

令和 2 年 9 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06274

研究課題名（和文）自己細胞を用いた新しい肺再生医療モデルの開発

研究課題名（英文）Development of a Lung Regeneration Model Using Autologous Cells

研究代表者

北野 健太郎（Kitano, Kentaro）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70647073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ミニブタモデルで自己細胞をもとに再生肺を構築し生体内でガス交換能を維持できるか検証することである。再生肺の構築のために我々は脱細胞化技術を用いた。レシピエントとなるブタの肺部分切除から得て培養した自家細胞を、ドナーブタから摘出し脱細胞化した肺に、配置して再生肺を構築した。得られた再生肺を用いてレシピエントに左片肺移植を行った。再生肺を移植されたブタは2時間生存し、その間の酸素ガス交換能は同種他家肺移植と同等であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患や間質性肺炎などの末期肺疾患は依然として生命予後の悪い疾患である。同種他家肺移植は末期肺疾患に対して唯一の望みのある治療法であるが、拒絶などの合併症の問題がある。そこで患者自身の細胞をもとに再生肺を構築し、それを移植することで末期肺疾患を克服できると考えた。本研究はブタという大動物モデルを用いて、自家細胞由来の再生肺を構築し、実際にレシピエントに肺移植を行ってガス交換能を検証した。本研究は、今後の肺再生研究において必要な課題を提示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to evaluate feasibility and in vivo function of bioengineered lung transplanted in the porcine model. We utilized decellularization technique. Porcine decellularized lung scaffolds were seeded with recipient-derived porcine auto-cells collected from lung tissue obtained by pulmonary wedge resection. The resulting grafts were unilaterally transplanted into porcine recipients. The pigs transplanted with bioengineered lungs survived for 2 hours. The oxygen gas exchange of bioengineered lung transplant was comparable to that of allograft transplant.

研究分野：医学

キーワード：再生医療 脱細胞化 肺再生 大動物モデル 肺移植 細胞分離 呼吸器外科 臓器再生

1. 研究開始当初の背景

重症呼吸器疾患患者に対する現時点ではほぼ唯一の根本治療は肺移植である。日本においてはドナー不足が深刻で、脳死肺移植を希望する患者は移植適応判定を受けた待機期間中に約 4 割が原病死している。また、肺移植後の患者の予後は、免疫抑制剤の使用に伴う重症感染症、あるいは現状の免疫抑制剤によっても回避することが困難な慢性移植肺機能不全に大きく影響される。従って免疫抑制の必要がない患者と遺伝的に同一の肺を人工的に再生することが重要な課題である。一つの戦略として患者自身の終末分化した体細胞から人工多能性幹細胞を経由し肺組織特異的な細胞への分化を誘導する研究がなされているが、現状では微小組織の大きさとどまり、臓器としての肺を形作るには至っていない。

本研究の描く最終目標は、他人の心臓死後の肺を脱細胞化処理することで得られた肺スカフォールドに、患者由来の細胞を 3 次元的に適切に配置することで、患者と遺伝的に矛盾のない臓器レベルの大きさの肺を短期間で再生する肺再生戦略である。肺スカフォールドは理論上、脳死ドナー由来でなくとも作成可能であることからドナー不足の心配は少なく、また患者由来の細胞を用いて呼吸機能を再生できれば拒絶反応を回避できることから、この戦略は重症呼吸器疾患患者に対する従来の肺移植医療を大きく転換させる究極の治療法となる可能性がある。本研究の具体的目標である、ブタ再生肺の生体内での長期ガス交換能が実現されれば、大動物モデルでこれまでにない成果であり、これまで理論上の可能性に過ぎなかった肺再生戦略を臨床応用へ押し進める大きな原動力となる。またこの動物モデルそのものが、肺胞の再生を検証することのできる生理環境を提供することができる。この結果、気道幹細胞である基底上皮細胞の再生において生体環境が果たす役割の理解がより進むことが見込まれる。

