

7. 肺胞の再生と治療への展望

石沢 興太 久保 裕司

Key words : 肺気腫, 骨髄由来幹細胞, 肺組織幹細胞, 増殖因子, 再生

(日老医誌 2007; 44: 79-82)

はじめに

多分化能を持つ幹細胞を用いて正常細胞や組織を再生させ、これを治療に応用する新しい医療“再生医療”が世界的に大きな注目を集めている。再生医療用の幹細胞として胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES cell) や成体幹細胞の利用が考えられている。ES細胞はその強力な多分化能ゆえ¹⁾²⁾、臨床応用への大きな可能性を秘めている。しかし実用化する上で、腫瘍化の危険性、免疫学的拒絶反応そして倫理的問題が大きな障壁となっている。成体幹細胞は我々身体の各臓器に存在すると考えられ、細胞の寿命や損傷による細胞減少時に新しい細胞を補給する役目を担っている。これまで成体幹細胞は限られた分化能のみを持つ細胞と考えられていた。しかし近年、骨髄に存在する成体幹細胞には、細胞系に依存しない分化能など、従来からは予期し得なかった能力の有ることが明らかにされた^{3)~7)}。肺においても骨髄由来幹細胞の多能性を示した報告が多数されている。マウスにおける骨髄移植のモデルでは造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) や間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) といった骨髄由来幹細胞が肺を構成する気管支上皮、肺胞上皮、肺毛細血管内皮、線維芽細胞に分化したと報告されている^{4)8)~10)}。また、ヒトにおいても性不一致の肺移植・骨髄移植症例の検討から、骨髄由来細胞が気管支上皮、肺胞上皮に分化した可能性が報告されている¹¹⁾¹²⁾。しかし、これらの骨髄由来細胞の組織細胞への分化にはまだまだ議論はつきない。

COPD に対する再生医療の可能性

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は慢性、持続性の閉塞性

換気障害を呈する疾患群であり、肺胞壁の破壊による肺気腫と過分泌を伴う中枢気道の慢性炎症による慢性気管支炎をその基本病態としている。成人肺は自発的に成長・再生はできないと考えられているので、COPDのなかでも肺気腫は進行性で不可逆的な疾患と考えられてきた。ところが1997年、Massaroらはエラストーゼ誘発性ラット肺気腫モデルにおいて、all-trans retinoic acid (ATRA) 投与により解剖学的・生理学的に改善が認められることを報告し¹³⁾、条件を整えば肺実質の再生が可能であることを示唆した。一方、最近の急性肺損傷モデルを用いた我々の研究により、骨髄由来幹細胞が炎症刺激により動員され、傷害部位に集積することを明らかにした⁸⁾。さらに骨髄由来幹細胞を抑制した状態で急性肺損傷を惹起すると、傷害後の修復機転がうまく働かず肺胞構築の破壊が生じることも判明した⁸⁾。骨髄由来細胞は多くの増殖因子を発現することも知られており、肺傷害後の肺実質の修復において骨髄由来細胞がなんらかの重要な役割を果たしていることを強く示唆していた。

そこで我々はこのような骨髄由来幹細胞または細胞増殖因子が肺気腫肺における肺実質の再生にも関与しているという仮定のもと検討を行った¹⁴⁾¹⁵⁾。

研究では、肺気腫肺の再生を促す因子として、ATRA、Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)、Hepatocyte growth factor (HGF) の三つを検討した。ATRAは肺の発達特に肺胞数の増加に重要な因子である¹³⁾。G-CSFは元来、顆粒球の遊走因子であり、顆粒球・マクロファージの成熟因子として知られているが¹⁶⁾、最近、G-CSFは骨髄由来幹細胞を含めた血球系および間葉系の骨髄細胞を末梢に動員する能力があることが明らかとなった¹⁷⁾¹⁸⁾。さらに、心筋梗塞モデルマウスを使った実験系において、G-CSF投与により骨髄由来幹細胞を動員することによって心筋再生が促進したと報告があり¹⁸⁾、我々はG-CSFを肺再生治療の候補とした。HGF

