

博士論文

部分切除肺から得た自家細胞をもとに脱細胞化技術で作成した
再生肺の移植の検討

柳谷 昌弘

論文タイトル：部分切除肺から得た自家細胞をもとに脱細胞化技術
で作成した再生肺の移植の検討

所属：外科学専攻

指導教員名：中島 淳

申請者名：柳谷 昌弘

目次

要旨	6
序文	7
1. 末期肺疾患の現状.....	7
2. 末期肺疾患に対する肺移植の現状と問題点.....	9
3. 脱細胞化技術を用いた臓器再生の現状.....	13
4. 脱細胞化技術を用いた肺再生研究の現状.....	18
目的	20
1. 肺の脱細胞化手法の最適化.....	20
2. 肺再生に必要な気道上皮基底膜細胞の分離培養ならびに性質の検討.....	22
3. 肺再生に必要な血管内皮細胞の分離培養ならびに性質の検討.....	23
4. 脱細胞化肺スキャフォールドの再細胞化.....	24
5. 再生肺の <i>in vivo</i> での機能評価	25
方法と結果	26
1. 動物愛護と倫理的配慮.....	26
2. 使用動物.....	26
3. 組織学的評価.....	26
4. 免疫組織化学.....	27

5. 統計解析.....	28
6. 脱細胞化肺スキャフォールドの検討.....	29
6-1. 肺グラフト摘出.....	29
6-2. 脱細胞化手技.....	31
6-3. 肺グラフトの DNA 抽出ならびに DNA 定量.....	36
6-4. 肺グラフトの細胞外マトリックスたんぱく質の評価.....	36
6-5. 結果.....	39
7. レシピエント自家細胞の分離と培養.....	48
7-1. 小開胸下ブタ肺部分切除	48
7-2. 気道上皮細胞の分離培養	50
7-3. 気道上皮細胞の Characterization	51
7-4. 血管内皮細胞の分離培養	52
7-5. 血管内皮細胞の Characterization	53
7-6. 結果	56
8. 再生肺グラフトの検討.....	59
8-1. 脱細胞化肺スキャフォールドの再細胞化	59
8-2. 結果	60
9. 再生肺移植と再生肺の in vivo 機能.....	62

9-1. 再生肺移植	62
9-2. 同種他家肺移植	65
9-3. 脱細胞肺移植	65
9-4. 結果	66
10. 移植後の再生肺グラフトの組織学的評価.....	74
考察	76
1. 肺の脱細胞化における気管支内生理食塩水注入の効果.....	71
2. 再生肺移植の実現可能性.....	78
3. 本研究の限界.....	85
結語	87
謝辞	88
参考文献.....	89

要旨

死因の主要な地位を占める末期肺疾患の有望な治療は同種他家肺移植であるが、拒絶などの問題がある。これらの問題解決のために、レシピエントと遺伝的に同一な細胞に基づいた肺再生が望まれる。

ブタ動物モデルにおいて、我々は脱細胞化技術を用いて、レシピエント由来の自家細胞をもとに再生肺を構築し、左片肺移植を行った。再生肺移植は同種他家肺移植と比較して超急性期において酸素ガス交換能は同等であったものの、嚢胞性変化や二酸化炭素ガス交換能不良といった結果をきたした。これらの変化は、脱細胞化過程におけるエラスチン喪失と自家細胞の不足が原因と考えられた。本研究は、今後の肺再生研究を行う上での課題を提示し、大きな礎になると考える。

序文

1. 末期肺疾患の現状

現在世界では約 3 億 8 千万の人が慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease, 以下 COPD と略す）に罹患しており，慢性下気道呼吸器疾患は依然として死因の主要な位置を占めている（1, 2）. 2015 年に報告された，123 報の既報に基づいたメタアナリシスによれば，2010 年には 30 歳以上の世界人口において，COPD 患者は 11.7%（8.4%-15.0%）を占め，1990 年からの 20 年間で約 1 億 6 千万人も増えている（1）. さらに，最も罹患率が低い東南アジア地域においても 9.7%であり，世界において局地的な問題ではなく，全世界的な問題であると言える（1）. 死亡数では，米国の 2015 年のデータにおいて，慢性下気道呼吸器疾患は死因の第 3 位であった（2）. COPD は罹患率・死亡数の高い疾患と言える.

また頻度は稀である末期肺疾患も存在する．間質性肺疾患の代表である特発性肺線維症はその典型例である（3）. 特発性肺線維症の罹患率は諸家の報告によるばらつきはあるものの，10 万人あたり 2 件から 29 件と推定されている（4-6）. そして，複数の後方視的縦断研究によれば，特発性肺線維症患者の中間生存期間は約 2 年から 3 年程度と報告されてきた（7-11）. 特発性肺線維症患者の経過には，ばらつきがあるとの報告もある（12）. しかしながら，特発性肺線維症患

者において、死亡の危険因子である急性増悪が年間約 5-10%に発生することを鑑みると、予後不良な肺疾患であることは間違いない (13-15)。急激な経過をたどり得る間質性肺疾患としては他に上葉優位型肺線維症も報告されている (16, 17)。上葉優位型肺線維症は診断から死亡まで 4 か月から約 2 年と報告されている (17)。

上記の通り、末期肺疾患には、罹患率と死亡数がともに高い COPD や、低頻度ではあるが予後は極めて不良な間質性肺疾患と様々な病態を含む。呼吸器科医にとって、これらの疾患は克服すべき課題であると言える。

2. 末期肺疾患に対する肺移植の現状と問題点

末期肺疾患に対して同種他家肺移植は依然として唯一の治療法である (18, 19). ヒトの臨床肺移植の第一例目は 1963 年に行われた米国ミシシッピ大学における左片肺移植である (20). 左主気管支の悪性腫瘍に対して左片肺移植を施行された第一例目の患者は術後 18 日目に腎不全ならびに悪性疾患に伴う全身状態不良により死亡した. この時, グラフト肺は機能していたと報告されているが, 僅かに拒絶の徴候も示していたとされる (20). その後, 1980 年代に入るまで, 2 例の移植患者において 6 か月と 10 か月という生存期間の延長が得られたものの, 退院できる程の長期生存は得られなかった (21). 移植黎明期における免疫抑制はステロイド, アザチオプリン, 胸腺に対するコバルト療法であった (22) が, 強力な免疫抑制剤であるシクロスポリンの登場によって肺移植治療は大きく変わった (23). シクロスポリンの使用により, 1981 年にスタンフォード大学は心肺移植の長期生存を (24), 1983 年にトロント大学は片肺移植の長期生存を報告した (25). その後, トロント大学では両肺を気管ごと移植する両肺移植が進められたが, 気管の縫合不全をはじめとする合併症が多く発生した (26). これは気管断端の長さによる血流不全が原因と考えられ, 1990 年に左右の両気管支を吻合する両側片肺移植が報告され, 現在まで標準術式となっている (27).

末期肺疾患に対する肺移植の治療成績は既に数多く報告されている (28, 29). 間質性肺疾患の中でも特に予後の不良な特発性肺線維症に対する肺移植では、術後の中央生存期間は約 4.5 年と報告されている (28). さらに国際心肺移植学会 (International Society for Heart and Lung Transplantation) の 2010 年の報告によれば、 α -1 アンチトリプシン欠損症、嚢胞性線維症、COPD、特発性肺動脈性肺高血圧症、サルコイドーシスの術後中央生存期間はそれぞれ 6.1 年, 7.1 年, 5.2 年, 4.9 年, 5.1 年と報告されている (29). 予後不良な末期肺状態を鑑みると、現時点では同種他家肺移植は最も有効な治療と考えられる.

しかしながら、同種他家肺移植には依然として看過できない問題がある。ドナー不足と合併症がその代表例である (18, 30).

肺移植医療におけるドナー不足は特に我が国、日本においては深刻である (31). 2017 年の報告によれば、我が国における脳死肺移植の適応となる患者の、移植までの平均待機期間は 2.5 年であり、これは米国の 3.4 か月と比して極めて長い (32, 33). 待機期間が長いことにより、待機期間中の患者死亡が少なくないという現状である (34). 脳死ドナー不足の解決策として、生体肺移植という治療法も存在する。生体肺移植とは生体ドナーから肺の一葉をレシピエントに移植する方法で、スタンフォード大学で 1990 年にはじめて長期生存例が報告された (35). 我が国においては、脳死ドナー不足から生体肺移植が多く行われて

きた (34). 我が国において 2013 年末までに実施された脳死肺移植は 197 件に対し、生体肺移植は 145 件と脳死肺移植に匹敵する件数が行われてきた (36). 生体肺移植の長期予後は、脳死肺移植と遜色ないという報告もあり、脳死ドナーを待機できない患者にとっては有効な治療である (37). しかしながら、生体ドナーから提供されるグラフトサイズが必ずしもレシピエントにマッチできることは限らないことや、生体ドナーの合併症の懸念から、生体肺移植の適応は限定的である (38, 39).

