

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462172

研究課題名(和文) 分化能を有するII型肺胞上皮細胞による障害肺の改善 - 肺移植の臨床応用に向けて -

研究課題名(英文) Improvement of damaged lung by type II alveolar epithelial cells with multipotency - for the purpose of clinical application of lung transplantation -

研究代表者

吉田 成利 (Yoshida, Shigetoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・呼吸器外科・部長

研究者番号：90334200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：移入するII型肺胞上皮細胞(AEC-II)の供給を安定化する目的で、マウス人工多能性幹細胞(iPS細胞)からAEC-IIへの分化誘導を試みた。さらにはマウス同種異系肺移植による慢性閉塞性細気管支炎(B0)モデルを作成し、B0肺の網羅的遺伝子解析を行った。AEC-II移入後評価の前実験として、luciferaseを遺伝子導入したA549細胞株をマウスに経静脈投与を行い、肺への細胞の生着・分布・増殖を確認した。マウス障害肺モデルも確立しており、今後はiPS細胞由来のACE-II移入を行い、死体肺移植の臨床応用の可能性をマウス実験により追求する。

研究成果の概要(英文)：As a preliminary experiment, to stabilize the supply of type II alveolar epithelial cells (AEC-II) transferring in the injury lungs, we experimented the induction of differentiation from mouse induced pluripotent stem cells (iPS cells) to AEC-II. In addition, we established the mouse chronic obstructive bronchiolitis (B0) model after allogeneic lung transplantation, and the exhaustive gene analysis of the B0 lung was performed. To image the kinetics of transferred AEC-II, the luciferase-transfected A549 cells were intravenously administered to mice, we confirmed the engraftment, distribution and proliferation of the cells in the lung.

We will be transferred ACE-II induced from iPS cells into mouse injury lung in next experiment, and the possibility of clinical application of cadaveric lung transplantation will be pursued.

研究分野：医歯薬学

キーワード：呼吸器外科学 移植 再生

### 1. 研究開始当初の背景

慢性進行性肺疾患に対する根治的治療である肺移植だが、世界的にドナー不足が問題となっている。日本では2010年に脳死臓器移植法が改正されて以来、臓器提供数は増加し、脳死肺移植数は増加してきた。本邦における脳死ドナーからの肺の利用率は67.9%であり、米国(18.7%)よりも高い割合で移植されている。しかしながら、登録待機中に移植を受けることなく死亡される患者数は以前と変わらず登録者数の半数あり、ドナー不足が依然問題として残っているのが現実である。その対策として、Ex vivo lung perfusionによる脳死や心停止後ドナー肺の評価を行い研究から臨床へと結びつけていたり、死体肺移植による臨床研究症を実施したりしているが、死体肺移植例では安定した実績が得られておらず、活用するためには保存のほか、新たな方法についてさらに研究する必要がある。

また、肺移植の治療成績は他臓器の移植治療成績に比べて不良であることも重要課題であり、その主たる原因である慢性閉塞性細気管支炎(BO)の克服するために、BOのメカニズム解明やBOの抑制あるいは改善について研究する必要がある。

一方、iPS細胞(induced pluripotent stem cells)を軸とする再生医療技術は移植医療の代替として注目され目覚しく発展している研究分野である。移植医療に代わる医療としても注目されている研究分野である。肺再生に関しても種々の機関で研究が行われており、再生促進因子や幹細胞について研究報告がされている状況である。ACE-II細胞を障害肺に移入するという研究は独創的であり、移植後のBOを改善させうる可能性や、ドナー肺の再生を促すことで死体肺活用への可能性を秘めており、ACE-II移入研究やiPS細胞からのACE-IIへの分化誘導は研究価値のあるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

目標は再生医療技術の応用による障害肺修復の可能性について追及することであり、

障害肺モデルにおけるACE-II細胞投与による生着・増殖・分布評価、マウス肺移植におけるBOモデルの確立と摘出肺における網羅的遺伝子解析、安定したACE-II供給のための単離、死体肺移植モデル・BOモデルにおけるACE-II投与、とした。

