

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：86403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462127

研究課題名(和文)胎生期肺組織移植による肺線維症治療の実験的検討 - 豚肺線維症モデルを用いて -

研究課題名(英文)Fetal lung fragments implantation into fibrotic lung of a pig model

研究代表者

先山 正二 (SAKIYAMA, Shoji)

独立行政法人国立病院機構高知病院(臨床研究部)・副院長室・副院長

研究者番号：60291986

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)：胎生期肺組織の成体肺移植においてマウス、ラットおよび豚においてそれぞれの種において移植片は正常成体肺内に生着、分化することを認めた。ただし、生着した胎生期肺組織の分化の速度はそれぞれの種における胎生期の肺の分化、成長のスピードに依存していると考えられる。移植後にglucocorticoidを投与すると移植した胎生期肺組織ではコントロールと比較してエラスチンが増加し、生着・分化が促進した。病的肺への胎生期肺組織移植ではラット肺線維症モデルでは生着を証明できたが、豚においては実証に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：One of the approaches to lung regeneration and repair, we have noticed to use fetal lung tissues having great potential to further grow and differentiate, and made an experimental model. In the research of fetal lung tissues implantation into normal adult lungs, we showed that implanted fetal tissues were able to live and grow in adult lung using mouse, rat and pig model. The speed of differentiation and growth of implanted fetal tissues depends on the kind. Speed of the growth and differentiation is slower in the pigs than the rodents. Administration of glucocorticoid to recipients after fetal lung tissues implantation facilitated the development and growth of implanted fetal lung tissues. The quantity of elastin in implanted fetal tissues was increased by glucocorticoid. These effects depended on the duration of the glucocorticoid use. Although fetal lung tissue could survive and differentiate in the fibrotic lung in the rats, in the pig model the matter has not been proved yet.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺の再生 胎生期肺 肺組織移植 肺線維症 豚 ラット ステロイド

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。

今回のプロジェクトは、我々のこれまで行ってきたラット、マウスおよび豚での実験結果に基づいて行う、胎生期組織肺移植の肺線維症における臨床応用への可能性と問題点を探る研究として開始した。その過程で複数の付随研究を行った。

2. 研究の目的

これまで我々が行ってきた胎生期肺組織移植が大動物である豚で可能であるかどうか、さらに病的肺である肺線維症モデルの作成の可能性と問題点を探り、モデル作成が可能であれば、病的肺内に胎生期肺組織を移植し、(1) 気管支鏡を用いて胎仔肺組織を経気道的にレシピエント肺に投与 (injection) し線維症肺への経気道的デリバリーの可能性を検討する。(2) 胎仔肺組織移植により、線維症肺の肺機能の改善について検討する。(3) 経気道的投与により惹起される合併症の推察と観察を行うこととした。また、豚での実験がうまく進まない場合には適宜、ラッ

トやマウスを用いた関連実験を行い、包括的に肺の再生における胎生期組織移植の意義について考察した。

3. 研究の方法

移植胎仔肺組織の正常肺、線維症肺への移植 (豚) 全身麻酔下に妊娠豚を犠牲死させ、胎齢 60 日の豚胎仔肺組織を採取し、採取した末梢肺組織を DMEM 培地で細切した。18 ゲージ針を通して細切した移植用胎仔肺組織を生体肺内に注入移植する準備を行った。

胎仔肺組織を全身麻酔下 (気道内挿管、GOS +Pbr 麻酔) の生体豚の左肺に開胸下に移植する。肺表面より肺実質内に、胎仔肺組織浮遊液を肺内に注入した。移植後は移植日より免疫抑制剤 (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) を投与した。

