

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：82401
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2019～2020
課題番号：19K22630
研究課題名（和文）肺線維症で起こる損傷 再生 炎症 線維化プロセスを再現する肺胞オルガノイドの開発

研究課題名（英文）Developing alveolar organoid recapitulating injury-regeneration-inflammation-fibrosis

研究代表者
森本 充（Morimoto, Mitsuru）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70544344
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症（IPF）は肺胞の線維芽細胞が筋繊維化することでガス交換の効率を下げる疾患である。in vitro でIPFを再現できる実験系が求められていた。我々は、肺胞細胞の3次元培養法を改良し、IPFで起こる損傷 再生 線維化誘導のプロセスをin vitroで再現できる実験系の開発を試みた。上皮細胞の薬剤性障害からTgfb1等の繊維化誘導因子の発現、培養上清を使った肺線維芽細胞の筋繊維化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPFは加齢に伴って増加する疾患であり、超高齢化社会を迎える日本において今後より患者数が増加していると予想される。肺の繊維化は上皮の損傷-再生の慢性化に起因すると考えられ、そのプロセスは肺胞上皮細胞の障害に始まる。本研究で開発しているin vitroの肺線維症モデルが完成すれば、これまで行えなかった発症プロセスの検証や、将来的に予防薬の新規ターゲットの探索や化合物スクリーニングへの応用も考えられる。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a disease in which alveolar fibroblasts become myofibroblast, reducing the efficiency of gas exchange. There is a need for an experimental system that could reproduce IPF in vitro. We modulated the three-dimensional culture method of alveolar epithelial cells, known as alveolar organoid culture method. Using this culture system, we attempted to develop an experimental system reproducing the process of injury-regeneration-fibrosis induction in vitro that occurs in IPF in vivo. We succeeded in expressing fibrosis-inducing factors such as Tgfb1 into alveolar epithelial cells via drug-induced damage. Furthermore, incubation of lung fibroblasts with culture supernatant of the drug-damaged epithelial cells transformed to myofibroblasts.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：肺胞オルガノイド 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は肺泡の線維芽細胞が筋繊維化することで肺泡上皮細胞と毛細血管を介したガス交換の効率を下げる疾患であり、3 年生存率が 50% と大変予後が悪い。また本疾患は他臓器の線維症と同様、加齢に伴って増加することが知られており、超高齢化社会を迎える日本において今後より患者数が増加していくことが予想される。肺の繊維化は上皮の損傷-再生の慢性化に起因すると考えられ、そのプロセスは肺泡上皮細胞の障害に始まる。肺線維症のマウス実験モデルとしてプレオマイシンモデルが知られているが、個体レベルでは細胞間シグナル解析が難しく、*in vitro* の線維症モデルが求められている。しかし線維症は複雑であるため、*in vitro* では特定のステップに注目した解析にとどまっていた。

2. 研究の目的

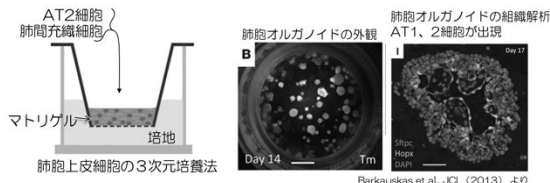
本研究の目的は、肺泡細胞の 3 次元培養法を改良して肺線維症の損傷 再生 炎症 線維化の一連のプロセスを試験管内で再現できる実験系を確立することである。

そのために肺線維症の発症プロセスである、上皮の損傷、II 型肺泡上皮細胞 (AT2 細胞) の増殖による再生、炎症系サイトカインの発現とマクロファージの M2 分化と誘引、上皮細胞とマクロファージ発現する Tgf や PDGF-A による線維芽細胞の増殖、線維化を *in vitro* で誘導することにした。

3. 研究の方法

肺泡オルガノイドは肺泡の幹細胞を使った上皮組織再生の *in vitro* モデルとして知られている (Barkauskas et al., JCI 2013)。

具体的には、マウス肺組織から単離した AT2 細胞と肺間充織細胞をマトリゲル中で 3D 培養することで、AT2 細胞の集合体がスフェア状に成長し、その内側に分化した 1 型肺泡上皮細胞 (AT1 細胞) が出現する (右図)。肺泡組織の構成細胞が封入されたこのスフェアを肺泡オルガノイドと呼ぶ。



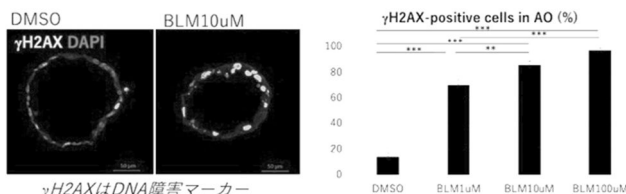
本研究では肺泡オルガノイド培養技術を土台として、より *in vivo* に近い *in vitro* 肺線維症モデルを作成する。そのために、AT2 細胞 (上皮)、PDGFR 陽性細胞 (線維芽細胞、ニッチ細胞)、マクロファージ (免疫細胞)、血管内皮細胞との共培養をそれぞれ挑戦する。

