

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0255

研究課題名（和文）Ex vivo再生肺創出への生理的刺激の最適化と国際基盤的研究ネットワークの構築

研究課題名（英文）The optimization of physiological stimulation for ex vivo lung bioengineering and the establishment of an international foundational study network

研究代表者

土谷 智史（TSUCHIYA, TOMOSHI）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員教授

研究者番号：30437884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：臓器再生/移植医療分野では、臓器を“脱細胞化”し、残った組織骨格を鋳型に組織を再構成する“再細胞化”による臓器再生が行われている。本研究では“適度な生理的刺激”という新たな因子に着目した。再生肺の肺血流モニターを行い、灌流量を増加させることにより毛細血管の細胞生着が促されることが分かった。また適切な細胞の種類により、再生肺上皮のバリア機能が増加し、肺胞の形態も正常に近づくことを証明した。ラット片肺切除モデルでは、機械的刺激により中皮細胞で機械伝達遺伝子が発現し、胸膜中皮細胞から肺胞幹細胞様のAlveolar Tuft Cellに働きかけて肺再生が起きることを示唆する研究成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究目標の達成は、臓器不足に悩まされる世界の再生医療への大きな貢献となる。しかし、臓器再生研究は多くの技術や知識を必要とし、国際的に取り組む重要かつ緊急な課題である。本構想では、移植時に破綻しないバリア機能を持つ肺胞を作り出す、灌流を維持できる毛細血管を再構築する、という関連する2つの課題を克服するために、臓器への機械的刺激（メカニカルストレス）の付加を手掛かりに、長崎大学チームとYale大学チームそれぞれの強みを生かした共同研究を行う。

研究成果の概要（英文）：In the field of organ regeneration/transplantation medicine, organ regeneration is performed by "decellularization" of organs and "recellularization" to reconstitute tissues using the remaining tissue scaffolds as a template. In this study, we focused on a new factor, "moderate physiological stimulation. We monitored pulmonary blood flow in the regenerated lungs and found that increasing perfusion stimulated capillary cell bioproduction. The appropriate combination of cell types increases the barrier function of the regenerated lung epithelium and that the morphology of the alveoli in the regenerated lungs approaches normal. In a rat single lung resection model, the results suggest that mechanical stimulation induces the expression of methanotrophic genes in mesothelial cells, which act from pleural mesothelial cells to alveolar stem cell-like Alveolar Tuft Cells, resulting in lung regeneration.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺再生 医工学 脱細胞化 再細胞化 再生医学 バイオリアクター バリア機能 接着因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

研究開発当時より、再生医療分野では、脱細胞化した細胞骨格を用いた臓器再生法が注目を集めてきた。脱細胞化組織骨格は、もともと心臓弁、皮膚、骨などの再生医療用材として実臨床で使用されてきた。2008年にラット心臓の脱細胞化組織骨格を“再細胞化”して臓器を再生する手法が Harvard 大学より世界に先駆けて示され (Ottら Nature Med.)、その後、気管、肝、肺、腎、小腸、食道などの臓器において、続々とその手法を用いた研究報告がなされた。この技術の最大の優位性は、組織骨格の構造をそのまま利用できることで、“構造自体の再構築”がより重要な動的臓器において威力を発揮する (図 1)。

