

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02925

研究課題名(和文) ヒト未分化細胞から誘導した肺上皮細胞のメッシュ上培養を用いた感染症研究への展開

研究課題名(英文) Mesh-culture system of lung epithelial cells from human undifferentiated cells for future application of infectious disease modelling

研究代表者

伊藤 功朗 (Ito, Isao)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40447975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺由来細胞を高効率に増殖させる手段としてフィーダー細胞を選別し、培地の組成を最適化したところ、従来よりも増殖速度が加速した。また、細胞シートモデルの作成にあたりフィーダーの除去方法を改良できた。気液界面培養により上皮細胞接着因子や肺胞上皮マーカーの発現を確認し、上皮バリア機能の成熟を達成した。マイクロメッシュ上培養については、メッシュと細胞外マトリクス薄膜を合成して基材を作成したところ、厚さ1-3 μmを達成し、市販の基材をはるかに上回る薄さであった。上記の肺胞上皮細胞と、ヒト肺由来血管内皮細胞の共培養のための、後者の単層シート作成も細胞外基質の調整により可能となった。以後検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薄型人工膜を用いた上皮細胞と血管内皮細胞の二層培養を成立させることが出来れば、従来の単細胞培養よりも、はるかに生体内を模写したモデルが確立できる。肺の研究のみならず、他臓器の研究へも応用範囲は広い。また、生理的反応や病態の理解に加え、創薬スクリーニングにも用いられる可能性が広がる。

研究成果の概要(英文)：For efficient development and increase of human lung epithelial cells, we adjusted the feeder cells and modified elements of culture medium. As the result, we succeeded in improvement of duplication speed of the cells. Air-liquid interface culture enabled the cells express epithelial tight junction markers and surfactant protein-C and the marker of type II pneumocytes. As the next step, we aimed to establish the two-sided culture system using micromesh-based thin membrane. The membrane with thickness of 1-3 micrometer was established. On the sheet we were able to culture human lung endothelial cells as well. We are now continuing to establish two-sided culture system.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺胞上皮細胞 SP-C マイクロメッシュ 気液界面培養 未分化細胞 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルスをはじめとする呼吸器感染症において、全身性のサイトカインストームやARDSは死亡リスクの上昇と直結する事象である。呼吸器感染症の病原体の多くは呼吸器系上皮細胞に感染し局所において免疫応答を惹起するが、これが局所にとどまらず、周囲の組織や臓器、全身に強い免疫応答を引き起こすプロセスの解明が進んでいるとは言い難い。

その要因の一つとして、宿主たる上皮細胞と病原体との相互作用を再現する良好な *in vitro* モデルが存在しないことが挙げられる。気道の線毛上皮、粘液分泌、型及び型肺胞上皮細胞などへの分化は、病原体の宿主選択性を再現するために重要であるが、この分野において広く用いられている不死化された各種細胞株は分化が十分であるとは言い難い。

申請者はヒト iPS 細胞から呼吸器系上皮細胞への分化誘導法の開発に携わるなか、肺胞上皮細胞は初代培養細胞の確立と維持が困難であることから、未分化細胞から誘導した肺胞上皮細胞を用いることがウイルス感染症の病態研究に有用と考えるに至った。

2. 研究の目的

本申請では誘導肺胞上皮細胞および初代肺胞上皮細胞の確立を試み、血管内皮細胞との共培養シートを作成し、その機能評価法を確立すること、および、この共培養系を用いて新型コロナウイルス感染の病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1 ヒト iPS 細胞や、肺組織由来初代培養から得られた未分化細胞を用いて、メッシュシートや透過性の細胞培養基材上に上皮細胞のシートを作成した

2 1と血管内皮細胞を基材の表裏に培養し、上皮と内皮が基底膜を介して接する生体内環境を再現する。

3 2の系を用いて新型コロナウイルスなどの感染モデルに応用し、共培養環境下での感染反応を解析する。

その手段として、医学と工学の技術的連携を行うことで、マイクロメッシュやマイクロ流体デバイスなどの organ-on-a-chip technology により、生体内に近い微小環境を模倣するに至らせることを目標とした。

4. 研究成果

・ヒト初代肺胞上皮細胞を用いた細胞シート作成

京都大学医学部附属病院呼吸器外科において施行された肺摘出組織から肺初代上皮細胞を用いて、感染症研究モデルとしての上皮シートを開発した。

肺由来の初代細胞を高効率に増殖させる手段としてフィーダーとの共培養法を採用するにあたり、マウスの胎児性線維芽細胞株 NIH-3T3 から、上皮細胞の増殖支持能の高い株を自家選抜した。樹立した亜株である NIH-3T3-YH2 を共培養に用い、さらに最適化した組成の培地を用いた場合、上皮細胞は元の NIH-3T3 株に比して約 1.6 倍の速度で増殖した。