また肺移植の合併症は看過できない問題である. 2014 年の我が国の報告によれば (40), 肺移植のレシピエントとなった 344 例のうち観察期間内に 76 例が死亡した. 死亡時期に関わらず、感染は死因の約 30-40%を示す主要な要因であり、移植後 90 日以内の死因としてはグラフト不全が約 50%近くを占めていた (40). 術後 1 年以内の死亡では感染が最も多く、術後 1 年以降での死亡は慢性グラフト機能不全 (chronic lung allograft dysfunction, CLAD) が最も多かった (40). 我が国の 2014 年の報告における肺移植後の予後は 1 年生存率 86.2%, 3 年生存率 79.6%, 5 年生存率 73.7%であった (40).

また免疫抑制剤の長期使用に伴う悪性疾患の発生も、肺移植患者における死因の要因である (41). 肺移植後の悪性腫瘍は死亡リスクを 1.44 倍も高めると報告されている (41).

上記の通り，末期肺疾患において同種他家肺移植は有用な治療法であるが，ドナー不足や合併症といった問題があり，これを克服する医療の開発が望まれる．

3. 脱細胞化技術を用いた臓器再生の現状

同種他家肺移植にみられる拒絶の問題を克服するには、究極的にはレシピエント由来の細胞をもとに再構築した臓器再生が必要となる (42, 43). 近年、レシピエント由来の自家細胞の配置のために、脱細胞化スキャフォールドを用いた組織工学技術での臓器再生が試みられている (43, 44).

脱細胞化技術とは、臓器にある細胞を完全に除去し、細胞外マトリックスのみの構造物を構築することである (45). 臓器を脱細胞化することで得られる脱細胞化スキャフォールドには 3 つの利点がある (43). 1 つは、脱細胞化スキャフォールドは臓器機能に必要不可欠な構造物、例えば血管網、肺に関しては気管支構造といったものが維持されていることである。肺においては血管網も弾性線維によって保持されていることが報告されている (46). 他の組織で代替して作成する再生臓器とは異なり、目的とする臓器の既存の構造物を残しながらの臓器再生は、サイズはもちろん、機能の面からも大きな利点があると言える (47). 2 つ目は、スキャフォールド自身が細胞自身の増殖・分化の足場となることである (48). 最後の利点は、細胞が完全に除去された細胞外マトリックスのみのスキャフォールドは、主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex) の class I や class II 抗原が除去されており、細胞介在性のグラフト拒絶の恐れがないということである。近年の研究では、不十分な脱細胞化をされた

スキャフォールドは移植後、炎症反応を惹起する M1-マクロファージが誘導されるのに対して、十分な脱細胞化されたスキャフォールドでは抗炎症性に働く M2-マクロファージが誘導されることが報告されている (49).

上記の利点を生かして、レシピエントと同種の心停止ドナーから得た臓器を脱細胞化し、レシピエント由来の細胞を配置することで、理論的にレシピエントから拒絶されることのない、理想の臓器再生ができると考えられる (図 1). さらに心停止ドナーから臓器を得られることは臓器ドナー不足の問題解決にも貢献すると考えられる.

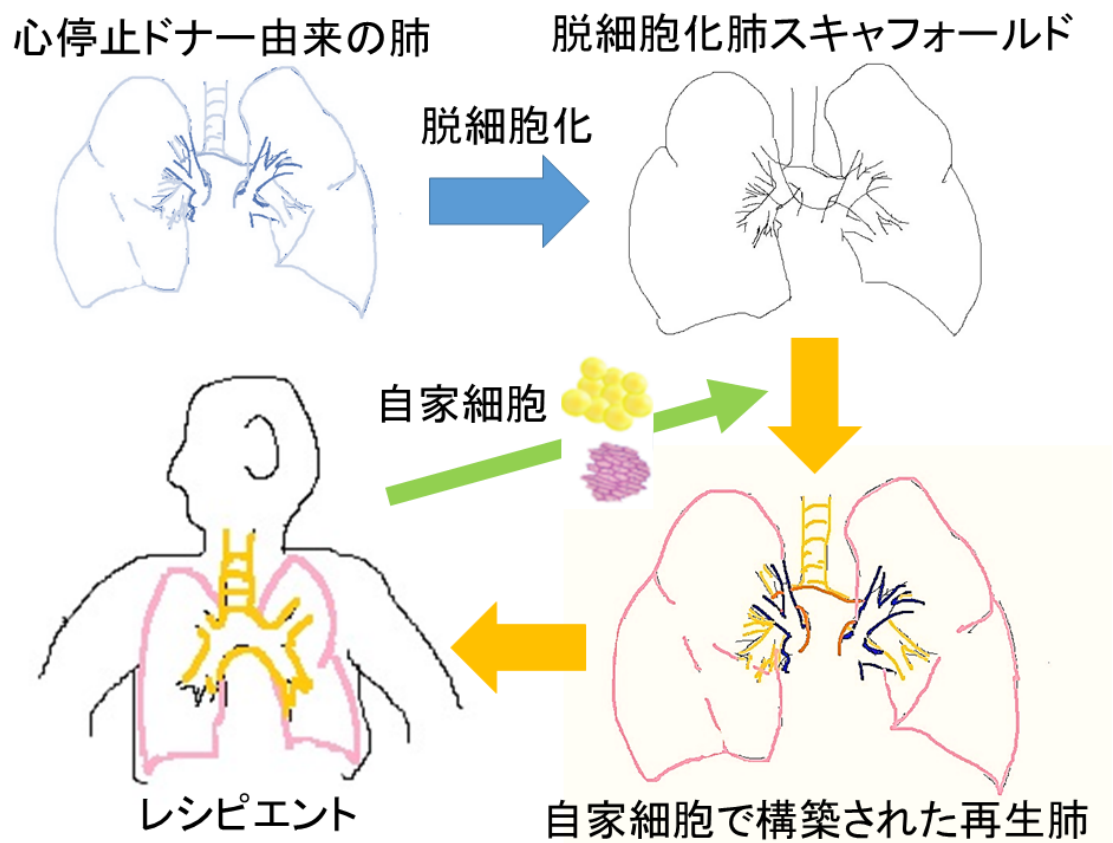


図 1 脱細胞化技術を用いた臓器再生の将来的展望

心臓の臓器再生の試みは 2008 年に Ott らによって報告された (50)。この研究ではラットにおいて冠動脈から界面活性剤を灌流し、脱細胞化心臓スキヤフォールドを作成し、その後心筋細胞・血管内皮細胞を再配置して、臓器再生を行った。完全な臓器スキヤフォールドを用いることで実際の心ポンプ機能を再現できたと考えられた。

肝臓における脱細胞化研究は 2004 年に初めて報告され、肝組織再生のためのスキヤフォールドとして期待された (51)。2016 年には、脱細胞化肝臓スキヤフォールドに、ブタの人工多能性幹細胞由来の肝細胞を配置させる肝臓再生の研究が報告された (52)。この研究では再細胞化された肝臓グラフトが動物モデルで移植され、短期間ではあるが、有用性が示された。

腎臓における再生研究は、1987 年の Bioartificial kidney (BAK) の提唱が先駆となる (53)。これは、従来の血液浄化システムに、腎尿細管細胞の代謝的・内分泌的役割を組み合わせようとするものである。大動物モデルでも有用性が確立され (54)、臨床応用も一部行われた (55)。脱細胞化技術を用いた、腎臓における臓器再生は 2011 年に報告された (56)。この研究では脱細胞化された腎スキヤフォールドに幼弱な腎細胞が生着できたことが示された。

膵臓においては 2010 年にはじめて脱細胞化技術を用いた研究が報告されている (57)。この研究では脱細胞化された膵島を再細胞化させ、小動物モデルに移

植し、糖尿病状態を改善したことを報告している。その後も、脱細胞化腭スキヤフォールドについては今後の臨床応用の可能性も含めて数多くの報告がある(58-60)。

消化管臓器においても、脱細胞化技術を用いた臓器再生が試みられている。2017年には小腸再生の報告がなされている(61)。また脱細胞化された小腸粘膜下層組織は食道穿孔患者において臨床的に使用された報告もあり、食道組織再生への期待もある(62, 63)。

