

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19491

研究課題名（和文）完全合成培地によるヒト肺泡オルガノイド培養法の確立

研究課題名（英文）Development of human alveolar organoid culture method using complete medium

研究代表者

森本 充（Mitsuru, Morimoto）

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）：本研究は、ヒト生肺組織から肺泡幹細胞を単離し、ヒト肺泡オルガノイドの作成技術を開発することを目的としている。既報のマウス肺泡オルガノイド用の培地を適正化することで、線維芽細胞や血清を含まない完全合成培地を確立し、ヒト肺泡オルガノイドの作成に成功した。神戸大学病院の協力を得て、新鮮なヒト生肺組織を使用し、AT2細胞を単離した後、肺泡オルガノイドを作成した。しかし、継代するとスフェア形状が変化してしまうことから、改善の余地があると考えられる。これにより、ヒト呼吸器疾患である肺線維症の *in vitro* モデルを構築し、AT2細胞のDNA損傷により隣接する筋線維芽細胞の誘導に成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト肺泡オルガノイド培養の条件を確立できたこと、また肺線維症オルガノイド培養を確立できたことで、以下のような社会への貢献が期待できる。(1) 呼吸器疾患の研究と治療法開発：ヒト肺泡オルガノイドの作成技術を活用することで、呼吸器疾患の研究が促進される。(2) 新薬の開発と効果評価：ヒト肺泡オルガノイドを利用した新薬の効果評価や副作用の検討が可能となる。(3) 個別化医療の推進：患者固有の肺疾患や治療反応を再現する *in vitro* モデルの構築により、個別化医療の実現が可能となる。患者に適した治療法の選択や治療効果の予測ができるようになるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to isolate alveolar stem cells from living human lung tissue and to develop a technique for the preparation of human alveolar organoids. By optimizing the previously reported medium for mouse alveolar organoids, a fully synthetic medium free of fibroblasts and serum was established, and human alveolar organoids were successfully prepared. In collaboration with Kobe University Hospital, fresh living human lung tissue was used to prepare alveolar organoids after isolation of AT2 cells. However, there is room for improvement as the spherical shape changes with passaging. This led to the establishment of an *in vitro* model of pulmonary fibrosis, a human respiratory disease, and the successful induction of adjacent myofibroblasts by DNA damage in AT2 cells.

研究分野：呼吸器幹細胞

キーワード：肺泡オルガノイド AT2細胞 肺線維症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患の患者数は世界的に増加しており、肺がん、COPD、COVID-19 に代表されるように人類の脅威になりつつある。その様な背景から呼吸器疾患の病因解明、治療法開発を強力に押し進めることができる実験モデル、創薬プラットフォームの構築が急務である。最近、生体の3次元組織構造を反映する幹細胞培養法“オルガノイド培養”が開発され、肺胞オルガノイド培養法も報告された。この肺胞オルガノイド作成法では幹細胞をサポートする線維芽細胞を添加する必要があり、細胞の反応や病理現象を再現するにはノイズを含むことになり実験系として不完全であった。研究代表の森本は10年以上にわたり呼吸器の発生生物学を細胞、分子レベルで研究し、国内の呼吸器幹細胞研究をリードしてきた。特に最近では肺胞および気管の幹細胞発生原理の研究と、気管組織の *in vitro* 再構成の研究で成果を上げており、今回挑戦するヒト肺胞オルガノイドの開発を行うための知識、技術、実績は十分に備わっている。研究室の先行研究で、マウス気管支の上皮性幹細胞であるクラブ細胞を培養する完全培地の開発に成功している (Fujimura et al., *Stem Cells* 2023)。これらの知識と経験を活かし、ヒト肺胞幹細胞である AT2 細胞の完全培地の開発を行う。

2. 研究の目的

本研究では、病院で採取されたヒト肺組織から肺胞幹細胞を単離し、線維芽細胞や血清を含まない完全合成培地でヒト肺胞オルガノイドを作成する技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

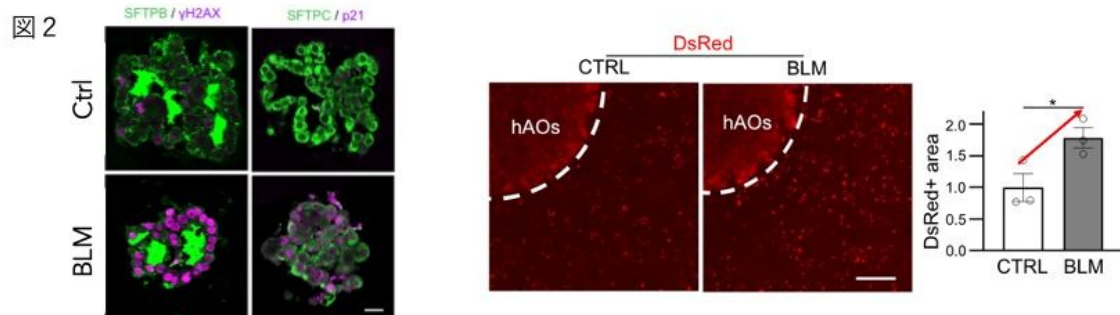
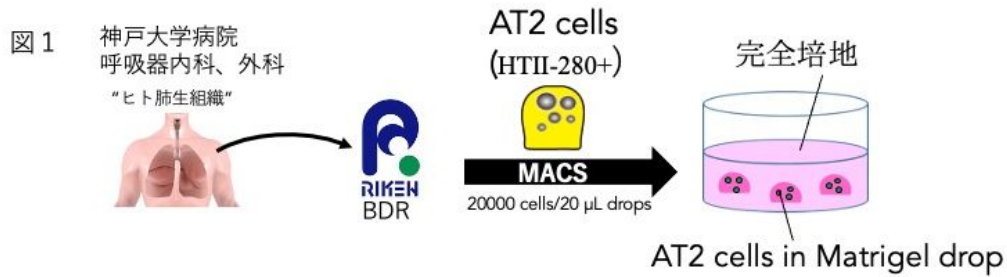
完全合成培地を用いたヒト肺胞オルガノイドの開発に向けて、クリアしなければいけない課題は3つある。(1)新鮮な生体ヒト肺組織の入手、(2)ヒト肺胞オルガノイドに適した培養条件の開発、(3)ヒト肺胞幹細胞の継代と保存、である。これらの課題を一つずつ解決していく。

