

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390312

研究課題名(和文)細胞移植による肺再生療法実現のためのトランスレーショナル研究

研究課題名(英文)Translational research for lung regenerative treatment by cell transplantation

研究代表者

吉野 一郎 (Yoshino, Ichiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40281547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：ラットおよびマウスのII型肺胞上皮細胞を分離し、左肺全摘をした同系ラット(雌)に径気道的に移入したところ、肺胞に取り込まれていること、肺胞密度が高くなっていることを確認した。臨床的に外科切除されたヒト肺よりII型肺胞上皮細胞を分離して短期培養法を確立した。この方法で得られた肺胞上皮細胞はin vitroでI型肺胞上皮細胞に分化する傾向を示し、片側肺全摘後の免疫不全マウスの肺胞に生着した。CT画像データを用いた肺組織量の評価法を考案し、臨床的に肺切除された患者の長期的な肺組織量を評価した。ヒトおよびマウスのiPS細胞を特殊培養下にて肺胞上皮細胞に分化させる手法を開発中である。

研究成果の概要(英文)：Type II pneumocytes prepared from male F344 rats were effectively integrated in the alveolar tissues of pneumonectomized rats (female), alveolar density of which were recognized to be enhanced (published). As like the above experiments using rats, compensatory lung growth is to be investigated in mice (B6). And also investigated is a relationship between histologic morphology and radiologic density obtained from computed tomography (on going). Human type II pneumocytes were prepared from clinically resected lung, and examined for capability to differentiate to type I pneumocytes and to be integrated in the lung tissue (submitted for publication). To prepare the future lung regeneration medicine, a novel method for estimated quantity of pulmonary tissue was developed (published). Human and murine iPS cells are to be subjected to culture for development of type II pneumocytes (on going).

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：肺再生 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

肺癌や肺気腫などの肺疾患が急増しており、生命の危険を伴う重症進行例では肺移植しか根本治療がないのが現状である。新たな治療法として肺再生療法が期待されているが、肺は複雑で多種類の細胞構成をしていることから臓器の再生は困難と考えられてきた。最近、肺胞単位の再生はII型肺胞上皮細胞の経気道移入により可能なことが小動物実験でしめされるようになり、またiPS細胞の経静脈投与にてもby-stander効果にて肺の再生・修復が促進されることが実験的に示されるようになった。臨床でこのような事象を応用して障害肺の治療を行うには、細胞ソースや組織再生の臨床的証明などの課題を克服する必要がある。一方、イヌやヒツジなどの大動物では肺切除後の残存肺は肺気腫様の変化に加えて組織の増成を伴う“代償性肺成長”現象が生じる事が知られている。多くの肺切除を行っている呼吸器外科領域では、術後の肺機能が予測よりも良好なことを多く経験していることから、ヒトの肺再生の研究モデルになりうると考えた。

2. 研究の目的

肺切除後の気腫化肺や慢性肺気腫に対する肺組織再生療法の臨床応用を目指した基礎的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ラットおよびマウスの肺全摘モデルについて組織再生を検討する。まずは肺全摘モデルにおいてどのような肺成長がおこるのか、形態変化、網羅的遺伝子発現について検討した。次いで、正常動物から事前に採取しておいたII型肺胞上皮細胞を経気道的に移入し、同様に検討した。

(2)ヒト切除肺より小動物と同様の酵素処理法および重層円心分離法によりII型肺胞上皮細胞を分離し、収率、培養期間、純度などを蛋白マーカーであるSpCを調べて検討した。またI型肺胞上皮細胞への分化傾向の有無について、蛋白マーカーであるAQP5の発現を調べて行った。さらに免疫不全ラットに経気道的に移入し肺胞領域に生着しうるか、また肺胞形成能力があるかどうか検討した。

(3)AZE社のWork Stationを用いて、種々の理由で肺切除を受けた臨床例についてCT画像のデータを解析して肺容積と密度を求め、それらを乗じて仮想重量をもとめる。術前の肺活量と術式をもとに予測した値と術後の実測値の差を解析した。小動物用にCTを用いて左肺全摘後マウスの残存した右肺の状況を同様に解析した。マウスにおいては左肺全摘五後経時的に組織増や遺伝子発現も解析した。

