

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592062

研究課題名(和文)胎生期肺組織移植による肺気腫治療の実験的検討 - 豚肺気腫モデルを用いて -

研究課題名(英文)Experimental examination of the pulmonary emphysema treatment with fetal lung tissue transplantation - a pig emphysema model -

研究代表者

先山 正二 (SAKIYAMA, Shoji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60291986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期肺組織移植による肺気腫の治療の可能性についての実験的検討を行った。豚では、正常成体肺内に移植した胎生期肺組織は免疫抑制下に生着分化した。豚肺気腫モデルは引き続き検討を必要とする。関連研究では、pallid mouse気腫肺に移植した胎生期肺組織は生着分化した。また、ラットでは、レシピエントへのグルココルチコイド投与で、移植胎生期肺組織の分化生着が促進し、この効果は投与期間依存性であった。

研究成果の概要(英文)：We have shown that fetal lung tissues implanted into normal adult rat lungs or bleomycin induced fibrotic lungs survive, differentiate and grown. In this study, the possibility of the pulmonary emphysema treatment with fetal lung tissue transplantation into adult lung parenchyma was examined. And some associated subprojects were performed. Implanted pig fetal lung tissues of the pseudoglandular stage survived in recipient lungs of naïve pig under immunosuppression. Further examination is necessary for the making of the pulmonary emphysema model in the pig. In subprojects, fetal mouse lung fragments survived and differentiated in the emphysematous lung of pallid mice. And in rat transplantation model, administration of glucocorticoid to recipient facilitated the development and growth of implanted fetal lung tissues. These effects was increased depend on the duration of glucocorticoid administration.

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：肺の再生 胎生期肺移植 肺移植 肺気腫 豚 ステロイド ラット マウス

## 1. 研究開始当初の背景

肺気腫や肺線維症などの終末的肺疾患にて対しては、肺移植が有用な治療手段として確立されている。しかし、肺移植におけるドナー不足は深刻である。したがって、再生医学的アプローチが考えられるが、現状においては肺の再生は他の組織と比べその構造と構成細胞の多さ故にその困難性が指摘されている。

我々は、胎生期肺組織の i) 肺への分化の方向付けがなされている、ii) 増殖能が旺盛である、iii) いわゆる“足場”となる間質組織が含まれている点に着目し、胎生期肺組織移植による、特に肺胞レベルでの組織再生・修復について検討してきた。これまでに、胎生 17 日齢ラット胎仔肺を細切し、naïve な成体ラット左肺に移植することにより、次の点を明らかにした。1) 胎仔肺組織が成体肺内に生着し、分化する。2) 移植場所として肺という環境が増殖、分化には重要である。3) レシピエント肺と移植肺組織は肺胞レベルで気道、血管系の連絡を有する。4) 胎仔肺は成体自己肺に比し、成体肺内に生着しやすい。5) 換気による mechanical stretch が強く加わる環境においては、移植胎仔肺の分化が促進される ( J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 131:1148-53)。

さらに、ラットブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、病的肺においても移植胎仔肺は生着し分化することを示した( 第 60 回胸部外科学会, 2007, その後 J Thorac Cardiovasc Surg 2012; 143: 1429-35 に発表 )。

## 2. 研究の目的

肺気腫症に対する再生医療の実現を念頭においた基礎的研究を行った。

我々は、胎生期肺組織に着目した、胎生期肺組織移植による肺組織再生・修復に関する実験的検討を行ってきたが、今回はこれまでの知見を踏まえて、豚を用いた大動物における肺気腫モデルでの胎生期肺組織移植の可能性を検討した。なお、研究を推進してゆく途上で、いくつかの解決すべき問題点が生じたため、適宜ラット、マウスなどの小動物による関連実験をサブプロジェクトとして行

った。

## 3. 研究の方法

豚における胎生期肺組織移植：胎齢 96 日の胎仔肺組織を採取し、DMEM 培地内で細切し、18G 針を用いて全麻下に成体右肺内および胸部筋肉内に注入移植した。移植当日より免疫抑制剤(サイクロスポリン; CsA, 10mg/kg i.m., 7日間連日、以降内服連日、14日以降内服隔日)と抗生物質を継続投与した。術後経時的(POD 0, 7, 14, 23, 30, 32)に胎生期肺組織を移植した右肺と筋肉部分を組織学的に検討した。

