

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10685

研究課題名(和文) 肺organoidを用いた肺細胞・組織移植による肺再生の試み

研究課題名(英文) The attempt for lung regeneration using lung organoid (lung cell and tissue transplantation)

研究代表者

川上 行奎 (KAWAKAMI, Yukikiyo)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：00596249

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)：ES細胞/iPS細胞から肺のorganoidを作成する技術が注目されたことと、肺organoidは胎生期肺組織に類似した細胞構成と組織構成を模倣していることから、障害肺への移植からの再生能力を考えた研究である。iPS細胞は継代維持の技術を安定化させることに時間を要し、同手技の安定化を得た。肺organoidは当初計画していた予想よりも作成が困難で、その間、マウス成体肺内への移植手技の確立のための小動物用麻酔器、人工呼吸器を整備(Harvard社とUniventor社)し、技術的な開胸手技や麻酔管理を鍛錬し技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺はその構成細胞の複雑さ故に再生が困難な臓器である。不可逆的な肺疾患(肺気腫、肺線維症など)において肺移植以外に臨床レベルで可能な肺の再生が可能となれば、社会にもたらす意義は大きい。またこのような研究系を通して、肺再生のメカニズムがさらに理解できれば、癌治療においても治癒の過程につながる微小環境が理解できる可能性も期待できる。その礎となるマウス処置の準備やiPS細胞の準備を整えておくことは、目的に大きくは近づくことができない結果となっても必ず、実験系統の一部として、また他の方法を介して、再生医療に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The technique which the lung organoid is made from ES cell / iPS cell is attracted an attention. The lung organoid imitates cellular composition and tissue composition which is similar embryonic lung tissue. We have taken the time for stabilizing the technology of the ips cell subculture and we got the stabilizing of this technology. The creating of lung organoid is difficult than expected therefore we have done our best for the establishment of the technology which we transplant the organoid in mouse lung. We have prepared the small animal anesthesia apparatus and ventilator. And we have established the stabilization of the management of thoracotomy technique and anesthesia.

研究分野：医歯薬学 呼吸器外科学

キーワード：胎生期肺組織 肺organoid 肺再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の研究の進歩は著しく、様々な組織や臓器において臨床応用をめざした研究が行われている。肺はその構成細胞の多さと構造の複雑性から、再生医療への応用が困難な領域である。現在、肺の再生(修復も含めて)へのアプローチとしては、レシピエントに骨髄細胞やII型肺胞上皮細胞等の細胞、KGF、HGF、FGF等の増殖因子を投与した報告や、脱細胞化した肺をスカホールドとして、気道上皮と血管内皮系細胞を生着・再分布させ、臓器移植を行う等の実験的検討はあるが、肺への胎生期肺組織移植としての取り組みは我々のグループ以外からの報告はない。

これまで我々のグループが行ってきた胎生期肺組織移植では、腺様期の胎生期肺組織が成体肺内に生着・分化することを示し、障害肺での肺胞レベルでの修復・再生の可能性を示してきた。

我々の胎生期肺組織移植をトランスレーショナルリサーチへとつなげてゆくには、細胞・組織ソースがネックであったが、ES細胞/iPS細胞を用いて肺organoidを作成する技術が可能となれば、これまでの我々の研究に大きなブレークスルーをもたらす。我々のこれまでにおこなってきた肺の再生へのアプローチに新たな知見をもたらす可能性が大きい。将来的には患者のHLAを考慮し、セルバンクのヒトiPSから肺organoidを作成し使用できるようになる可能性があるのではないかと考えている。

上記背景から、肺オルガノイドを用いた再生医療に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

このプロジェクトで、これまで我々の行ってきた胎生期肺組織移植で明らかにしてきた知見や実験上のノウハウを土台として、肺の再生における新たなアプローチの一つとなる可能性を示したい。

ラット/マウスを用いて、pluripotent embryonic stem cellsから3次元培養による肺のorganoid(細胞組織体)を作成し、この組織を用いて肺の組織修復・再生実験を行う。これまで我々は、胎生期肺組織に着目して、ラット/マウス/豚を用いて胎生期肺組織移植による肺の修復・再生の実験的検討を行い、移植した胎生期肺組織が成体肺内で生着し、増殖・分化することを明らかにしてきた。しかし、臨床応用の視点からは胎生期肺組織を得るのが難しく、そのブレークスルーが必要であると考えていた。そうしたところ、最近になりES細胞/iPS細胞から肺のorganoidを作成する技術が確立された。肺organoidは胎生期肺組織に類似した細胞構成と組織構成を模倣している。そこで今回は、肺organoidに着目して、肺organoidを利用した肺の再生・修復を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究はラットとマウスを用い次のような段階を踏んで実施する予定である。