(4)ヒトおよびマウスのiPS細胞を用いて肺再生の細胞ソースとなりうるか検討した。まったく新しい概念の研究であり、培養法や肺

胞上皮細胞への分化傾向の確認など、種々の方法で検討した。

4. 研究成果

(1)ラット(F344雄)のII型肺胞上皮細胞を分離し、左肺全摘をした同系ラットの残存右肺を術後経時的に採取し、肺胞密度、重量、体積、網羅的遺伝子発現につき解析したところ、重量、体積、および胸膜・神経・血管等に関わる遺伝子発現が時間とともに増加していったが、肺胞密度と肺発生や分化に関わる遺伝子発現に変化は殆ど認められなかった。この原因として、急激に過膨張したことに対して肺胞上皮細胞が量的に不足している、という仮説をたて、別の同系雄ラットより酵素溶解法と重層遠心分離法により分離したII型肺胞上皮細胞 2.5×10^5 を左肺全摘した雌ラットに経気道的に移入したところ、Y染色体を検出するin situ hybridization法にて移入したII型肺胞上皮肺胞が肺胞組織に取り込まれて生着していることが確認されるとともに(図1)、移入後の肺胞密度が密になっていることが確認された。またY染色体上に存在するSry遺伝子をPCR法に

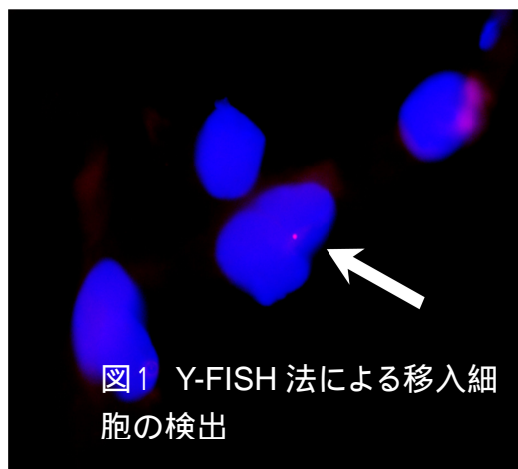


図1 Y-FISH法による移入細胞の検出

て増幅してみると、左肺全摘が行われなかったラット(疑似開胸のみ)の右肺にはSry遺伝子が確認されず、全摘を受けたラットでのみ確認された。以上の結果より、肺切除を受けた後の残存肺の膨張は、主には胸膜、神経、血管などの支持組織の増成によるものであるが、II型肺胞上皮細胞を補充する事で肺胞が増成されることが示された。(論文化済)

(2)同様にマウス(Black/6)を用いてと同様の手法にて肺切除後の代償性肺成長を病理学的および画像的に解析するシステムを確立しつつある。マウスを全身麻酔のもと開胸し、左肺を摘出し、術後3日、7日、14日、28日、3ヶ月、6ヶ月後に動物用CTにて残存する右肺を撮像し、画像解析にて容積と密度を算出し、さらに画像的仮想重量を算出す

る。また画像撮影の後に犠牲死させ、残存右肺の容積、重量を測定後、組織標本を作成して肺胞密度を測定する。また同時に網羅的に遺伝子発現を解析する。現在までに予定のマウスの作成と右肺の画像情報の取得と病理標本の作成がほぼ終了しており、今後解析作業を中心に行っていく。(実験中)

