

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08913

研究課題名(和文)肺胞上皮細胞シート移植による肺再生研究

研究課題名(英文)A novel alveolar epithelial cell sheet fabricated for potential use in pulmonary regenerative therapy

研究代表者

光星 翔太(Mitsuboshi, Shota)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70746875

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)：体重100-150gの雄ラットから単離した肺胞上皮細胞(AEC)をフィーダーフリーで低カルシウムイオン培地を用いて初代培養を行った。培養増殖したAECを温度応答性培養皿に継代し、細胞シートとして回収した。無胸腺ラットの肺を一部切除し切除断端へAECシートを移植し、1週間後に移植肺を摘出し、AECの機能を維持し生着していた。作製されたAECシートは再生医療への活用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植、人工臓器の発展、進歩は目覚ましいが、それぞれ克服すべき課題があるり、これらを克服するための手段として再生医療が提案される。肺再生にはガス交換能を有する肺胞上皮細胞(AEC)が重要とされるが、長期培養が困難とされ、再生医療が進んでいない。本研究ではAECの培養方法、AECシート作製、移植までを行い、AECの特性を維持し生着を確認できた。今後、AECシートを用いた臨床応用が期待でき、再生医療における意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We describe a novel feeder-free method of fabricating alveolar epithelial cell (AEC) sheets that may be suitable for pulmonary regenerative therapy.

Lung tissues excised from male rats were finely minced and dissociated with elastase. The isolated AECs were cultured in the low-calcium medium containing a rho kinase inhibitor and on tissue culture dish coated with recombinant laminin-511 E8 fragment. The expanded cells were cultured on temperature-responsive dishes and subsequently harvested as AEC sheets. The AEC sheets were firmly engrafted 7 days after transplantation onto the lung defect and expressed AEC marker proteins. AEC sheets fabricated under feeder-free conditions retained the features of AECs after transplantation onto the lung in vivo. Further improvement of this technique may allow the bioengineering of alveolar-like tissue for use in pulmonary regenerative therapy.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺胞上皮細胞 細胞シート フィーダーフリー 移植

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 疾患、外傷等により生じた欠損、損傷臓器・組織の再建・修復は、生体機能の回復のためにしばしば必要となる。欠損や損傷が大きく重篤な場合には、現状では臓器移植や人工臓器に頼らざるを得ないことも少なくない。しかし臓器移植では慢性的なドナー不足や免疫拒絶反応など解決すべき課題が残されており、また人工臓器の利用においては、抗血栓性、生体親和性、耐久性などが大きな問題となっている。このため、これらの代替であり、かつ根治治療を可能にするものと期待される再生医療が大きな注目を集めている。

(2) 呼吸器領域における再生医療はガス交換を行う点で他臓器と異なり複雑とされる。肺胞内でガス交換、表面張力、吸入された病原体や毒素からの保護を維持する必要があるため、AEC が重要な役割を担っている。AEC は 1 型と 2 型に分類され、1 型肺胞上皮細胞 (AECI ; type I alveolar epithelial cell) は周囲の毛細血管との間でガス交換を行うために扁平な形をし、2 型肺胞上皮細胞 (AECII ; type II alveolar epithelial cell) はサーファクタントの分泌を行い表面張力や吸入された病原体や毒素からの保護を維持している。AECII は自己複製能を持ちながら、AECI へ分化するという肺における幹細胞としての重要な役割も担っている。WNT シグナル伝達経路が AECII の幹細胞性を調節することが示唆され、応答遺伝子である Axin2 の活性が報告されている。

(3) AEC は *in vitro* では AECII から AECI へ分化し、長期培養が困難と報告される。AEC の培養方法は、増殖や分化に必要な環境を整えるためマウス由来フィーダー細胞との共培養が確立している。しかし、マウス由来フィーダー細胞と共培養されたヒト上皮細胞移植片は、米国食品医薬品局で異種製品に分類され、異種由来の細胞を使用し培養された細胞は、より安全性の担保が必要な再生医療には使用しづらい。

(4) 細胞シート移植は細胞注入よりも高い生着率、長期生存のため、機能面を有意に改善させると報告されるが、現在までにフィーダーフリーでの AEC の培養方法、AEC 単一細胞からなるシート作製の報告はない。