### 3. 研究の方法

純度を高めたACE-IIに対してlipofectamineを使用してluciferaseをトランスフェクションする。ACE-II細胞の増殖因子であるhepatocyte growth factor(HGF)を付加した培養にてACE-II細胞を増殖させ、動物体内を非侵襲的に観察することができるIVIS® Lumina-II(Xenogen/Caliper)を用いて細胞の活性をwell上で測定する。培養を評価後、同処理したACE-II細胞( $2.5 \times 10^6$ 個/生食200 $\mu$ l)を経気道的に投与する。投与直後から定期的にIVIS®で細胞の動態(増殖・分布)

を体外から評価する。また、ACE-II細胞を尾静脈から注入した際にどのような経過を辿るか、IVIS®で評価する。

C57BL/10[H2b]→C57BL/6[H2b]のマウス同種異系肺移植を行い、BO作成を確立させる。術後3週目に小動物用CTで画像的評価を行ったのち犠牲死させ、HE/Masson染色でBOの有無を評価し、移植肺についてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行う。

ACE-IIの単離技術としてRichard RJらの報告した方法をmodifyした形で行い、純度を高める目的で培養し、得られた細胞がAEC-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で確認する。

純度の高いACE-IIをラット/マウス脳死肺移植モデル・BOモデルにおいて移入し、移入したACE-II細胞生着や分布、組織学的変化を評価する。

### 4. 研究成果

前実験としてluciferaseを遺伝子導入したA549細胞株をマウスに経静脈投与を行い、肺への細胞の生着・分布・増殖を確認した。

の培養実験と関連するが、純度の高く細胞数の多いAEC-IIを培養することが難渋し、AEC-IIにおける動物体内での生着・分布・増殖を見る実験には至らなかった。

マウス同種異系肺移植の移植手技が安定し、マウスの生存が得られ、BOモデル作成が確立された。文献同様に約半数のモデルにBOを認めた。BO肺を網羅的遺伝子解析し、拒絶に関連する遺伝子群の検出の他、繊毛運動に関与する遺伝子の発現低下が認められた。また、Akt, mTOR, ICAM-2等が発現していることが分かった。

安定した純度の高いAEC-IIの獲得は重要項目であるが、前述のように培養で純度の高い細胞数のあるACE-II培養までには至らなかったため、他のプロジェクトと連結しiPS細胞からのAEC-II分化誘導を試みた。2014年の報告された方法を用い、マウスiPS細胞をActivin A, Wnt 3aを用いた培地の培養により胚体内胚葉へと分化させ、分化誘導をSOX17, Foxa2などで確認した。さらにSABM培地にFGF2を加えた培地で培養し、12日目にSP-Cの発現を確認し得た(Figure.1)。今後、さらに実験を重ね、純度の高い安定供給のできるAEC-IIの獲得を目指す。

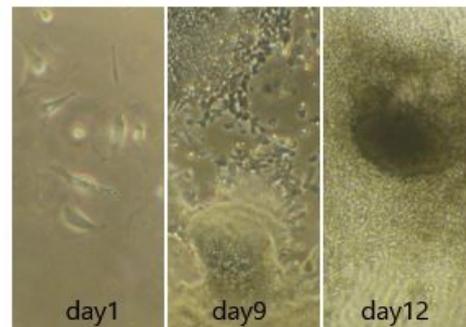


Figure 1

死体肺移植モデルの確立と純度の高いAEC-II移入については、当初の目的通りには至らなかった。今後の遺伝子解析やノックアウトマウス使用、マウスiPS細胞由来のAEC-II分化誘導培養、そしてその細胞の移入という実験系を考慮すると全面的にマウス実験であり、実験系をラットからマウスに移行して実験を継続していく方針である。

#### 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)

##### [雑誌論文](計 7件)

和田啓伸, 坂入祐一, 吉野一郎. 肺の回復・成長・再生 肺移植と再生医療 . 移植, 査読あり, Vol 52, 2017, 31-37.

Ito T, Suzuki H, Wada H, Fujiwara T, Nakajima T, Iwata T, Yoshida S, Yoshino I. Concordant pattern of radiologic, morphologic, and genomic changes during compensatory lung growth. J Surg Research, 査読あり, Vol 212, 2017, 60-67.

