

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670629

研究課題名(和文)脱細胞化、再細胞化技術を使った再生肺の脆弱性の改善と、臓器保護に関わる基礎研究

研究課題名(英文)Basic researches for the improvement of the fragility and the organ protection about de-and re-cellularization based regenerated lung

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)・准教授

研究者番号：30437884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脱細胞化、再細胞化技術は、現時点では肺の再生に最も有用である。本研究は、ラットモデルを使用して同技術で肺を再生するとともに、脱細胞化経路や灌流液等を改良し、脆弱性を改善したより成熟した再生肺を作成することを主目的とした。成果として、強ナトリウム溶液のみで脱細胞化する手法を行い、組織障害の軽減に関しては従来のもと同程度で、コスト減を図ることができた。また、閉鎖回路を使った気管経路の脱細胞化法を考案した。また再細胞化時の組織ライブイメージングを行ったところ、脂肪幹細胞は間質に移行し、周皮細胞に分化していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Decellularization and recellularization technique is the most useful for lung regeneration. The aim of the present study was to regenerate lung using the technique and the main subjects were improvement of the decellularization method including decellularization route and decellularization solution. As results, we developed the NaOH based decellularization solution; the matrix damage was similar to original method and the total cost of the method was reduced. We could also developed ventilation-based decellularization system of the lung. The live imaging of the recellularization represented that adipose tissue derived stromal cells migrated stroma and differentiated into pericytes.

研究分野：再生医学 呼吸器外科学

キーワード：肺再生 肺 再生 組織工学 脱細胞化 再細胞化 肺移植 マトリックス

1. 研究開始当初の背景

脱細胞化、再細胞化の技術を使った再生臓器は、心臓、肝臓、肺で、一時的に機能を持つことが証明され、将来の移植医療への応用が期待されている。

肺においては、ラット肺を界面活性剤で脱細胞化し、肺動脈から血管内皮細胞を、気管からは新生児ラット肺細胞を注入して、バイオリアクター内で3次元培養を行って再細胞化し、これを移植した。この技術の特徴は、微細な3次元構造を保ったまま臓器骨格を得ることが可能なことで、自己の細胞による再細胞化によって、免疫原性を最小限にした再生臓器を創出可能となる。

しかしながら、移植された再生肺は数時間で機能不全となった。原因としては、脱細胞化溶液そのものが、基底膜の様な、繊細な膜構造を破壊するためと考えられている。この再生肺の脆弱性を改善することが、再生臓器を創出する上で最も重要なポイントであり、これには、組織マトリックスのダメージ軽減と十分な再細胞化が不可欠であるということが分かっていた。

2. 研究の目的

本研究は、ラットモデルを使用して同技術で肺を再生するとともに、脱細胞化経路や灌流液等を改良し、脆弱性を改善したより成熟した再生肺を作成することを主目的とした。そのために、(1) 強ナトリウム溶液による脱細胞化、(2) 閉鎖回路を使った気管経路の脱細胞化、(3) 再細胞化時の組織ライブイメージングと脂肪幹細胞による血管内皮再細胞化肺の移植、(4) Polyethylene glycol (PEG)による再生肺の灌流; Immuno-camouflage、以上4つの実験を行う予定とした。

3. 研究の方法

(1) 強ナトリウム溶液による脱細胞化; 脱細胞化液中の SDS や CHAPS 等の界面活性剤は、もともと蛋白を変性、溶出させるための溶媒で、組織障害を伴う。これを使用せず、強ナトリウム溶液のみで脱細胞化した。

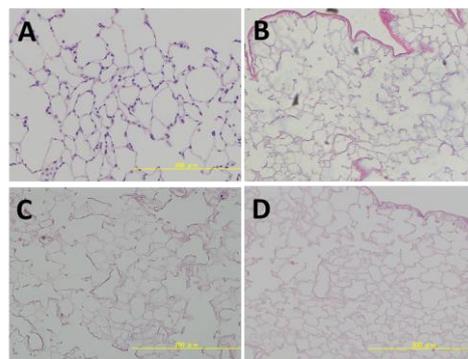
(2) 閉鎖回路を使った気管経路の脱細胞化; 従来の肺の脱細胞化は、肺動脈から界面活性剤を還流して行うが、気管支経路から持続的に界面活性剤を出し入れして行うシステムを構築した。

