

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09174

研究課題名(和文) 誘導性肺前駆細胞を用いたBioengineered Lungの作成

研究課題名(英文) Development of the bioengineered lung using induced progenitor-like cells

研究代表者

鈴木 隆哉 (Takaya, Suzuki)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：80611996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：まずマウススケールの心肺ブロック還流型バイオリアクターの開発を行った。この還流培養装置はマウスの心肺に細径カニューラからポンプ送液を行って生理的な心肺還流を実現するもので、この装置により非常に小さいスケールで肺血管内皮細胞・上皮細胞を生体内動態に近い形で培養することが可能になった。これに引き続いて人工的前駆細胞開発を行った。ヒト初代培養細胞に初期化リプログラミング因子をコードしたmRNAを細胞に導入すると、極めて増殖能力の高い細胞群が出現した。この中間的な前駆細胞は、mRNAの影響をキャンセルしもとの培養条件に戻すことにより、出発細胞に近い特徴をもった細胞に分化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のユニークな点は複数系統の細胞を出発材料として、統一的方法により多様性をもった人工的前駆細胞集団を作り出すことである。一つの多能性幹細胞からどれだけ多くの成熟細胞を作成するかというこれまでの視点から、成熟細胞の多様性を利用して増殖能と組織特異性を保った前駆細胞を利用する点で独自性がある。また安全性が高いmRNAを利用することにより、臨床展開がスムーズにできると考えた。本研究で開発されたマウス型の還流型バイオリアクターによりハイスループットな細胞スクリーニングが可能になった。またマウス心肺ブロック回路の活用により、肺微細構造の3Dデータ化と培養シミュレーション可能になった。

研究成果の概要(英文)：first, we developed a mouse-scale heart-lung block retrograde type bioreactor. This circulatory culture device achieves physiological heart-lung perfusion by pump infusion from a small-diameter cannula into the mouse heart and lungs, allowing for the cultivation of pulmonary vascular endothelial cells and epithelial cells on a very small scale in a form close to in vivo dynamics. Following this, we conducted the development of artificial progenitor cells. When we introduced mRNA that codes for reprogramming factors into human primary cultured cells, an extremely proliferative group of cells propagated. These intermediate precursor cells differentiated into cells with characteristics similar to the starting cells by canceling the effects of the mRNA and returning to the starting cell conditions.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：人工幹細胞 人工前駆細胞 組織工学 脱細胞化 呼吸器再生

## 1. 研究開始当初の背景

iPS細胞や組織幹細胞の発見により患者固有の細胞を利用した組織再生が可能になった。幹細胞の臨床応用が人工気管・網膜・心筋シートなど平面的な構造の組織で臨床応用されるようになった現在、より複雑な3次元構造をもつ臓器を自己の幹細胞のみで再生する試みが始まっている。移植可能な人工臓器が創出できれば、数だけでなくサイズミスマッチやドナー臓器の不均一なクオリティなど、脳死ドナー提供では解決が困難な問題を解消できる。

ヒト細胞を材料として臓器を再生する方法に臓器脱細胞化・再細胞化法がある。これはドナーとなる臓器から界面活性剤等により細胞のみを完全に取り除き(脱細胞化)、そこに培養した患者固有細胞を注入し、バイオリアクターによる還流培養を行って細胞を定着させ(再細胞化)、臓器を復元再生する技術である(図1)。

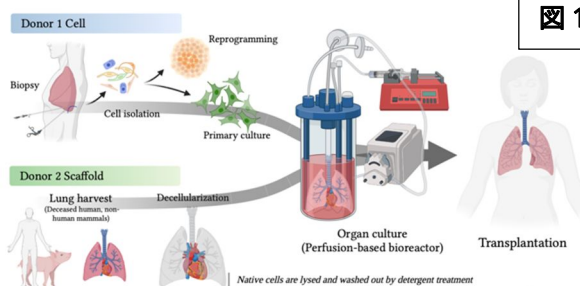


図1

肺には40種類以上の細胞があり、それぞれの細胞が異なる機能を発揮して正常な呼吸機能を維持している。臓器脱細胞化・再細胞化法によるバイオ人工肺作成においても、正常な呼吸機能を発揮するためこの多様な細胞種を再現する必要がある。多能性幹細胞(ES/iPS細胞)は、理論上すべての臓器固有細胞への分化が可能であるが、それぞれの細胞への分化には異なる培養条件が必要であり、数十種類の細胞種をすべて多能性幹細胞から一度に誘導するのは多大なコストと数ヶ月以上の時間がかかり、生命の危機が差し迫った患者に対する治療として現実的でない。

私はこの問題を解決するために、成熟細胞が初期化され多能性幹細胞へ至るときに発生する中間的な状態の細胞に注目した。この中間的な細胞は増殖能に優れるが出発細胞の記憶を保持しており、初期化因子を断ち切ることで出発細胞へ戻ると考えられている。つまり成体内での前駆細胞に近似した細胞と考えられ、その増殖能と分化能のバランスから組織工学的応用に長けていると考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト細胞由来誘導性肺前駆細胞を開発し、バイオ人工肺作成に応用する。

## 3. 研究の方法

成熟細胞を多能性幹細胞へ誘導する初期化因子(Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc等の転写因子群)を細胞へ導入すると、多能性幹細胞の他に多様な分化状態の細胞集団が生まれる(Zunder, et al. 2015)。その一部は初期化因子のシグナルがなくなると、誘導前の元の細胞に戻る可能性が示されている。この知見に着目し、初期化因子を限定的に発現させることにより、組織特異性を持った前駆細胞を作り出せる。

