

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09163

研究課題名（和文）脂肪幹細胞・iPS細胞を用いた難治性呼吸器疾患に対する新規肺再生治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel lung regeneration therapy for intractable respiratory diseases using adipose stem cells and iPS cells

研究代表者

福井 絵里子（Fukui, Eriko）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90814591

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）：慢性閉塞性肺疾患（COPD）は非可逆性の慢性進行性の肺疾患で、根治的な治療法がなく、新たな再生医療の開発が望まれている。今回、脂肪組織由来幹細胞（ADSCs）から肺胞上皮細胞へ分化することで肺胞を再生させるという、COPDに対するADSCs補充療法の研究を行った。ADSCsを肺気腫モデルマウスに尾静脈から投与した。マウス肺を遺伝子発現解析を行い、COPDマウスで高発現し、ADSCs投与により改善する遺伝子を確認した。さらに、ヒトのCOPD肺を網羅的に解析し、COPDモデルマウスで高発現していた遺伝子と一致する遺伝子に注目し、ADSCsの傷害肺の修復メカニズムを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの難治性呼吸器疾患は年々著しく増加している。

肺移植以外の根治的な治療法は確立されておらず、予後不良であり新たな治療法の開発が喫緊の課題である。現在の幹細胞治療ではパラクリン効果が主な作用であり、このような非可逆的な肺胞破壊を伴う難治性呼吸器疾患に対しては治療効果に限界がある。本研究では幹細胞自身が肺胞細胞へ分化する可能性を示し、COPDに対する根治的な肺胞再生治療の可能性を示した。また障害肺におけるマウスとヒトの共通遺伝子に注目することでヒトへの効果やメカニズムをより詳細に検討できる。

研究成果の概要（英文）：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an irreversible, chronic, progressive lung disease for which there is no curative treatment and the development of new regenerative medicine is desired. In this study, we investigated ADSCs supplementation therapy for COPD, in which adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) are differentiated into alveolar epithelial cells to regenerate alveoli. Gene expression analysis of mouse lungs was performed, and genes that were highly expressed in COPD mice and improved by ADSCs administration were identified. Furthermore, we are analyzing human COPD lungs comprehensively and focusing on genes that match those highly expressed in COPD model mice to analyze the repair mechanism of ADSCs-injured lungs.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 慢性閉塞性肺疾患 細胞移植治療 肺胞上皮細胞 肺再生

## 1. 研究開始当初の背景

COPD や特発性間質性肺炎 (IIPs)、新型コロナウイルス感染症などで問題となっている急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) などの難治性呼吸器疾患は年々著しく増加している。COPD は 2030 年には世界の死亡率の第 3 位を占めるようになると言われており、IIPs の 3 年生存率は 50%、ARDS は発症後の死亡率が 30~58%と極めて予後不良である。現在、これらの難治性・進行性の呼吸不全に対しては肺移植以外の根治的な治療法はない。しかし、臓器移植には、常に免疫抑制、拒絶反応などの医学的問題と、深刻なドナー不足という社会的問題を抱えており、再生医療の実用化が期待されている。

幹細胞を用いた再生医療は近年様々な肺疾患モデル動物に対して有効であると報告されているが、そのメカニズムは十分に明らかになっておらず、ヒトでの有効性を示すまでには至っていない。臨床応用を進める上で、肺再生メカニズムの解明や、複雑な肺組織における構成細胞間の相互作用の理解が必要である。しかし近年、マウスとヒトの間に重要な細胞や分子機構の違いがあることより、モデル動物を使った研究だけではヒトの呼吸器疾患の病態や再生を十分に再現できないことが問題となっている。

## 2. 研究の目的

モデルマウスのみではなく、ヒト肺組織からのアプローチも併用し、ADSCs の組織修復・肺再生メカニズムを解明する。その結果を基に効果的で安全な ADSCs を用いた細胞治療法を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ADSCs の組織修復メカニズムの解明：

当科での肺切除術で得られた余剰検体のうち、十分なインフォームドコンセントのもとに提供された肺組織から、Single cell sequence や RNA sequence を用いて、まず、ヒト COPD 肺とヒト健常肺組織を分析し発現変動遺伝子を同定する。次に、COPD モデルマウスと、ADSCs を投与したマウスの間で発現変動遺伝子を検証する。そして、ヒトとマウスの遺伝子候補を比較し、ヒト肺組織およびマウス肺組織で一致した挙動を示す遺伝子を同定し、ADSCs の COPD 修復メカニズムに關与する可能性が高い候補遺伝子を抽出する

肺オルガノイドの作成：

と同様にして得られた肺組織をハサミで細片化した後、プロテアーゼによる酵素処理により細胞レベルに分離させる。その細胞からフローサイトメーターで肺胞上皮細胞や気道上皮細胞を抽出し、マトリゲル内で 3 次元培養し、オルガノイドを樹立する。

