

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893034

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた肺再生・成長の解析

研究課題名(英文) The examination of compensatory lung growth utilizing transgenic mice

研究代表者

尹 貴正 (Yun, Takamasa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80710491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト臨床における肺切除後の代償性肺成長(CLG)を画像的に評価してきた。マウス左肺全摘モデルを作成し、経時的な右肺の形態学的解析、画像解析、遺伝子発現解析を行った。右肺の湿重量は経時的に増大し、特に心臓葉で顕著であった。また、肺容積、仮想肺組織量も同様に増加傾向を示した。組織学的肺胞密度は低下し、画像的密度と相関していた。細胞増殖、血管新生に関連する遺伝子群が、術後早期で発現増強しており、特に心臓葉で顕著であった。肺胞の新生・分化に関する遺伝子群はほとんど変化しなかった。仮想肺組織量は臨床的CLGの評価に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We recently developed the way of evaluation for lung weight using radiologic analysis in post-pulmonary resection adult human. In this study, we serially evaluated morphologic, radiologic and genomic status during CLG in pneumonectomized mice. After left pneumectomy, the right lung progressively enlarged both in volume and weight during observation period. Estimated weight also increased associated with the real volume. Among the lobes, the cardiac lobe markedly increased in size. The alveolar density was always lower in pneumonectomized mice than in sham controls. Microarray analysis revealed that multiple genes related to proliferation (but not specific alveolar development) were initially upregulated and then returned to normal after 30 day. The morphologic and genomic changes were more evident in the cardiac lobe than in the upper lobe. During CLG, morphologic, radiologic and genomic changes were related to each other in pneumonectomized mice.

研究分野：胸部外科

キーワード：代償性肺成長

### 1. 研究開始当初の背景

肺は一般的には再生しない臓器として知られている。肺の再生医療に関する研究は、その生物学的・構造的特徴から他臓器に比べ大幅に後れている。現段階では肺移植が慢性難治性肺疾患患者に対する唯一の根治的治療であるが、その症例数は十分でなく、他の固形臓器移植と比較して予後不良であり、肺移植の予後の改善と並行して肺の再生技術に対する期待は高い。

肺は構成細胞の種類や機能が多岐にわたるため、臓器としての再生は困難とされているが、肺切除後の残存肺が欠損を補うように容積・蛋白量・組織量、DNA量が増える現象が動物実験で証明され、肺切除後の代償性肺成長 (Compensatory Lung Growth: CLG) と呼ばれている。動物実験では、肺切除により生じる機械的牽引、肺環流血流量の増加の影響などが一因ではないかと考えられており、また肺再生を促すサイトカインや増殖因子 (レチノイン酸、Hepatocyte growth factor (HGF)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Keratinocyte growth factor (KGF)、Thyroid transcription factor (TTF-1)) も数多く報告されている。

動物やヒトにおいて、成熟した大人の肺を移植した場合、体の成長とともに移植肺も成長することが報告されており、成熟した個体においても、ある特殊な環境が整っていれば、既存の肺組織が成長する可能性は十分に秘めている。

ヒトにおける代償性肺成長も報告されている。肺癌にて右肺全摘を施行された33歳女性が、以降15年間にわたり、CT画像で肺容積と肺密度の増加を示し、超偏極He3ガスを用いたMRIでは、肺胞数の増加を示したと報告されている。[N Engl J Med. 2012]

しかしこの現象は動物種により大きく異なり、かつ成熟した個体では起こりにくく、その分子機序については不明な点が多く残さ

れている。我々は肺再生医療の実現を目指し、まず術後肺に着目し、肺切除後の残存肺における肺胞組織の再生・修復を目的とした基礎研究に着手している。

### 2. 研究の目的

我々はヒト生体肺移植ドナー、原発性肺癌における肺切除後のCLGを画像的に肺容積、仮想肺組織量 (Radiologic Lung Weight: RLW) として評価してきた [J Thorac Cardiovasc Surg. 2013] [Surg Today. 2014]。また、ラット左肺全摘モデルにおける網羅的遺伝子発現解析でCLGの機序について研究してきた [J Thorac Cardiovasc Surg. 2012]。

CLG現象が既に証明されているマウスにおいて (1) ヒト臨床で検証した仮想肺重量が関連することを証明する、(2) ラットでは血管・神経・胸膜など肺の支持組織の増殖が主体であったCLG関連遺伝子変化をマウスにて検証する、ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 左全摘後残存肺 (右肺) の形態学的解析および遺伝子発現解析

#### (1) 手術

成体マウスC57BL/6 (9週齢) 4匹 (+2匹) に対してイソフルラン吸入による全身麻酔下に気管内挿管を施行し、人工呼吸器管理を行う。左第4肋間で開胸し、左肺門を5-0ナイロン一括処理により左肺を切除する全摘群 (PNX群) を作成する。摘出した左肺は凍結標本として保存する。