第1段階: LEWラット胎生期肺から培養により肺organoidを作成し、ラット成体肺内への移植を行い生着・分化について検討する。

第2段階: C57/BL6マウス胎生期肺から肺organoidを作成し、上記と同様な検討を行う。

第3段階: マウスES細胞から培養により肺organoidを作成し、成体肺内への移植を行う。

第4段階: マウスiPS細胞から培養により肺organoidを作成し、成体肺内での生着・分化について検討する。以上よりES細胞/iPS細胞からの肺organoidを利用した肺の再生を行う。

### 4. 研究成果

これまでの我々の研究成果として、胎生期肺組織の(1)肺への分化の方向付けがなされている、(2)増殖能が旺盛である、(3)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、これまでに、胎生17日齢ラット胎仔肺を細切しnaïveな成体ラット左肺に移植することにより、次の点を明らかにした。胎仔肺組織が成体肺内に生着し、分化する。移植場所として肺という環境が増殖、分化には重要である。レシピエント肺と移植肺組織は肺胞レベルで気道、血管系の連絡を有する。胎仔肺は成体自己肺に比し、成体肺内に生着しやすい。換気によるmechanical stretchが強く加わる環境においては、移植胎仔肺の分化が促進される。ラットプレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、病的肺においても移植胎仔肺は生着し分化することを示した。さらに、雄性ラット胎仔肺組織を雌性ラット成体肺内に移植し、ドナー由来細胞をY染色体(FISH法)により同定すると、胎生期肺組織片は生着分化する過程で、肺胞レベルにおいてはレシピエントの肺胞と癒合し、移植片とレシピエントとの境界領域の肺胞では、ドナーとレシピエント双方由来の細胞により肺胞がモザイク状に形成されていることを認めた。

また、GFPラット由来の胎生期肺組織と同一系の正常ラット由来の胎生期肺組織を細切し、同時に成体ラットに移植すると、それぞれの移植片があたかもブロックが接合するように癒合

し、成体肺内に生着分化することを認めた。以上、これまでの研究成果である。

ES細胞/iPS細胞から肺のorganoidを作成する技術が注目されたことと、肺organoidは胎生期肺組織に類似した細胞構成と組織構成を模倣していることから、障害肺への移植からの再生能力を考えた研究であるが、肺organoidは当初計画していた予想よりも作成が困難であった。

しかしiPS細胞は継代維持の技術を安定化させ、この作業に時間を要し、同手技の安定化を得た。その間、マウス成体肺内への移植手技の確立のための小動物用麻酔器、人工呼吸器を整備(Harvard社とUniventor社)し、技術的な開胸手技や麻酔管理を鍛錬し技術を確立した。

動物愛護の倫理的観点も十分考慮し、鎮静、麻酔器に関してもマウス肺に極力負担をかけない装置と条件にて手術手技を施行する手技を鍛錬した。マウスを吸入麻酔(イソフルラン)下に、キシラジン(0.25mg/body)+ケタミン(0.25mg/body)にて鎮静(体重25gマウスにて)、経口挿管を施行、経口挿管はマウスの口腔内に光が入りにくいため、マイクロスコープを用いて、挿管する。即臥位にて開胸し、筋こうをマグネットの板にて引っ張るような装置でかけ安定させる。麻酔器の設定は、TV:220 $\mu$ l/回, RR=90回/分, PEEP 2cmH<sub>2</sub>Oにて右側臥位にて人工呼吸管理を施行する。麻酔濃度は2%イソフルランと20%酸素濃度のAirを混合して換気する。このような技術を安定化させることに今回時間を要した。

肺はその構成細胞の複雑さ故に再生が困難な臓器である。不可逆的な肺疾患(肺気腫、肺線維症など)において肺移植以外に臨床レベルで可能な肺の再生が可能となれば、社会にもたらす意義は大きい。またこのような研究系を通して、肺再生のメカニズムがさらに理解できれば、癌治療においても治癒の過程につながる微小環境が理解できる可能性も期待できる。その礎となるマウス処置の準備やiPS細胞の準備を整えておくことは、今回、目的に大きくは近づくことができない結果となっても必ず、実験系統の一部として、また他の方法を介して、再生医療に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	滝沢 宏光  (TAKIZAWA Hiromitsu)  (90332816)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授   (16101)	
研究分担者	鳥羽 博明  (TOBA Hiroaki)  (40403745)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教   (16101)	
研究分担者	吉田 光輝  (YOSHIDA Mitsuteru)  (30403710)	徳島大学・病院・講師   (16101)	
連携研究者	先山 正二  (SAKIYAMA Shoji)  (60291986)	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   (86403)	