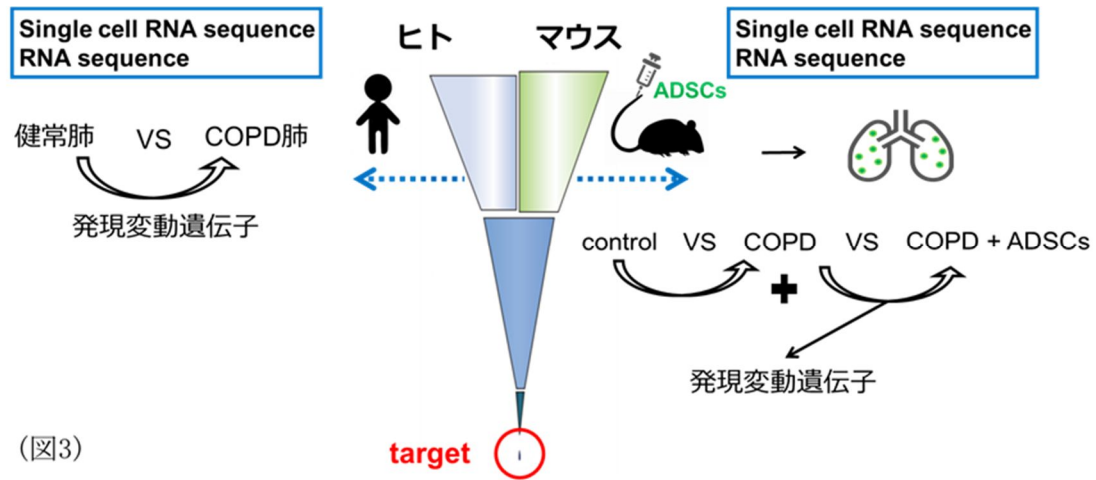
効果的な ADSCs 治療の確立：

の結果からピックアップされた ADSCs の生着・分化を促進する遺伝子や蛋白を、投与する ADSCs や投与されるレシピエントに誘導し、効率的・効果的な ADSCs 治療を確立する。ADSCs の改善効果・肺再生の評価は、COPD モデルマウスやヒト肺オルガノイドを用いて、組織学的評価、小動物呼吸機能、小動物 CT、換気血流シンチ、超偏極 129Xe-MRI、免疫組織化学染色、RT-PCR、ウェスタンブロッティングで行う。

## 4. 研究成果

次世代シーケンサーによる解析

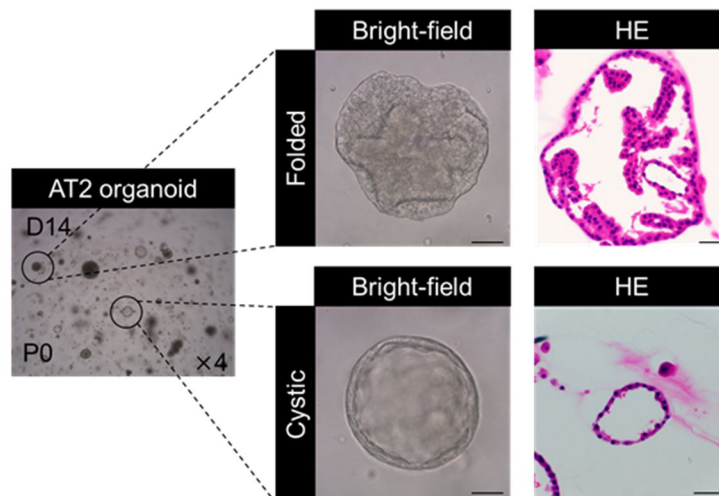
まず、進行した COPD または正常な肺を持つヒト被験者の摘出肺組織標本のシングルセル RNA シーケンスのプロファイルを解析した。次に、PPE 誘発 COPD マウスと ADSCs で治療したマウスから得られた発現が変動する遺伝子を RNA シーケンスで検討した。最後に、ヒトとマウスの遺伝子候補を組み合わせて、ADSCs に關連する COPD 修復機構に關与する可能性が高いと考えられる遺伝子を検証・選択した。血管内皮細胞、マクロファージ、肺胞上皮細胞で発現し、ヒト肺 Single cell RNA sequence で変化が見られたものを選択し、候補遺伝子を選定した。



(図3)

### 肺オルガノイドの作成

当科での肺切除術で得られた余剰検体から肺胞上皮細胞をソーティングし、ヒト肺オルガノイドを作成した。このヒト肺オルガノイドを用いて、ADSCs との共培養による候補遺伝子・産生蛋白質の変化を免疫染色、RT-PCR、ウェスタンブロッティング等を用いて検討する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 福井 絵里子, 新谷 康	4. 巻 36
2. 論文標題 幹細胞を用いた難治性呼吸器疾患に対する肺再生治療の研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 382-384
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 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福井絵里子、宮下裕大、木村賢二、狩野孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南正人、宮川 繁、澤 芳樹、新谷康
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞を用いた難治性呼吸器疾患に対する肺再生治療法の研究
3. 学会等名 第73回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井絵里子、宮下裕大、福島清春、木村亨、狩野孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、新谷康
2. 発表標題 Development of Lung Regenerative Medicine Using Adipose Tissue-derived Stem Cells
3. 学会等名 第75回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福井絵里子、新谷康	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 BIO Clinica	

〔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
---------	---------