

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03747

研究課題名(和文) 組織骨格を利用した再生臓器におけるハイブリッド型血管ニッチの確立と移植研究

研究課題名(英文) Establishment of hybrid vascular niche in regenerated organs using organ scaffolds and transplantation research

研究代表者

土谷 智史 (TSUCHIYA, TOMOSHI)

富山大学・学術研究部医学系・特命教授

研究者番号：30437884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：脱細胞化骨格に自己の細胞を生着させる技術は、臓器の微細構造を維持した臓器そのものを再生できる点で画期的である。しかしながら、この手法で作成された再生臓器は、血管網の再構築が完全でなく、毛細血管を含む成熟した血管網の再構築が、この研究の鍵となる。本研究は改良型Transwellによる透過性の評価、エラスチンナノファーバーによるコーティング技術を駆使してin vitroで血管ニッチを伴う疑似肺胞壁を組織工学的に再構築した。そしてその条件で脱細胞化肺に再構築された血管網を、ex vivoで灌流圧の測定やデキストランによる還流実験によって評価し、その完成度を高めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺胞腔内に血液成分が漏出しなければ、呼吸機能が維持できると考えられ、世界に先駆けて、持続的な機能を持つ再生肺の創出が可能となる。再生肺で毛細血管の構築が成功すれば、肝臓や腎臓などのその他の臓器に応用可能であり、臓器再生手法のブレークスルーになると考えられる。さらにブタを使用した大型動物の実験を行い、再生臓器を臨床応用できるになれば、移植再生医療の革新的な治療法になると考えられる。この研究は細胞接着や幹細胞技術の様々な研究分野に関連しており、この研究を進めること自体が、臓器再生について深い知見を得ることに繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：The technique of biogenesis of autologous cells on decellularized scaffolds is revolutionary in that it can regenerate the organs themselves while maintaining the microstructure of the organs. However, regenerated organs created by this technique do not have a fully reconstructed vascular network, and the reconstruction of a mature vascular network, including capillaries, is the key to this research. In this study, we evaluated the permeability using a modified Transwell and tissue-engineered reconstruction of pseudo alveolar walls with vascular niches in vitro using a coating technique with elastin nanofarbers. The vascular network reconstructed in decellularized lungs under these conditions was then evaluated and perfected ex vivo by measuring perfusion pressure and by dextran-induced reflux experiments.

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱細胞化骨格に自己の細胞を生着させる技術は、臓器の微細構造を維持した臓器そのものを再生できる点で画期的である。この手法で再生された臓器はそのまま移植可能で、自己の細胞で再生できれば理論的には生涯にわたる免疫抑制剤は不必要となる。しかしながら、この手法で作成された再生臓器は、血管網の再構築が完全でなく、毛細血管を含む成熟した血管網の再構築が、この研究の鍵となる。

本研究はその問題点を克服するため、1) 改良型 Transwell®による透過性の評価、ナノファイバーによるコーティング技術を駆使して *in vitro* で血管ニッチを伴う疑似肺胞壁を組織工学的に再構築する。そして2) その条件で脱細胞化肺に再構築された血管網を、*ex vivo* で灌流圧の測定やマイクロビーズによるリアルタイムイメージングによって評価して完成度を高める。3) 最終的に実験動物に再生臓器を移植し、*in vivo* で再生臓器の生着を評価して、臨床応用への可能性を探りたい。

2. 研究の目的

現在まであらゆる再生臓器において血管網の構築が最大の課題であり、特に毛細血管を再構築することが、臓器再生研究のブレークスルーになると予見される。本研究は、血管の破綻が直接臓器障害に関与する肺を研究対象とし、血管～毛細血管の再構築に多方面の手法を駆使してチャレンジする。