2. 研究の目的

慢性拒絶に代表される現在の肺移植医療の限界を越えるために、患者と遺伝的に同一の肺を再生することが重要な課題である。近年、他人の心臓死後の肺を脱細胞化処理することで得られた臓器の骨格（肺スカフォールド）に、患者由来の細胞を適切に配置（再細胞化）することで、患者と遺伝的に矛盾のない臓器レベルの大きさの肺を短期間で再生する戦略が提案された。肺胞を構成する 2 型肺胞上皮細胞は生体外で培養・作成することが困難であるため、これまで代表者は、気道の幹細胞である基底上皮細胞を使用し、不完全ながらも肺胞上皮の再生を試みた。再細胞化した肺（再生肺）のブタ生体に移植した際の短時間のガス交換能が示されたものの、長期間の機能は示されていない。

本研究の目的は、自己の細胞で構成された再生肺が、生体内で中長期的、具体的には 1~2 週間、ガス交換能を維持できるかを検証することである。また生体内の真に生理的な環境において、気道基底上皮細胞が肺胞上皮を再生または維持することができるかを問う。本研究によって、肺胞の成熟に生体環境が果たす役割を検証する基盤を作り、気道基底上皮細胞の再生能に関する理解を深めることを目指す。

3 . 研究の方法

本研究の目的達成のために我々は次の4つの事項を行った。1つ目は肺の脱細胞化を実現させることである。2つ目はブタの自己細胞を分離培養することである。3つ目は脱細胞化された肺スキャフォールドに、レシピエントの自己細胞由来の細胞を配置することである。4つ目は構築された再生肺を適切に移植させることである。

(1)肺の脱細胞化は既報の方法に則り、肺動脈からドデシル硫酸ナトリウムならびにトリトン X-100 を一方的に灌流する方法で行った[1]。脱細胞化処理された肺の組織染色や DNA 定量を通じて、適切な脱細胞化が行われているかを検証した。

(2)レシピエント自己細胞の分離培養を気道上皮系細胞である KRT5+p63+細胞と、血管内皮細胞である CD31+細胞についてそれぞれ行った。気道上皮系細胞である KRT5+p63+細胞は既報に沿って Small Airway Growth Media (SAGM)培地で培養を行いながら増殖させた[2]。血管内皮系である CD31+細胞は既報に沿って Magnetic-activated cell sorting 法を用いて分離培養させた[3]。それぞれの系統の細胞を培養増殖させた後に免疫染色ならびにフローサイトメトリーを行い、適切に特徴化され、目標とした細胞群が得られているかを検証した。

(3)脱細胞化された肺への自己細胞由来の細胞の配置は既報に則った方法で施行した[1]。最初に血管内皮系である CD31+細胞を肺血管から流して配置した。その後に気道から気道上皮系細胞である KRT5+p63+細胞を流して配置した。構築された肺組織の検討を行い、自己細胞が配置されているかを検討した。

(4)上記の手順で構築された再生肺を用いてレシピエントブタに対して左片肺移植を行った。移植後 1 時間ごとに血液ガスを採取してガス交換能を評価した。さらにコントロール群として同種他家肺移植、脱細胞化されただけの肺を移植する脱細胞肺移植群を設定し、ガス交換能について比較検討した。

4 . 研究成果

上記の方法に沿って結果を述べる。

(1)既報に沿った方法でブタ肺の脱細胞化を試みた。脱細胞化処理後の肺組織で細胞がほぼなくなったことを確認し、さらには肺の DNA 定量で細胞成分のないことを確認した。以上から適切な肺の脱細胞化がなされたと判断した。

(2)分離培養処理をして得られた細胞群について免疫染色ならびにフローサイトメトリーを行った。適切に KRT5+p63+細胞ならびに CD31+細胞を分離培養できたことを確認した。

(3)脱細胞化された肺に自己細胞の KRT5+p63+細胞ならびに CD31+細胞を配置した。配置後の肺の組織の検討を行い、細胞配置前にはみられなかった細胞群を配置後の肺組織で確認できた。さらに免疫染色で目的とする KRT5+p63+細胞ならびに CD31+細胞を確認し、自己細胞が配置されたことを確かめた。

(4)上記の手順で得られた再生肺を用いた左片肺移植を 3 件施行した。3 件全例でレシピエントブタは 2 時間生存した。同種他家肺移植も 3 件施行し、全例 2 時間生存した。一方で脱細胞肺移