上記の通り、様々な臓器で脱細胞化技術を用いた再生の研究が既に報告されている。しかしながら、臨床応用に至ったものは依然として少なく、今後のさらなる検討が待ち望まれるという現状である。

4. 脱細胞化技術を用いた肺再生研究の現状

2010年に2つのグループが別々に脱細胞化技術を用いた肺再生について報告した(64, 65) Ottらは小動物モデルにおいて肺を脱細胞化させ、上皮細胞と内皮細胞を用いて再細胞化させて構築した再生肺を片肺移植した。片肺全摘モデルと比して、有意に良好な酸素ガス交換能を示した(64)。Petersenらも同様に小動物モデルにおいて脱細胞化肺を血管内皮細胞と気道上皮細胞で再細胞化させて得た再生肺を片肺移植した。正常肺グラフトと比較し、グラフトの酸素ガス交換能はやや不良であったが、二酸化炭素ガス交換能はほぼ同等で、再生肺移植の実現性を高めた(65)。

2011年には小動物モデルにおいて脱細胞化技術を用いた再生肺の片肺移植後7日まで生存できたことが報告された(66)。2018年にはブタを用いた大動物モデルにおいて短時間ではあるが、再生肺移植の実行性が報告された(67)。しかしながら、上記すべての報告において再細胞化に用いた細胞は、肺移植を受けるレシピエントとは異種もしくは他家由来のものであった。

Nicholsらはこの問題を克服すべく、ブタモデルにおいてレシピエントの自家細胞を用いた再生肺を構築し片肺移植を行った(68)。この研究の中で、移植された再生肺グラフトには拒絶所見はみられず、レシピエントブタは最大2か月まで生存できたことが報告された(68)。この研究は再生研究を大きく前進させる

検討であったが、臨床的な観点から2つの問題を抱えていた。1つはレシピエント由来の細胞を得るためにレシピエントに対して片肺全摘を行ったことである。実際の臨床において、移植適応となる末期肺疾患の患者に対して、片肺全摘を行うのは適切ではない。2つ目に移植手技において気管支吻合しかなされていなかったという点である。実際の臨床においては肺動脈や左房といった血管構造物の吻合も必須である。

以上より我々は上記の研究の問題を克服すべく、大動物モデルにおいて、より臨床応用できるような肺再生モデル構築の検討を進めた。

目的

1. 肺の脱細胞化手法の最適化

肺の脱細胞化手法については、これまで様々な方法が報告されてきた。具体的には、物理的手法、酵素法、化学的手法が挙げられる。物理的な手法としては肺組織の凍結や超音波破碎、攪拌が代表的であるが、肺の細胞外マトリックスの破壊が問題となり実用的ではなかった (69, 70)。さらに酵素法では、DNase やトリプシンなどを用いた手法が報告されているが、肺全体の臓器の脱細胞化を実現するには莫大な量を必要とし、コスト面から考えて効率的ではないと考えられた (69, 70)。その中では化学的手法は肺の細胞外マトリックスの保持の観点ならびにコスト面からみても、脱細胞化に最も適した手法と考えられてきた。

脱細胞化を行う化学的手法の中でも、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, 以下 SDS と略す) や Triton X-100, 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 以下 CHAPS と略す), デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate, 以下 SDC と略す) が脱細胞化のための界面活性剤として報告されてきた (69, 70)。

ラットやマウスなどの小動物においては DNA 定量で正常肺と比して、10%

未満まで脱細胞化が実現されたことが報告されている(64, 65).

しかしながら、ブタやマカクサルなどの大動物においては、約 10-20%にしか抑えられておらず、理想とする DNA 定量でほぼ 0%まで抑えることから程遠い現状である(67, 71, 72).

そこで我々は従来の SDS と Triton X を用いた手法に加え、あらかじめ気管に生理食塩水を注入する方法を試みた。この方法は過去にも報告されている方法である (71)。脱細胞化のための界面活性剤注入前に、気管に生理食塩水を大量に注入することで末梢に残存する微細な空気を除去することができ、それにより界面活性剤が肺の末梢まで行きわたり、効率的に脱細胞化がなされているというものである。この方法は有望であると考えられるが、実際に脱細胞化が効率的に実現されたかどうかの検証がいまだなされていない。

実際に我々は全身麻酔下で安楽させたブタから肺を摘出し、気管への生理食塩水注入の有無で脱細胞化の質が異なるかを検証した。

2. 肺再生に必要な気道上皮基底膜細胞の分離培養ならびに性質の検討

肺再生を実現するのに必要な細胞は数々報告されているが、実際にどの細胞を用いるかについて未だ最適化されていない。

我々は近年、肺障害後の修復において重要な役割を果たすと報告されている KRT5 陽性、p63 陽性気道上皮基底膜細胞（以下、KRT5+p63+気道上皮細胞）に着目した(73)。マウス肺においてインフルエンザ感染を惹起させ傷害された肺において、KRT5+p63+気道上皮細胞は肺修復に関わると報告されている(73)。我々は KRT5+p63+気道上皮細胞を肺再生において必要な細胞と考えた。

KRT5+p63+気道上皮細胞はマウスやヒトにおいては分離培養の報告がなされていた(67, 73)。しかしながら、我々が扱う大動物であるブタの肺においては KRT5+p63+気道上皮細胞の分離培養の報告がなされておらず、プロトコールが確立されていない現状であった。そこで我々は、ヒトと同様のプロトコールで目標とする細胞の分離培養ができるか検証した。その上で、細胞の **Characterization** を行った。

3. 肺再生に必要な血管内皮細胞の分離培養ならびに性質の検討

肺再生を実現するうえで、肺血管における細胞の配置も重要な要素の1つである。肺血管の再生に重要な細胞について、脂肪由来幹細胞を用いた研究も報告されている(46)。この研究では、ラットモデルにおいて、脂肪由来幹細胞を脱細胞化肺スキャフォールドに配置することで、同細胞が血管内皮細胞へ分化し、血管内皮構造の安定化を得たことを示した(46)。

今回、我々は肺血管に実際に存在する肺血管内皮細胞の分離培養を試みた。ラットやマウス、ヒトにおいては肺血管由来の内皮細胞の分離培養のプロトコールが報告されている(74, 75)。しかしながら、我々が扱うブタにおいて、肺血管内皮細胞の分離培養のプロトコールはいまだ確立していない。我々はラットと同様のプロトコールで目標とする細胞の分離培養ができるか検証した。そして、**Characterization** を行い、得られた細胞について検討した。

4. 脱細胞化肺スキャフォールドの再細胞化

脱細胞化手技で得られた脱細胞化肺スキャフォールドに細胞を播種させる再細胞化は過去にも報告されている (46, 64, 65, 67, 68). 培養期間や使用する培地, 灌流速度は報告毎によって異なる. Ott らはラット肺スキャフォールドで 9 日間培養を行った (64). Petersen らはラット肺スキャフォールドで 8 日間培養を行った (65). Doi らはラット肺スキャフォールドで培養期間を 3 日, 5 日, 8 日で検討している (46). Zhou らはブタ肺スキャフォールドで 6 日間培養を行った (67). Nichols らはブタ肺スキャフォールドで 30 日間培養を行った (68). 全ての報告において, 使用された培地については, 播種した細胞に適した培養液が使用されていた. 灌流速度について, Doi らは 4ml/min (46), Zhou らは 20ml/min (67) と報告している.

上記の報告を参考に, 我々はレシピエント由来の自家細胞を用いて, ブタの脱細胞化肺スキャフォールドを再細胞化した. 再細胞化されたグラフトを組織学的に評価し, 播種した細胞が適切に配置されているかを検討した.