**マウスにおける胎生期肺組織移植(肺気腫自然発症モデルである pallid mouse を用いた検討)**: pallid mouse (C57BL6/J pa+/pa+) をレシピエントとし、胎齢 16.5 日から 16 日の C57BL/6 GFP マウスの胎仔より肺組織(腺様期)を摘出し、DMEM 培地内で細切した後に、肺気腫を生じた 1 年齢の pallid mouse の左肺内に移植した。麻酔下にレシピエントマウスに 22-G のサーフロー外套針を気管内挿管し、人工呼吸管理下(tidal volume; 0.2mg/kg, respiratory rate 150 回)に左開胸を行った。

レシピエントの左肺内に 26-G 針を用いて細切した胎生期肺組織を胸膜表面より肺実質内に注入移植した。GFP 蛋白に対する免疫反応を抑制するために、移植直後から 4 日おきに cyclosporine(10mg/kg, i.m.)を投与した。移植後 1, 2, 4 週後に組織学的検討を行った。なお、今回のサブプロジェクトとして pallid mouse を用いたのは、以前我々は、肺気腫モデルとしての妥当性に関する検討を行い報告しており、当該マウスに関する十分な知見を有していたからである (Lab Invest 2009; 89:760-8)。

**ラットにおける胎生期肺組織移植(ステロイドの投与が移植胎生期肺組織の生着・分化に及ぼす影響に関する検討)**: 胎齢 17 日齢の LEW ラット(ドナー)の胎仔肺組織を採取し、DMEM 培地内で細切し、成体 LEW ラット(レシピエント)左肺内に 18G 針を用いて注入移植した。

レシピエントへの移植は、挿管、人工呼吸管理下に、左開胸を行い、臓側胸膜表面より左肺内に直視下に行った。本実験系では同一

近交系ラット間の移植のため、免疫抑制剤なしでも拒絶反応は生じない。実験Iとして実験群(E群)には移植後にレシピエントにベタメタゾンを2日間投与(0.2mg/kg, day0 & day1)し、コントロール群(C群)には生食を投与した。移植後、1週と2週後にレシピエントを犠牲死させ、肺を摘出しH&E染色とTTF-1およびSurfactant Protein(SP)-Aの免疫染色を行い組織学的に検討した。移植胎仔肺組織の分化の程度は正常ラットの胎生期から出生後の肺の細胞形態、肺胞構造および末梢気道の分岐形態をリファレンスとした形態的評価およびTTF-1およびSP-Aの発現により評価した。次に、実験Iの結果を受けて実験IIを行った。実験IIは、移植後にレシピエントにベタメタゾンを7日間投与(0.2mg/kg, day0 - day6)し、2日間投与の場合と比較検討した(Gen Thorac Cardiovasc Surg 2013)。

#### 4. 研究成果

豚を用いた研究では、十分な肺気腫モデルの作成には至っていない。しかし、Naïveな成体肺への移植では、POD7だと、肺内に移植胎生期肺組織の生着を認め、当該部分は単層立方上皮を有する呼吸細気管支、肺胞道様の構築を示し、胎生期後期の構造ながら胎仔肺組織採取時よりも分化を認めた。一部にはリンパ球浸潤とレシピエント肺との間に線維性変化を認めた。細切した胎生期肺組織は、生体肺内への移植後早期より、お互いに接着する傾向を認めた。しかし、一カ所に集中して胎生期肺組織移植片を注入移植した場合には、移植部位の中心部の血流と栄養供給は十分でなく、壊死、線維化に至り易かった。

また、豚においては、胎生期肺組織移植片はレシピエントのallograft rejectionによる免疫反応が移植胎生期肺移植片の生着に重要な影響を及ぼした。サイクロスポリンによる免疫抑制を行ったが、長期的にはより強力で持続的な免疫抑制が必要ではないかと推察された。

この結果を受けて、ステロイドの使用を考慮し、ラット胎生期肺組織移植モデルにおけるステロイドの影響を検討したサブプロジ

ェクトでは、後述する有用な知見を得る事ができた。

豚はラット、マウスと比較して胎仔肺の成長速度や出生後の肺の成長分化の速度がゆっくりしている。従って、それぞれの動物種において成体肺内に移植された胎生期肺組織の生着後の生着分化の速度も、それぞれの種本来の肺組織の分化成長のスピードに依存していた。すなわち、豚においては、ラット、マウスと比較して成体肺内に移植された胎生期移植肺組織の分化速度はゆっくりしていた。