細胞シートモデル作成時に磁気ビーズ法を用いてフィーダーを除去するあたっても手順の改良を行い、フィーダーの残留を最小化し、わずかに残留したフィーダーも気液界面培養 (Air-liquid-interface culture, ALI) の基材上に上皮細胞が定着する際に排除されることを利用して、純粋な上皮からなる細胞シートの作成に成功した。

この上皮シートの機能を評価するにあたり、細胞間接着分子である上皮型カドヘリン、オクルルディン、および肺胞上皮マーカーの発現について、固定標本の免疫蛍光染色と定量的 RT-PCR で確認した。細胞間の密着結合のマーカーであるオクルルディンの発現および経上皮電気抵抗 (Transepithelial electric resistance, TEER) による上皮のバリア機能評価においては、ALI 培地の組成を修正することにより、上皮シート全体に密着結合が形成され、TEER 値 $110 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度を達成した。

・マイクロメッシュ上の細胞シート作成

本研究におけるマイクロメッシュと細胞外マトリクスの薄膜を組み合わせた培養基材において、薄膜の厚さを測定したところ、約 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ であった。これは、生体内における厚さ数十～数百 nm の基底膜より厚いものの、市販の樹脂や生体高分子を用いた培養基材 (厚さ数百 μm) より格段に薄く、肺胞上皮細胞と血管内皮細胞が基底膜を介して近接し、ガスや物質の交換を行うモデルの構築を可能にするものと考えられた。これを踏まえ、薄膜の片面に肺胞上皮を、他の面にはヒト肺の毛細血管由来の血管内皮細胞を播種し、肺胞の機能単位を再現したモデルの開発に着手した。血管内皮細胞はメッシュ上で CD31 を発現する単層シートを形成した。当初はメッシュ上への定着を維持することが課題であったが、薄膜をコ

ートする細胞外マトリクスの種類と濃度を調整することにより、細胞シートの統合性を保って1週間程度の維持が可能となった。今後も、より進歩した細胞シートの作成を実現できるよう検討を重ねる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Oii I, Ito I, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Investigation of predictors for in-hospital death or long-term hospitalization in community-acquired pneumonia with risk factors for aspiration.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Eur Clin Respir J	6. 最初と最後の頁 2335721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20018525.2024.2335721.	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 Hamao N, Ito I, et al.	4. 巻 225
2. 論文標題 Clinical phenotypes of nontuberculous mycobacterial disease by cluster analysis based on pulmonary function.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Respir Med	6. 最初と最後の頁 107600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2024.107600.	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 Kataoka Y, Tanabe N, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Artificial intelligence-based analysis of the spatial distribution of abnormal computed tomography patterns in SARS-CoV-2 pneumonia: association with disease severity.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-024-02673-w.	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 Shirata M, Nishioka K, et al.	4. 巻 220
2. 論文標題 Impact of wearing a surgical facemask during exercise on dyspnea in patients with chronic pulmonary infections: a randomized crossover study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respir Med	6. 最初と最後の頁 107453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2023.107453.	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 7.Nishikawa A, Ito I, et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Pharmacokinetics of GS-441524, the active metabolite of remdesivir, in patients receiving continuous renal replacement therapy: A case series.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 348-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2023.10.015.	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 Ito I	4. 巻 61
2. 論文標題 Have clinical studies on COVID-19 matured?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respir Investig	6. 最初と最後の頁 800-801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2023.08.010.	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 Shirata M, Ito I, et al.	4. 巻 61
2. 論文標題 Effect of biologic therapy on the humoral immune response to the BNT162b2 vaccine in patients with asthma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respir Investig	6. 最初と最後の頁 733-737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2023.07.006.	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 Shirata M, Ito I, et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Impact of methotrexate on humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccine in patients with rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clin Exp Med	6. 最初と最後の頁 4707-4720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10238-023-01163-5.	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 Shirata M, Ito I, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Factors Associated With the Development of Bacterial Pneumonia Related to Seasonal Influenza Virus Infection: A Study Using a Large-scale Health Insurance Claim Database.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Open Forum Infect Dis	6. 最初と最後の頁 ofad222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ofid/ofad222.	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 Oi I, Ito I, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Protein C activity as a potential prognostic factor for nursing home-acquired pneumonia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0274685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0274685.	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
研究分担者	今井 晶 (松島晶) (Imai-Matsushima Aki) (40828943)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	
研究分担者	今井 誠一郎 (Imai Siichiro) (90572610)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	
研究分担者	オケヨ ケネディオモンディ (Okeyo Kennedy) (10634652)	京都大学・医生物学研究所・講師 (14301)	退職、米国へ異動にて年度途中に分担者から外れた。外れるまでに成果を供与いただいたため、研究は遂行できている。

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
---------	---------