

令和 4 年 2 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19609

研究課題名（和文）新規ex vivo肺癌研究モデルとしての小型ヒト再生肺の創出

研究課題名（英文）Generation of the small human lungs as the novel ex vivo lung cancer study models

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脱細胞化したラット肺組織骨格に、ラットの全肺細胞、ラット肺微小血管内皮細胞およびラット脂肪幹細胞を用いて再細胞化を行い、小型再生肺を作製した。この再生肺上にヒト肺癌細胞を局所注入することで癌細胞を生着させ、正常な肺胞上皮や血管内皮と癌細胞が共存した、ex vivoの肺癌モデルの作製に成功した。

Ex vivo肺癌モデルでは、2次元培養では形成できないような結節形成や腺管構造形成などの癌特異的な形態学的構造を観察できた。上皮成長因子受容体（EGFR）に変異を持つPC-9を播種させた肺癌モデルにおいて、gefitinibに対する薬剤反応試験を行い、正常細胞を残しながら肺癌細胞の脱落がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本モデルは改良の途上であるが、より正確な薬剤スクリーニングや癌の生理学的研究に応用可能と考えられる。また、患者由来の細胞を使用すれば、薬剤の有効性など患者由来の再生臓器で評価でき、個別化医療に発展させる可能性を有している。さらに、癌研究にとどまらず、肺気腫モデルや肺線維化モデルなど他疾患の疾患研究モデルにもなりうる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We have fabricated small engineered lung using decellularized rat lung scaffold reseeded by rat whole lung cells, rat lung microvascular cells and rat adipogenic stromal cells. In the bioengineered lung, 4 types of human cancer cell lines (A549, PC-9, NCI-H520, PC-6) were seeded. Then, we have succeeded to establish an ex vivo lung cancer model, in which normal lung epithelial cells, capillary endothelial cells and cancer cells are living side by side. In the ex vivo cancer model, cancer specific morphologies such as nodule or gland formations were observed, which are not formed in 2D culture. In addition, the drug responsiveness test in the ex vivo lung cancer model represented that gefitinib killed epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation positive PC-9 cells with preserving surrounding normal lung cells.

研究分野：組織工学

キーワード：肺再生 組織工学 臓器工学 脱細胞化 がんモデル 再生医療 脂肪由来間葉系細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌研究において、培養細胞を使ったシグナル伝達系の解明や抗癌剤のスクリーニング等がさかんに行われてきたが、2次元の堅い培養皿上の細胞は、多くの細胞と相互作用しながら3次元で生きている細胞と同じではない。実際、3次元の組織で起こる現象の多くは培養細胞では起こらず、血流等の物理的ストレス、細胞外マトリックスへの接着等が、細胞の分化や増殖に大きく影響していることはよく知られている。そのため、癌細胞が3次元でどのような動態を示すか、ゲル等を使用して培養し、多光子顕微鏡を使ったライブイメージングによって継続的な変化を追う研究が始まっている。しかしながら、ゲルを使用した細胞動態の評価は、生体内での物理的刺激やマトリックスとの相互関係を正確に反映しておらず、生体臓器と同じ構造内で癌の動態が可視化できれば、より深く詳細な検討が可能となると考えられる。

我々はYale大学から導入したバイオリアクターを使用して、再生肺を作成してきた。現在では、肺血管細胞と脂肪由来間葉系細胞をラット脱細胞化組織内で3次元培養し、成熟した血管構造を持つ肺の構築に成功している。脂肪由来幹細胞は壁細胞に分化することで肺血管の脆弱性を改善させ、移植直後の肺出血は起きなくなった。多光子顕微鏡を用いたライブイメージングでは、間葉系細胞がマトリックス内に侵入していく様子を観察することも可能であった。

この手法を用いてヒト細胞とヒト組織骨格からなる小型の再生肺を創出し、そしてその再生肺でex vivo肺癌研究モデルを作成できれば、新たな研究モデルとなる。

2. 研究の目的

脱細胞化-再細胞化の手法を利用した肺の再生研究は、米国で2010年の報告から少しずつ認知されているが、わが国では当教室のみが唯一研究を開始し、続けている。現在まで脱細胞化マトリックスに対し、癌細胞を生着させた研究が数件報告されているが(DhruvaらAnn Thoracic Surg 2012)、これらの研究は癌細胞の生体マトリックス上の進展過程をみたものであり、ヒト肺の正常細胞との関係を見たものでもないし、ましてライブイメージングによって継続的な変化を見たものでもない。

