

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462198

研究課題名(和文) 難治性気道疾患と重症肺疾患への新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Novel method for tracheal diseases and pulmonary diseases

## 研究代表者

松本 桂太郎 (MATSUMOTO, Keitaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：80404268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難治性良性気道狭窄および気管支断端補強に対する新たな治療法の開発として、細胞シートを用いた。狭窄改善効果として、組織学的に細胞シート群に狭窄改善効果がみられた。しかし、その結果には安定性がなかった。気管断端に対する創傷治癒増幅効果については、コントロール群と比較し、細胞シート群ではBurst pressureにおいて、約8倍の強度が得られた。

肺前駆細胞は、TGF $\beta$ にてコントロールされていることが確認された。経気道的細胞投与のモデルとして、Chlodronateにより、肺内マクロファージを減ずることが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Novel method using cell sheet for tracheal stenosis and reinforce of bronchial stump. Using tracheal stenosis model of rabbit, cell sheet of fibroblast were affixed on the scratched site. In some cases, tracheal stenosis was prevented, however, the effects were unstable. For tracheal incision model cell sheets made of primary cultured dermal fibroblast were affixed on the incision of trachea in cell sheet group and no cell sheets in control group. On day 3, the strength of tissue healing in cell sheet group was about 8 times than that in control group. GFP positive cells of CCSP-CreER-GFP mice differentiated to two groups, which were proximal bronchial epithelial cells and distal bronchial epithelial cells. These were controlled by TGF $\beta$  signal pathway. As cell implantation model, we administered clodronate intra-tracheally to delete macrophages, which phagocyte implanted cells. By clodronate, the number of macrophages in the lung was reduced.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：細胞シート 気道狭窄

1. 研究開始当初の背景

1) 細胞シートによる難治性良性気道狭窄の新たな治療法の開発および治療課程における細胞シートの有用性

気道においては、临床上困難な疾患として、難治性良性気道狭窄がある。小児の声門下狭窄や、成人の気管切開後や肺癌、肺移植手術後における気道狭窄症に対しては、発症頻度が高いにもかかわらず、治療が確立していない。通常はレーザーで焼灼を行うが、肉芽形成を繰り返し、ステントは長期生存に対しての材料の劣化や刺激による肉芽のさらなる増生、感染症などの理由により、選択されることは少ない。手術も選択し得るが、手術のリスクと再狭窄が問題となる。

2) 肺前駆細胞の解析と重症肺疾患への新たな細胞治療の開発

末梢肺における再生は未だ遅れている。とくに近年、embryonic stem cell や induced pluripotent stem cells などが注目されているが、肺の再生はいまだに難しい。そのためには、肺前駆細胞の抽出と特徴の解明、そして ES 細胞、iPS 細胞からの肺組織細胞の作製ならびに治療法の開発が臨床応用を目指す上では非常に重要である。

2. 研究の目的

1) 細胞シートは、食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄に対して狭窄防止の効果が見られ、臨床試験が行われている。これを気管気管支の難治性狭窄に使用することで、実際的な治療法を開発する。また、期間の治療過程への効果を確認する。

2) 肺前駆細胞の特性を解明し、疾患モデル(肺線維症、肺気腫)を用いて、重症肺疾患への治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

1) a. 20 週齢 Rabbit を用いて、気管切開後、擦過法を用いて気管狭窄モデルの作製を行った。この狭窄モデルに対して、皮膚線維芽細胞を用いた細胞シートを作製し、擦過直後に気管内に細胞シートを貼付し、CT および組織学的検討を行った。

b. 12 週齢 Fischer ラット気管切開モデルを用い、Fischer ラットより採取し、Primary culture した皮膚線維芽細胞を細胞シートとして作製し、気管切開部へ 4 枚貼付した。コントロール群として、細胞シートを用いない群と比較検討した。組織学的、力学的検討を行った。

2) CCSP(Clara cell specific protein)-CreER-GFP マウスを用いて、CCSP 発現細胞の肺前駆細胞としての役割の解析を行った。CCSP-CreER-GFP より GFP 陽性細胞を抽出し、Matrigel で培養し、増殖、分化の評価を行った。また、経気道的投与を行うため、まずは経気道的にマクロファージをなくす、Chrodrionate を投与し、細胞

を投与するモデルを作製した。

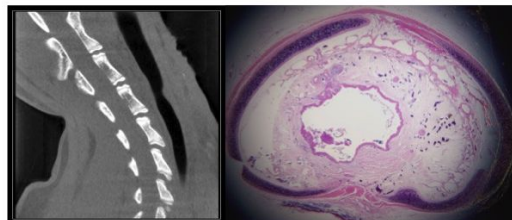
4. 研究成果

1) a. 狭窄は 1 週間から 10 日で約 50% 狭窄となった。しかし、生存率は低く、50% 程度であった。これに対して、細胞シートを貼付した。20 週齢雄ラビットに対して、ブラシを挿入し、10 回擦過後に、3 週間培養後の線維芽細胞シートを気管擦過部に貼付した。コントロール群として、擦過のみの群も作製した。結果では、狭窄改善効果として、組織学的に細胞シート群に狭窄改善効果がみられた。しかし、その程度は、効果がみられるもの、効果が見られないものなど改善効果に安定性がなく、評価が困難であった。