(3) 再細胞化時の組織ライブイメージングと脂肪幹細胞による血管内皮再細胞化肺の移植; 脂肪幹細胞を血管内皮細胞とともに肺動脈から生着させて再細胞化させた。量子ドットで脂肪由来幹細胞を標識し、生着の過程をライブイメージングした。

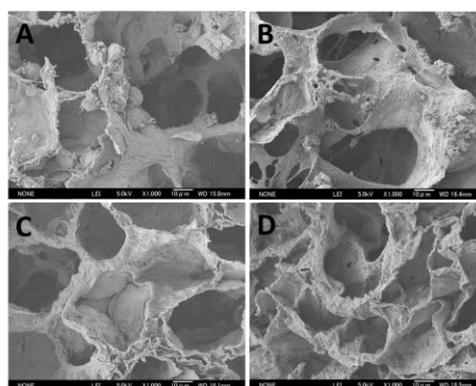
4. 研究成果

(1) 強ナトリウム溶液による脱細胞化; 組織障害の軽減に関しては従来のものと同程度

で、コスト減を図ることができた。また再細胞化も可能であった。

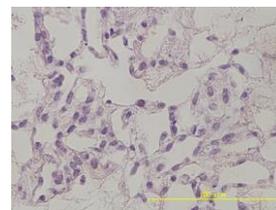


A:Control, B: SDS, C:CHAPS, D: NaOH
上記の説明: HE 染色では、従来の脱細胞化法に遜色なく、細胞成分は消失している。

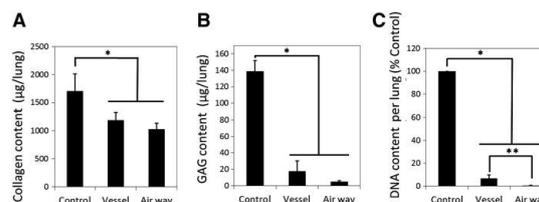


A:Control, B: SDS, C:CHAPS, D: NaOH
上記の説明: 電顕でも、従来の脱細胞化法に遜色なく、細胞成分は消失している。

また、NaOH で脱細胞化したラット脱細胞化肺は HUVEC を用いて再細胞化が可能であった。

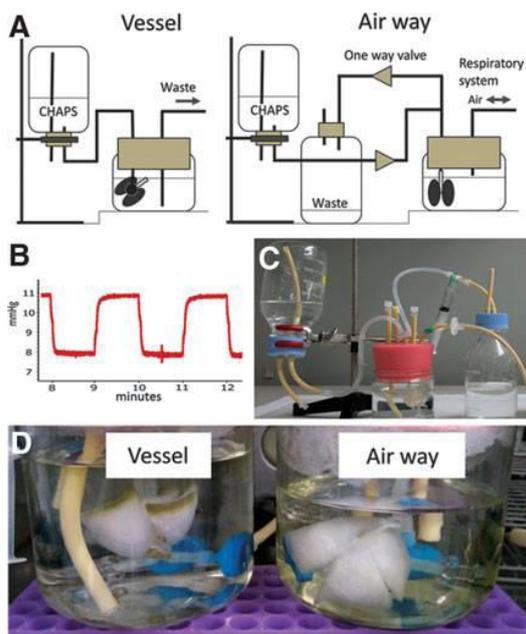


(2) 閉鎖回路を使った気管経路の脱細胞化; 気管経路の脱細胞化は従来の肺動脈経路のものに比べゆるやかに灌流でき、末梢の肺動脈から脱細胞化されることから均一に脱細胞化可能で、圧力学上も基底膜は破壊されにくかった。一方で組織マトリックスは通常の脱細胞化法に比べ減少し、より厳格な脱細胞化法であることが分かった。