本研究は、もっと大きな目標を持つ。すなわち、我々の持つ技術によって、単純な構造の小型ヒト肺を創出し、新しいex vivo研究モデルを確立する。

特に癌の生着や進展には、癌の周囲環境である組織マトリックスが重要な影響を与えるため、この再生肺での研究モデルでは、培養皿では観察できない様々な現象が捉えられると予想される。また、バイオリアクター内で抗癌剤や成長因子、栄養素の有無などの外的要因を容易に調整できることも特徴で、さらに、それら外的要因への正常細胞と腫瘍細胞との影響の比較が容易に行える。これらを、多光子顕微鏡を用いたライブイメージング等でリアルタイムに観察可能である。

3. 研究の方法

段階(1) 小型再生肺の創出

Yale大学から導入したバイオリアクターを使用し(Petersenら2010 Science)、我々が改良を加え確立した手法で、ラット脱細胞化組織骨格内に、ラット細胞(血管内皮細胞; HPMEC 1×10^6 個 + 間葉系幹細胞; ADMSC 1×10^6 個)を使用した、成熟した血管網を構築する。

気道からラット肺胞上皮細胞を投与して、道系と血管系の2系統の最低限の細胞の種類と基本構造を持つ、小型肺を創出する。

段階(2) 小型再生肺へのヒト腫瘍細胞の播種と進展様式の観察

癌細胞を再生肺に生着させることによって、癌の生着や進展の様式をライブイメージングでリアルタイムに観察する。

ヒト肺癌細胞を蛍光ラベルして局所注入し、その生着の状態を観察する。癌細胞の注入経路は、胸膜直下への直接注入、経気道注入、経肺動脈注入の3パターンとする。まず腺癌細胞株の再生肺内での生着、進展様式を確認する。扁平上皮癌や小細胞癌の細胞株でも同様の実験を行う。(表面より近い胸膜下直接注入は、必ず観察可能と考える。)

癌の進展実験としては、当施設で稼働している多光子顕微鏡を使用して、組織ライブイメージングを行う。



段階(3) 小型ヒト再生肺での正常細胞、腫瘍細胞への外的刺激の観察

癌と正常細胞は、異なった代謝経路を持っている。癌を生着させた再生肺を成長因子や抗癌剤入り培養液、あるいは人工血液で灌流し、組織ライブイメージングを行うことによって、癌および正常細胞への影響の違いを、肺胞構造を持つ3次元臓器内組織マトリックス上でリアルタイムに観察可能となる。

可視化できるサイズの腫瘍に対し、培養液あるいは人工血液内に生理的濃度の抗癌剤、あるいは成長因子を還流させ、癌への影響を病理組織学的に検索する。

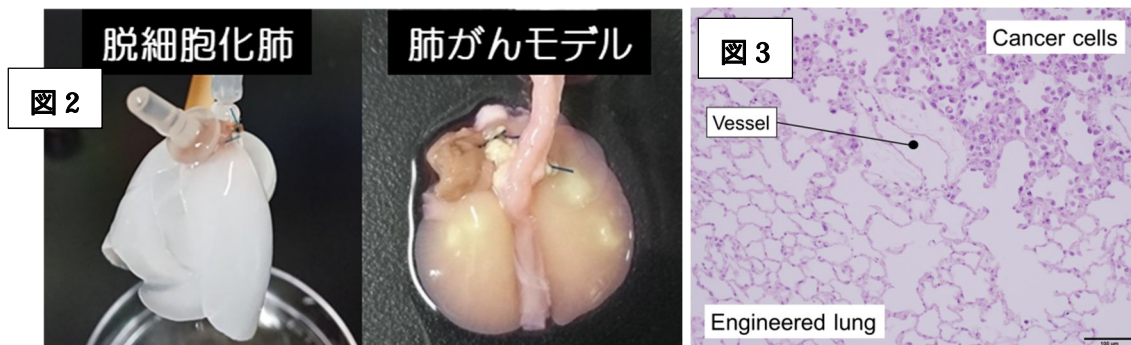
[最初の実験系として、Epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor (EGFR -TKI)による抗腫瘍効果が病理学的に異なった形態で生じるか、時系列で解析する]