Pallid mouseを用いた、気腫肺へ胎生期肺組織を移植したサブプロジェクトの結果は下記の如くであった。

Pallid mouseの胎生期肺組織片を成体pallid mouse気腫肺内に移植した場合には、移植後7日の時点で、移植組織片は生体肺内に生着した。この時期の移植組織片は腺様期の組織学的特徴を残した部分と、出生後の新生仔期に認められるような、含気があり、薄くなった肺胞隔壁を有する部分を認めた。移植部位とレシピエント肺の接合部分の連続性はスムーズであった。移植後14日後には、移植片領域の肺胞への分化がさらに進み、肺胞壁はさらに薄くなり、肺胞領域も拡大し、移植後14日の移植組織片は、正常の出生後14日の肺の形態に類似する部分を認めた。一部には、立方状上皮が認められ、このような部分においては、肺胞壁は比較的厚かった。

移植後28日後では、移植片部分の肺胞隔壁はさらに薄くなり、含気のある肺胞領域はさらに広がり、それぞれの肺胞腔も広がっていた。

以上より、肺気腫を有する肺組織内への胎生期肺組織移植において、移植した胎生期肺組織は生体肺内に生着し、分化することが明らかになった。

周術期のステロイド投与が胎生期肺組織移植片の成体肺内への生着・分化への影響を検討したラットを用いたサブプロジェクトの結果は下記の如くであった。

**実験I(移植後にレシピエントにベタメタゾンを2日間投与、対照群には生食を投与)：**

移植後1週の時点ではE群とC群の間に移植胎仔肺組織のH&Eによる形態上の分化の程度には差を認めなかったが、術後2週後の時点において、実験群(E群)は対象群(C群)より肺胞への分化が促進していた。TTF-1の発現は移植後1週からE群においてC群より気道上皮を主体として広範かつ強く発現していた。SP-Aは肺胞へ分化が見られる領域で多く発現しており、E群の移植後2週でC群より発現の増加が認められた。

**実験II(ベタメタゾンの2日間投与と7日間投与の比較)：**移植後2週において7日間投与群が2日間投与群より肺の分化がより促進されており、肺胞レベルで顕著であった。Glucocorticoidのレシピエントへの投与は、成体肺に移植した胎生期肺組織の生着・分化を促進した。またその効果は投与期間を延長することでより増強された。

以上より、本研究に適した豚気腫肺モデルの作成に関しては今後も継続的な研究が必要である。サブプロジェクト研究結果より、pallid mouseによる豚気腫自然発症モデルを用いた検討では、豚気腫肺においても、移植した胎生期肺組織は、病的成体肺内に生着し、分化することを示した。また、移植後のグルココルチコイド(ベタメタゾン)投与により、移植した胎生期肺組織の分化生着が促進されることを明らかにした。

#### 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1件)

Toba H, Sakiyama S, Koichiro kenzaki, Yukikiyo kawakami, Koh Uyama, Yoshimi Bando, Akira Tangoku. Implantation of fetal rat lung fragments into bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Thorac Cardiovasc Surg, 査読有, vol.143, 2012, 1429-1435

[学会発表](計2件)

先山 正二、監崎孝一郎、鳥羽 博明、宇山 攻、梶浦耕一郎、中川 靖士、吉田 光輝、

川上 行奎、滝沢 宏光、近藤 和也、丹黒 章、肺の再生・修復を目的とした胎生期肺組織移植、第29回日本呼吸器外科学会総会、2012年5月17日-18日、秋田キャッスルホテル(秋田県)

宇山 攻、先山 正二、鳥羽 博明、吉田 光輝、監崎孝一郎、丹黒 章、胎仔肺移植による豚気腫自然発症モデルマウス肺修復の試み、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月26日-28日、東京都(紙上開催)

[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

先山 正二(SAKIYAMA, Shoji)  
徳島大学・大学院ヘルスケア工学研究部・  
准教授  
研究者番号：60291986

(2)研究分担者

川上 行奎 (KAWAKAMI, Yukikiyo)

徳島大学・大学病院・特任講師

研究者番号：00596249

滝沢 宏光 (TAKIZAWA, Hiromitsu)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：90332816

梶浦 耕一郎 (KAJIURA, Koichiro)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：60596253

(3)連携研究者

( )

研究者番号：