

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18219

研究課題名（和文）ラット胎仔肺細胞より作成したオルガノイドの経気道投与による肺再生の可能性

研究課題名（英文）Lung regeneration by airway transplantation of organoids made from rat fetal lung cells

研究代表者

松本 大資（MATSUMOTO, Daisuke）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・特任助教

研究者番号：10761893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胎齢17日のGFP胎仔肺組織を採取し、肺オルガノイドの作成を行った。培養開始6日目のオルガノイドをドナーとして、雌性LEWラットをレシピエントとして用いた。全身麻酔下に気管挿管して、胎仔肺オルガノイドを含むDMEM液0.4mlを気管内投与した。投与後3日・1・2・4・8週に犠牲死させ、両肺を摘出し評価した。GFP(+)ドナー由来組織を観察して生着を確認し、蛍光免疫染色でPodoplaninやSurfactant protein Cなどの発現を確認した。さらにプレオマイシン肺線維症モデルにも同様に移植した。投与後4週で評価したところ、正常肺への投与と同様にGFP(+)の肺胞構造を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎仔肺組織によりオルガノイドが形成でき、肺に生着することが確認できたため、今後の再生医療において重要な細胞ソースの一つとなる可能性が示された。また、気管内投与による移植にも成功し、ラット以外に対しても低侵襲で効率の良い移植方法として実現性が高いものと考えられ、将来的に選択肢の一つになりうると思われる。新たな肺再生医療の基礎的知見が得られ、今後の研究につながる成果であったと考える。

研究成果の概要（英文）：17-day-old GFP fetal rat lung tissues were harvested to generate lung organoids. The organoids were used as donors after 6 days culture, and female LEW rats were used as recipients. A tube was inserted into the trachea, and 0.4ml DMEM including fetal rat lung organoids was administered intratracheally. We harvested the both lungs on 3 days, 1, 2, 4, and 8 weeks, and histologically evaluated. The GFP (+) areas were observed, and the expressions of Podoplanin, Surfactant protein C, Foxj1 and club cell secretory protein were confirmed by immunostaining, indicating that the grafts could survive and differentiate in recipients' lung. The fetal lung organoids were administrated into bleomycin-induced pulmonary fibrosis model as well. At 4 weeks after administration, the GFP (+) alveolar-like structure were confirmed in the fibrotic lungs such as shown in the normal lungs.

研究分野：医歯薬学 呼吸器外科学

キーワード：再生 幹細胞 肺 オルガノイド 気道投与

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Embryonic Stem Cell (ES 細胞) や induced Pluripotent Stem cell (iPS 細胞) の研究技術の革新により再生医療研究は飛躍的に進歩している。その一方で、肺の再生は、多数の細胞が構築に関与していることや、適合性の良い足場や増殖因子の調整が難しいこと、肺組織の 3D 構築が難しいことなどから、他臓器よりも研究が遅れていた。

これまで研究代表者のグループでは、ラット胎仔肺組織モデルを用いて肺胞領域の再生にアプローチし、基礎的知見を得てきた。胎仔肺組織が正常ラット肺だけではなく、プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおいても生着・分化すること、移植片は正常の発生・分化過程を模倣している可能性があることを証明した (Kenzaki, JTCVS 2006, Toba, JTCVS 2012)。また、移植片が肺胞レベルで脈管と交通していたとともに、Kohn 孔により気道とも交通していた。さらに、移植片は生着・分化する過程で、肺胞レベルではレシピエントの肺胞と癒合するとともに、境界領域では、ドナーとレシピエントと双方由来の細胞により肺胞がモザイク状に形成されていた。そして GFP (+) / GFP (-) 両方のラット胎仔肺組織を同時に成体ラット肺に移植すると、それぞれの移植片があたかもブロックが接合するように癒合し、成体肺内に生着した。以上から、生着・分化した移植片が、一部はレシピエント肺に迷入するように癒合し、最終的に肺胞構造を構築する事象を確認できた。

ここからさらに研究を進め、新たな移植のソースとして用いるため、ラット胎仔肺細胞からオルガノイド作成に取り組んでいる段階でいた。また、これまでの実験系では移植のために開胸手術を要していたが、経気道投与が可能になれば簡便かつ肺胞領域の広い範囲に移植できると考えていたため、今回の実験の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、(1) ラット胎仔肺細胞からオルガノイドを作成し、細胞ソースとしての至適時期を決定し、(2) 正常肺に気道内投与することで生着・分化するかどうか、(3) 障害肺 (プレオマイシン誘導) の修復や線維化肺のリモデリングに寄与し、機能を持たせることができるかどうかについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット胎仔肺オルガノイドの作成と移植至適時期の決定