5. 再生肺の in vivo での機能評価

脱細胞化肺スキャフォールドに自家細胞を播種して再細胞化されたグラフト（再生肺グラフト）の in vivo で機能を評価するために、我々は左片肺移植を行った。

再生肺の移植後、レシピエントブタが実際に生存できるか否かを評価した。その上で、再生肺の吻合後、4時間まで再生肺の肺動脈と肺静脈の血液ガスを採取し、再生肺のガス交換能を検証した。さらに移植後4時間後にレシピエントブタを安楽死させ、摘出した肺の wet-to-dry weight ratio を測定し、肺水腫の評価を行った。

再生肺の移植の比較となるコントロール群を我々は2つ設定した。1つは、同種他家肺移植である。これは別の個体のブタから得られた肺グラフトを、レシピエントに左片肺移植するというもので、臨床で広く行われている片肺移植と同じである (25)。もう1つのコントロール群は、脱細胞化肺スキャフォールドを左片肺移植するというものである。脱細胞化肺スキャフォールドを移植することで、再細胞化の効果を検証できると考えた。

方法と結果

1. 動物愛護と倫理的配慮

本研究における全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する法律」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して行われた。また、本実験計画は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会における承認を得た(承認番号:医-P17-093, 医-P17-132)。

2. 使用動物

ランドレースとヨークシャーを交配させて産まれた交雑種のオスブタ (SPF, ゼンノー・プレミアム・ピッグ (WL 種), 東京実験動物株式会社) を本実験では使用した。全例去勢されていた。体重は全例 15kg から 25kg であり, 生後約 2 か月であった。

3. 組織学的評価

組織サンプルはパラホルムアルデヒドで固定し, パラフィン包埋した。その上で 5 μm 切片を作成した。ヘマトキシリンエオジン染色は標準的なプロトコールに則って行った。

4. 免疫組織化学

抗 CD31 抗体による蛍光免疫染色以外では、脱パラフィン化した切片を Citrate buffer (pH 6, Sigma-Aldrich) で 120°C 20 分間抗原賦活化処理を最初に行った。抗原賦活化処理後、切片を 0.1% の Triton X-100 で浸透処理を行い、PBS で洗浄し、1% BSA で 30 分間ブロックした。切片に希釈した 1 次抗体をかけて、4°C 一晩置いた。翌日に PBS で洗い、Alexa fluor 共役の 2 次抗体をかけて、30 分間室温に置いた。染色後、組織切片を 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen) 入りのマウント剤を塗布して、固定した。適切な励起波長を用いて蛍光顕微鏡で観察した。

抗 CD31 抗体による蛍光免疫染色では、脱パラフィン化した切片を proteinase K (Dako, Santa Clara, CA) で抗原賦活化処理を最初に行った。抗原賦活化処理後、1% BSA で 30 分間ブロックした。切片に希釈した 1 次抗体をかけて、4°C 一晩置いた。翌日に PBS で洗い、Alexa fluor 共役の 2 次抗体をかけて、30 分間室温に置いた。染色後、組織切片を 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen) 入りのマウント剤を塗布して、固定した。適切な励起波長を用いて蛍光顕微鏡で観察した。

使用した抗体は表 1 にまとめた。

表 1 免疫組織化学で使用した抗体

ターゲット	ホスト	Manufacturer	Catalogue number	希釈濃度
1 次抗体				
KRT5	Rabbit	Novus Biologicals	NB110-56916	1:100
p63	Rabbit	Fitzgerald	70R-50620	1:400
CD31	Rat	R&D Systems	MAB33871	1:100
Laminin	Rabbit	Abcam	11575	1:100
Fibronectin	Rabbit	Abcam	2413	1:100
Collagen I	Rabbit	Abcam	34710	1:100
Elastin	Rabbit	Abcam	21610	1:100
2 次抗体				
Rabbit IgG	Goat, 488	Invitrogen	A11034	1:500
Rat IgG	Goat, 594	Invitrogen	A11007	1:500
Rabbit IgG	Goat, 546	Invitrogen	A11010	1:500

5. 統計解析

数値は平均値±標準偏差で表記した. 2 群間の平均値の比較は Student's t-test を用いて行った. さらに対応のある 2 群間の平均値の比較は反復測定分散分析を行った. 統計ソフトは EZR を使用した (76). $P < 0.05$ で統計学的有意と判定した.

6. 脱細胞化肺スキャフォールドの検討

6-1. 肺グラフト摘出

脱細胞化肺スキャフォールド作成に必要な肺グラフトの摘出は次のような手順で施行した。

あらかじめ犠牲死するドナーブタを前日夜から絶食とし、キシラジン（バイエル薬品，東京）（2 mg/kg），ドルムカム（アステラス製薬，東京）（0.5 mg/kg），アトロピン（田辺三菱製薬，大阪）（0.03 mg/kg）を筋肉注射した。その後，気管内挿管を行い，1.5%のイソフルラン（ファイザー，東京）で全身麻酔を行った。5cmH₂O の positive end expiratory pressure（以下 PEEP と略す）をかけながら，1 回換気量を 10ml/kg，呼吸回数を 12 回で設定した。耳介から末梢静脈ラインを確保し，生理食塩水を連結させ，補液を持続的に行った。

胸骨正中切開を施行した。心膜と両側の胸膜を切開した。両側の肺靭帯を切離した。下大静脈をテーピングした。また，Transverse sinus から 1 号絹糸を通し，肺動脈と大動脈を一括してテーピングした。ヘパリンを 400 U/kg 静脈投与し，3 分経過後，上大静脈を遮断鉗子でクランプし，下大静脈を結紮した。左心耳を切開して放血を行い，安楽死させた。右室を切開してカニューレーションチューブを挿入し，先端が肺動脈にあることを確かめた上で，あらかじめテーピングしていた 1 号絹糸を結紮した。換気を継続させながら，カニューレ

ションを通じて生理食塩水 2000ml で灌流を行った。左房から出てくる血液成分が透明になることを確認した。灌流終了後、肺動脈本幹基部ならびに大動脈基部を切離した。房室間溝の心室側で切り、左房後壁を温存する様に切除を進めた。上大静脈・下大静脈を切離し、心臓を切除した。食道を損傷しないように気管ならびに大動脈の授動を進めた。頸部の気管を露出させ、そこから左右の胸腔に向かって切離を進め、大動脈の分岐血管を切離した。大動脈と奇静脈を尾側で切離した。気管ならびに両気管支を食道から授動させた。気管をテーピングし、挿管チューブを浅くして、肺が膨らんでいる状態で気管を遮断し、気管を切離した。膨らんだ状態で両肺グラフトを摘出した。この時点で肺の損傷があった場合には 4-0 プロリンによる縫合を行って修復を行った。

使用する左肺グラフトのトリミング操作を行った。縦隔葉と左肺の間にある胸膜を切開しながら、縦隔葉からドレナージされる肺静脈を結紮切離した。右下肺静脈を気管支から剥離し、同様に結紮切離した。肺動脈と左房の間を鈍的に剥離し、左房後壁を損傷しないようにテーピングした。左上肺静脈・下肺静脈の近傍の左房後壁が残存する様に右肺静脈側でテーピングした糸を結紮した。左房にカニューレションを装着し、用手的に左房から肺静脈を生理食塩水で充たしエアを抜き、さらに左房や肺静脈に損傷がないことを確認した。この時点で損傷があれば、5-0 プロリンによる縫合で修復を行った。肺動脈本幹を

カニューレションし，肺動脈を末梢まで剥離しながら，右肺動脈を同定した。右肺動脈を結紮切離した。カニューレションを通じて肺動脈を生理食塩水で充たしエアを抜き，肺動脈に損傷がないことを確認した。この時点で損傷があれば，5-0 プロリンによる縫合で修復を行った。大動脈ならびに奇静脈を切離した。気管から右上葉に向かう気管気管支，ならびに右中下葉に向かう右気管支を露出させ，気管気管支より末梢側の気管，ならびに右気管支の中枢側の 2 か所を切離して，左肺グラフトの摘出を完了した。

6-2. 脱細胞化手技

脱細胞化手技は SDS ならびに Triton X を用いた方法で行った (67)。さらに SDS の灌流に先立って左気管支に生理食塩水を注入するか否かの違いで 2 つの手法を行い，完成した脱細胞化肺スキャフォールドの違いを検討した。左気管支への生理食塩水の注入は 50ml シリンジを用いて用手的に行い，計 2L 使用した (図 2)。

SDS ならびに Triton X を用いた灌流法は次の通りであった。あらかじめ肺動脈に連結していたカニューレションを通じて，0.5% SDS を 30 時間，蒸留水を 12 時間，1% Triton X-100 を 12 時間，リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline, 以下 PBS と略す) を 48 時間持続的に灌流した (図 3)。