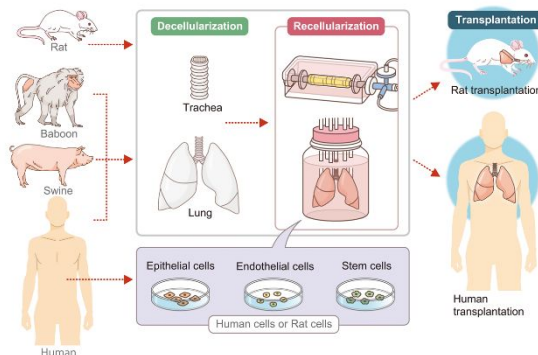


図 1. 土谷ら 日本外科学会雑誌, 119 巻 4 号より

同手法による肺の臓器再生については、2010年に Yale 大学が初めて報告し、脱細胞化-再細胞化で創出された再生肺は、一時的に呼吸機能を持った。しかし構造的には未熟であり、短時間で呼吸機能は廃絶した。病理組織学的な検討から、その原因は毛細血管内の血栓形成と、脆弱な肺胞バリア機能の破綻であると考えられ、大きな課題として残されていた。現在、オルガノイドや多層細胞シートなど、組織再生や臓器再生に関する多くの研究がなされているが、3次元構造を伴う組織再生や臓器再生において最大の障害は、組織や臓器に酸素や栄養を運ぶ血管網の確立が十分にできないことであり、機能的な毛細血管を再構築する手法は臓器再生研究のブレークスルーになると予見された。

組織工学は、細胞、それを取り巻くマトリックス、栄養因子の3因子から成るとされている。一方、臓器工学の観点からは、臓器はその特有な構造に加え、特有の機能を持たせるためには、第4の因子として生理的刺激 (physiological stimulation) が極めて重要であることがわかって来た。すなわち臓器再生には seeds となる細胞と soil となる環境 - マトリックス、栄養因子、生理的刺激の最適化が必須となる。細胞レベルでは、物理刺激 (メカニカルストレス) によって、細胞の分化、増殖、細胞接着やバリア機能などが修飾される。実際、Yale 大学はバイオリアクターの物理的刺激で iPS 由来 II 型肺細胞を I 型肺細胞に分化誘導に成功した (Journal of Clinical Invest. 2013)。発生学的には、ヒト胎児は10週から“胎児呼吸”をするが、胎児呼吸がないと肺の低形成や無形性を起こす。また間欠的力学的伸展運動 (Intermittent mechanical stretch; IMS) は胎児性呼吸のシミュレーションとして使われ、胎児肺の線維芽細胞や上皮細胞の細胞増殖、II 型肺胞上皮細胞からのサーファクタントプロテインの産生、Extracellular matrix (ECM) の合成や分泌を明らかに促す。これらのことを鑑みると、細胞に対する物理刺激のように、適度な生理的刺激が肺の臓器としての成熟に重要であることが容易に想像できる。

肺再生時にも適度な“生理的刺激”を加えれば、血管内皮と肺胞上皮のバリア機能を強化することが可能ではないかと考えるに至った。より成熟した肺組織再生を目指すならば、臓器の特性に沿った最適な生理刺激を、厳密にモニターしながら調整することができる、洗練された動的バイオリアクターを用い、肺再生にベストの seeds と soil の特定が必須である。しかしながら、生体に近い環境を再現するバイオリアクターの精度が低かったこと、圧や流量のモニタリング自体もあまり行われてこなかったこともあり、現在まで生理的刺激の最適条件については、深く研究されていない。

2. 研究の目的

呼吸運動や灌流などの生理的刺激の再生肺への影響を解明するとともに、その最適化と標準化を図る。そして、移植に耐えうる肺胞バリア機能を持ち、血流を維持できる毛細血管のネットワークを有する、機能する再生肺を創生する。再構築された毛細血管の破綻を防ぐためには、細胞間の tight junction や細胞と基底膜間の adherence junction などの血管内皮バリア機能が重要であるが、肺においては、毛細血管が肺胞上皮を介して直接外界と接する Air blood barrier (ABB) を形成しているため、さらに肺胞上皮のバリア機能も重要である。発生学および生理学的に、血管バリア機能の増強には血流による shear stress が、また肺胞上皮バリア機能の維持には呼吸運動が重要であることが分かっており、本構想では、臓器再生時に“生理的刺激”という新しい見地から改良を加えて、灌流可能な毛細血管のネットワークを持つ、成熟した肺胞の再生を達成する。そして再生臓器移植の前臨床研究を視野に入れ、ヒトサイズの臓器再生まで到達する。

