

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22931

研究課題名（和文）肺由来生体・生物材料を用いた多能性幹細胞から肺オルガノイドの創生

研究課題名（英文）Induction of lung organoid from pluripotent stem cells using lung-derived biomaterials

研究代表者

北村 知嵩 (Kitamura, Tomotaka)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00882044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、各種臓器に由来する細胞外マトリックスを利用した臓器再生が試みられており、呼吸器領域における報告も散見される。本研究では、マウスES細胞から肺由来脱細胞化マトリックス（LM）を用いて、肺オルガノイドの分化誘導を試みた。成獣マウス由来LMをシート状に加工したLMSheetを作成し、それを用いてES細胞の三次元培養を行った結果、各種肺細胞および、気道上皮細胞のマーカーの遺伝子発現誘導亢進を認めた。さらに、組織学的解析により、LMSheetでの細胞生着を認め、LMの有効性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺は種々の細胞が立体的配置により機能しているが、その立体構成には細胞外マトリックスが主に関与していると考えられている。これまで細胞外マトリックスは専ら足場として利用されてきたが、本研究では、分化誘導因子としての可能性を精査した。マウス由来正常肺を脱細胞化後、シート状に加工したものをを用いてES細胞の分化誘導を行ったところ、肺および気道各種細胞への分化誘導を認めた。本研究成果は、肺再生や肺形成における細胞外マトリックスの新たな知見を示し、今後の呼吸器再生医学に大いに貢献し得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Recently, organ regeneration using extracellular matrix derived from various organs has been reported, and a few reports in the respiratory area. In the present study, we attempted to induce lung organoid from mouse embryonic stem (ES) cells using lung-derived decellularized matrix (LM). Three-dimensional cultures of ES cells were performed using sheets of LM prepared from adult mice lung (LMSheet). Increased gene expressions of various lung or airway epithelial cell markers were observed in differentiation of ES cells using LMSheet. Furthermore, histological analysis demonstrated formation of ES-derived lung organoid in LMSheet.

研究分野：再生医療

キーワード：肺オルガノイド 脱細胞化 細胞外マトリックス 胚性幹細胞 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の肺は複雑な構造を有し、気管から細気管支、肺胞に至りガス交換という機能を担っている。近年の目覚ましい分子生物学的、発生生物学的解析により、各種肺細胞の分化過程も解明されつつあるが、いまだ臓器レベルで肺を創り出すに至っていない。しかし、再生医療研究において様々な臓器（肝臓、脳など）の再生を模倣したオルガノイド生成技術を応用し、未熟な肺オルガノイドの作成に成功している報告から（Strikoudis *et al.*, *Cell Rep.*, 2019 など）肺を臓器レベルで創生・再生できる可能性も出てきた。なかでも、オルガノイドの作成には、外的環境や物理的強度等の関与が報告されており（Ueno *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2015）細胞分化・臓器の形成において、細胞外マトリックスは特に重要と考えられた。そこで私は、各種肺細胞への分化と肺オルガノイド誘導を同時に実現する目的で、肺由来細胞外マトリックス（LM）を調製・利用することにより立体構造と機能性を有する肺オルガノイドの創生を試みた。

2. 研究の目的

これまでの肺再生医療に関連した研究は、その多くがある種の特異細胞（2型肺胞上皮など）への分化に注視されがちであった。しかしながら、肺の特殊な発生と複雑な構造から、特定の細胞にターゲットを絞った研究は、臓器レベルの再生に十分とは言い難い。そこで本研究では、肺発生のダイナミックな現象に着目し、多能性幹細胞（ES細胞）から肺オルガノイドを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

脱細胞化マトリックス（LM）の調製

成獣マウスの肺を摘出し、脱細胞化処理を行うことで、肺由来脱細胞化マトリックス（LM）を調製した。LMをシート状に加工することでLMSheetを作成した。各種LMは、組織化学的解析（HE染色や基質関連の免疫染色）により精査した。