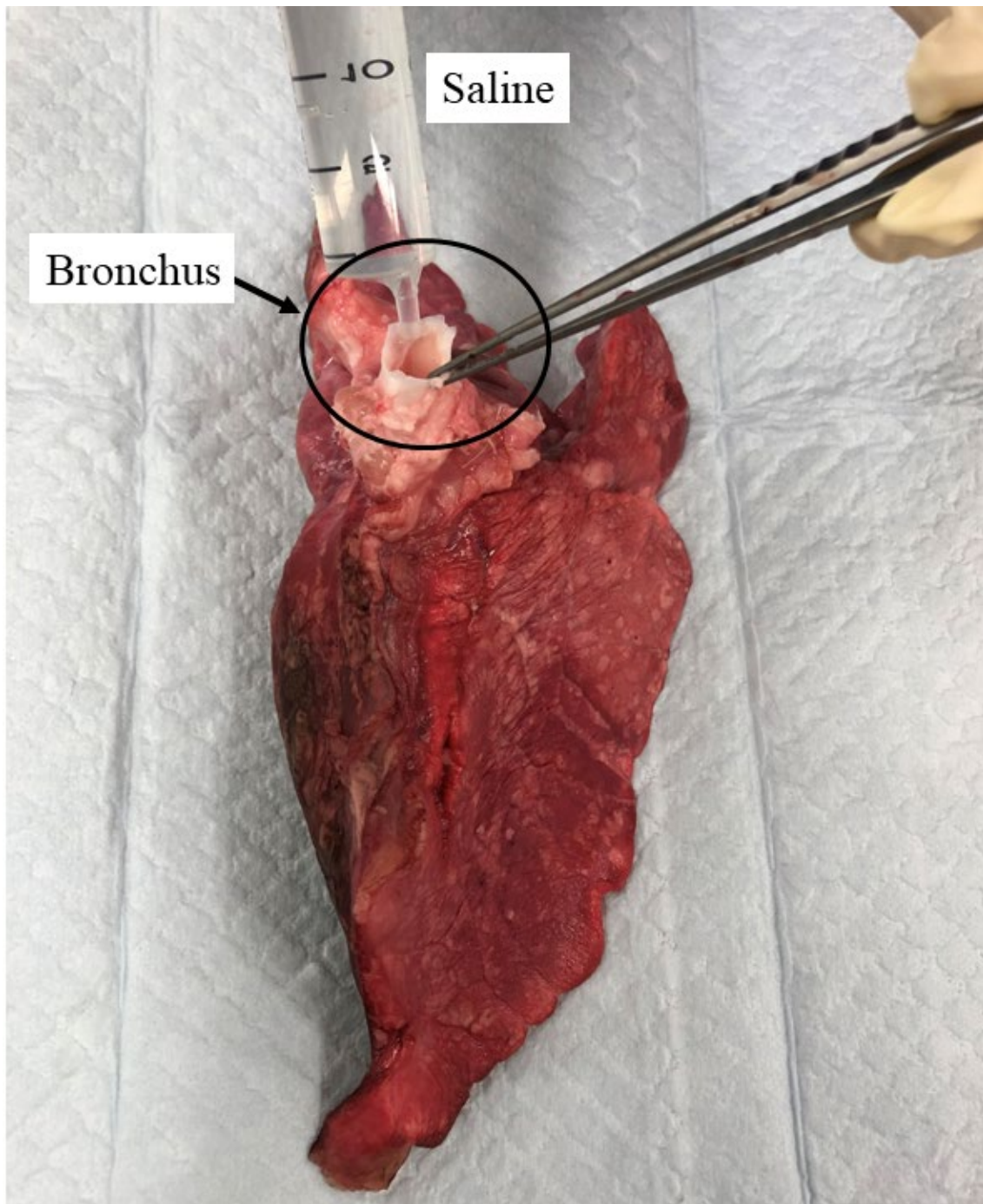


図2 気管支内への生理食塩水の注入
SDS/Triton X-100 による脱細胞に先立ち、気管支内へ生理食塩水 2L を注入した。(文献 (77) より一部改変)

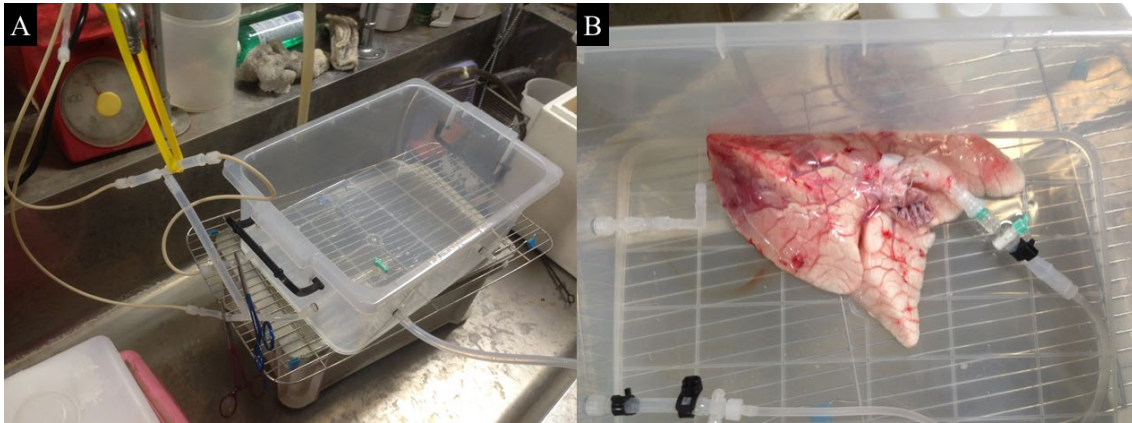


図 3 脱細胞化溶液灌流 Bioreactor

(A) 脱細胞化を行うための Bioreactor 装置の実際

(B) グラフト肺動脈にコネクトを行い実際の灌流を行っている様子

我々は、①SDS ならびに Triton X を用いた灌流法の効果，ならびに②気管支生理食塩水注入の効果の 2 つについて検討するため，下記並びに図 4 のように群を設定した．組織切片での評価は，Normal 群，PreTx+群，PreTx-群を比較して行った．定量的評価は Normal 群と Decell 群，PreTx+群と PreTx-群の 2 つに分けて行った．

①SDS ならびに Triton X を用いた灌流法の効果の検討

Normal 群(N=3)：SDS/Triton X の灌流を行っていない群（正常肺グラフト群）

Decell 群(N=6)：SDS/Triton X の灌流を行った群

②気管支生理食塩水注入の効果の検討

PreTx+群(N=3)：気管支内生理食塩水注入を行い SDS/Triton X の灌流をした群

PreTx-群(N=3)：気管支内生理食塩水注入なしで SDS/Triton X の灌流をした群

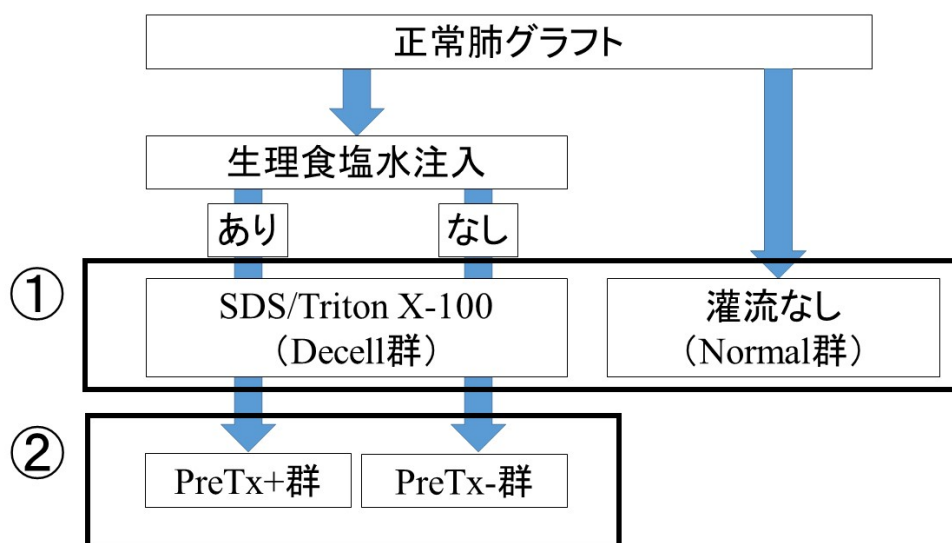


図4 脱細胞化実験群の設定

①SDS ならびに Triton X を用いた灌流法の効果の検討

②気管支生理食塩水注入の効果の検討

6-3. 肺グラフトの DNA 抽出ならびに DNA 定量

DNA 抽出は SDS と Proteinase K を用いた方法で行った (61). 得られたグラフトのサンプルを, Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 30 μ L, RNaseA 30 μ L, 10% SDS 300 μ L を混ぜた STE Buffer (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 100mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl) 2.7 ml (合計約 3 ml) に入れて 45°C で 1 時間かけて緩徐に攪拌しながら溶解した. フェノール・クロロホルムで抽出を行った後にエタノール沈殿を行った. 50 μ L の TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) に溶解した.