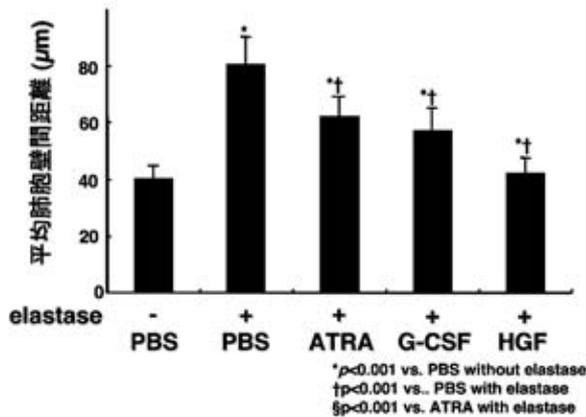
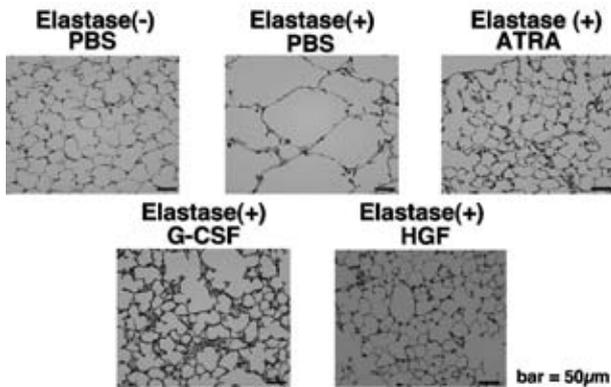


図1 ATRA・G-CSF・HGF投与による気腫肺の改善。ATRA・G-CSF・HGF投与により肺胞数が増加し気腫性変化が改善した。気腫性変化のパラメーターであるmean linear intercept (平均肺胞壁間距離)はATRA・G-CSF・HGF投与群において改善を示した。

は種々の細胞に作用し多彩な作用を示すサイトカインとして知られている¹⁹⁾²⁰⁾。HGFは血管内皮細胞の遊走・増殖を促し、強力な血管増生因子として知られている^{21)~23)}。また、HGFは肺切除後の代償的な肺組織の増殖・成長に関与しているとの報告があり²⁴⁾、再生治療の候補になると我々は考えた。これら三つの候補因子が肺再生に与える影響を、骨髄由来幹細胞の関与も含めて検討した。

骨髄由来細胞の動態を調べるため、骨髄細胞にマーカーを付けその分布を調べた。具体的には、C57BL/6マウスに放射線照射を行い、GFPトランスジェニックマウスの骨髄を移植した。この骨髄移植により、全身の臓器はGFP陰性であるが、骨髄細胞および末梢血中の骨髄由来細胞(主に血球成分)のみGFP陽性のキメラマウスが作成される。このキメラマウスでは、骨髄由来細胞の組織中の分布が、緑色の蛍光を発する細胞の分布として同定できる。

このGFPキメラマウスにエラストラーゼを経気道的に

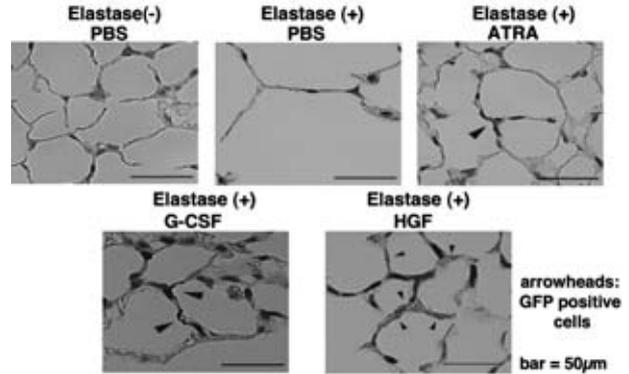


図2 再生した気腫肺に存在する骨髄由来細胞。GFPに対する免疫染色像。ATRA・G-CSF・HGF投与群において、肺胞壁に茶色に染まる扁平なGFP陽性細胞(矢印)が存在した。ATRA群に比しG-CSF・HGF投与群ではGFP陽性細胞が肺胞壁に増加していた。しかし、全ての肺胞が骨髄由来細胞で構築されているわけではなく、肺組織幹細胞も肺胞再構築に関与している。

投与し気腫性変化を惹起させた。その後、ATRA, G-CSF, HGFを投与し気腫性変化の改善度を調べた。ATRA投与は、これまでに報告されているとおり、気腫性変化を改善した(図1)。G-CSF投与群でもATRA投与群とほぼ同様に気腫性変化が改善した(図1)。HGF投与群では、ATRA・G-CSF投与群よりもさらに気腫性変化が改善しており、PBS群に比し90%もmean linear intercept (平均肺胞壁間距離)が改善していた(図1)。