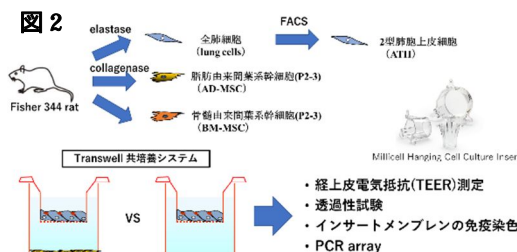
本研究目標の達成は、臓器不足に悩まされる世界の再生医療への大きな貢献となる。しかし、臓器再生研究は多くの技術や知識を必要とし、国際的に取り組む重要かつ緊急な課題である。本

構想では、“移植時に破綻しないバリア機能を持つ肺胞を作り出す”、“灌流を維持できる毛細血管を再構築する”という関連する2つの課題を克服するために、長崎大学チームとYale大学チームそれぞれの強みを生かした国際共同研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 脂肪由来間葉系幹細胞による肺上皮細胞間バリア機能増強効果

血液の漏れない機能的な毛細血管を再構築する目的で、現在、肺胞上皮、血管内皮で作成した再生肺胞のバリア機能 (Air-blood barrier; ABB) を Transwell® 上で解析し、正常肺に匹敵する抵抗値 (抗 TEER 値 $500\Omega \cdot \text{cm}^2$) を持つ ABB を作成した (図 2)。長崎大学では、血管内皮のバリア機能を上昇させるため、ペリサイトに分化する間葉系細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell; MSC) の働きも交えてさらなる ABB の強化を行った。



(2) 生理的刺激によるバリア機能の増加

Yale 大学では、再生肺に完全な毛細血管網を作成する最適な灌流圧を検討するため、native 肺と脱細胞化肺において 10ml/min, 30ml/min, 60ml/min の 3 パターンで実験を行い、毛細管圧や毛細血管径、microvascular recruitment などの評価項目として解析をした。これに加えて、任意の灌流圧における total barrier resistance を算出することで、灌流条件の最適化を行った。この結果をもとに、灌流圧を 20ml/min から 40ml/min に漸増する灌流方法をデザインし、ラットの脱細胞化肺骨格を使用してラット肺微小血管内皮細胞 (RLMVEC) 単細胞培養系と RLMVEC にラット肺線維芽細胞を共培養した 2 細胞培養系の 2 通りの評価を行った。培養中はバイオリアクター内に陰圧を加えることで呼吸刺激を与え、培地は MCDB-131 complete medium を使用し、培養 3 日目から連日 1/2 培地交換を行った。組織の評価には H&E 染色の他、Trichrome 染色、Elastica van Gieson 染色を行った。また、培養中はバイオリアクター内で肺動脈圧、肺静脈圧、気管内圧、胸膜圧をそれぞれリアルタイムでモニタリングしながら 7 日間培養を行い、それぞれのパラメーターがどのように変化するかを追跡して検討を行った。

(3) 中皮細胞から Alveolar Tuft Cell へのシグナル伝達の発見

雄 SD ラットを左片肺切除し、経時的に右残存肺を摘出し、病理所見を比較した。さらに Sox9+ alveolar Tuft Cell の変化を免疫組織学的に検索した。また経時的に採取された右残存肺を Single cell RNA sequencing で解析し、中皮細胞の細胞分画と Alveolar Tuft Cell の細胞分画がそれぞれどのような遺伝子発現の傾向を示したかをバイオインフォマティクスで解析した。