DNA 定量ならびに純度は 260nm ならびに 280nm の吸光度の測定値から評価した.

6-4. 肺グラフトの細胞外マトリックスたんぱく質の評価

肺グラフトを検討する上で, 細胞外マトリックスたんぱく質の評価は重要である. 細胞外マトリックスは肺臓器の構造維持の役割だけではなく, 弾性収縮といった臓器の機能, さらには細胞の増殖・分化の場としても大切な構成要因だからである (47, 48). 我々は肺を構成する細胞外マトリックスたんぱく質として代表的なエラスチン, 硫化グリコサミノグリカン, ラミニン, フィブロネクチン, コラーゲンについて検討した. 肺の細胞外マトリックスたんぱく質は

次の 2 種類に分けることができる (78). 1 つは上皮や内皮を覆う基底膜組織である. もう 1 つは細胞間を連結する緩んだ弾性様のメッシュ網である間質組織である. エラスチンは肺胞間質を構成する主要な細胞外マトリックスたんぱく質であり, 硫化グリコサミノグリカンも同様に間質を構成する代表的な細胞外マトリックスたんぱく質である. コラーゲンは間質組織や基底膜組織の両方を構成する細胞外マトリックスたんぱく質である. ラミニンは基底膜組織を構成する細胞外マトリックスたんぱく質である. フィブロネクチンは細胞同士の接着に関わる間質組織を構成する細胞外マトリックスたんぱく質である. これらの細胞外マトリックスたんぱく質の概略を図 5 にまとめた.

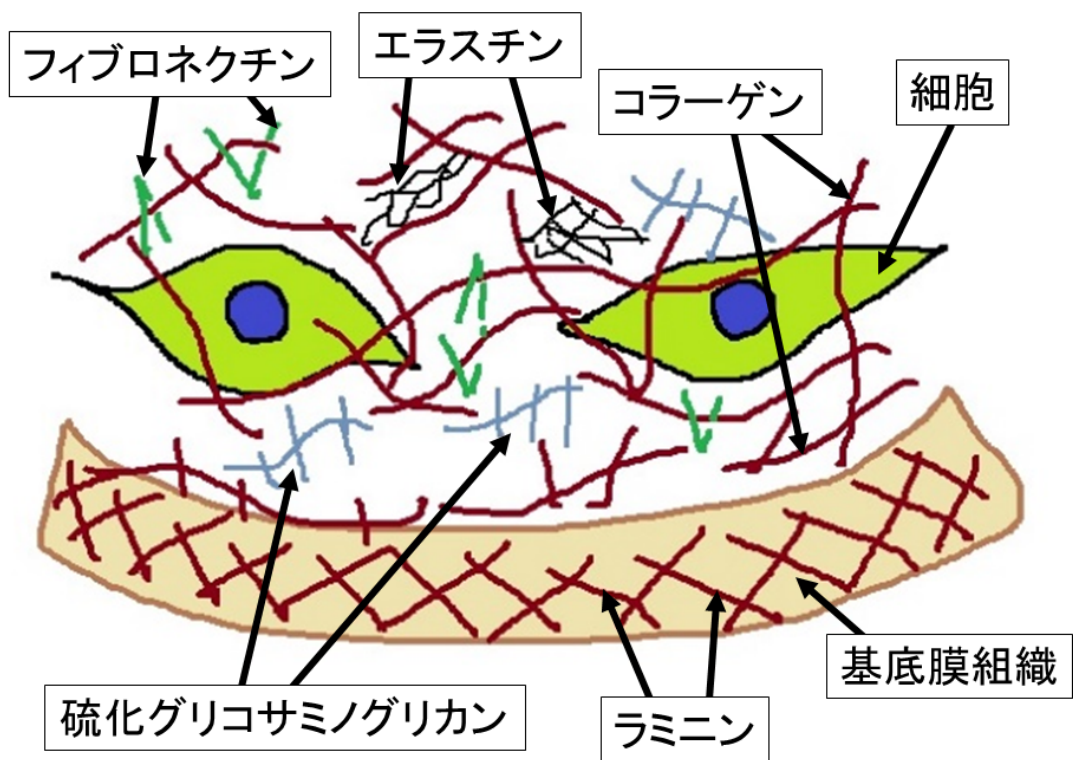


図5 細胞外マトリックスたんぱく質の概略

肺グラフトのエラスチン定量は Fastin assay (Bicolor, Carrickfergus, UK) を用いて行った。グラフトサンプルを 0.25M のシュウ酸に入れて 100°C で 2 時間かけてエラスチンを抽出した。Fastin assay (Bicolor, Carrickfergus, UK) の説明書に従い、エラスチンを着色させた。490nm の吸光度の測定値からサンプルのエラスチンを定量化した。

肺グラフトの硫化グリコサミノグリカン (Sulfated Glycosaminoglycan, 以下 sGAG と略す) の定量は Blyscan assay (Bicolor, Carrickfergus, UK) を用いて行った。sGAG は、グラフトのサンプルを papain extraction reagent (Sigma-Aldrich) を用いて 18 時間 65°C で溶解して、抽出した。630nm の吸光度の測定値からサンプルの sGAG を定量化した。

ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンについては定量化手段がなく、免疫染色によって評価を行った。免疫染色の具体的な手法については前述の 27 ページにまとめた。

6-5. 結果

脱細胞化を行った Decell 群においては、ともに図 6 のように肺グラフトは徐々に白色から透明に色調が変化した。

PreTx+群, PreTx-群, Normal 群のヘマトキシリンエオジン染色の結果を示

す (図 7). 正常肺グラフトである Normal 群においては, 細胞を多数確認できるが, 脱細胞化処理を行った PreTx+群・PreTx-群においては細胞をほとんど確認できなかつた (図 7).

ラミニン, フィブロネクチン, コラーゲン I による免疫染色を各群について行った (図 8). 正常肺グラフトである Normal 群においては, ラミニンは気道上皮周囲, フィブロネクチンは胸膜周囲, コラーゲン I は血管周囲において強く染色された (図 8). 脱細胞化処理を行った PreTx+群・PreTx-群においてもラミニン, フィブロネクチン, コラーゲン I は染色された (図 8).

DNA 定量解析では, 正常肺グラフトである C 群に比して, 脱細胞化処理を行った Decell 群は有意に DNA 量が低下していた (35.1 ± 17.1 vs. 5300 ± 2530 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue, $P < 0.001$) (図 9). さらに気管支内生理食塩水注入を行った PreTx+群は, PreTx-群に比して有意に DNA 量が低下していた (21.6 ± 5.46 vs. 48.7 ± 12.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue, $P < 0.05$) (図 9).

sGAG 定量解析では, 正常肺グラフトである Normal 群に比して, 脱細胞化処理を行った Decell 群は有意に sGAG 量が低下していた (1.50 ± 0.79 vs. 5.69 ± 2.13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue, $P < 0.001$) (図 10). PreTx+群と PreTx-群では sGAG 量に有意な違いは認めなかつた (1.69 ± 0.86 vs. 1.32 ± 0.71 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue, $P = 0.337$) (図 10).