(3)臨床的に外科切除されたヒト肺からのII型肺胞上皮細胞の効率的分離と短期培養法を確立した。28例の部分肺を経気道・および経血管的に生理食塩水にて洗浄し、酵素溶解法と重層遠心分離法によりII型肺胞上皮細胞を分離し、bFGF、EGF、インスリン、ステロイドホルモンを添加したDMEM培地にて初期培養を行い、初期培養を行った。また培養皿の底面に接着した貪食細胞や線維芽細胞を定期的に除去し、培養5-10日には均一な球形浮遊細胞を得た。電子顕微鏡ではII型肺胞上皮細胞の特徴であるmicrovilliとlamellar bodyを有していた(図2)。これらの細胞をフローサイトメトリーおよび蛍光色素染色にてII型肺胞上皮細胞の蛋白マーカーであるSpCにて検出を試みたところ、約70%の陽性率であった。またI型肺胞上皮細胞の蛋白マーカーであるAQP5を染色したところ、SpC陽性細胞の約20%に検出された(double positive細胞)(図3)。さらに培養をつづけていくこのdouble positive細胞の割合が経時的に高くなり、II型からI型への分化が生じていることが示唆された。このよ

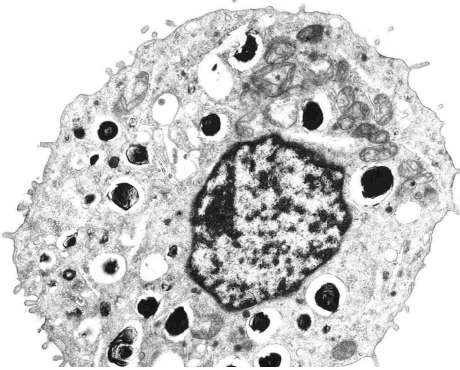
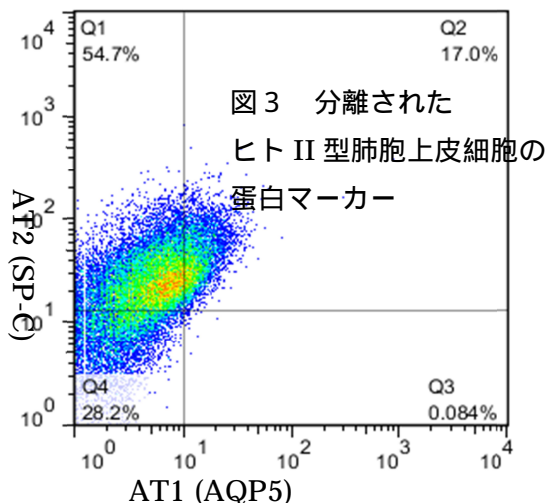


図2 分離されたヒトII型肺胞上皮細胞

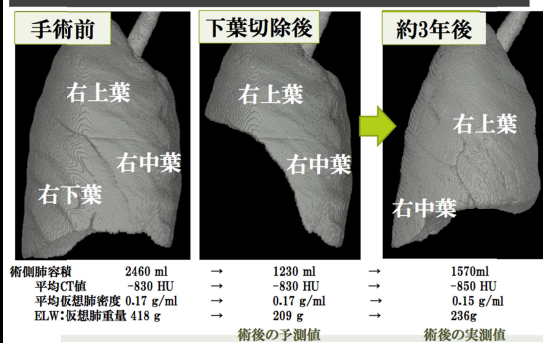
うにして得られた短期培養後のヒト肺胞上皮細胞を、8-9週齢の左肺全摘を施した免疫



不全ラット(F344/N/Jcl-mu/mu)の気道内に 2.5×10^5 個注入したところ、一部生着が確認された(ヒト特異的HLA-A抗原およびCalnexin抗原陽性細胞)(論文投稿中)

(4)CT画像データを用いた肺組織量の評価法を考案し、臨床的に肺切除された患者の長期的な肺組織量を評価した。まず京都大学呼吸器外科における生体肺移植ドナー35例(呼吸機能が正常な健常人で右肺下葉切除を受けている状態)の術後の肺機能と残肺の容積、密度(CTデータを用いて算出)および仮想肺重量(容積 \times 密度)を検討したところ、予測値(術前のスパイロメトリー検査を元に算出した下葉切除後の予測値)よりも肺活量、容積、仮想重量が有意に上回っていることを証明した(図4)。(論文化済)