4. 研究成果

まずは新鮮な “(1)新鮮な生体ヒト肺組織の入手” を進めた。神戸大学病院呼吸器内科の永野医師の協力のもと、生体ヒト組織提供の導線をチャートで整理し、安全かつ迅速なプロセスを体系的に構築した。加えて、呼吸器外科の担当医と連絡をとり、患者にインフォームドコンセントを行い、肺がん手術で摘出した病理組織の比較的正常な領域を切り取り、分与をうける了承を得た。

次に “(2)ヒト肺胞オルガノイドに適した培養条件の開発” を進めた。大学病院で肺がん患者の肺がん患部を切除し、その検体の正常部分について 3cm x 3cm に切り分けて、病院内で当研究室の研究員に受け渡した。研究員は検体を生理食塩水に浸して氷冷し、厳重に密閉して研究所まで輸送した。6回の検体分与を受け、生体ヒト肺組織の入手および研究室までの輸送経路を確立した。研究所に持ち込まれた生体ヒト肺組織は、P2 細胞培養施設に持ち込まれ、肺胞以外の部分を外科的に切除し、消化酵素で分解され、物理的な破壊により解された。マグネティックビーズを使った MACS カラム法で上皮細胞だけを回収し、一部は qRT-PCR で肺胞細胞の成分を確認し、残りはマトリゲル中に散布した。初めに当研究室で確立した完全培地と、桂研究員が前職で確立した培地を使って培養を行ってみた。その結果、非効率的ながら、回収した肺細胞の一部を増やすことができた。細胞濃度や、足場材であるマトリゲルの条件などを検討し、最適化を進めた(図1)。“(3)ヒト肺胞幹細胞の継代と保存” についても検討を行った。ヒト生肺組織から培養した AT2 細胞を培養6日目に回収、トリプシンで分解し、再度別のマトリゲルに播種した。しかし残念ながら継代するとスフェアの形状がおかしくなり、状態が悪くなかった。また、保存について

も市販の細胞保存試薬液を用いて凍結保存を試みた。しかしながら、再度播種する過程でやはり細胞増殖の著しい低下し、また育ったスフェアの形状も異常であった。そこで、継代および保存は諦めて、初代培養だけで実験を進めることにした。ヒト肺胞オルガノイド培養ができるようになったことで、ヒト呼吸器疾患を *in vitro* で再現できる可能性ができた。そこでプレオマイシンを使った肺線維症モデルの開発を行った。プレオマイシンは AT2 細胞内で DNA 傷害をおこし、ストレス状態となって p53 経路を活性化する。P53 経路が活性化した AT2 細胞は細胞老化様状態となり、SASP を分泌し始めるようになった。この細胞老化様 AT2 細胞は周囲の線維芽細胞を筋線維芽細胞に変化させることができた。すなわち、肺線維症誘導能を *in vitro* で確認することができた。この研究成果を取りまとめて論文として発表した(図 2 : Enomoto et al, *Nat. Commun.* 2023)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yasunori Enomoto, Hiroaki Katsura, Takashi Fujimura, Akira Ogata, Saori Baba, Akira Yamaoka, Miho Kihara, Takaya Abe, Osamu Nishimura, Mitsutaka Kadota, Daisuke Hazama, Yugo Tanaka, Yoshimasa Maniwa, Tatsuya Nagano, Mitsuru Morimoto | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Autocrine TGF- β positive feedback in profibrotic AT2-lineage cells plays a crucial role in non-inflammatory lung fibrogenesis. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Nature communications | 6. 最初と最後の頁 4956-4956 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-40617-y | 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 Takashi Fujimura, Yasunori Enomoto, Hiroaki Katsura, Taisaku Ogawa, Saori Baba, Akira Ogata, Akira Yamaoka, Katsuyuki Shiroguchi, Mitsuru Morimoto | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Identifying a Lung Stem Cell Subpopulation by Combining Single-Cell Morphometrics, Organoid Culture, and Transcriptomics. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Stem cells (Dayton, Ohio) | 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） 10.1093/stmcls/sxad044 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 中山彰吾, 森本充 | 4. 巻 39巻 |
| 2. 論文標題 呼吸器発生の解明が導く気管・肺泡オルガノイド培養技術の開発 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 羊土社 実験医学 | 6. 最初と最後の頁 2863-2869 |
| 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 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 榎本泰典, 森本充 | 4. 巻 76 |
| 2. 論文標題 肺泡オルガノイド | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 科学評論社 臨床免疫・アレルギー学 | 6. 最初と最後の頁 491-496 |
| 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 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 森本充 |
| 2. 発表標題 呼吸器の発生・再生ロジック |
| 3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演 教育講演（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森本充 |
| 2. 発表標題 幹細胞研究からオルガノイド開発、そして肺疾患解析へ、 |
| 3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演 会長企画シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森本充 |
| 2. 発表標題 幹細胞研究からオルガノイド開発、そして肺疾患解析へ、 |
| 3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会 シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|