4. 研究成果

本研究の目的である、損傷 再生 炎症 線維化の一連のプロセスを試験管内で再現できる肺泡オルガノイド培養法を確立するため、(1) 肺泡オルガノイドの血管化、(2) *In vitro* の上皮損傷、(3) 線維化の誘導と検出、(4) 線維化貢献度の定量化を試みた。

- (1) 肺泡オルガノイドの血管化: 血管内皮細胞はそのままオルガノイド培養に加えても血管化できない。そこで京都大学横川隆司博士の開発した細胞塊血管化デバイス (Nashimoto et al., *Integr. Biol.* 2017) を利用して、肺泡オルガノイドに毛細血管を繋げることを試みた。横川博士から研究所に技術移管が済まされており、当研究室でも血管化デバイスの量産が可能になっていた。本研究ではこの血管化デバイス作成技術を利用した。並行して、マウス肺から取り出した AT2 細胞をマトリゲル中で PDGFR 陽性細胞と共培養を行い、肺泡オルガノイドを作成した。肺泡オルガノイドを血管化デバイスに埋め込んだ。デバイス上の別スロットに、HUVEC もしくはマウス肺血管内皮を植え、デバイス上のスロットからすり抜けた内皮細胞が肺泡オルガノイドを血管化するかどうか検討した。結果的には内皮細胞がうまくキャピラリー化せず、オルガノイドに近づかなかった。血管化活性を高める工夫が必要であることがわかった。

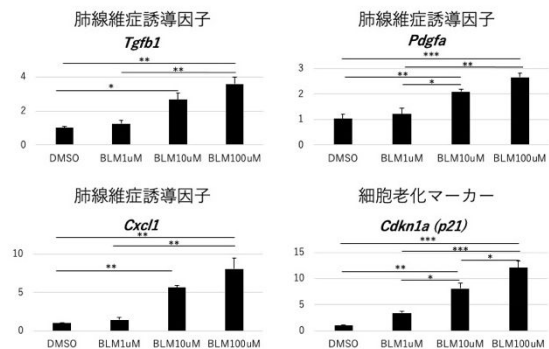
- (2) *In vitro* の上皮損傷: 線維化の起点である上皮損傷を再現するため、*in vivo* の損傷モデルでよく使用されるプレオマイシンを培養系に加え、肺泡オルガノイドに与える影響を検討した。予想通り、プレオマイシン添加により、



肺泡オルガノイドは成長を止め、濃度依存的に DNA 障害を受けてストレスによりアポトーシスを起こすことが確認された (上図)。さらに、プレオマイシンを除いて培養を続けると、肺泡オルガノイドはまた細胞分裂を起こして成長する、すなわち再生現象を再現することがわかった。

(3) 線維化の誘導と検出：肺泡オルガノイド培養には肺間充織細胞がすでに入っているが、現在の実験系では多彩な細胞種が含まれている。線維化の元になる筋線維芽細胞はPDGFR 陽性細胞に由来する。そこで上皮障害に起因する線維芽細胞の線維化を誘導するモデルを確立するために、プレオマイシン処理した肺泡オルガノイド培養の上精を別皿の肺線維芽細胞に振りかけることで、筋線維芽細胞が誘導を行ったところ、微弱ながら線維化の兆候が見られた。この実験系は、肺線維化の初期段階である損傷 再生 線維化をミニマムに再現する実験系として有用である。今後、再現性を確認する実験を行う予定である。

(4) 線維化貢献度の定量化：各細胞は相互作用をしながら最終的に Tgf や PDGF-A を分泌するようになる。(2)で確立した上皮損傷モデルを使って、上皮細胞が分泌する線維化誘導因子を定量した。その結果、肺泡オルガノイドがプレオマイシン処理により *Tgfb1*, *Pdgfa* など遺伝子発現を顕著に上昇させることが確認された(右図)。さらに、細胞老化を反映する遺伝子群の発現上昇が確認された。最近、細胞老化と肺線維症に密接な関係が明らかになっており、本研究成果は肺線維症が AT2 細胞の細胞老化に誘発される可能性を示す新しい知見となった。



< 引用文献 >

Barkauskas CE, Cronic MJ, Rackley CR, Bowie EJ et al., Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest.* 2013;123(7):3025-3036.

Nashimoto Y, Hayashi T, Kunita I, Nakamasu A et al., Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integrative Biology*, Volume 9, Issue 6, June 2017, Pages 506–518,2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 1細胞解像度で探る呼吸器の発生
3. 学会等名 第49回呼吸器学会学術講演会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器細胞パターンニング
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器幹細胞の発生
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器幹細胞の発生
3. 学会等名 第56回日本周産期・新生児医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 呼吸器形成研究チーム
<http://www.cdb.riken.jp/lungdev/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------