2. 研究の目的

本研究では再生医療の組織補填療法として肺胞構造の再構築を目的に、AEC を細胞ソースとし、フィーダーフリーでの AEC 培養方法の確立と AEC シート作製と再生治療としての移植までを行う。

3. 研究の方法

(1) 体重 100-150g の雄 Outbred ラットもしくは Green Fluorescent Protein(GFP)トランスジェニックラットから肺を摘出し、エラスターゼ処理後、密度勾配法で AEC を単離した。単離した AEC をフィーダーフリーで培養方法を検討した。低カルシウムイオン(Ca^{2+})培地に Rho kinase inhibitor 添加の有無、培養皿に Laminin コーティングの有無において 4 通りの培養方法で初代培養を行った。

(2) 培養増殖した AEC を温度応答性培養皿に継代し、コンフルエント後に 20 ℃へ低温して細胞シートとして回収した。

(3) 無胸腺ラットを挿管、全身麻酔管理とし、肺の一部を切除し切除断端へ AEC シートを移植し、1 週間後に移植肺を摘出し解析した。

4. 研究成果

(1) 単離した AEC を 4 通りそれぞれで初代培養した。1 週間後に細胞数を計測し、Rho kinase inhibitor 添加した低 Ca^{2+} 培地、Laminin コーティングした培養皿を用いた方法が他の方法と比較し、有意に細胞増殖した。増殖した細胞を免疫染色を行い、AEC のマーカーである aquaporin(AQP)-5、Surfactant Protein(SP)-A、SP-C、SP-D、Axin-2 いずれも陽性を呈し、AEC の増殖が得られた。

(2) 培養増殖した AEC を温度応答性培養皿へ播種し、コンフルエント後に 20 ℃へ低温するも細胞シートとして回収できず。コンフルエント後に Ca^{2+} を添加して、培養を継続した。3 日後に 20 ℃へ低温すると細胞シートとして回収できた。細胞シートとして回収前の細胞を免疫染色すると、 Ca^{2+} を添加した細胞は細胞間接着の E-cadherin 陽性を呈した。得られた細胞シートを免疫染色

すると、AQP-5、SP-A、SP-C、SP-D、Axin-2いずれも陽性を呈し、AECシート作製が確認された。

(3) 作製された GFP-AEC シートを挿管、全身麻酔管理とした無胸腺ラット肺の一部を切除し切除断端へ移植した。1週間後に開胸し、肺に紫外線照射すると GFP 蛍光を認め、GFP-AEC シートの生着を確認した。移植肺を摘出し、免疫組織学的解析では、摘出した移植肺の GFP 陽性を示す部位に一致し、AQP-5、SP-A、SP-C、SP-D、Axin-2 陽性を呈し、AEC の機能を維持し生着していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Mitsuboshi Shota, Homma Jun, Sekine Hidekazu, Takagi Ryo, Shimizu Tatsuya, Kanzaki Masato	4. 巻 19
2. 論文標題 A novel alveolar epithelial cell sheet fabricated under feeder-free conditions for potential use in pulmonary regenerative therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 113 ~ 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.01.005	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 光星翔太, 関根秀一, 本間順, 高木亮, 清水達也, 神崎正人
2. 発表標題 フィーダーフリーで作製した肺胞上皮細胞シートを用いた肺再生医療
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 光星翔太, 四手井博章, 荻原哲, 高圓瑛博, 青島宏枝, 井坂珠子, 西内正樹, 神崎正人
2. 発表標題 フィーダーフリーで作製したラット肺胞上皮細胞シートの構造的解析
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光星翔太, 四手井博章, 高圓瑛博, 前田英之, 青島宏枝, 井坂珠子, 西内正樹, 神崎正人
2. 発表標題 フィーダーフリー肺胞上皮細胞シート作製と移植の解析
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光星翔太, 小俣智郁, 四手井博章, 荻原哲, 青島宏枝, 井坂珠子, 松本卓子, 神崎正人
2. 発表標題 フィーダーフリーで作製した肺胞上皮細胞シート移植による構造的解析
3. 学会等名 第40回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------