本研究ではこの発想を更に発展させ、肺の代表的な細胞集団である肺胞上皮細胞・肺血管内皮細胞に

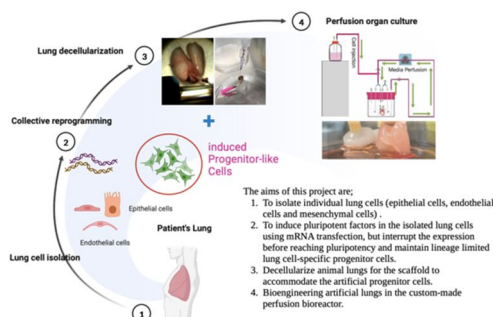


図2

対して臨床検体を利用して同時に初期化因子導入を行う「集団的リプログラミング」と呼ぶ手法を考案した。多系統細胞を同じ因子で同時にリプログラミングし、因子の作用時間を制御することで胎児臓器のような多様性をもった肺前駆細胞集団が形成され、これを脱細胞化肺内で短期間に高い機能性をもったバイオ人工肺を形成できると仮説をたてた（図2）。

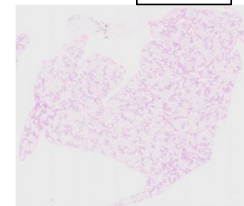
#### 4. 研究成果

まず細胞・臓器培養条件スクリーニングのためにマウススケールの心肺ブロック還流型バイオリアクターの開発を行った。この還流培養装置は非常に小さいマウスの心肺を顕微鏡手術下に摘出し、細径カニューラからポンプ送液を行って生理的な心肺還流を実現するものである。この装置により非常に小さいスケールで肺血管内皮細胞・上皮細胞を生体内動態に近い形で培養することが可能になり、多様な細胞や培養条件を同時に検討することができるようになった（図3）。



図4

この還流型バイオリアクターを使用してヒト血管内皮細胞を用いて臓器培養を行うと、図4のように極めて均質に分布した血管網が再生された（図4）。



このシステムを用いて臓器培養条件・細胞数の最適化を行っている。マウスの肺は血管内皮細胞が6000万個あるとされているが、還流培養により微細な肺毛細管ネットワークの再生に注入すべき細胞の数は知られていない。これを明らかにするためにいくつかの細胞数を試し、興味深いことに3000万個を超えたところから顕著な改善が得られないことが判明した（論文執筆中）。

これに引き続いて人工的前駆細胞開発を行った。ヒト初代培養細胞を用い、いわゆる山中4因子を含む初期化リプログラミング因子をコードしたmRNAを細胞に導入し、17日かけて極めて増殖能力の高い細胞群が出現した。ほぼ同じプロトコルを用いて血管内皮細胞と気道上皮細胞の両方からコロニー形成能の高い前駆細胞様細胞が分離された。これらはiPS細胞のようにすべての細胞に分化し得る完全に初期化された細胞ではなく、血管内皮から出発した細胞には血管内皮の特徴が、気道上皮細胞から出発した細胞は気道上皮の特徴を保ったユニークな細胞であった。

この中間的な前駆細胞は、mRNAの影響をキャンセルしもとの培養条件に戻すことにより、出発細胞に近い特徴をもった細胞に分化した。血管内皮細胞を例にとると、まず初期化因子を4日間作用させ、リプログラミング培地・幹細胞培地と順に培地変更すると、大きな細胞形態の変化はないままに成熟した血管内皮に発現する表面タンパク質CD31が急速に失われ、同時に増殖能が100倍程度高まった。これらの誘導細胞をもとの血管内皮培地に戻すと、1週間程度で自然にもとのCD31発現を取り戻すというダイナミックな変化を見せた（図5）。

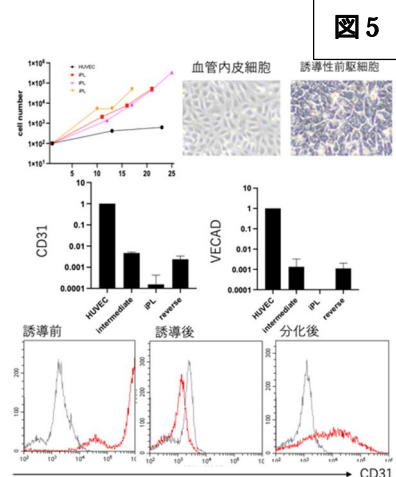


図5

つまり、完全に分化した細胞から高い増殖能をもった人工的な前駆細胞が生み出され、新しい臓器を作るほどに十分に増殖した後も、特殊な操作を必要とせず、もとの機能を発揮する細胞に戻る可能性が示唆された。同様の実験は肺上皮細胞に対しても行われ、同様に肺胞上皮タンパク質の発現低下と再現というダイナミックな変化が見られた。これらの細胞を同時にマウススケール還流型臓器培養バイオリアクターに投入し、脱細胞化肺の再生を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eric A. Chadwick, Takaya Suzuki, Michael G. George, David Romero, Cristina Amon, Thomas K. Waddell, Golnaz Karoubi, and Aimy Bazylak.	4. 巻 -
2. 論文標題 Vessel network extraction and analysis of mouse pulmonary vasculature via X-ray micro-computed tomographic imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Computational Biology	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） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木隆哉、カロウビ・ゴルナツ、アリザダ・アザド、ウイルソン・マイケル、ワデル・トーマス
2. 発表標題 誘導性血管内皮前駆細胞による脱細胞化肺の血管再構築
3. 学会等名 日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2020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	野津田 泰嗣 (Notsuda Yasutsugu)  (00636037)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	
研究分担者	大石 久 (Hisashi Oishi)  (60451580)	東北大学・大学病院・講師  (11301)	

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