

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550046

研究課題名(和文) 初代培養細胞群からの生理学的肺胞モデルの構築と経肺吸収率予測への利用

研究課題名(英文) Development of physiological lung epithelial model

研究代表者

酒井 康行 (Sakai, Yasuyuki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：00235128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二重底培養器(カルチャーインサート)内にラット初代培養細胞のみを用いて肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージによる共培養を形成した肺胞組織モデルを確立した。第二に、肺胞近傍の各組織を一定容量、一定濃度の液体の「箱」とみなす“コンパートメントモデル”を用いて、コンパートメント間のナノ粒子の移行速度を濃度の一次に依存する物質収支式で記述することにより、組織モデルの定量結果に基づく数値シミュレーションを行い、ナノ粒子の肺胞部における局在性と血中移行性について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Three in vitro pulmonary alveolus culture models were established. Our aim was to optimize existing human lung in vitro models to better mimic the in vivo situation to study the nanoparticles toxicity and translocation study. Epithelial and endothelial cells were separately cultured on the opposite sides of the cell culture insert consisting of the polycarbonate microporous membrane to form separate cell layers. This co-culture system is proved to be a novel pulmonary alveolus model that might be applied to evaluate the safety evaluation of drugs, chemicals and nanomaterials. Then primary epithelial cells were used in the second rat alveolar tissue model, which could be used to directly compare in vivo and in vitro conditions. Results likely indicate the formation of the rat primary culture model with high stability. This primary culture system is a novel pulmonary alveolus model and might be applied to evaluate the safety evaluation of drugs, chemicals and nanomaterials.

研究分野：生物化学工学, 生体組織工学

キーワード：細胞・組織 生物・生体工学 環境 薬学 培養モデル ナノ粒子 肺吸収

1. 研究開始当初の背景

欧州を中心とした動物愛護・反動物実験の社会的要請により、個体の応答メカニズムを考慮しつつ、動物試験を用いない試験管内での化学物質影響評価手法の確立が求められている。この有力かつ唯一のアプローチは、理想的にはヒトの培養細胞から構成される培養ヒトモデル組織で得られる生物学的応答と、細胞から組織/臓器、個体までの階層構造を考慮するため数理モデルとを融合利用するものである。ここで、主要なメカニズムを忠実に再現可能な生理学的なヒト培養組織モデルの構築が大前提であるが、その妥当性はやはり *in vitro-in vivo* 相関性の検証過程を経る必要がある。すなわち、培養モデルの開発・確立においては、一方で *in vivo* 実験も可能な動物種の初代培養細胞を用いた生理学的培養モデルの構築をまずは行う必要がある。

化学物質の摂取経路として重要な経肺暴露影響の評価への利用を想定し、申請者らは培養細胞を用いた肺胞近傍組織の再現を試みてきた。すなわち、肺胞上皮表面を覆う肺サーファクタント (II 型上皮細胞が産生) で形成される気液界面、非常に薄い I 型肺胞上皮細胞による上皮単層膜、マクロファージの共存の 3 点の再現を念頭に置いて、株細胞からの肺胞モデルの再構成を試みてきた。しかしながら、これら 3 点のいずれにおいても全く不完全なものしか製作し得なかった。一方、ラット初代培養細胞においては、上述の 3 種の細胞の培養による再現が可能であることが、個別細胞の培養実験によって明らかとなってきた。しかしながら、これら 3 種の細胞を適切に再構成し、肺胞近傍組織の再現を行った研究例も国内外ともに報告が皆無である。

2. 研究の目的

ラット肺より I 型・II 型肺胞上皮細胞・肺胞マクロファージを採取精製し、適切に再構成することで、ラット *in vivo* 経肺暴露実験を代替可能な高度に生理学的な培養肺胞モデルを構築する。具体的には、半透膜培養器の半透膜上にラット I 型・II 型肺胞上皮細胞を播種培養し、培養液成分・播種密度・基底膜成分・微小な幾何学的構造などを最適化した培養環境で I 型と II 型が 95:5 の比率で共存する肺胞実空間の再現を目指す。最終的には、蛍光性のナノ粒子を対象としたラット気管内注入実験の結果との比較を通じて、培養モデルの妥当性を検証する。