Hata A, Nakajima T, Yoshida S, Kinoshita T, Terada J, Tatsumi K, Matumiya G, Date H, Yoshino I. Living donor lung transplantation for secondary pleuroparenchymal fibroelastosis. Ann Thorac Surg, 査読あり, Vol 101, 2016, 1970-1972.

鈴木秀海, 畑 敦, 椎名祐樹, 尹 貴正, 田中教久, 坂入祐一, 和田啓伸, 藤原大樹, 中島崇裕, 岩田剛和, 千代雅子, 吉田成利, 吉野一郎. 慢性期移植肺機能不全と悪性腫瘍:慢性移植肺機能不全モデルの歴史と発展. 胸部外科, 査読あり, Vol 69, 2016, 923-929.

Mizobuchi T, Chen F, Yoshino I, Iwata T, Yoshida S, Bando T, Date H. Radiologic evaluation for volume and weight of remnant lung in living lung donors. J Thorac Cardiovasc Surg, 査読あり, Vol 146, 2013, 1253-1258.

Ohba T, Wada H, Yoshino I, Yoshida S, Tagawa T, Yamazaki K, Maehara Y. Increase of bone morphogenetic protein-7 expressing pulmonary resident cells in pneumonectomized rats. Surg Today, 査読あり, Vol 44, 2013, 324-331.

Susuki H, Labury ME, Fan L, Vital R, Mickler EA, Benson HL, Shilling R, Wu Q, Weber DJ, Wagner SR, Lasaro M, Devore d, wang Y, Sandusky GE, Lipking K, Pandya P, Reynolds J, Love R, Wozniak T, Gu H, Brown KM, wilkes Ds. Role of complement activation in obliterative bronchiolitis post-lung transplantation. J Immunol, 査読あり, Vol 191, 2013, 4431-4439.

##### [学会発表](計 25件)

椎名祐樹, 坂入祐一, 鈴木秀海, 伊藤祐輝, 佐田諭己, 畑 敦, 豊田行英, 稲毛輝長, 田中教久, 藤原大樹, 和田啓伸, 中島崇裕, 岩田剛和, 千代雅子, 吉野一郎. iPS細胞からの肺前駆細胞の誘導と虚血再灌流障害に対する投与療法の試み. 第 1350 回千葉医学会 2017.2.11 千葉

畑 敦, 鈴木秀海, 中島崇裕, 伊藤祐輝, 小野里優希, 松本寛樹, 佐田諭己, 椎名祐樹, 豊田行英, 稲毛輝長, 田中教久, 藤原大樹, 和田啓伸, 千代雅子, 岩田剛和, 吉野一郎. マウス肺移植モデルにおける慢性拒絶反応の網羅的遺伝子発現解析. 第 1350 回千葉医学会 2017.2.11 千葉

寺田二郎, 島田絢子, 安部光洋, 西村倫太郎, 加藤史照, 和田啓伸, 中島崇裕, 鈴木秀海, 岩田剛和, 津島健司, 吉野一郎, 巽浩一郎. 臍帯血移植後間質性肺炎の急性増悪に対してVV-ECMOをbridgeとして生体肺移植を行った1例. 第 1350 回千葉医学会 2017.2.11 千葉

和田啓伸, 伊藤祐輝, 椎名祐樹, 佐田諭己, 豊田行英, 畑 敦, 稲毛輝長, 田中教久, 坂入祐一, 藤原大樹, 中島崇裕, 鈴木秀海, 岩田剛和, 千代雅子, 吉野一郎. 肺高血圧症を伴う肺静脈閉塞症に対して脳死両肺移植を行った1例—当院初の脳死肺移植—. 第 1350 回千葉医学会 2017.2.11 千葉

中島崇裕, 和田啓伸, 寺田二郎, 田中恵美, 森 美穂, 金子裕美, 稲垣 武, 古川誠一郎, 山本実紗, 谷口俊文, 坂入祐一, 藤原大樹, 鈴木秀海, 岩田剛和, 千代雅子, 巽浩一郎, 吉野一郎. 肺移植症例に対する術前・術後管理への取り組み. 第 1350 回千葉医学会 2017.2.11 千葉

Yamamoto T, Yoshida S, Nakajima T, Fujiwara T, Suzuki H, Iwata T, Yoshino I. Bronchoscopic assessment of bronchial anastomosis by visualizing local circulation status. 2016 ESTS 2016.5.30 ナポリ