図4 画像解析例: 右下葉切除



また肺癌患者の根治治療としての肺切除を行った40症例の術後の肺機能・肺容積・仮想肺重量を術前の値と術式から導いた各パラメーターの術後予測値を比較検討したところ、10垂区域以上切除した症例では肺活量、容積のみならず仮想肺重量も有意に上回っていたが、10垂区域未満の切除例では仮想重量は予測値と同等の値であった。これは肺の代償性成長は一定以上の肺切除が行われる必要があることが示される結果となり、ラットの研究が臨床的にも示されたこととなった。(論文化済)

(5)ヒトおよびマウスのiPS細胞をES細胞からII型は違法上皮細胞を分化誘導することが可能なSABM培地にて培養し、同様な分化誘導がおこなわれるか検討中である。現在、京都大学再生研究所より供与されたヒトiPS細胞にSpC遺伝子プロモータープラスミド(ネオマイシン体制遺伝子導入済)を導入し、SABM培地にて培養を開始した。培養15日後にSpC遺伝子プロモーターが発現した細胞をネオマイシン添加培地にて選別した後採取し、肺胞細胞への分化関連遺伝子発現の変化、SpC蛋白の発現、電子顕微鏡による微小構造を検討し、肺胞上皮細胞への分化、あるいはその蛍光を探る。(実験中)

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4件)

Spirometric and radiological evaluation of the remnant lung long after major pulmonary resection: can compensatory phenomena be recognized in clinical cases?

Mizobuchi T, Wada H, Sakairi Y, Suzuki H, Nakajima T, Tagawa T, Iwata T, Motoori K, Yoshida S, Yoshino I. Surgery Today Surg Today. 査読有、2013 Aug 27 [Epub ahead of print]

PMID:23982195[PubMed - as supplied by publisher]

Increase of bone-morphogenetic protein-7 expressing pulmonary resident cells in pneumonectomized rats. Ohba T, Wada H, Yoshino I, Yoshida S, Tagawa T, Shoji F, Yamazaki K, Maehara Y. Surgery Today. 査読有、2013;44:324-331.

Radiologic evaluation for volume and weight of remnant lung in living lung donors. Mizobuchi T, Chen F, Yoshino I, Iwata T, Yoshida S, Bando T, Date H.

J Thorac Cardiovasc Surg. 査読有、2013;146:1253-1258.

Transplantation of alveolar type II cells stimulates lung regeneration during compensatory lung growth in adult rats. Wada H, Yoshida S, Suzuki H, Sakairi Y, Mizobuchi T, Komura D, Sato Y, Yokoi S, Yoshino I. J Thorac Cardiovasc Surg. 査読有、2012 143(3):711-719

[学会発表](計5件)

坂入祐一, 和田啓伸, 鈴木秀海, 吉田成利, 石橋史博, 田村創, 岩田剛和, 溝淵輝明, 守屋康光, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 吉野一郎. ヒト手術肺からの肺再生

療法を目的としたcell sourceの分離および解析. 第64回日本胸部外科学会学術集会, 名古屋, 2011年10月9-11日

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, 溝淵輝明, 守屋康光, 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47回日本移植学会, 仙台, 2011年9月14-16日.

Mizobuchi T, Inage T, Morimoto J, Sakairi Y, Ishibashi F, Chiyo M, Kometani T, Iwata T, Moriya Y, Hoshino H, Yoshida S, Yoshino I. Compensatory Lung Growth Triggered by Major Lung Resection Determined by a Novel Method: Estimated Quantity of Pulmonary Tissue (EQPT). The annual meeting of American Thoracic Society, San Francisco, USA May 13-18, 2011.

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, 溝淵輝明, 守屋康光, 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. 全摘術後残存肺における肺再生にはII型肺胞上皮細胞の補充が必要である. 第111回日本外科学会学術集会 (誌上開催 2011年).

[図書](計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

吉田 成利 (YOSHIDA, SHIGETOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90334200

溝渕 輝明 (MIZOBUCHI, TERUAKI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50569861

坂入 祐一 (SAKAIRI YUICHI)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30551949