3. 研究の方法

ラット肺胞を構成する異種細胞の同時分離精製法の確立

研究分担者の諏訪部章・小笠原理恵は、肺胞 II 型細胞から産生されるサーファクタントに関する研究実施のためにラットからの肺胞上皮細胞の精製に関して豊富な経験を有している。しかしながら、薄い肺胞内腔面積の 95% を覆っている I 型細胞の分離培養に関しては、従来は目的外であった。そこで、数は数ないが既存の文献を参考に、同一ラットから I 型・II 型上皮細胞を実験実施に十分な量、同時分離精製する手法を確立する。

基礎的な培養条件の影響検討

肺胞を構成する I 型・II 型肺胞上皮細胞の同時分離法の確立と平行して、得られた細胞を用いて生体内環境と同じく I 型と II 型とが面積比 95:5 の比率で単層膜を形成する条件を探索する。II 型細胞は I 型細胞の前駆細胞としての機能を有していることが知られているが、初代培養条件下では、I 型形質の数日間以上の維持は困難であり、II 型も通常の培養では徐々に I 型に分化する。また我々の知る限り、生体肺胞と同等の比率で I 型・II 型を、生理学的な比率で同時安定共培養するという試みは報告されていない。そこで、I 型・II 型の増殖と形質維持に係る増殖因子・播種密度・培養形態について系統的に実験的検討を行う。具体的には、I 型・II 型の形質維持に影響を与えるとされる KGF や FBS の添加、播種密度・半透膜培養器 (カルチャーインサート) を用いる培養の影響等について検討を加える。I 型または II 型細胞の同定は、I 型細胞に特異的に発現する Aquaporin5 や II 型細胞特異な SP-C の抗体を用いた免疫染色により行う。

基底膜成分の影響検討

肺胞上皮細胞の形質維持については、増殖因子等の影響と同時に、線維芽細胞や血管内皮細胞との直接の接触やそれらの細胞が産生し蓄積されたマトリックス物質も大きな影響を示すことが十分に考えられる。そこで、国立環境研究所の持立克身博士 (現フェロー) が研究開発してきた合成基底膜成分を I 型・II 型共培養に利用し、その可能性を検証する。この合成基底膜は、予め間葉系の細胞株を培養器で培養して蓄積させ、脱細胞化処理を行って基底膜成分のみを残すものである。現在、我々が手にすることが可能な最良の基底膜成分と言える。持立博士からの協力については内諾を受けている。

培養表面形状の影響検討

I 型・II 型の生理学的比率での共培養を実現する上で、両細胞が周囲の幾何学的形状を認識している可能性がある。それは、I 型細胞がまさに薄い肺胞膜を構成しているのに

対し、II 型細胞は肺胞膜が合一する隅となっている部分に局在しているためである。このことを検証し利用するために、シリコンゴムの型取り微細造形を用いて、20-300 μm の直径の凹型のマイクロウェル構造を持つ培養面を作製し、I 型・II 型細胞の局在を観察する。20 μm では細胞一個が凹型構造内に入り、肺胞の直径と同じ 300 μm ではウェル底面と側面の接線に沿って II 型細胞が局在し、それ以外の部分は I 型細胞で覆われることを期待する。マイクロウェル構造を持ちながらも 5-10 μm 程度の穴が空いた半透膜をも製作することは可能で、これで市販のカルチャーインサートの膜を置き換えた培養器を製作することも可能である。

マクロファージを付加した膜型培養における透過実験と透過を記述する数理モデルの構築

培養液・播種条件・半透膜培養器・血管内皮/繊維芽細胞との共培養・基底膜成分・マイクロウェル構造等に関する研究結果を統合して、I 型・II 型細胞の気液界面培養を行い、生体と同じ比率でバランスよく 2 週間程度の培養が可能かどうか検討する。この際、細胞膜の示す経上皮電気抵抗値の値、I 型・II 型細胞の各種表面マーカー・水の輸送活性・サーファクタントの産生量等から、作成された培養肺胞モデルの生理学的妥当性を最終的に評価する。もし、これらが不十分の場合には、肺胞内腔側と体内血液側の培養液の組成自体を、大胆に生理学的なものにする試みも行う。

一方、ナノ粒子をモデル化学物質として利用し、その肺胞モデル透過量の時間変化を計測、暴露 2 日間程度の培養モデル内での挙動を記述可能な数理モデルを構築し、輸送に関する速度論的パラメータを決定する。既に申請者らは、肺胞内腔・細胞層・体内血液側の 3 つのコンパートメントにおける毒性物質濃度が動的な平衡関係にあるとする簡単な数理モデルを構築し、低揮発性化学物質の培養系でのモデル肺胞膜（ヒト II 型様の癌細胞から形成されるもの）を介した透過挙動を良好に記述することに成功している（AATEX, in press）。ナノ粒子の取り込みにおいては、肺胞に存在するマクロファージによる貪食の関与が極めて大きい。そこで同じラットの肺洗浄液から肺胞マクロファージを採取生成し、I 型・II 型上皮細胞等から構成される肺胞モデルに付加する。上述の基本骨格を持つ数理モデルを利用し、対象として量子ドットや蛍光ラベルシリカ粒子等の定量が容易なナノ粒子をモデル物質として透過実験を行い、それらの透過を記述するモデルを完成させる。