3. 研究の方法

I) *in vitro* でのハイブリッド血管壁と疑似肺胞壁の透過性の最適化

脳血管の Blood brain barrier (BBB) の透過性を評価する方法を応用し、多孔質 (0.4 μ m, 3.0 μ m, 5 μ m pore size) の半透膜をもつ立体培養皿 (Transwell®) を用い疑似肺胞壁を作製し、*in vitro* での血管ニッチの構築と Air-blood barrier (ABB) の透過性の評価を行う。以下のモデルを比較評価し、Transwell® に経内皮細胞電気抵抗値 (Transendothelial electrical resistance; TEER) 500 Ω · cm² 程度の理想的な透過性の Air-blood barrier を持つ、疑似肺胞壁を *in vitro* で構築する。

i) 細胞のみのモデル: Transwell® の半透膜上にラット肺毛細血管内皮細胞 (RLMVEC) とラット脂肪幹細胞から分化させた周皮細胞 (ペリサイト) を播種して、疑似血管壁を *in vitro* で作成する。RLMVEC: ペリサイトの比率を変える (1:1~50:1)。

ii) マトリックスコーティングを加えたモデル: Transwell® の半透膜上に、肺脱細胞化組織骨格をホモジナイズしてコーティングし、i) と同様に細胞を播種する。

iii) エラスチン類似ポリペプチドのコーティングを加えたモデル: Transwell® の半透膜上に、肺脱細胞化組織骨格、エラスチン類似ポリペプチドを2重にコーティングし、i) の結果を参考にして、同様の細胞比率で細胞を播種する。

iv) 類似肺胞壁の構築: さらに Transwell® の半透膜下に分離した肺胞上皮細胞を播種し、肺胞上皮、血管内皮、間葉系細胞からなる肺胞壁モデルで血管透過性、Air-blood barrier (ABB) 機能を、以下の方法を用いて測定し、TEER 500 Ω · cm² 程度の最適な透過性を持つ条件を探す。

a) EVOM 抵抗計 (Volt-Ohm resistance meter) を用いた経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER)、b) sodium fluorescein 法 [小分子 (376Da) の paracellular transport、Evans' blue albumin 法 [大分子 (67kDa) の transendothelial transport]、c) Immunoblot 法によるタイトジャンクションタンパク (claudin-5, occludin, ZO-1)、とトランスポーターの発現測定。

II) *ex vivo* でのハイブリッド血管ニッチの確立と再生肺の構築

i) I) の実験で透過性が最適であった条件を、脱細胞化組織骨格上で再現する。肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、ペリサイト、コーティング剤によるハイブリッド型再生肺を創出する。灌流時の肺動脈圧および肺静脈圧の測定 (PowerLab®)、デキストランによる毛細血管通過過程の描出、Hb 濃度計測によるラット赤血球の灌流前後の漏出測定を実施し、ラット摘出肺をコントロールとして比較する。

ii) 再生肺において灌流中の肺動脈圧、肺静脈圧および気管内圧を測定することで再細胞化による血管透過性および毛細血管の通過を間接的に評価する。測定方法の確立および評価の baseline として rat lung microvascular endothelial cell (RLMVEC) のみで再細胞化した再生肺での測定を行った。

III) *in vivo* での再生肺移植による機能評価

最適な細胞構成とコーティング技術によって、血液成分の漏出がなく、血栓形成を最大限に抑制したハイブリッド血管を持つ再生肺を *ex vivo* で作成。同再生肺を左肺移植し、時系列で組織学的変化を観察する。また移植肺静脈血の酸素飽和度を測定する。再生移植肺は観察後に摘出し、上皮細胞の運命決定に重要な Notch シグナルを含めた遺伝子発現の解析を行う。また移植後にラットを覚醒させ、生存可能かも観察する。

IV) ブタを使用した前臨床研究

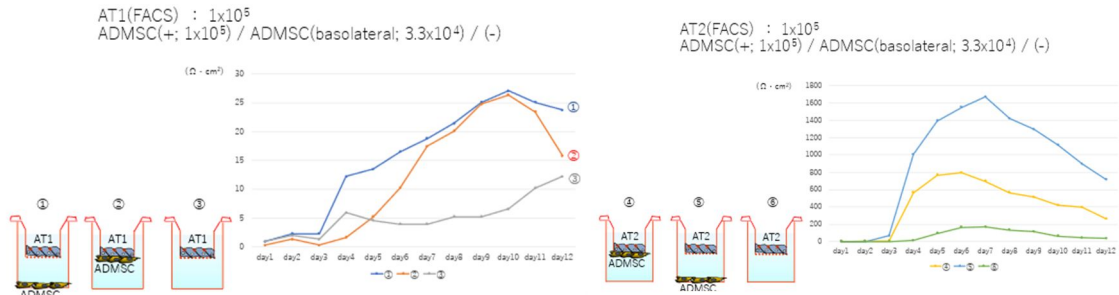
脱細胞化したブタ肺を II) の条件と報告された手法(Nicholes ら Science Translational Med. 2018)を参考にしながら再生し、左肺移植する。移植後 1 時間で肺を摘出し、病理学的、分子生物学的に解析する。また覚醒させ、生存可能かを確認する。移植後の時系列でも解析する。