肺線維症モデルの作成は、全身麻酔下に気管支鏡下に、レシピエント豚 (体重約 25kg) の左肺にプレオマイシンを経気道的に散布し作成予定であった。噴霧には当科において開発した噴霧カテーテルを用いて、気管支鏡のチャンネル孔より噴霧カテーテルを挿入し、左肺気管支から末梢肺内にプレオマイシンを散布する計画であった。(結果的に、豚では気道内に投与したプレオマイシンの研究者、介助者および動物飼育員への暴露対策の問題が解決できず、豚での肺線維症モデルの作成に至らなかった。)

(ラット) 胎齢 17 日の LEW ラット肺を DMEM 培地内で細切した。レシピエントラットは、挿管、全身麻酔下に左開胸した。左肺に臍側胸膜表より 18G 針を用いて、胎仔肺組織を成体肺内に注入移植した。

ラット肺線維症モデルは、LEW ラット (8~

10W)の気管に経皮的に細径チューブを留置し、総量4.5mg/Kgのプレオマイシンをチューブより分割投与することにより作成した。プレオマイシン投与後3から4週後にこれらのラットをレシピエントとして用いた。

胎性期肺組織移植片に及ぼすステロイドの影響に関する検討

本研究はラットを用いて行った。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、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(Exp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と、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。

移植した胎性期肺組織移植片の気道系の分化とbranchingの検討

ラット胎仔肺移植モデルにおいて、成体肺内に移植した胎仔肺組織の気道系の分化とbranchingについて検討した。胎齢17日齢のLEWラット(ドナー)の胎仔肺を採取し、気管や主気管支を可及的に除去し、胎仔肺をDMEM培地内で細切し、これを成体LEWラット(レシピエント)の左肺内に人工呼吸管理下に左開胸し注入移植した。移植直後、1、2および4週後にレシピエントを犠牲死させ、肺を摘出しH&E、TTF-1、Surfactant Protein(SP)-A、SP-C、FGFR-2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branchingをリファレンスとした。

4. 研究成果

胎性期肺組織移植

豚における胎性期肺組織移植においては、大動物においても胎生期肺組織は成体肺内に生着し、分化することを示した。Allograft combinationでは、移植組織の生着の継続のためには嚴重な免疫抑制が必要である。ラットの場合と比較して、豚の移植肺組織の移植後の分化はゆっくりしており、種本来の当該組織の分化スピードに依存していると考えられる。

今回は豚において肺線維症モデルを作成することを試みたが、作成に至らなかった。その主な原因は、豚では経気道的にプレオマイシンを投与した後の咳嗽などによる、研究者や動物飼育管理者への有効な暴露防止対策を確立できなかったことによる。

胎性期肺組織移植片に及ぼすステロイドの影響

(実験 I) 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、E 群は 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。

Glucocorticoid の投与により移植日した胎性期肺組織由来の肺胞レベルでのエラスチンの発現増強が認められた。

(実験 II) ベタメタゾンの 2 日間投与と 7 日間投与の比較では、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。結論として glucocorticoid のレシピエントへの投与は、成体肺に移植した胎性期肺組織の生着・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。

胎性期肺組織移植片の気道系の分化と branching の検討

細切して移植した組織片は、局所で一塊となり癒合して存在していた。成体肺内において移植後 1 週から 4 週にかけて経時的に細気管支、肺泡道、肺胞の形成が認められ、FGFR-2 はこれらの領域に広く発現し、TTF は分岐部、気道成長先端部に主な発現が認められた。肺胞領域には SP-A および SP-C の発現が認められた。ドナー肺はレシピエント肺と主に肺胞レベルで癒合が認められた。これらの気道