このモデルは、あくまでさまざまな限界乗る in vitro のものであり、内投与での暴露量（粒子総量）と肺胞微小表面への実暴露量との間を、補正する必要がある。また、肺胞

モデル系では、3 つのコンパートメントの粒子濃度は平衡に達するが、in vivo では血液側に透過した粒子は絶えず流されるという非平衡状態にある。これらの点を補正するため、肺の幾何学的構造等を考慮したモデルへと培養系のモデルを拡張利用する必要がある。

4. 研究成果

II 型から I 型への安定的誘導

型肺胞上皮細胞は Sprague Dawley ラットより摘出した肺をエラスターゼ処理・密度勾配遠心により、肺胞マクロファージは摘出肺の気管支肺胞洗浄液より、それぞれ安定して採取することに成功した。しかし、培養系にて、II 型肺胞上皮細胞は次第に I 型細胞へ分化するが、カルチャーインサート上で培養液やコートタンパクを様々に変えて検討したが、当初は播種密度の制御により薄く扁平な II 型肺胞上皮細胞層を再現性良く形成させることができなかった。

そこで、8, 10, 15, 40 週齢のラットから採取した細胞を様々な密度で播種し、24 時間後の接着密度を測定し、さらに 7 日間培養後の細胞形状を観察した。一連の検討の結果、週齢に依らず、24 時間後の正味の付着細胞数を $3.0-4.0 \times 10^4$ cells/cm² の範囲に持ち込むことで、ほぼ I 型の面積が大きく極めて薄い I 型様の上皮細胞組織をカルチャーインサート上に安定して形成させることに成功した。

このように形成した細胞層の経上皮電気抵抗値は、ヒト II 型株細胞の A549 の約 100 ohm \cdot cm² に比べて極めて高い約 500 ohm \cdot cm² という値を示し、約 1 週間は安定であった。この上に、採取した肺胞マクロファージを播種すると、強固に付着することが観察された。

I 型細胞の安定培養

肺胞上皮細胞の培養条件については、確立した II 型細胞の単離および播種条件を基礎として、様々な培養基質で被覆した半透膜培養器（カルチャーインサート）を用い、2 週間までの形態や経上皮電気抵抗値を元に検討を行った。その結果、胎児型の基底膜成分を含むマトリゲルが最もよい結果を与えた。各種増殖因子のカクテルでの添加も行ったが、マトリゲル被覆では相乗的な効果は得られなかったため、以後、マトリゲル被覆したカルチャーインサートと通常の血清添加培養液を用いて実験を進めることとした。

I 型および II 型の安定的共培養の試み

In vivo 肺胞では、ガス交換に与る I 型上皮細胞は内腔面積の 95% を覆い、II 型細胞は隣り合った肺胞壁との連結部位に存在することが示されている。つまり、II 型細胞は幾何学的に肺胞内腔の角となった部分に安定

して存在している。もし、この特性を利用して、扁平状の I 型細胞層と部分的な II 型細胞をバランスよく培養系で共存させることができれば、II 型細胞が産生する各種肺サーファクタント層で薄く覆われた生理学的な肺胞内腔を in vitro で再構築することができるかもしれない。

このための初期検討として、肺胞とほぼ同じ大きさ (326 μm) を持ったシリコンゴムの一種である PDMS (ポリジメチルシロキサン) マイクロウェル構造を持つシートを作成、まずは通常のマイクロプレート底面に装着して培養を行い、I 型・II 型各々に特異的な表面マーカーにて免疫染色を行った。その結果、おおよその傾向として、中央底面部の扁平な細胞は薄く緑に染まっており、マイクロウェル近縁部と側面とで形成される角の部分に紫で染まる細胞が、角に沿って培養されていることが分かる。すなわち、マイクロウェル構造で I 型・II 型のバランスの取れた高度な培養肺胞モデルを構築できる可能性が示されたといえる。