コントロール群としてSham operation群 (Sham群) 4匹 (+2匹) では同様の手技で開胸を行い、肺の切除は行わずに閉胸する。

#### (2) 肺湿重量

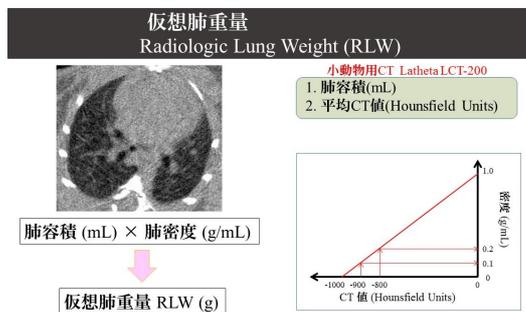
左肺全摘後3日、7日、30日後に、胸部CTを撮影した後、マウスにケタミン (100mg/kg) ・キシラジン (100mg/kg) を腹腔内注射した後、胸

骨正中切開で開胸し上大静脈を切開し脱血死させる。右肺を摘出し、lobeごとの肺湿重量を測定し2群間で比較する。肺湿重量はマウスの体重で補正を行った。

### (3) 画像解析

左肺全摘後3日、7日、30日後に、胸部CTを撮影する。CT画像データを用い、画像解析ソフトで肺容積、CT値、仮想肺組織量を測定する。非侵襲的に経時的な肺の評価を行い、病理組織像との比較を行う。

RLWの計算根拠、計算方法：仮想肺組織密度の計測を必要とする。水(密度 1g/mL)のCT値は0HU(Hounsfield Unit)であり、空気(密度 0g/ml)のCT値は-1000HUである。物質の実際の密度とCT値との間にリニアな関係があるという仮説が成り立つのであれば、平均密度は(1000+平均CT値)/1000の式で計測可能となる。CT画像解析ソフトで平均CT値および肺容積を測定する。肺の平均組織密度は、(1000+ )/1000となり、仮想肺組織量は、×で計算可能である。同様の手法は、急性呼吸促進症候群の重症度定量法(Lung Weight)としてARDS Definition Task Force, Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition.に報告されている[JAMA 2012;307: 2526.]。



### (4) 肺胞壁間距離(組織学的肺胞密度)

10%ホルマリンを15cm水柱の圧で気管から注入後、気管を結紮して固定。パラフィン包埋後、5μmに薄切した組織をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行う。肺胞壁間距離を測

定し、肺胞腔の大きさ、肺胞数を比較する。肺胞壁間距離(Lm) = 全長/肺胞壁と直線の交差数(長さがわかっているラインを引き、肺胞壁との交点を数える)。肺胞壁間距離は肺胞密度と関連がある。

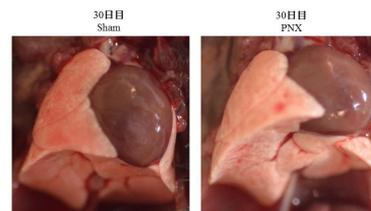
### (5) 遺伝子発現解析

全摘群の右肺上葉、心臓葉よりRNAを抽出し、マイクロアレイにより遺伝子発現に関して、あらかじめ切除していた左肺をコントロールとして網羅的遺伝子発現解析を行う。2倍以上、もしくは1/2以下に発現が変化した遺伝子をリストアップし、Gene Ontology解析、Pathway解析を行い、どのような遺伝子群の発現が有意に変化していたかを解析する。

## 4. 研究成果

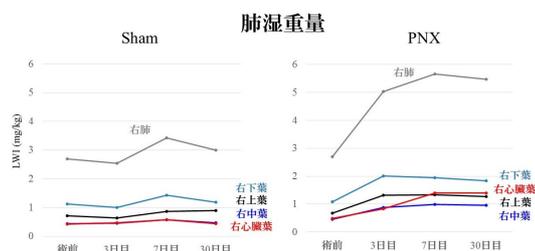
### (1) 形態学的変化

肉眼所見では、30日目のSham群と比べPNX群では残存右肺、縦隔-が左に偏位していた。また、残存右肺はSham群と比較し、PNX群の方が大きく膨張していた。



### (2) 肺湿重量

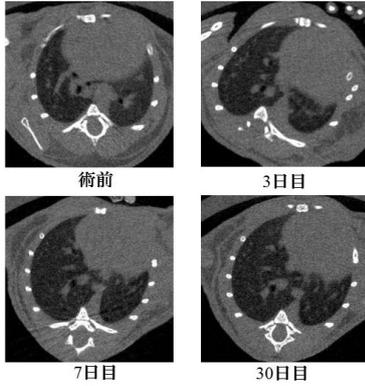
右肺全体での肺湿重量はSham群では3日目、7日目、30日目とほとんど変化を認めなかったが、PNX群では経時的に増加を認めた。また、lobeごとの湿重量もPNX群では経時的に増加を認め、特に心臓葉の増加が顕著であった。心臓葉には機械的牽引力が最も強く働く影響が考えられた。