山田義人, ラウベ・イザベル, ジャンジェ・ウィ, ボンビー・ニジョン, ベクシマー・ベアトリス, ヴェーダー・ウォルター, 吉野一郎, ユングライトマイヤー・ウォルフガング. セボフルランを用いたブレコンディショニングによる肺アログラフト保護効果 マウス移植モデルでの検証 . 第 33 回日本呼吸器外科学会総会 2016.5.12 京都

畑 敦, 鈴木秀海, 大島拓美, 佐田諭己, 豊田行英, 稲毛輝長, 山本高義, 田中教久, 藤原大樹, 和田啓伸, 中島崇裕, 岩田剛和, 吉田成利, 吉野一郎. マウス肺移植モデルにおける慢性拒絶反応の免疫学的解析. 第 1330 回千葉医学会 2016.2.13 千葉

山本高義, 海竈大輔, 佐田諭己, 豊田行英, 畑 敦, 稲毛輝長, 田中教久, 和田啓伸, 藤原大樹, 中島崇裕, 鈴木秀海, 岩田

剛和, 吉田成利, 吉野一郎. iPS細胞から2型肺胞上皮細胞への分化誘導実験. 第1330回千葉医学会 2016.2.13 千葉

山本高義, 吉田成利, 中島崇裕, 佐田諭己, 豊田行英, 畑 敦, 稲毛輝長, 田中教久, 和田啓伸, 藤原大樹, 鈴木秀海, 岩田剛和, 吉野一郎. 気管・気管支形成術後の新たな吻合部内視鏡的評価方法. 第1330回千葉医学会 2016.2.13 千葉

尹 貴正, 鈴木秀海, 和田啓伸, 藤原大樹, 中島崇裕, 岩田剛和, 吉田成利, 吉野一郎. マウス肺全摘モデルを用いた代償性肺成長の画像的, 形態的および遺伝子学的解析. 第1330回千葉医学会 2016.2.13 千葉

和田啓伸, Marcelo Cypel, 中島崇裕, 藤原大樹, 岩田剛和, 吉田成利, Thomas Waddell, Shaf Keshavjee, 吉野一郎. 脳死肺移植後における長期 Extracorporeal Lung Support を要した症例の検討 - A preliminary report from Toronto General Hospital- 第32回日本肺および心肺移植研究会 2016.1.30 日光

山本高義, 吉田成利, 中島崇裕, 大島拓美, 海竇大輔, 畑 敦, 稲毛輝長, 尹 貴正, 田中教久, 森本淳一, 藤原大樹, 長門芳, 鈴木秀海, 岩田剛和, 吉野一郎. 気管・気管支形成術後の吻合部内視鏡的評価. 第68回日本胸部外科学会学術集会 2015.10.19 神戸

尹 貴正, 鈴木秀海, 藤原大樹, 長門芳, 中島崇裕, 岩田剛和, 吉田成利, 吉野一郎. 肺切除後の代償性肺成長における画像および遺伝子プロファイル解析. マウス肺全摘モデルにおける基礎実験. 第51回日本移植学会総会 2015.10.3 熊本

尹 貴正, 鈴木秀海, 稲毛輝長, 山本高義, 田中教久, 鎌田稔子, 森本淳一, 長門芳, 中島崇裕, 岩田剛和, 吉田成利, 吉野一郎. マウス肺全摘モデルを用いた代償性肺成長の解析. 第32回日本呼吸器外科学会総会 2015.5.15 高松

Nakajima T, Yoshida S, Kinoshita T, Terada J, Tsushima K, Tanoue S, Tanaka E, Nagato K, Suzuki H, Iwata T, Date H, Yoshino I. Living donor lung transplantation for secondary pleuroparenchymal fibroelastosis after cytotoxic chemotherapy. The 11th Lung Transplantation Conference. 2015.5.14 高松

鈴木秀海, 畑 敦, 稲毛輝長, 尹 貴正, 山本高義, 田中教久, 鎌田稔子, 森本淳一, 中島崇裕, 長門 芳, 岩田剛和, 吉田成利, 吉野一郎. 皮膚筋炎に合併した間質性肺炎 (CADM-IP) に対し両側上葉温存生体肺移植後、管理に難渋した一例. 第31回日本肺および心肺移植研究会 2015.1.31 東京