肺胞マクロファージとの共培養

一方、ラット肺胞由来初代培養マクロファージについては別途単離・培養条件を既報に基づいて確立した。毒性の低い 1 μm の二酸化チタン粒子を暴露し、その挙動を顕微鏡及びタイムラプスにより観察したところ、ヒト細胞株の THP-1 由来のものに比べ、貪食活性が極めて高く、仮足を広げ、遊走をしながら広範囲の粒子を積極的に貪食する様子が確認された。

透過実験と数理モデル化

二重底培養器 (カルチャーインサート) 内にラット初代培養細胞のみを用いて肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージによる共培養を形成した肺胞組織モデルを確立した。第二に、肺胞近傍の各組織を一定容量、一定濃度の液体の「箱」とみなす“コンパートメントモデル”を用いて、コンパートメント間のナノ粒子の移行速度を濃度の一次に依存するとした物質収支式で記述することにより、組織モデルの定量結果に基づく数理シミュレーションを行い、ナノ粒子の肺胞部における局在性と血中移行性について検討を行った。

カルチャーインサート内に前述のように共培養系を構築し、内腔側に 100 μg のナノ粒子 (蛍光 SiO₂ 粒子 10, 30, 100 nm) を暴露し、所定時間経過後に各コンパートメントの粒子を回収し、分光蛍光光度計により粒子量を定量した。実験値にコンパートメント間の動的平衡を濃度に対して一次の可逆反応で仮定した数理モデル式をフィッティングし、物質移動係数 k を算出した。Euler 法によりそれぞれのモデル式について数値解を得ることで数理シミュレーションを行い、粒子の移行性について検討を行った。数理モデル式

は実験値に良好にフィッティングされ、粒子移行を本手法で簡便に記述できることが示された。ナノ粒子に懸念される、他臓器への間接障害へ繋がる血中移行性に注目すると、粒径と血中移行量に負の相関が見られ、物質移動係数により比較可能であることが示された。

本結果は定性的には対応する動物実験の結果と一致したが、血中移行が過大評価されており、今後は肺胞組織モデルの改善、数理モデルへの新たなパラメータの導入の検討が必要だろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

諏訪部章, 小笠原理恵, 培養装置付き蛍光・位相差顕微鏡によるラット分離肺胞 II 型細胞の観察, 分子呼吸器病, 査読無, 19 巻, 2015, 115-117.

諏訪部章, 肺胞上皮細胞, Respiratory Medical Research, 査読無, 4 巻 2 号, 2016, 54-58.

〔学会発表〕(計 6 件)

諏訪部章, 肺胞 II 型上皮細胞の形態と機能, 第 50 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会, 2014 年 10 月 25 日, 盛岡.

原納弘大, 岩沢こころ, 小笠原理恵, 諏訪部章, 酒井康行, ナノ粒子の毒性評価のためのラット初代培養肺胞組織モデルの開発, 化学工学会第 80 年会, 2015 年 3 月 20 日, 東京.

岩沢こころ, 原納弘大, 小笠原理恵, 篠原直秀, 張貴華, 蒲生昌志, 諏訪部章, 酒井康行, ラット初代培養細胞及びヒト培養細胞を用いた肺胞モデルの開発とナノ粒子の毒性評価のための数理モデル利用, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会, 横浜国立大学, 2014 年 12 月 5-7 日.

酒井康行, 竹内昌治, 藤井輝夫, 薬効・毒性評価野のための生理学的培養組織モデル, 第 66 回日本生物工学会大会, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 9-11 日.

Xinying Xu, Ayaka Uemura, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai, Formation of in Vitro Co-culture Model of Pulmonary Alveolus Using human epithelial cell line A549, human monocytic cell line THP-1, and human umbilical vein cells HUVEC for Prediction Study of Nanoparticle Permeation, 第 28 回日本動物代替法学会, ワークピア横浜, 2015 年 12 月 11 日.

酒井康行, 細胞アッセイ系の生理学性向上のための組織工学的アプローチ, 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎ブリックホール, 2017 年 3 月 15-17 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://orgbiosys.t.u-tokyo.ac.jp/sakai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 康行 (SAKAI, Yasuyuki)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：00235128

(2) 研究分担者

諏訪部 章 (SUWABE, Akira)

岩手医学大学・医学部・教授

研究者番号：20241713

(3) 研究分担者

岩沢 ころろ (IWASAWA, Kokoro)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：30402796

(4) 研究分担者

小笠原 理恵 (OGASAWARA, Rie)

岩手医学大学・医学部・助教

研究者番号：70347871