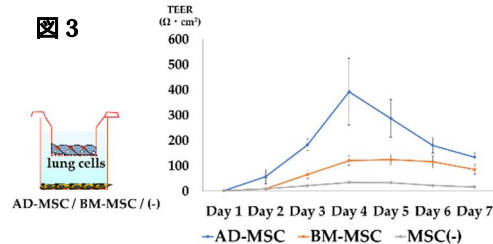
(4) ラット肺用バイオリアクターの開発

当初予定はしていなかったが、企業と肺再生用バイオリアクターの共同開発を行った。

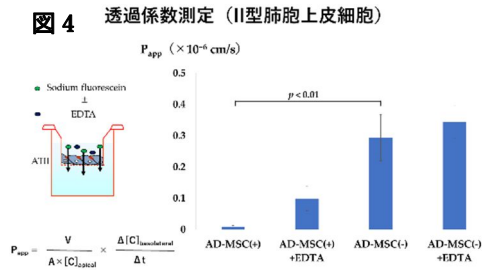
4. 研究成果

(1) 脂肪由来間葉系幹細胞による肺上皮細胞間バリア機能増強効果

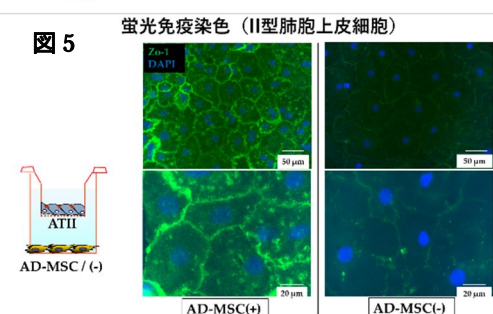
まず、全肺上皮細胞に対するバリア機能の増強効果を比較し、脂肪幹細胞 (Adipose stem/stromal cell; AD-MSC) が、骨髄由来幹細胞 (Bone marrow stem/stromal cell; BM-MSC) より高いバリア機能増強を持つことを示した (図 3)。この傾向は、II 型肺細胞に対しても同様であった。



次に II 型肺胞上皮に対する Sodium fluorescein の透過係数を測定し、これによっても AD-MSC のバリア機能増強効果を示した。一方で、バリア機能を破壊する EDTA 添加では透過係数は増加した (図 4)。さらに免疫染色では、Transwell 底面での AD-MSC の共培養によって、II 型肺胞上皮細胞内での細胞間接着に関わる Zo-1 遺伝子蛋白発現の明らかな上昇がみられた (図 5)。



また電顕顕微鏡写真では、tight junction がより狭くなっていることが分かり (図 6)、さらに細胞接着関連の遺伝子発現で Claudin4, 6, 15 が増加した。



これらの結果から、脱細胞化肺を再細胞化する際の細胞の構成によって、肺泡バリア機能を主とした臓器の成熟度が変化することが示唆された。

(2) 生理的刺激によるバリア機能の増加

Yale 大学にて行ったラット肺毛細血管内皮細胞 (RLMVEC) 単細胞培養及び RLMVEC と肺線維芽細胞の 2 細胞培養実験では、従来長崎大学で行っていた 4ml/min の灌流圧の再生肺と比較し、細胞がより均一かつ広範囲に分布し生着していることが病理組織結果から確認された (図 7)。これは、低灌流圧では十分な毛細血管の再細胞化が達成できず、より成熟した毛細血管網の作成にはより高い灌流圧が適していることが示唆された。また、肺動脈圧、肺静脈圧、気管内圧、胸膜圧のモニタリングでは、経時的に緩徐な肺静脈圧の上昇および気管内圧の低下が確認された。これは、培養が進むにつれて徐々に毛細血管内の内皮化が進み、少しずつではあるが血管バリアの形成が生じていることを示す所見と考えられた。

一方で、線維芽細胞との共培養系では、予想していた血管バリア機能に対する変化は確認できず、肺静脈圧は上昇していったものの、気管内圧は一度低下傾向を示した後、培養後期で緩徐な上昇に転じた (図 8)。これは、肺線維芽細胞のみが気道内に播種されたことにより、線維芽細胞が間質のみならず、肺泡の基底膜上にも増殖したことで、ECM の分解が生じたことが影響したと考えられた。Yale 大学の過去のデータで、これに第 3 の細胞として免疫系細胞の肺泡マクロファージを投与することで細胞の debris が取り除かれ、組織が適正化されたため、今後は肺泡マクロファージを加えた 3 細胞共培養系での評価が必要であると思われる。

(3) 中皮細胞から Alveolar Tuft Cell へのシグナル伝達の発見

肺切除後、中皮細胞は、実質上皮の増殖と肺泡組織の成長と密接に追跡するパターンで、表現型と遺伝子発現に根本的な変化を示すことがわかった (図 9)。組織再生の初期炎症段階において、中皮は WNT リガンド分泌を介して上皮の増殖を促進し、微小血管透過性の増大を指揮し、ケモカイン分泌を介して免疫の血管外侵入を促した。そして血管新生と BMP 経路の感作を特徴とする組織の再構築 (リモデリング) 期が続き、その後安定的に恒常性に戻る。このような実質構造とマトリックス産生における重要な変化と相まって、累積的な効果として肺が成長し、機能する組織実質を含むより大きな臓器が形成されるという、肺切除後の臓器形成の流れを証明した。