エラスチン定量解析では、正常肺グラフトである Normal 群に比して、脱細胞化処理を行った Decell 群は有意にエラスチン量が低下していた (2.97 ± 2.10 vs. $14.3 \pm 3.24 \mu\text{g}/\text{mg wet tissue}$, $P < 0.001$) (図 11)。さらに気管支内生理食塩水注入を行った PreTx+群は、PreTx-群に比して有意にエラスチン量が低下していた (1.36 ± 1.72 vs. $4.59 \pm 0.50 \mu\text{g}/\text{mg wet tissue}$, $P < 0.05$) (図 11)。

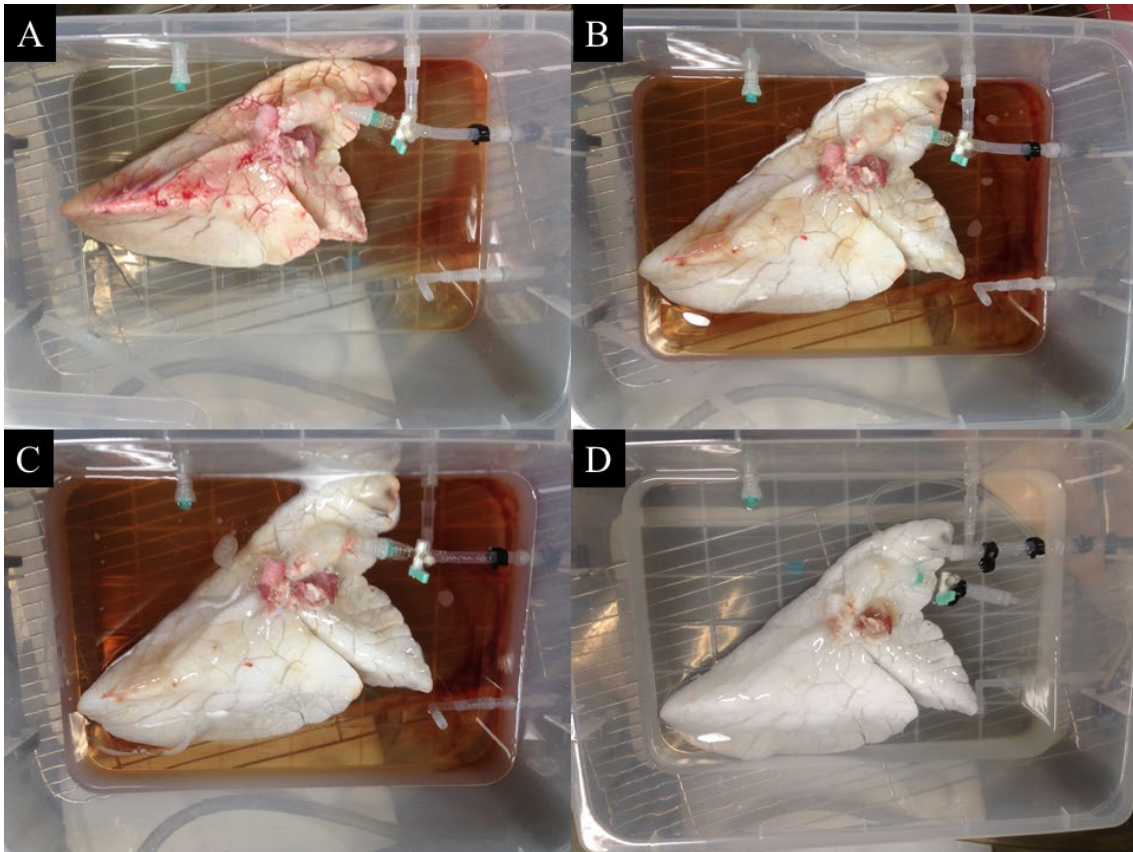


図6 肺の脱細胞化

- (A) SDS による灌流開始時
- (B) SDS による灌流 6 時間後
- (C) SDS による灌流 12 時間後
- (D) SDS による灌流 30 時間後

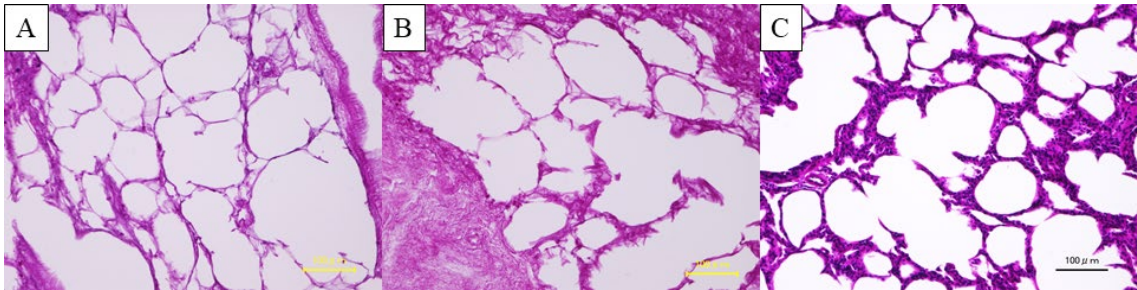


図7 肺組織のヘマトキシリンエオジン染色

(A) 気管支生理食塩水注入を行った脱細胞化後の肺組織 (PreTx+群)

(B) 気管支生理食塩水注入を行わなかった脱細胞化後の肺組織 (PreTx-群)

(C) 脱細胞化を行っていない正常肺組織 (Normal 群)

(文献 (77) より一部改変)

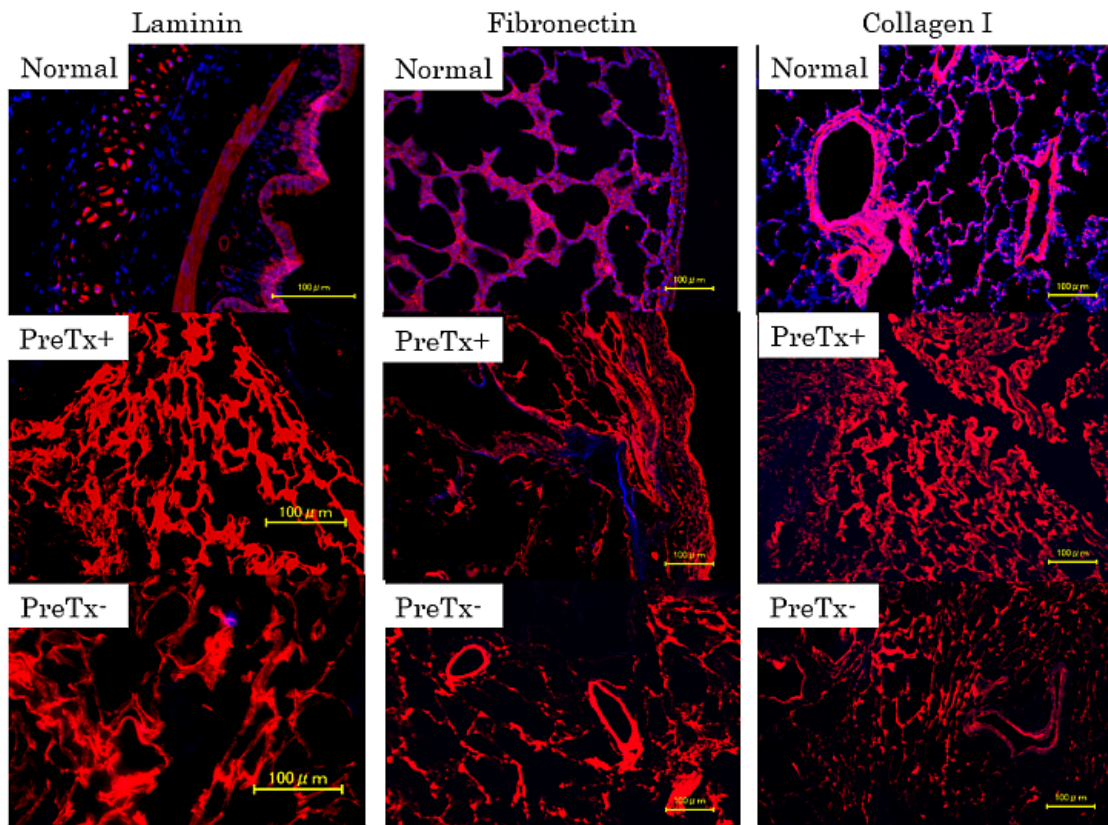


図8 肺組織の免疫染色

PreTx+群・PreTx-群・Normal 群の肺組織に対する、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンIの免疫染色
(文献 (77) より一部改変)