この気腫肺の再生に骨髄由来細胞がどのように関わっているかを評価するため、抗GFP抗体を用い免疫染色を行った。コントロールマウスでは肺胞マクロファージや血管内に存在する白血球のみが陽性で肺胞壁にGFP陽性細胞は存在しなかった(図2)。一方、ATRA・G-CSF・HGF投与群の肺胞壁には扁平なGFP陽性細胞を認め、この数はG-CSF・HGF投与群において増加していた(図2)。これらのGFP陽性骨髄由来細胞は、上皮細胞マーカーとしてのCytokeratinまたは内皮細胞マーカーとしてのCD34が陽性であり、血球系マーカーであるCD45陰性であることから肺胞上皮または肺毛細血管内皮細胞に分化または細胞融合した骨髄細胞であると考えられた(図3)。さらに、骨髄由来幹細胞数はG-CSFやHGF投与により、末梢血中に約3倍に増加した。

以上の結果から、これまで報告のあったATRA以外にも、G-CSFやHGF投与によって肺気腫肺が再生することが明らかとなった。その機序として、G-CSFやHGF投与によって末梢に骨髄由来幹細胞が動員され、肺に集積し、それらの細胞が肺胞上皮細胞や肺毛細血管内皮細

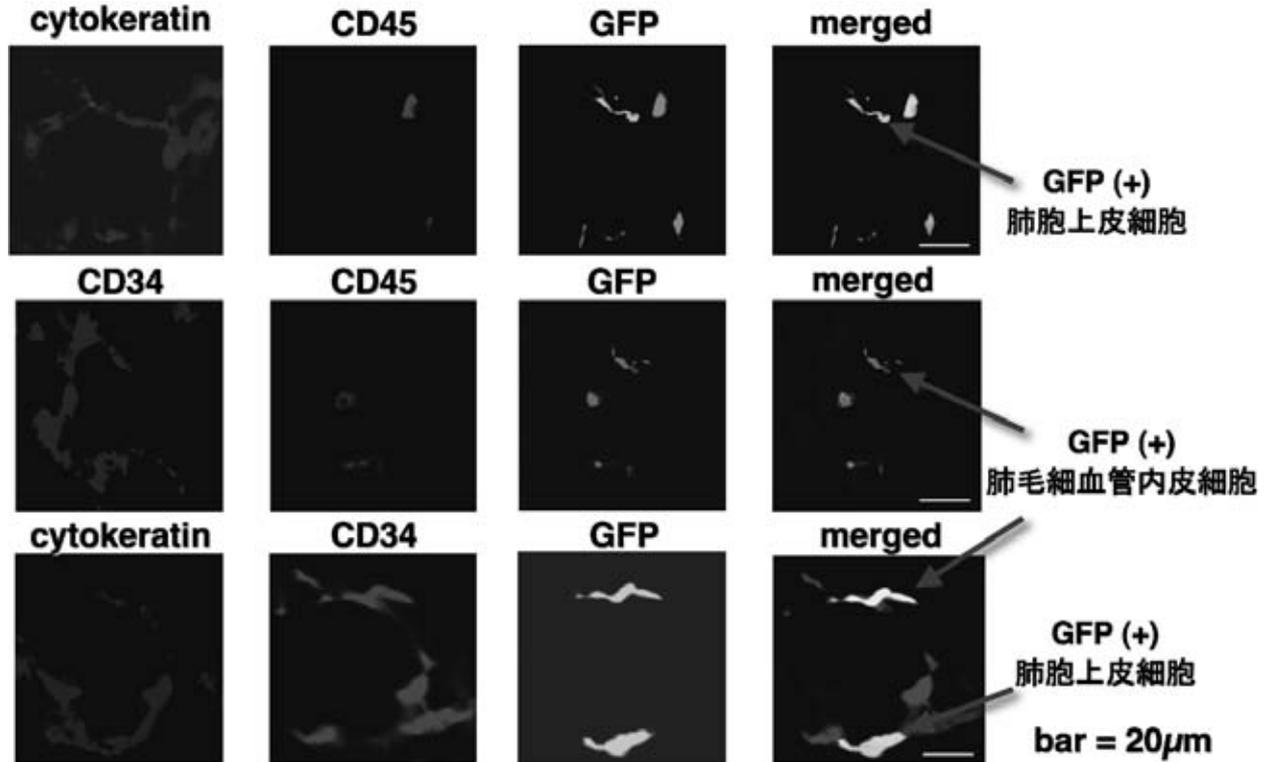


図3 再生した気腫肺で認めた骨髄由来の肺胞上皮・肺毛細血管内皮. Cytokeratin (上皮マーカー) または CD34 (内皮マーカー), CD45 (白血球マーカー), GFP. 再生した肺胞壁に肺胞上皮 (Cytokeratin +/CD45 -/GFP +) または肺毛細血管内皮 (CD34 +/CD45 -/GFP +) に分化または細胞融合した骨髄由来細胞を認める (矢印).

胞に分化, または細胞融合することによって肺気腫肺の再生が促進したと考えられた. また, HGF 投与群では G-CSF 投与群と肺胞壁に存在した GFP 陽性骨髄由来細胞の数がほぼ同程度であったにも関わらず, 肺気腫改善の程度が有意に高かった. このことから, HGF は肺固有の組織幹細胞・前駆細胞の増殖を促し肺の再生を促進させている可能性が考えられ, 肺再生の有力な薬剤となる可能性が示唆された.

肺再生医療の今後

以上の研究結果は, 条件がそろえば, 再生しないと考えられていた肺においても, 肺胞再構築が起こりうることを示している. この肺再生には肺組織固有に存在する幹細胞・前駆細胞とともに, 骨髄由来幹細胞の関与も示唆された. 今回の研究で, 傷害肺に集積した骨髄由来幹細胞が肺再生に貢献する機序としては次の三つが考えられる. ①肺胞上皮細胞や肺毛細血管内皮細胞に分化し, 肺実質細胞を補充する^{4)8)~10)}. ②肝臓等の他臓器で報告されているように, 傷害された肺組織細胞と融合することによって傷害細胞を救援する²⁵⁾²⁶⁾. ③増殖因子を産生し肺組織幹細胞の増殖を促す²⁷⁾. これらの機序により,

骨髄由来幹細胞は肺組織幹細胞と協調して肺再生を促進していると推測される.

また, 再生医療と遺伝子治療を組み合わせた方法の開発も重要と考えられる. 採取した骨髄由来幹細胞に HGF 等の増殖因子を遺伝子導入し生体内に戻すことによって, 肺に集積した骨髄由来幹細胞が遺伝子導入された増殖因子を放出し, 肺組織固有の幹細胞の増殖を刺激することによって, 肺の再生・修復を促進できる可能性がある.

今後, 骨髄由来幹細胞の遊走・集積の機序の研究, 肺固有の幹細胞・前駆細胞の増殖因子の研究, 遺伝子導入技術の開発を押し進めることによって COPD を含め肺の再生医療は実現可能になると思われる.

参考文献

- 1) Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
- 2) Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-7638.

- 3) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
- 4) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377.
- 5) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
- 6) Korblyng M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, et al: Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746.
- 7) Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, et al: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.
- 8) Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, et al: Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 2004; 172: 1266-1272.
- 9) Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al: Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8407-8411.
- 10) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH: Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004; 113: 243-252.
- 11) Kleeberger W, Versmold A, Rothamel T, Glöckner S, Brecht M, Haverich A, et al: Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury. *Am J Pathol* 2003; 162: 1487-1494.
- 12) Suratt BT, Cool CD, Serls AE, Chen L, Varella-Garcia M, Shpall EJ, et al: Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 318-322.
- 13) Massaro GD, Massaro D: Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 1997; 3: 675-677.
- 14) Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, et al: Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett* 2004; 556: 249-252.
- 15) Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al: Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 276-280.
- 16) Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al: Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994; 84: 1737-1746.
- 17) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-436.
- 18) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-10349.
- 19) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1450-1459.
- 20) Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 29: 209-248.
- 21) Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, et al: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992; 119: 629-641.
- 22) Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G: HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood* 2003; 101: 4816-4822.
- 23) Ono M, Sawa Y, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H: In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via the pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung. *Circulation* 2002; 106: 1264-269.
- 24) Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, Miyoshi S, Matsuda H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 525-533.
- 25) Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, et al: Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
- 26) Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL: Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-1169.
- 27) Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM: Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 2003; 19: 583-593.