当施設で稼働している多光子顕微鏡を使用して、組織ライブイメージングを行う。アポトーシスを起こした細胞の蛍光や、GFP 蛍光等を継時的に観察する。

4. 研究成果

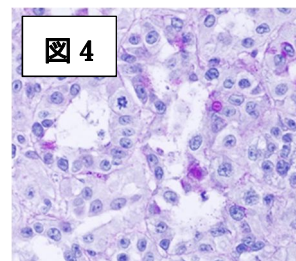
成果(1) 再生肺上における肺癌モデルの作製

我々は肺癌細胞懸濁液を局所注入で播種させた。実際には、培養した肺癌細胞を作製した再生肺に針付きシリンジを使用して肺の表面から局所注入して生着させた(図 2)。生着させた肺癌細胞はいずれも培養可能な接着細胞であったため、いずれも良好に生着を認めた(図 3)。一方で、やや接着能の低い細胞は注入部以外にも播種状に生着することもあることから、細胞の性質に応じて注入法や静置時間などを検討する必要があると考えられた。

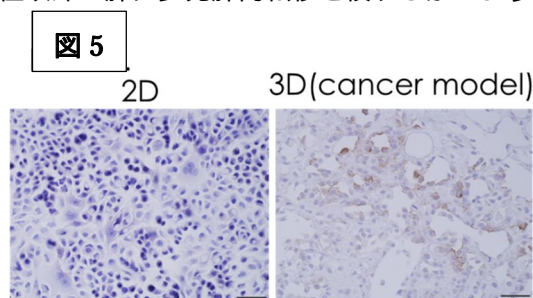


成果(2) 小型再生肺へのヒト腫瘍細胞の播種と進展様式の観察

使用した肺癌細胞株は腺癌の A549 と PC-9、扁平上皮癌の NCI-H520、小細胞癌の PC-6 であったが、いずれも異なる形態を呈しながら生着していることが HE 染色にて確認された。特に同じ腺癌でも、A549 では充実性の結節を呈して腺管構造の形成するような所見が認められる(図 4)一方で、PC-9 では肺胞上皮置換性に生着しており、それぞれの細胞の特徴を示すような病理組織像であった。NCI-H520 は扁平上皮癌であるが、低分化であるため細胞間橋の形成や癌真珠の形成など扁平上皮癌に特徴的な所見を有するところまでは確認できなかった。PC-6 では、局所注入した部位に充実性の結節を形成していたが、やや接着能が低い性質のためか、注入した部位以外の肺に多発肺内転移を模するかのようになり、複数の結節を形成していた。



さらに、MUC-1 は正常の上皮細胞や多くの固形癌細胞に発現されていることが知られ、特に癌細胞ではこれが高発現されて癌細胞の増殖や浸潤能の促進、アポトーシスの抑制などに関与するとされている。2次元の培養細胞ではほとんど発現されていないMUC-1は3D培養されると、高発現を呈することが確認され、より in vivo に近い発現形式を示していることが示唆された(図 5)。



多光子顕微鏡を使用した組織ライブイメージングについては、現在も実験継続中である。

また、我々は院内の倫理委員会の承認のもと、長崎大学病院腫瘍外科で行われた肺癌手術の一部の検体を使用し、肺癌組織から肺癌細胞を抽出し、これを脱細胞骨格へ注入し生着できるかの検討を行った。Invasive mucinous adenocarcinoma の症例では、注入部に良好に生着を示したとともに、内部には多量の粘液を含む肺癌細胞が確認できた。