またメカニカルストレスにより中皮細胞で機械伝達遺伝子が発現し、そのパラクライン効果で胸膜中皮細胞から肺泡に常在する幹細胞のような Alveolar Tuft Cell に働きかけて肺再生が起きることを示唆する研究成果を得た。これまで報告されていなかった細胞間情報伝達が、メカニカルストレスに敏感な胸膜中皮細胞から肺泡に常在する幹細胞のような Tuft cell (内胚葉幹細胞マーカーである Sox9 と Lgr5 を発現する) への情報伝達を媒介することを明らかにし (図 10)、中皮細胞から肺泡タフト細胞へのクロストークが、肺切除後の肺再生の制御の中心的役割を担っているのではないかと考えられた。ここで明らかになった細胞応答経路は、組織再生の誘導と安定状態への復帰を促すうまく設計されたアプローチによって、脱細胞化-再細胞化によるヒトの肺再生が誘導可能であることを示唆した。

図 6

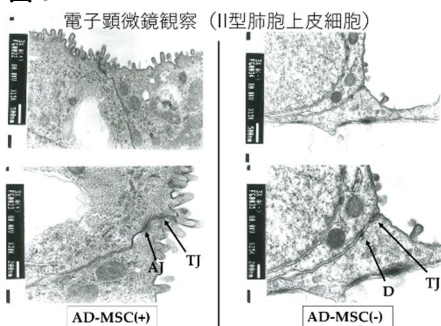


図 7

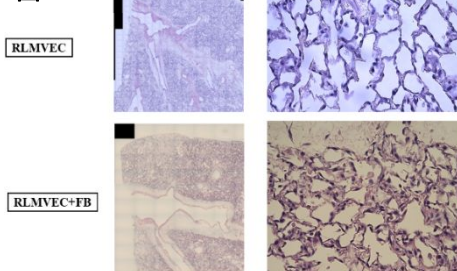


図 8

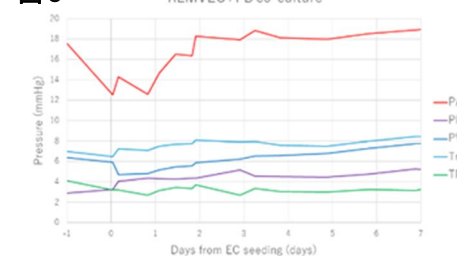


図 9. 片肺切除後の組織変化と遺伝子変化

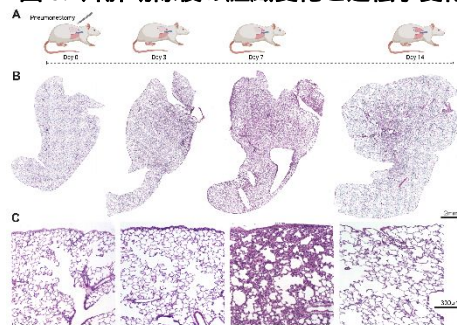
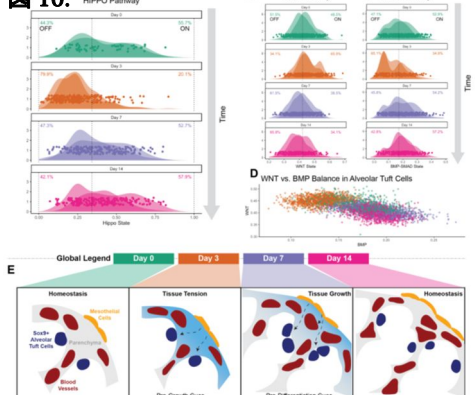


図 10.