肺オルガノイドの作成・解析

LMSheet上で多能性幹細胞（マウスES細胞）と3次元培養を行った。培養組織の解析として、各種の肺細胞分化マーカーの遺伝子発現、および組織学的解析を行った。

4. 研究成果

脱細胞化マトリックス (LM) の調製

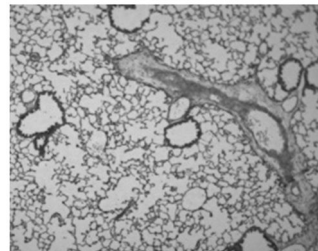
成獣マウス由来 LM と、シート状に加工した LMsheet の調製条件の検討を行った。成獣マウスの肺を NaCl、あるいは SDS により脱細胞化処理した場合、後者の条件で LM の調製に成功した。LM を固定後、凍結切片を作成し、H&E 染色により細胞除去処理を確認することができた(図 1)。更に、シート状に形成加工した LMsheet は、厚みの異なるシートを作成した。

肺オルガノイドの作成・解析

LMsheet を用いてマウス ES 細胞の三次元培養を行った。培養後のオルガノイドより total RNA を抽出後、real time RT-PCR により遺伝子発現変化を精査した結果、LMsheet を用いて培養した場合、各種肺細胞マーカー (1 型肺胞上皮細胞 : AQP5、2 型肺胞上皮細胞 : SPC、クラブ細胞 : CC10 など) および、各種気道上皮細胞マーカー (基底細胞 : TRP63、線毛細胞 : FOXJ1、杯細胞 : MUC5AC、クロライドチャネル : CFTR など) の発現亢進を認めた(図 2)。更に三次元培養後のオルガノイドを固定後、凍結切片を作成し、H&E 染色により組織学的解析を行った結果、LMsheet 内への細胞の増殖、生着を認めた(図 3)。現在、各種肺・気道マーカーの発現を免疫組織学的に解析している。

図 1

マウス正常肺のHE染色



LM-sheetのHE染色

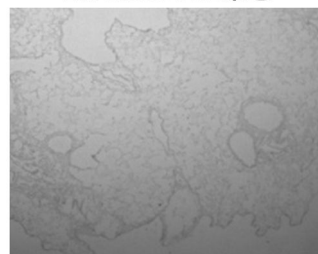


図 2

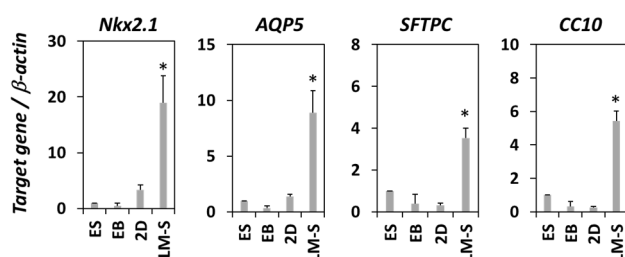
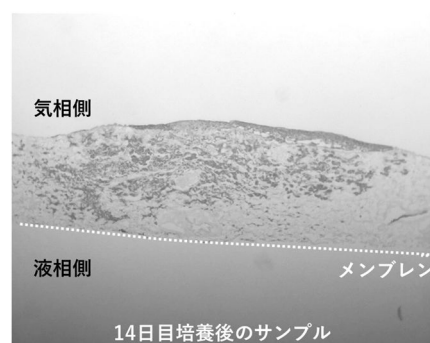


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 中山絵美, 北村知嵩, 濱田恵理子, 前倉俊也, 中村孝人.	4. 巻 7
2. 論文標題 多発肺結節・腫瘤の急速増大を認め経気管支肺生検により診断しえた多発血管炎性肉芽腫症の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 気管支学	6. 最初と最後の頁 in press
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 吉川 正英, 一色 厚志, 王寺 幸輝, 平位 暢康, 北村 知嵩, 三須 政康, 西村 知子	4. 巻 31
2. 論文標題 文献調査からみたわが国の糞線虫症の現況 2013年6月から2020年2月までの文献報告例の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床寄生虫学雑誌	6. 最初と最後の頁 28-33
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 王寺幸輝, 三須政康, 北村知嵩, 尾崎大輔, 吉川正英
2. 発表標題 プロスタミド誘導体の発毛促進におけるWntシグナルの影響
3. 学会等名 第20回再生医療学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 王寺幸輝, 三須政康, 北村知嵩, 阪上雅治, 尾崎大輔, 島田賢子, 吉川正英, 濱崎めぐみ, 濱野真二郎
2. 発表標題 住血吸虫をモデルとした人工in vitroライフサイクルの実現に向けて
3. 学会等名 第31回日本臨床寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔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
---------	---------