ラット胎仔肺オルガノイド作成：胎齢 17 日の GFP 胎仔肺組織 (= ドナー) を摘出する。摘出肺を細切し cell strainer (40um) を通して細胞を回収し、遠心分離して胎仔肺細胞を得る。採取した細胞群を DMEM/F12 培地の 24 well plate に播種させ、培地に FGF-10 (50 ng/mL) と HGF (25 ng/mL) を添加した後、マトリゲルを加えて細胞を 3D 培養し、肺オルガノイドを作成する。

至適時期の決定：培養開始後 4, 6, 8, 10 日のオルガノイドを候補とする。real time RT-PCR にて、未分化マーカー (SOX2, SOX9, ProSFTPC, Id2, Nmyc) と分化マーカー (I 型: Pdpn, Ager, Aqp5, II 型: Sftpc, Muc1, Sftpb, Abca3) の発現を確認し、未分化・分化マーカーがともに発現したポイントを至適時期とする。加えて、免疫染色 (CCSP, ProSftpc, Pdpn, T1a, Foxj1) にて、作成したオルガノイドにおけるそれぞれの細胞の局在を確認する。

(2) オルガノイドを成体肺に気道内投与し、生着・分化を確認する

雌性 LEW ラット (8~12 週) をレシピエントとする。全身麻酔下に気管内挿管し、胎仔肺オルガノイドを 0.4ml (5-6 × 10⁵ / 0.4ml PBS) 気管内投与する。投与後 3 日・1・2・4・8 週に犠牲死させ、両肺を摘出する。

生着：無染色で GFP (+) ドナー由来組織の確認するとともに H-E にて形態的評価。

構成細胞：Pdpn (I 型), Sftpc (II 型), Foxj1 (ciliated), CCSP (club) にて局在確認。

未分化マーカー / 分化マーカーの経時的变化：(2) に準じ real time RT-PCR で評価。
気道、脈管との交通：India ink stain (脈管) と電子顕微鏡による超微形態と肺胞間孔の確認。

マイクロ CT：同一個体で経時的にマイクロ CT を撮像し、ドナーの経時的变化を確認。

(3) プレオマイシン (BLM) 誘導肺障害・肺線維症モデルの作成

雌性 LEW ラット (8~12 週) の気管内にチューブ (内径 0.3mm) を留置し、他方を皮下~後頸部に誘導し、3 日後 4.5mg/kg の BLM を 4 回に分けて、2 時間おきにチューブから気管内投与し、モデルを作成する。

(4) オルガノイドの気管内投与による障害肺の修復・線維化肺のリモデリングの評価

BLM 投与 3 日後を肺障害モデル、21 日後を肺線維症モデルとする。オルガノイド投与群 (n=5) vs. コントロール群 (n=5) vs. 病的肺モデル群 (n=5) の 3 群で比較する。オルガノイド投与群には、チューブから準じてオルガノイドを気管内投与し、コントロール群には、PBS のみを投与する。投与後 3 日・1・2・4・8 週に犠牲死させ、両肺を摘出する。

肺障害の修復：H-E による形態学的評価、W/D ratio、好中球・マクロファージの免疫染色、Micro beads array によるサイトカイン測定、マイクロ CT による画像評価。
線維化のリモデリング：H-E(Ashcroft score)、Masson-trichrome 染色、Sirius Red / Fast Green 染色、real-time RT-PCR(TGF- β 1, procollagen I, fibronectin)、気道・肺胞上皮構成細胞の染色(Pdpn(I 型), Sftpc(II 型), Foxj1(ciliated), CCSP(Club))によるリモデリング、マイクロ CT による画像評価。
機能評価：プレチスモグラフによる呼吸機能測定(TV, MV, AV, PIF, PEF, dV など)やトレッドミルによる運動能の評価など。

4 . 研究成果

胎齢 17 日の GFP 胎仔肺組織を採取し、肺オルガノイドの作成を行った。移植至適時期は real time RT-PCR による未分化マーカー・分化マーカーの発現程度から培養開始後 6 日目に決定し、移植モデルが確立した。正常ラットは雌性 LEW ラット(8~12 週)をレシピエントとして用い、全身麻酔下に気管内挿管して、胎仔肺オルガノイドを 0.4ml 気管内投与した。投与後 3 日・1・2・4・8 週に犠牲死させ、両肺を摘出して評価した。無染色で GFP(+)ドナー由来組織を観察することで生着を確認し、蛍光免疫染色で Pdpn(type-I cells)、Sftpc(type-II cells)、Foxj1(ciliated cells)、CCSP(club cells)の発現を確認した。

さらにプレオマイシン肺線維症モデルへのオルガノイド投与も行った。プレオマイシン誘導肺障害モデルについては、上述の気管内チューブ留置手術によるプレオマイシンの気管内投与により作成できた。その後、同様に胎仔肺オルガノイドを投与し、投与後 4 週をタイムポイントとして評価したところ、正常肺への投与と同様に GFP(+)の肺胞構造を確認することができた。投与したオルガノイドが生着することを確認することはできたが、線維化肺を改善させるまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|