(4) ラット肺用バイオリアクターの開発 (図 11)

当初予定はしていなかったが、日本において企業と肺再生用バイオリアクターの共同開発を行った。このバイオリアクターでは、定圧灌流ポンプユニット(BPU)、圧力刺激ユニット(PSU)という2つのユニットによって血流と呼吸運動を持続的に再現できる(図9左下)。

開発においては、企業と詳細に協議し、バイオリアクターの適正なサイズ、形状、カニューレシヨンの位置を詳細に検討し、摘出ラット肺に留置された気管、肺動脈、肺静脈のカニューレとコネクターがいつも変わらない状態で着脱できることを確認した。このバイオリアクターによって、長時間にわたる Ex vivo での臓器3次元培養が可能となった。

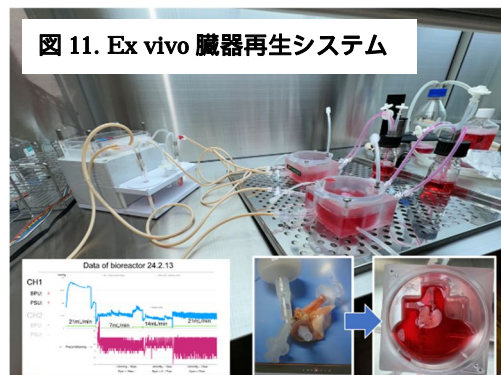


図 11. Ex vivo 臓器再生システム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishii Mitsutoshi, Tsuchiya Tomoshi, Doi Ryoichiro, Morofuji Yoichi, Fujimoto Takashi, Muto Hideki, Suematsu Takashi, Mori Ryoichi, Matsumoto Keitaro, Miyazaki Takuro, Tomoshige Koichi, Watanabe Hironosuke, Iwatake Mayumi, Nagayasu Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased In Vitro Intercellular Barrier Function of Lung Epithelial Cells Using Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081264	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 -

1. 著者名 Obata T, Mizoguchi S, Greaney AM, Adams T, Yuan Y, Edelstein S, Leiby KL, Rivero R, Wang N, Kim H, Yang J, Schupp JC, Stitelman D, Tsuchiya T, Levchenko A, Kaminski N, Niklason LE, Brickman Raredon MS	4. 巻 26
2. 論文標題 Organ Boundary Circuits Regulate Sox9+ Alveolar Tuft Cells During Post-Pneumonectomy Lung Regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Bioeng Biotechnol.	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) 10.3389/fbioe.2023.1179830.	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 -

1. 著者名 Obata T, Mizoguchi S, Greaney AM, Adams T, Yuan Y, Edelstein S, Leiby KL, Rivero R, Wang N, Kim H, Yang J, Schupp JC, Stitelman D, Tsuchiya T, Levchenko A, Kaminski N, Niklason LE, Brickman Raredon MS	4. 巻 8
2. 論文標題 Organ Boundary Circuits Regulate Sox9+ Alveolar Tuft Cells During Post-Pneumonectomy Lung Regeneration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2024.01.07.574469.	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Iwatake M, Nagamura-Inoue T, Doi R, Tanoue Y, Ishii M, Yukawa H, Matsumoto K, Tomoshige K, Nagayasu T, Tsuchiya T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Designer umbilical cord-stem cells induce alveolar wall regeneration in pulmonary disease models	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Front Immunol.	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) 10.3389/fimmu.2024.1384718.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 溝口聡
2. 発表標題 Use of Bioengineered Rat Lungs for Novel Ex Vivo Human Lung Cancer Models
3. 学会等名 米国胸部学会総会 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 疾患モデル	発明者 土谷智史、永安武、 溝口聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/003159	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 疾患モデル	発明者 土谷智史、永安武、 溝口聡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、7425485	取得年 2024年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

Organ Engineering Research T.Tsuchiya's Research Team in Nagasaki University https://www.organengineering.com/
--

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	土肥 良一郎 (Doi Ryoichiro) (00817786)	長崎大学・病院（医学系）・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	溝口 聡 (Mizoguchi Satoshi) (20816706)	長崎大学・病院（医学系）・医員 (17301)	
研究分担者	渡邊 洋之助 (Watanabe Hironosuke) (30457551)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員 (17301)	

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			
米国	Yale大学			