8週間経過観察し、肺気腫を形成させた。

【徐放化 basic-FGF 製剤の調整】

ゼラチン (Nitta Gelatin Company, Osaka, Japan) をグルタルアルデヒドにて架橋し、シ

ート状に形成した後、粉碎化。その後、53 μm のフィルターで処理した。このゼラチンハイドロゲル粉末を真空凍結処理した後、EOG 滅菌し保存した。ヒト recombinant basic-FGF (Kaken Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan) をラットへの投与前に乾燥ゼラチンハイドロゲル粉末に加えて結合させた。basic-FGF はラット 1 匹あたり 200 μg で、20 μL の生理食塩水に溶解し、20 mg の乾燥ゼラチンハイドロゲル粉末に加え、1 時間の反応の後、ラットに投与した。コントロールとして 20 μL の生理食塩水のみを乾燥ゼラチンハイドロゲル粉末に加えたものを用意した。これらのゼラチンハイドロゲルは投与直前に 500 μL の希釈フィブリン糊製剤 (Beriplast P Combi-Set; CSL Behring, Tokyo, Japan) に混和した。

【徐放化 basic-FGF 製剤の投与】

エラストーゼの気道内投与 8 週後に、計 14 匹のラットに対し、徐放化 basic-FGF 製剤およびコントロール薬剤の投与を行った。isoflurane 吸入により麻酔し、左胸を切開。肋間から希釈フィブリン糊に混和した薬剤を注入し、閉胸した。

【組織学的評価】

全てのラットは実験開始 10 週後 (徐放化 basic-FGF 製剤投与 2 週間後) に sofurane の過剰投与により sacrifice し、組織学的検索に供した。両側肺を気管とともに en bloc に摘出し、20 cmH₂O でホルマリンを注入し、1 週間固定。その後、両側の肺をパラフィン包埋し矢状断 3 μm の切片とし、H.E. 染色にて mean linear intercept (LM) を測定した。

4. 研究成果

【肺気腫モデルの作成】

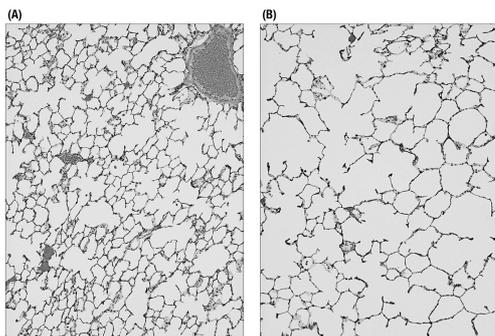


Figure 1

上記の Figure 1 において、(A)は無処置群、(B)はエラストーゼ群の肺胞の H.E. 染色標本の例である。無処置群の肺胞の mean linear intercept は $54.5 \pm 3.8 \mu\text{m}$ であった。エラストーゼ群では $116.4 \pm 19.5 \mu\text{m}$ であり、無処置群に対し約 2 倍 ($p < 0.0001$) に延長し

ており、気道内へのエラストーゼ投与により肺気腫が形成されていることが確認された。

【徐放化 basic-FGF 製剤による肺胞の再生】

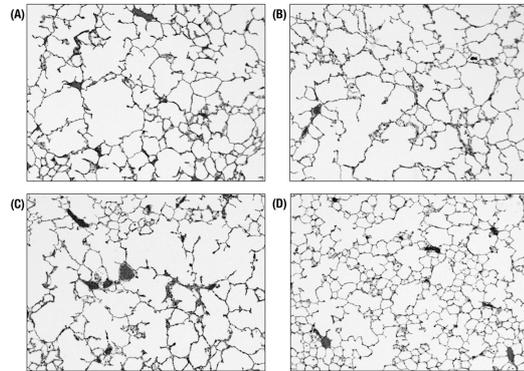


Figure 2

上記の Figure 2 において、(A)はコントロール群の右肺、(B)はコントロール群の左肺、(C)は徐放化 basic-FGF 製剤投与群の右肺、(D)は徐放化 basic-FGF 製剤投与群の左肺である。(A) (B)間に差は認められないが、(C)に比べ(D)では肺胞隔壁の修復が確認される。

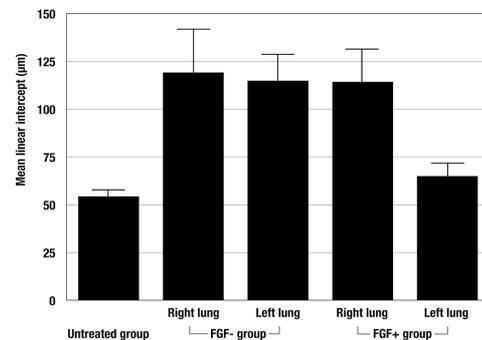


Figure 3

それぞれの群における mean linear intercept の測定値を Figure 3 に示した。コントロール群においては、右肺が $119.3 \pm 23.2 \mu\text{m}$ 、左肺が $115.0 \pm 14.3 \mu\text{m}$ で、処置側と非処置側に有意差はなかった ($p = 0.6237$)。徐放化 basic-FGF 製剤投与群においては、右肺が $114.4 \pm 17.5 \mu\text{m}$ 、左肺が $65.1 \pm 7.0 \mu\text{m}$ で、右肺に比べ左肺で mean linear intercept の短縮が確認された ($p = 0.0005$)。また、徐放化 basic-FGF 製剤投与群の左肺はコントロール群に比べ有意に ($P < 0.0001$) 短かった。以上より、徐放化 basic-FGF 製剤の胸腔内投与により、肺胞隔壁の修復が生じることが確認された。一方、徐放化 basic-FGF 製剤投与後も mean linear intercept は無処置群に比べ有意に

($p=0.0027$)延長しており、修復が完全ではないことも確認された。さらに、非処置側の右肺では、徐放化 basic-FGF 製剤投与群とコントロール群の間に差がない ($p=0.04875$) ことから、徐放化 basic-FGF 製剤の胸腔内投与では、対側肺の肺胞を再生することができないことも確認された。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

吉増達也, 尾浦正二, 粉川庸三, 川後光正, 平井慶充, 大橋拓矢, 中村理恵, 岡村吉隆, 山本雅哉, 田畑泰彦: 徐放化 basic-FGF 製剤の胸腔内投与による肺気腫の再生医療. 第 2 回 DDS 徐放化再生医療研究会, 2012/12/22, 京都

〔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

中村 理恵 (NAKAMURA RIE)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号: 70405447