### (3) 画像解析

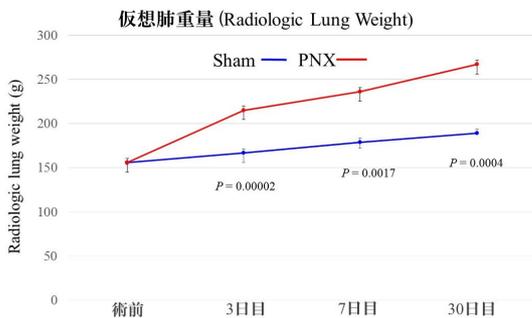
#### 肺容積

PNX 群、Sham 群ともに、3 日目、7 日目、30 日目と肺容積は経時的に増加した。3 日目、7 日目、30 日目の全てにおいて PNX 群の方が Sham 群と比較して有意に肺容積は大きい傾向にあった。



#### 仮想肺組織量

PNX 群、Sham 群ともに、3 日目、7 日目、30 日目と仮想肺組織量は経時的に増加した。3 日目、7 日目、30 日目の全てにおいて PNX 群の方が Sham 群と比較して有意に仮想肺組織量は大きい傾向にあった。仮想肺重量は臨床的 CLG の評価に応用できる可能性が示唆された。



### (4) 肺胞壁間距離 (組織学的肺胞密度)

HE染色における肺胞壁間距離ではSham群に比べPNX群で大きい傾向があり、PNX群の方がSham群と比較して肺胞腔が拡大していた。



### (5) 遺伝子発現解析

左肺に対して右肺上葉、右肺心臓葉で2倍以上に増加した遺伝子に対して、各期間において Gene Ontology解析、Pathway解析を行った。Cell proliferation, Cell division, Cell cycle, Cell differentiation などの細胞増殖に関わる遺伝子群、Angiogenesis, Vasculature developmentなど血管新生に関わる遺伝子群が術後3日目の右心臓、術後7日の右肺上葉、心臓葉では発現増強したが、術後30日目はほとんど発現を認めず収束した。また、神経・胸膜の発生・分化に関する遺伝子群の遺伝子発現増強を若干認めたが、Lung alveolus development など肺胞の新生・分化に関わる遺伝子群は増強を認めなかった。マウス肺全摘モデルで術後早期のCLGが確認されたが、我々のラットにおける研究と同様にマウスCLGにおける肺胞新生は示唆されなかった。

#### 遺伝子発現解析

Gene set	P-value					
	3日目		7日目		30日目	
	右上葉	右心臓葉	右上葉	右心臓葉	右上葉	右心臓葉
Cell division	-	$7.62 \times 10^{-13}$	$5.97 \times 10^{-2}$	$3.48 \times 10^{-18}$	-	-
Cell cycle	-	$1.47 \times 10^{-17}$	$4.77 \times 10^{-2}$	$7.38 \times 10^{-21}$	-	-
Cell proliferation	-	$3.42 \times 10^{-4}$	-	-	-	-
Cell differentiation	-	$2.36 \times 10^{-3}$	$8.58 \times 10^{-2}$	-	-	$2.62 \times 10^{-2}$
Angiogenesis	-	$1.02 \times 10^{-3}$	-	$1.26 \times 10^{-2}$	-	-
Vasculature development	-	$3.47 \times 10^{-5}$	$4.26 \times 10^{-3}$	$1.40 \times 10^{-3}$	-	$8.70 \times 10^{-2}$

	3日目		7日目		30日目	
	右上葉	右心臓葉	右上葉	右心臓葉	右上葉	右心臓葉
肺胞						
<i>Nkx2-1</i>	0.71	0.61	0.62	0.63	1.03	0.95
<i>Gata6</i>	0.99	1.26	1.01	1.03	0.81	0.91
<i>Slpc</i>	0.81	0.77	0.87	0.90	0.91	0.84
胸膜						
<i>Msln</i>	1.03	16.7	0.58	1.54	1.39	1.65
血管						
<i>Fgf9</i>	3.49	7.98	3.36	5.37	2.54	4.29
<i>Il1b</i>	22.6	19.7	12.7	9.69	6.20	8.79
<i>MMP-9</i>	37.6	33.9	14.4	4.86	4.97	6.77
<i>Timp-1</i>	6.95	27.6	5.48	14.7	1.78	2.95
神経						
<i>Prph</i>	2.65	1.75	0.99	0.91	0.95	0.76
<i>Isl1</i>	0.34	0.29	1.01	0.89	0.97	0.78
<i>Sox6</i>	0.59	1.40	2.60	1.44	0.97	1.26

## 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)

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  
 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年5月14日~15日. かがわ国際会議場. (香川県 高松市)

[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

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

尹 貴正 (YUN Takamasa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 80710491

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

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

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

溝淵 輝明 (MIZOBUCHI Teruaki)

日産厚生会 玉川病院・呼吸器外科 副部長

研究者番号: 50569861

岩田 剛和 (IWATA Takekazu)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 30586681

鈴木 秀海 (SUZUKI Hidemi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 60422226