4 . 研究成果

I) in vitro でのハイブリッド血管壁と疑似肺胞壁の透過性の最適化

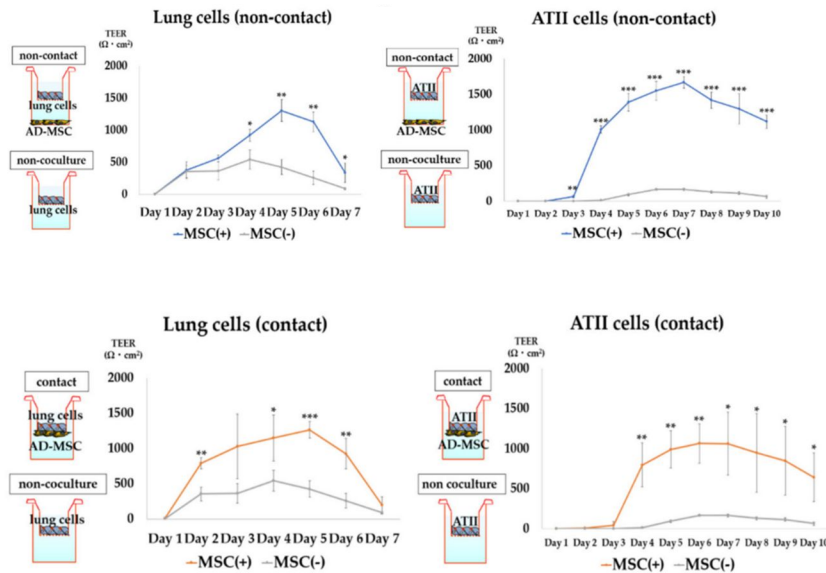
i) 細胞のみのモデル

類似肺胞壁の構築として、Transwell の半透膜上に分離した肺胞上皮細胞を播種し、肺胞上皮のバリア機能を、EVOM 抵抗計(Volt-Ohm resistance meter) を用いた経内皮電気抵抗(transendothelial electrical resistance, TEER)で測定した。I 型肺細胞を播種したモデルでは TEER $30\Omega \cdot \text{cm}^2$ まで到達せず、殆どバリア機能の増強はみられなかった。一方で II 型肺細胞を播種したモデルでは、TEER $1000\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上の膜透過性を達成した。

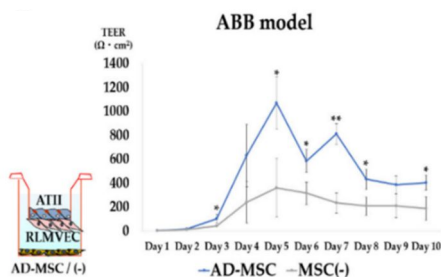


次に、ラット肺から採取した全肺細胞、さらに II 型肺細胞に対する脂肪由来幹細胞のバリア機能への影響を計測し、有意に脂肪由来幹細胞の共培養によってバリア機能が上昇することが分かった(Ishii et al, Pharmaceutics 2021)。AD-MSC は血管内皮細胞の成熟を促すことが分かっており(Doi et al, Scientific Rep 2017)、肺胞上皮細胞のバリア機能も著明に増加させることを示した。