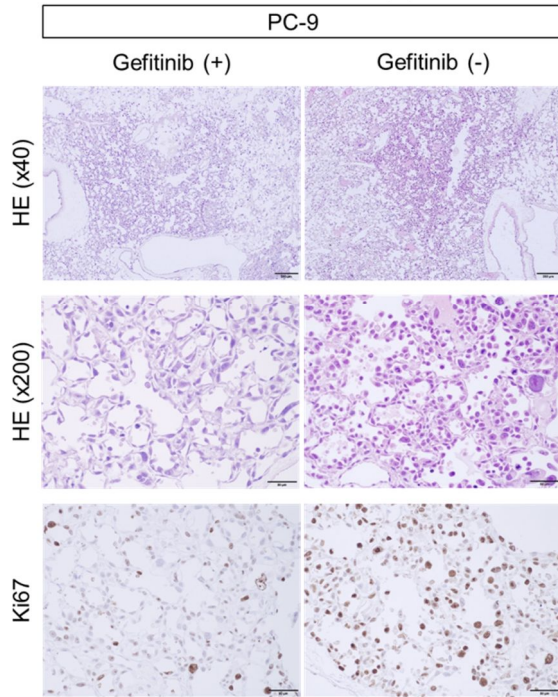
成果(3) 小型ヒト再生肺での正常細胞、腫瘍細胞への外的刺激の観察

作製された再生肺癌モデルを用いて、これに抗がん剤投与を行いその反応を検討した。ヒト肺癌細胞は EGFR mutation (Exon 19 deletion) を有する PC-9 と EGFR wild type の A549 を使用し、EGFR-TKI である gefitinib を一定の濃度となるように培地に混入させ、48 時間培養を行った。培養中は肺動脈から一定の速度で gefitinib 入りの培地を灌流させて培養を行った。

その結果、EGFR mutation を有しない A549 の肺癌モデルでは、gefitinib の投与に関わらず増殖マーカーである Ki67 の高発現を認めたが、EGFR mutation を有する PC-9 では gefitinib を投与した群では有意に Ki67 の発現低下を認めた(図 6)。また、PC-9 の gefitinib 投与群では caspase-3 の陽性率の上昇も認められており、gefitinib 投与による apoptosis の誘導も示唆さ

6

EGFR mutation (+)



れた。

多光子顕微鏡を使用した組織ライブイメージングについては、現在も実験継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝口聡、土谷智史、石井光寿、小畑智裕、土肥良一郎、松本桂太郎、宮崎拓郎、畑地豪、渡邊洋之助、永安武
2. 発表標題 小型再生肺でのex vivo肺癌モデル作製の試み
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口聡、土谷智史、渡邊洋之助、土肥良一郎、石井光寿、松本桂太郎、宮崎拓郎、畑地豪、永安武
2. 発表標題 ラット再生肺を用いたヒト肺癌播種モデルの作製
3. 学会等名 第22回日本異種移植研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷智史
2. 発表標題 生体内微小環境を再現したex vivoがん治療評価モデル
3. 学会等名 BioJapan 2020 / 再生医療JAPAN 2020 / healthTECH JAPAN 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷智史、土肥良一郎、畑地豪、松本桂太郎、宮崎拓郎、渡邊洋之助、朝重耕一、永安武
2. 発表標題 臓器再生研究と外科医の役割
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷智史, 土肥良一郎, 溝口聡, 小畑智裕, 石井光寿, 橋本泰匡, 畑地豪, 松本桂太郎, 宮崎拓郎, 渡邊洋之助, 朝重耕一, 町野隆介, Laura Niklason, 永安武
2. 発表標題 脱細胞化臓器骨格を利用した肺再生研究の10年の歩み
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷智史
2. 発表標題 再生肺を利用したEx vivo 肺癌モデル
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会テクノークション
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土谷智史, 土肥良一郎, 溝口聡, 小畑智裕, 石井光寿, 橋本泰匡, 畑地豪, 松本桂太郎, 宮崎拓郎, 渡邊洋之助, 朝重耕一, 町野隆介, 田中義正, 池田裕明, Laura Niklason, 永安武
2. 発表標題 臓器骨格を利用した肺の Organ engineering
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 土谷 智史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 8
3. 書名 再生医療の開発戦略と最新研究事例集	

1. 著者名 土谷 智史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 バイオテクノロジーシリーズ；脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 疾患モデル	発明者 土谷智史ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-014778	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 疾患モデル	発明者 土谷智史ほか	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0件

〔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	濱田 聖暁 (HAMADA Yoshiaki) (30796181)	長崎大学・病院(医学系)・医員 (17301)	
研究分担者	永安 武 (NAGAYASU Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

	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
研究協力者	由井 克之 (YUI Katsuyuki)		

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
研究協力者	酒井 宏水 (SAKAI Hiromi)		
研究協力者	李 桃生 (LI Taosen)		

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 University			