系の形成には胎齢 17 日の肺組織で多く認められた peripheral epithelial buds が関与していると考えられた。結論として移植した胎性期肺組織は成体肺内で分化し、末梢気道の branching も認められた。考察として RJ Metzger (Nature 2008) の、胎性期発生段階での肺内気道の分岐に関する報告は、気管支分岐のパターンが基本的な 3 つの分岐パターンの組み合わせで構成される (subroutine coupling) ことが示された。また、近年の分子生物学的解析手法の進歩により、胎性期において肺の発生、成長の過程で成長してゆく気道、気管支の先端部分およびその側方における娘枝の分岐には、間質組織における基質と気管支における気管支の分岐・成長を促進する因子と抑制因子が微小環境において相互作用することで、気管支の分岐が生ずることを示す知見が集積されつつある。この気管支の分岐における自発的・自己組織的パターン形成を説明する原理の一端は、1952 年に AM Turing により発表された拡散反応モデル (Turing モデル) により説明することができるのではないかと考える。このことは、我々の胎性期肺組織移植実験の知見で得られた移植胎性期肺組織の気管支の分岐パターンの検討結果に照らし合わせて考えると、移植した胎性期肺組織が成体肺内で生着し、気管支の分岐が成長とともに進む状況は、部分的にはあるが、正常の胎性期の分岐パターンを模している。胎性期の気道上皮と間質組織が同時に移植されることが重要であることを示している。ただし、肺胞レベルでの生着・分化と異なり、胎性期肺組織移植における気管支については、中枢から抹消へと気道本来の役割を期待することはできない。一連の実験にお

いては、移植する胎性期胎児肺を細切して用いるわけであるが、肺胞に関してはそれぞれが癒合し、さらにはレシピエントの肺胞と癒合し、血流に関してもレシピエントから血流があることを示したが、気管支に関しては移植時胎性期肺組織の細切片が一つのユニットとして生着し・成長する過程で局所的に統一性を欠いた状態で成長する可能性がある。

これまでのマウス、ラットおよび豚を用いた胎性期肺組織移植について総括すると、正常成体肺内へ移植した胎性期移植片は生着した場合、移植した肺組織は分化・成長する。成体肺内での移植した胎性期肺組織の分化は、局所的に正常の胎性期の発生・分化を模する。移植片の成体肺内での生着後の分化のスピードは、実験に用いた動物種の本来の分化・成長のスピードに依存すると考えられる。

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 1 件)

Uyama K, Sakiyama S, Yoshida M, MD, Kenzaki K, Toba H, Kawakami Y, Okumura K, Takizawa H, Kondo K and Tangoku A. Lung regeneration by fetal lung tissue implantation in a mouse pulmonary emphysema model J Med Invest, Vol. 63, No. 3-4, P. 182-186, 2016, doi 10.2152/jmi.63.182.

[学会発表](計 2 件)

S.Sakiyama, M.Yoshida, Y.Kawakami, K.Kenzaki, M.Tsuboi, K.Kajiura, Y.Nakagawa, H.Takizawa, K.Kondo, A.Tangoku. Lung regeneration: Glucocorticoid Administration facilitates differentiation of rat fetal lung fragments into adult rat lung parenchyma. The 2014 American Thoracic Society International Conference, 2014 年 5 月 16 日-21 日, San Diego Convention Center (USA)

先山正二、鳥羽博明、監崎孝一郎、坪井光弘、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

胎生期肺組織移植における気道系の分化と branching に関する検討
第 37 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
2014 年 4 月 14 日-15 日, 国立京都国際会館 (京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

先山 正二 (SAKIYAMA, Shoji)
独立行政法人国立病院機構高知病院 (臨床研究部)・副院長室・副院長
研究者番号: 60291986

(2) 研究分担者

滝沢 宏光 (TAKIZAWA, Hiromitsu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・准教授
研究者番号: 90332816

吉田 光輝 (YOSHIDA, Mitsuteru)
徳島大学・大学病院・講師
研究者番号: 30403710

川上 行奎 (KAWAKAMI, Yukikiyo)
徳島大学・大学病院・特任講師
研究者番号: 00596249

鳥羽 博明 (TOBA, Hiroaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・助教
研究者番号: 40403745

梶浦耕一郎 (KAJIURA, Koichiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・助教
研究者番号: 60596253

坪井 光弘 (TSUBOI, Mitsuhiro)
徳島大学・大学病院・助教
研究者番号: 10711872