この効果は、細胞間が接触していても接触していなくても生じ(下図)、AD-MSC から分泌されるものによる効果であることが示唆された。



さらに、Transwell の膜上下に肺胞上皮細胞と血管内皮細胞を播種し作成した Air-blood barrier(ABB)モデルでも、同様の効果を示した。



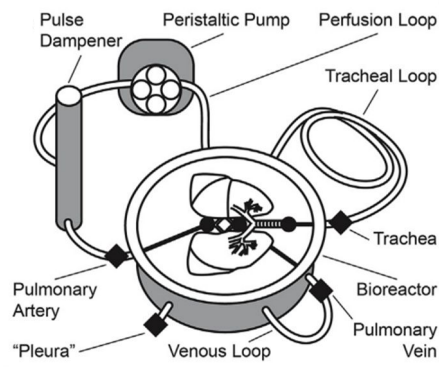
- ii) マトリックスコーティングを加えたモデル：Transwell®の半透膜上に、肺脱細胞化組織骨格をホモジナイズしてコーティングし、i)と同様に細胞を播種したが、明らかなバリア機能増強効果は認めなかった。
- ii) エラスチン類似ポリペプチドのコーティングを加えたモデル：Transwell®の半透膜上に、肺脱細胞化組織骨格、エラスチン類似ポリペプチドを2重にコーティングし、i)の結果を参考にして細胞を播種したが、こちらもバリア機能増強効果はみせなかった。
- iii) エラスチン類似ポリペプチドのコーティングを加えたモデル：Transwell®の半透膜上にエラスチン類似ポリペプチドを2重にコーティングし、その上で細胞を播種してTEERを測定したが、細胞の接着性が低下し、TEERは逆に減少した。

II) ex vivoでのハイブリッド血管ニッチの確立と再生肺の構築

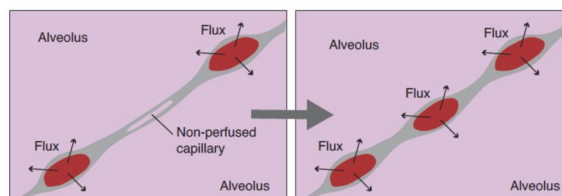
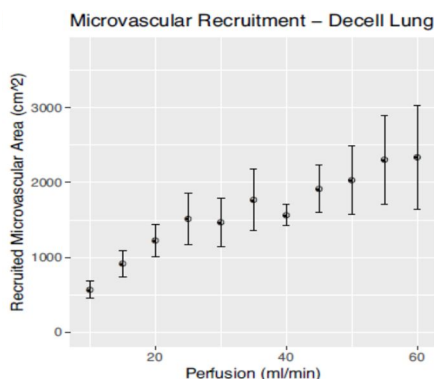
i) I)の実験で透過性が最適であった条件を、脱細胞化組織骨格上での再現を試みた。しかし脱細胞化組織骨格へのII型肺胞上皮細胞の接着率が予想外に悪く、肺胞透過性を評価したが、評価困難であった。そのため肺の全細胞と血管内皮細胞、脂肪幹細胞による再生肺を創出し、デキストラン(2,000kDa)kDaをバイオリアクター内で肺動脈より注入したところ、肺静脈よりほぼすべてのデキストランの流出が観察できた(左下図)。一方で、肺動脈からエラスチンコーティングを行い、ハイブリッド肺を作成したが、エラスチンが肺動脈内で硬化し、肺の柔らかさを損なってしまった。濃度を変更しても同様の傾向は変わらなかった(右下図)。



ii) 再生肺において灌流中の肺動脈圧、肺静脈圧および気管内圧を測定することで再細胞化による血管透過性および毛細血管の通過を間接的に評価した。測定方法の確立および評価のbaselineとして rat lung microvascular endothelial cell (RLMVEC)のみで再細胞化した再生肺での測定を行った。



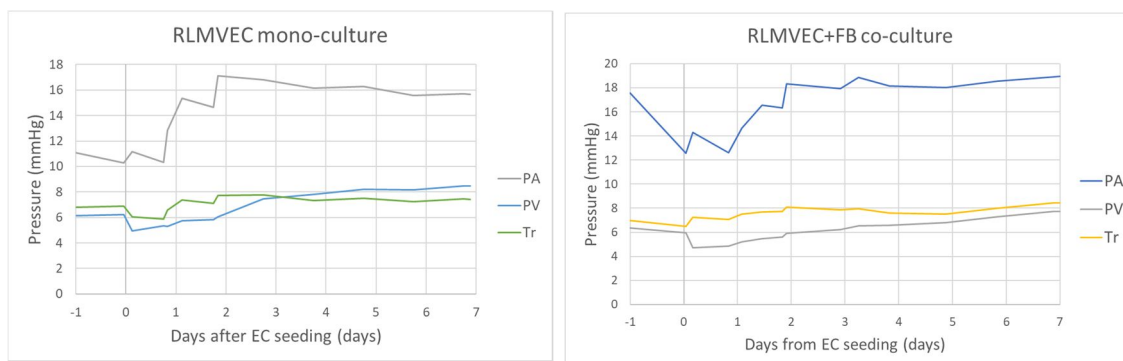
以前は灌流速度を4ml/minで培養を行っていたが、共同研究者のYale大学Niklason Labからの報告では、灌流速度が速い方がより多くの毛細血管のrecruitmentができるとの報告があったため(下図参照)、20~40ml/minの高流速で7日間培養を行った。