植は2例施行したが、全例移植後30分以内に死亡した。再生肺移植群の酸素ガス交換能は同種他家肺移植群と比して同等の結果であった。しかしながら再生肺移植群は移植後の再換気直後から顕著な嚢胞性変化を認め、組織検査でも著しい胸膜損傷をきたしていた。原因としては細胞数の絶対的な不足と、脱細胞化に伴う細胞外マトリックスたんぱく質の喪失が考えられた。本研究は、今後の肺再生研究において必要な課題を提示した。

<引用文献>

1. Zhou H, Kitano K, Ren X, Rajab TK, Wu M, Gilpin SE, et al. Bioengineering human lung grafts on porcine matrix. *Ann Surg.* 2018; 267: 590-8.
2. Karp PH, Moninger TO, Weber SP, Nesselhauf TS, Launspach JL, Zabner J, et al. An in vitro model of differentiated human airway epithelia. *Methods for establishing primary cultures. Methods Mol Biol.* 2002; 188: 115-37.
3. Alphonse RS, Vadivel A, Zhong S, McConaghy S, Ohls R, Yoder MC, et al. The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs. *Nat Protoc.* 2015; 10: 697-708.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yanagiya Masahiro, Kitano Kentaro, Yotsumoto Takuma, Takai Daiya, Asahina Hiromichi, Nagayama Kazuhiro, Nakajima Jun | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Effect of normal saline flush injection into a bronchus on lung decellularization | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease | 6. 最初と最後の頁 5321 ~ 5327 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2019.11.59 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Yanagiya Masahiro, Kitano Kentaro, Yotsumoto Takuma, Asahina Hiromichi, Nagayama Kazuhiro, Nakajima Jun | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Transplantation of Bioengineered Lungs Created From Recipient-Derived Cells Into a Large Animal Model | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.semtcvs.2020.03.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 柳谷昌弘 北野健太郎 長山和弘 中島淳 |
| 2. 発表標題 肺再生モデル作成に必要なブタ気道上皮前駆細胞の分離培養の確立 |
| 3. 学会等名 第71回 日本胸部外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiro Yanagiya, Kentaro Kitano, Takuma Yotsumoto, Kazuhiro Nagayama, Jun Nakajima |
| 2. 発表標題 Effect of normal saline flush injection into bronchus on lung decellularization |
| 3. 学会等名 27th The Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柳谷昌弘 北野健太郎 長山和弘 中島淳 |
| 2. 発表標題 肺再生モデル作成に必要な、ブタ肺血管内皮前駆細胞の分離培養の確立 |
| 3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柳谷昌弘 北野健太郎 長山和弘 中島淳 |
| 2. 発表標題 肺再生モデル作成に必要なブタ気道上皮前駆細胞の分離培養の確立 |
| 3. 学会等名 第71回 日本胸部外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柳谷昌弘, 北野健太郎, 長山和弘, 四元拓真, 唐崎隆弘, 佐藤雅昭, 中島淳 |
| 2. 発表標題 部分切除肺より得た自家細胞をもとに作成した再生肺の移植の検討 |
| 3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masahiro Yanagiya, Kentaro Kitano, Takuma Yotsumoto, Kazuhiro Nagayama, Masaaki Sato, Jun Nakajima |
| 2. 発表標題 Transplantation of bioengineered lungs created from recipient-derived cells in a large-animal model |
| 3. 学会等名 The 27th European Conference on General Thoracic Surgery (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 柳谷昌弘 北野健太郎 長山和弘 佐藤雅昭 中島淳 |
| 2. 発表標題 脱細胞化技術を用いた肺再生構築の課題 |
| 3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔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 | 長山 和弘 (Nagayama Kazuhiro) (00647935) | 東京大学・医学部附属病院・病院診療医 (12601) | |
| 研究分担者 | 安樂 真樹 (Anraku Masaki) (70598557) | 東京大学・医学部附属病院・特定研究員 (12601) | |
| 研究分担者 | 垣見 和宏 (Kakimi Kazuhiro) (80273358) | 東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 中島 淳 (Nakajima Jun) (90188954) | 東京大学・医学部附属病院・教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 似鳥 純一 (Nitadori Jun-ichi) (40424486) | 東京大学・医学部附属病院・助教 (12601) | 削除：2018年7月12日 |