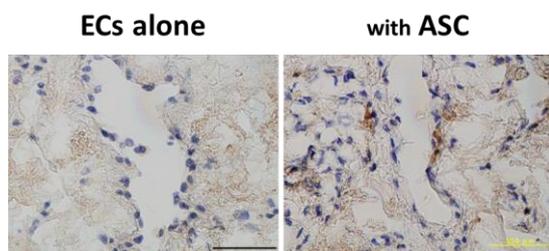
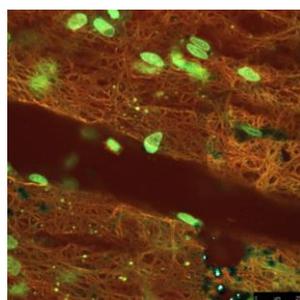


上記の説明: Collagen assay、GAG assay、DNA assay では、気管経路の脱細胞化は通常の肺動脈からの脱細胞化と遜色ないか、むしろやや

強い脱細胞化能が示唆された。



(3) ラット肺に脂肪由来幹細胞と血管内皮細胞を生着させたところ、脂肪幹細胞は間質に移行し、周皮細胞に分化していることが示唆された。



上記の説明：脂肪幹細胞+血管内皮細胞投与群では、周皮細胞のマーカーNG2が再生肺血管周囲に陽性となった。

(4) Polyethylene glycol (PEG)による再生肺の灌流；実験(3)の結果、再生血管は移植後、長期的に機能を保てるほどの成熟段階には達していないことが判明したため、同研究は完遂できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- (1) Ventilation-Based Decellularization System of the Lung. Tsuchiya T, Mendez J, Calle EA, Hatachi G, Doi R, Zhao L, Suematsu T,

Nagayasu T, Niklason LE. *Biores Open Access*. 2016 1;5(1):118-26. (査読有)

[学会発表] (計 6件)

- ① 土谷 智史、土肥 良一郎、畑地 豪、光武 範吏、扇玉 秀順、湯川 博、馬場 嘉信、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、蒲原 涼太郎、山崎 直哉、永安 武「臓器再生第一段階としての肺・脱細胞化組織骨格内の血管網の構築」第43回日本臓器保存生物学会、2016年11月26日、東京薬科大学(東京都・八王子市)
- ② 土肥 良一郎、土谷 智史、畑地 豪ほか「Adipose-derived stromal cells facilitate ex vivo angiogenesis and endothelial cell survival with pericyte differentiation in the decellularized rat lungs」、ISSCR 2016 Annual Meeting、2016年6月22日、Moscone West (米国・サンフランシスコ)
- ③ 土肥 良一郎、土谷 智史、畑地 豪、西村 智、松山 睦美、中沢 由華、山崎 直哉、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、扇玉 秀順、荻 朋男、湯川 博、馬場 嘉信、光武 範吏、永安 武「ラット脱細胞化肺における肺血管作製」、第18回異種移植研究会、2016年2月20日、長崎大学良純会館(長崎県・長崎市)
- ④ 土谷 智史、扇玉 秀順、山崎 直哉、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、畑地 豪、Laura Niklason、永安 武「間歇的圧変化を利用した、気管からのラット肺脱細胞化法」第52回日本移植学会総会、2015年10月2日、ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)
- ⑤ 土谷 智史、山崎 直哉、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、寺谷 工、扇玉 秀順、土肥 良一郎、小林 英司、永安 武「肺における小型、大型動物の脱細胞化組織骨格を用いた、ドナー臓器再生・移植医療への可能性」、第115回日本外科学会定期学術集会、2015年4月17日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋)
- ⑥ 扇玉 秀順、土谷 智史「NaOH-PBSによるラット肺の脱細胞化・再細胞化」、第41回臓器保存生物学会、2014年11月29日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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)・
准教授
研究者番号：30437884

(2) 研究分担者

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：802884686

山崎 直哉 (YAMASAKI, Naoya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
准教授
研究者番号：70404217

秋田 定伯 (AKITA, Sadanori)
福岡大学・寄付講座・客員教授
研究者番号：90315250

下川 功 (SHIMOKAWA, Isao)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：70187475

樋上 賀一 (HIGAMI, Yoshikazu)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：90253640