(Raredon MSB, et al. J Appl Physiol 131: 1444-1459, 2021.より引用)

RLMVEC のみの再細胞化肺では、Day2 で 40ml/min まで流速を挙げた後には肺動脈圧の平均は 17mmHg 程度で安定したが、その後日を追って徐々に低下傾向を示し、培養終了時点では 15.67mmHg まで低下した。一方で、肺静脈圧の平均は日を追って上昇傾向を示し、培養日数を重ねることで徐々に毛細血管が成熟されていることが示唆された。さらに、これに伴って気管内圧も日を追って緩徐に低下傾向を示し、血管内皮のみでも緩徐に barrier が形成されていっているものと考えられた(下図左参照)。

続いて RLMVEC に間葉系細胞の肺線維芽細胞を加えた co-culture 再細胞化で同様の実験を行ったところ、血管内皮細胞の mono-culture と同様に肺静脈圧は一過性的上昇傾向を示した。ただ、肺動脈圧・気管内圧については一旦減少傾向を示したのちに上昇傾向に転じており、線維芽細胞の増加に伴って ECM の破壊などによって生じた debris が血管の閉塞などにより肺動脈圧が上昇している可能性が考えられた。同じ間葉系細胞で feeder 機能が血管内皮細胞にもたらす merit 面を期待していたが、肺線維芽細胞のみではその demerit 面が強くなるため、多分化能を有し pericyte などの血管支持細胞などへも分化することのできる脂肪幹細胞の方がより成熟した毛細血管網を作製できると考えられた(下図右)。



付記)

当初予定していた、

III) in vivo での再生肺移植による機能評価

IV) プタを使用した前臨床研究

については、コロナ禍での研究の停滞と施設利用制限もあり、本研究期間で行うことはできなかった。

一方で、本実験で行った行程により、ニッチ構造がより生体に近い再生肺を創出できた。再生肺に肺癌細胞の結節を作成した肺癌モデルを創出したが (Mizoguchi et al. Front Bioeng Biotechnol.2023)、その技術内には本研究の理論が使用されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2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 Tsuchiya Tomoshi, Doi Ryoichiro, Obata Tomohiro, Hatachi Go, Nagayasu Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Lung Microvascular Niche, Repair, and Engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.00105	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 Mizoguchi Satoshi, Tsuchiya Tomoshi, Doi Ryoichiro, Tomohiro Obata, Iwatake Mayumi, Matsumoto Hiroataka, Yukawa Hiroshi, Hayashi Hiroto, Tao-Sheng Li, Yamamoto Kazuko, Matsumoto Keitaro, Miyazaki Takuro, Tomoshige Koichi, Nagayasu Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 A novel ex vivo lung cancer model based on bioengineered rat lungs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 105
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 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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土谷智史
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
2. 発表標題 肺再生研究の現状と展開 臓器構造を再現する過程で見えてきた課題
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土谷 智史
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回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 光寿、土谷 智史、土肥 良一郎、溝口 聡、松本 桂太郎、畑地 豪、渡邊 洋之助、永安 武
2. 発表標題 Transwell共培養システムを用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞による肺細胞間バリア機能増強効果の解析
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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	山本 和子 (Yamamoto Kazuko) (10398167)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	鳴瀧 彩絵 (Narutaki Ayae) (10508203)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	湯川 博 (Yukawa Hiroshi) (30634646)	名古屋大学・未来社会創造機構・招へい教員 (13901)	
研究分担者	諸藤 陽一 (Morofuji Yoichi) (40437869)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	李 桃生 (Ri Tausen) (50379997)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授 (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)	
研究分担者	佐原 寿史 (Sahara Hisashi) (90452333)	鹿児島大学・総合科学域共同学系・准教授 (17701)	
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)	

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	生体医工学講座		