### 細胞シート移植

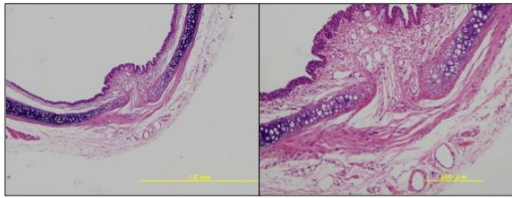


### 気管狭窄モデル(ラビット)

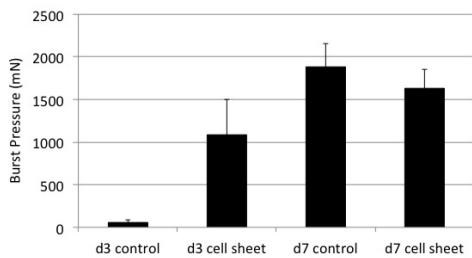


b. Burst pressure test にて強度を測定した。Day7 では、細胞シート群とコントロール群間で差はみられなかった。コントロール群において、すでに線維芽細胞の増殖と創傷治癒が進行し、組織学的にも細胞シート群と相違がみられなかった。また、Burst pressure test では、膜様部が損傷するため、膜様部以上の強度が創部に得られたことが証明された。しかしながら、細胞シート群とコントロール群に差はみられなかった。Day3 では、組織学的に細胞シートによる創部の閉鎖がみられ、周囲の線維芽細胞増殖も多く見られた。また、Burst pressure では、コントロール群と比較し、細胞シート群では Burst pressure において、約 8 倍の強度が得られた。

## 細胞シート群

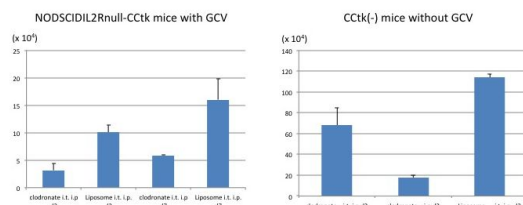


## Burst pressure



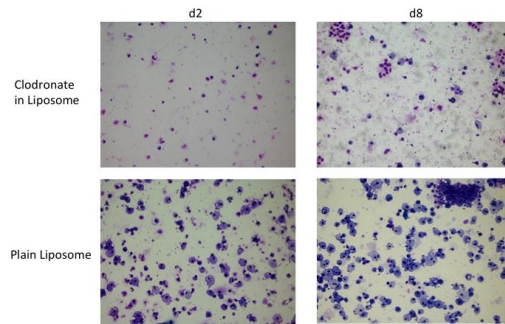
2) CCSP(Clara cell specific protein)-CreER-GFP マウスを用いて、CCSP 発現細胞の肺前駆細胞としての役割の解析を行った。CCSP-CreER-GFP より GFP 陽性細胞を抽出し、Matrigel で培養し、増殖、分化の評価を行った。Matrigel にて培養された CCSP-GFP 細胞は、増殖しコロニーを形成した。コロニーには 2 通りあり、Ball type と Branchied type がみ Ball type では、BrdU 陽性細胞が多く見られ、増殖細胞が多く見られた。逆に Branched type では増殖細胞数が少なかった。これらは、SB-431542 投与により、より Ball type が多く見られた。このことから、コロニーの増殖は TGF により抑制されていることが証明された。一方で、構成細胞にも差がみられた。Ball type では CCSP 陽性細胞、FoxJ1 陽性細胞が多く見られた。Branched type では、SP-C(Surfactant protein C)陽性細胞が多く見られた。つまり、Ball type コロニーでは、気道の中樞細胞へと分化し、Branched type では、末梢気道細胞へと分化がみられた。つまり、CCSP 陽性細胞は、両方の細胞への分化能を持ち、それらは TGF にてコントロールされていることが確認された。

Cell number in lavage after liposome injection



胞は、両方の細胞への分化能を持ち、それらは TGF にてコントロールされていることが確認された。経気道的投与を行うため、まずは経気道的に

Lavage of NODSCIDIL2Rnull-CCTk d2 and d8 after Clodronate and Plain liposome injection



Chrodronate を投与し、肺内マクロファージを減ずることが可能であった。これを用いて、気道上皮細胞損傷モデルと合わせ、前駆細胞の経気道的投与モデルを作製することが出来た。

## 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)  
現在投稿準備中。

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

松本 桂太郎 (MATSUMOTO, Keitaro)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・講師

研究者番号：80404268

(2)研究分担者

土谷 智史 (TSUCHIYA, Tomoshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
准教授 研究者番号：30437884

山崎 直哉 (YAMASAKI, Naoya)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
准教授 研究者番号：70404217

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
教授 研究者番号：80284686

(3)研究協力者

田浦 康明 (TAURA, Yasuaki)  
長崎大学・病院 (医学系)・助教