尹 貴正, 鈴木秀海, 稲毛輝長, 山本高義, 鎌田稔子, 田中教久, 森本淳一, 中島

崇裕, 田川哲三, 岩田剛和, 溝渕輝明, 吉田成利, 吉野一郎. マウスを用いた代償性肺成長の解析. 第1307回千葉医学会 2015.2.7 千葉

山本高義, 坂入祐一, 尹 貴正, 田中教久, 鎌田稔子, 森本淳一, 中島崇裕, 鈴木秀海, 田川哲三, 岩田剛和, 溝渕輝明, 吉田成利, 吉野一郎. iPS細胞による2型肺胞上皮細胞の誘導の試み. 第1307回千葉医学会 2015.2.7 千葉

中島崇裕, 安福和弘, 吉田成利, 鈴木秀海, 岩田剛和, 田川哲三, 溝渕輝明, Keshavjee Shaf, 吉野一郎. 重症肺高血圧症に対し PA-LA Novalung 導入後両側肺移植を行った1例 周術期管理に関する考察. The 10th Lung Transplantation Conference. 2014.10.2 福岡

21 吉田成利, 中島崇裕, 鎌田稔子, 森本淳一, 山本高義, 尹 貴正, 鈴木秀海, 田川哲三, 岩田剛和, 溝渕輝明, 吉野一郎. 気管支形成術後吻合部におけるIHb分布画像による粘膜血流評価. 第31回日本呼吸器外科学会総会 2014.5.29 東京

22 吉田成利, 中島崇裕, 鎌田稔子, 山本高義, 稲毛輝長, 森本淳一, 鈴木秀海, 田川哲三, 岩田剛和, 溝渕輝明, 吉野一郎. 肺癌に対する気管・気管支形成後の内視鏡的評価. 第37回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 2014.4.15 京都

23 Suzuki H, Yoshida S, Sata Y, Inage T, Yun T, Yamamoto T, Kamata T, Morimoto J, Sakairi Y, Nakajima T, Tagawa T, Iwata T, Mizobuchi T, Wilkes DS, Yoshino I. Donor lung derived myeloid and plasmacytoid dendritic cells differentially regulate T cell proliferation and cytokine production. The 9th Lung Transplantation Conference. 2013.10.18 仙台

24 鈴木秀海, 吉田成利, 中島崇裕, 田川哲三, 岩田剛和, 溝渕輝明, 吉野一郎. 肺移植後の慢性拒絶反応における液性免疫の関与. 第49回日本移植学会総会 2013.9.7 京都

25 鈴木秀海, 吉田成利, 豊田行英, 尹 貴正, 鎌田稔子, 森本淳一, 坂入祐一, 山田義人, 田川哲三, 岩田剛和, 溝渕輝明, 千代雅子, Fan L, Wilkes DS, 吉野一郎. 肺移植における慢性拒絶反応の病態解明と臨床応用への可能性. 第113回日本外科学会定期学術集会 2013.4.13 福岡

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田成利 (YOSHIDA SHIGETOSHI)  
千葉県がんセンター (研究所)・呼吸器外科・部長  
研究者番号: 90334200

(2)研究分担者

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

岩田剛和 (IWATA TAKEKAZU)  
千葉県がんセンター (研究所)・呼吸器外科・主任医長  
研究者番号: 30586681

鈴木秀海 (SUZUKI HIDEKI)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 6042226

中島崇裕 (NAKAJIMA TAKAHIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号: 20400913

山本高義 (YAMAMOTO TAKAYOSHI)  
千葉県がんセンター (研究所)・呼吸器外科・医長  
研究者番号: 20648349

尹 貴正 (YUN TAKAMASA)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 80710491

田川哲三 (TAGAWA TETSUZO)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号: 90419557

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

鎌田稔子 (KAMATA TOSHIKO)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60586692

(3)連携研究者

(4)研究協力者

和田啓伸 (WADA HIRONOBU)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90514604

畑 敦 (HATA ATSUSHI)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 3070806

椎名祐樹 (SHIINA YUKI)  
千葉大学・医学部附属病院・医員