



Title	Three-Dimensional Idiopathic Pulmonary Fibrosis Model Using a Layer-by-Layer Cell Coating Technique
Author(s)	久能, 英法
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85345
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	久能 英法
論文題名 Title	Three-Dimensional Idiopathic Pulmonary Fibrosis Model Using a Layer-by-Layer Cell Coating Technique (LbL法を用いた三次元特発性肺線維症モデル)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 特発性肺線維症(IPF)は予後不良の疾患であり未だそのメカニズムの解明は不十分である。IPFの病態解明における問題点として、既存のin-vitro/in-vivo assayがIPFの病態を十分に反映していない事があげられ、近年三次元培養を用いた疾患モデルが着目されている。しかし既存の三次元培養では三次元構造を維持するためにscaffoldを要する事から、細胞固有の機能を十分反映し得ない事が問題となりIPF由来細胞を用いた三次元培養モデルはまだ確立されていない。そこで我々は細胞周囲を細胞外マトリックスのナノ薄膜でコーティングすることでscaffoldを用いずに三次元組織の構築が可能となるLayer-by-Layer法(LbL法)に着目した。LbL法を用いる事で線維芽細胞からなる三次元組織が構築可能となり、さらに血管内皮細胞を混合培養することで微少血管網を含有した三次元組織も安定かつ早期に構築できることがこれまで報告されている。一方、血管新生阻害薬であるNintedanibが抗線維化薬として臨床認可を受け、線維芽細胞/血管新生との関係について着目されている。そこで我々は、IPF由来線維芽細胞を用いたscaffold freeな三次元modelを作製することで、IPFにおける線維化/血管新生の病態を模した新規in-vitro三次元間質性肺炎モデルが構築可能ではないかと考えた。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 LbL法を用いて肺線維芽細胞をECMによるナノ薄膜でコーティングし、三次元組織作成。それぞれの三次元構築を検討した。①正常肺由来線維芽細胞(NHLF)を用いた三次元組織(NHLF-3D)を構築しHE染色を用いてその形態、最適条件の検討を行った。さらに肺微小血管内皮細胞(HMVEC-L)と混合培養し微小血管含有三次元組織(V-NHLF-3D)を作製しCD31による蛍光免疫染色を用いて細胞数の最適条件の検討を行った。血管網の定量化には画像解析ソフトのWintubeを用いた。②IPF由来肺線維芽細胞(DHLF-IPF)を用いた三次元組織(IPF-3D)を構築し、NHLF-3Dとの構造をHE染色/COL1・α SMAの蛍光免疫染色を用いて比較した。さらにDHLF-IPFを用いた微少血管含有三次元組織(V-IPF-3D)を作製しV-NHLF-3Dとの間でCD31を用いた蛍光免疫染色で微小血管網の比較を行った。さらにセルラインであるNHLF/ DHLF-IPFで見られた三次元的特徴が、正常肺/IPF肺の手術検体から確立したPrimary culture(正常肺由来線維芽細胞(NF)/間質性肺炎由来線維芽細胞(PIP))を用いた細胞でも観察されるのか検討した。③DHLF-IPFに抗線維化薬であるPirfenidone(PFD)/Nintedanib(BIBF1120)を投与することで、三次元構造/血管構造がどのような変化をとるか/薬剤応答性をもつのかを、HE染色/COL1, α SMA, CD31の蛍光免疫染色を用いて比較検討した。 ①HE染色からNHLF-3Dでは疎な三次元組織が構築された。また、共焦点顕微鏡によるCD31蛍光免疫染色からHMVEC-Lと共培養を行うことで、微小血管網を持った三次元組織が構築されることが確認された。以後NHLF-3D/V-NHLF-3DをコントロールとしてIPF由来線維芽細胞から作成された三次元組織(IPF-3D/V-IPF-3D)との比較を行った。②HE染色においてIPF-3DはNHLF-3Dに比較して密な三次元形態をとり、蛍光免疫染色においてIPFの特徴であるCOL1/α SMAの高発現が確認された。またCD31による蛍光免疫染色の結果V-IPF-3Dは臨床検体における線維化早期層で見られた様な、豊富な血管網が形成されていた。これらの傾向はPrimary cultureを用いた検討でも同様であった。③PFD/BIBF1120を投与した所、IPF-3Dはその三次元構造/微少血管網においてそれぞれNHLF-3D/V-NHLF-3Dと類似した三次元構造を呈し、COL1/α SMAの発現も抑制された。以上の事からLbL法によるIPF三次元modelは薬剤応答性を持つ事が確認された。 〔総 括(Conclusion)〕 LbL法を用いて作成されたin-vitro三次元IPF モデルは、IPFの病態を模し、薬剤応答性を示す新規アッセイになりうる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 久能 英法

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授	新谷 康
	副 査 大阪大学教授	待田 直毅
	副 査 大阪大学教授	江口 英利

論文審査の結果の要旨

特発性肺線維症に関わる因子として線維芽細胞の活性化、細胞外マトリックスの増生、血管新生などが報告されているが、線維化の病態や線維化における血管新生を十分に表現したアッセイが存在しないことから病態解明は進んでいない。そこで足場材を用いずに三次元組織が構築可能となる交互積層法を用いて、ヒト由来肺線維芽細胞と血管内皮細胞からなる三次元組織を作製し、特発性肺線維症における線維化と血管新生の病態を反映した薬剤スクリーニングにも応用できる生体外三次元肺線維症モデルの作成が試みられた。作成された特発性肺線維症由来線維芽細胞からなる三次元組織では密な三次元構造を呈し、COL1A/ α SMAの発現も亢進が見られた。また血管含有組織においては、特発性肺線維症の早期の病態に類似した血管新生の亢進も見られた。既存の薬剤である

Pirfenidone/Nintedanibに対してもそれぞれの薬剤応答性を示し、作成された三次元特発性肺線維症モデルは病態を反映し薬剤応答性をもった新規アッセイとなりうる可能性を示した。

本研究論文は学位の授与に値すると考えられる。