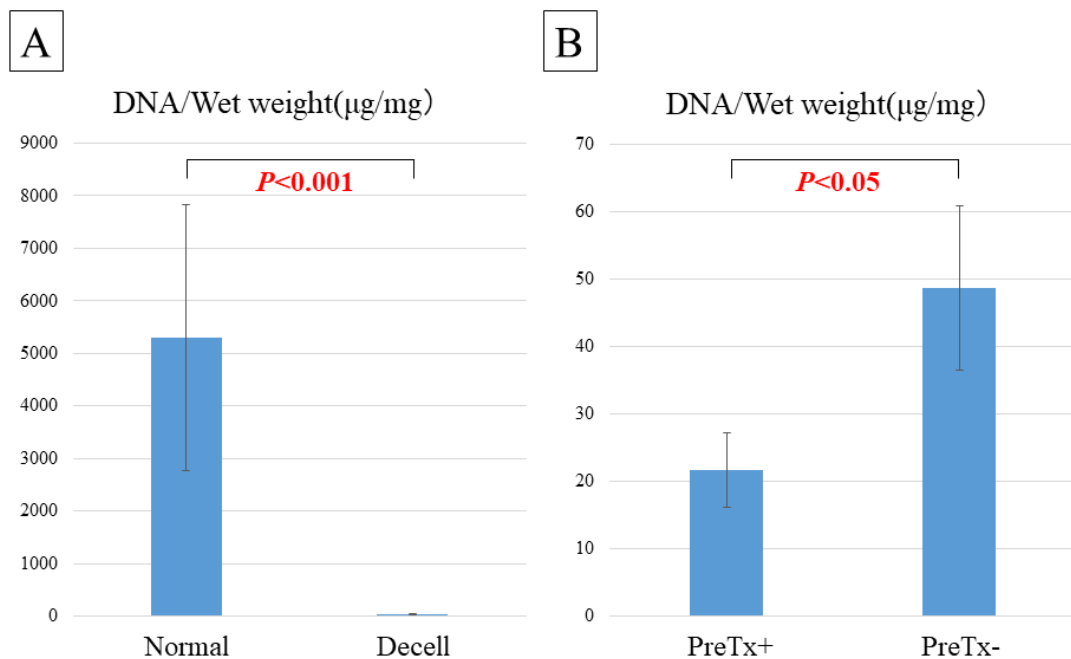


図9 正常肺と脱細胞肺のDNA定量解析

(A) 正常肺 (Normal 群) に比して脱細胞肺 (Decell 群) は有意にDNA量が低下した.

(B) 気管支内生理食塩水注入を行った PreTx+群では, 注入を行っていない PreTx-群に比して有意にDNA量が低下した.

(文献 (77) より一部改変)

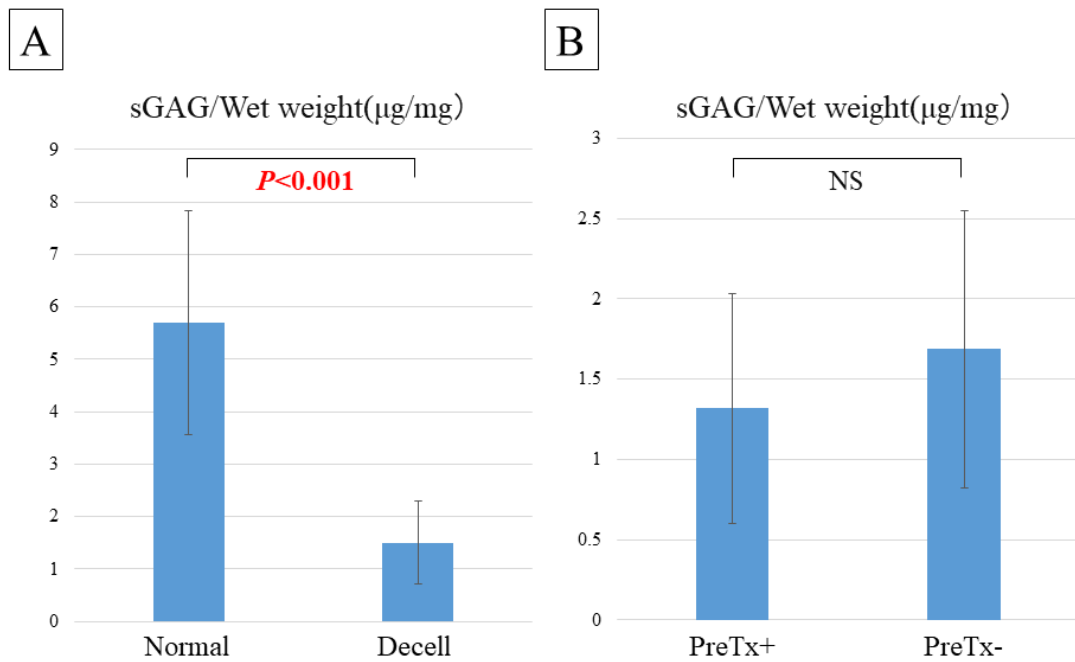


図 10 正常肺と脱細胞肺の sGAG 定量解析

(A) 正常肺 (Normal 群) に比して脱細胞肺 (Decell 群) は有意に sGAG 量が低下した。

(B) 気管支内生理食塩水注入を行った PreTx+群と注入を行っていない PreTx-群では sGAG 量について有意な違いを認めなかった。

(文献 (77) より一部改変)

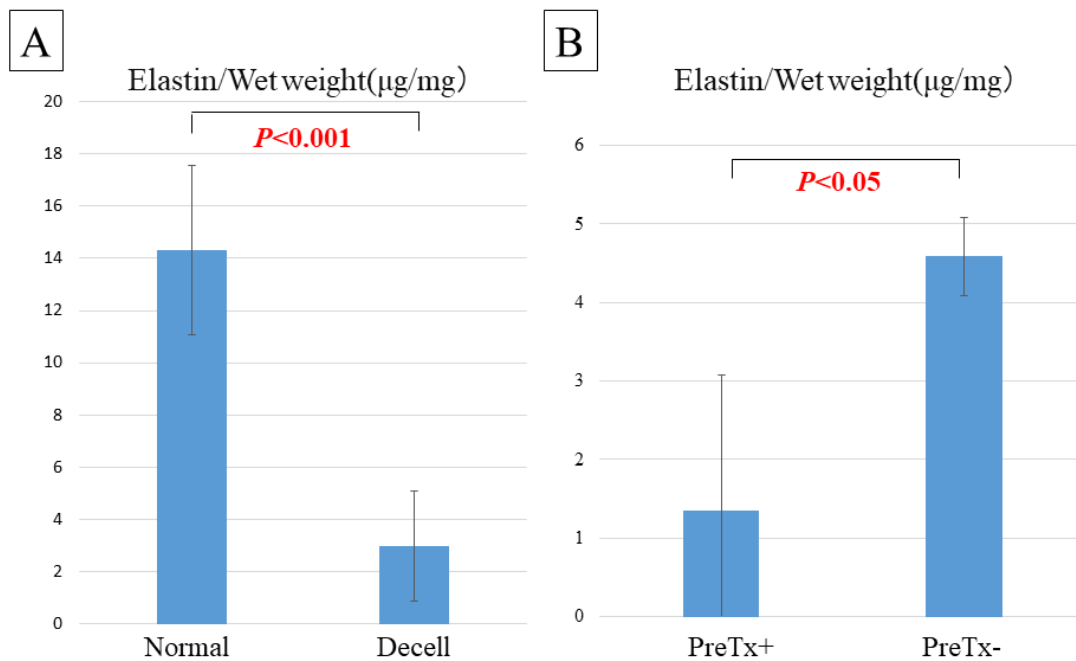


図 11 正常肺と脱細胞肺のエラスチン定量解析

(A) 正常肺 (Normal 群) に比して脱細胞肺 (Decell 群) は有意にエラスチン量が低下した.

(B) 気管支内生理食塩水注入を行った PreTx+群では, 注入を行っていない PreTx-群に比して有意にエラスチン量が低下した.

(文献 (77) より一部改変)

7. レシピエント自家細胞の分離と培養

7-1. 小開胸下ブタ肺部分切除

自家細胞を得るためにレシピエントブタに対して小開胸下肺部分切除を行った。レシピエントブタを前日夜から絶食とし、キシラジン(バイエル薬品, 東京) (2 mg/kg), ドルムカム (アステラス製薬, 東京) (0.5 mg/kg), アトロピン (田辺三菱製薬, 大阪) (0.03 mg/kg) を筋肉注射した。その後, 気管内挿管を行い, 1.5%のイソフルラン (ファイザー, 東京) で全身麻酔を行った。5cmH₂O の positive end expiratory pressure (以下 PEEP と略す) をかけながら, 1 回換気量を 10ml/kg, 呼吸回数を 12 回で設定した。耳介から末梢静脈ラインを確保し, 生理食塩水を連結させ, 補液を持続的に行った。

第 4 肋間前方に 3–4cm 大の皮膚切開を置き、肋間を開けて開胸下に手術を行った (図 12)。左肺舌区の先端を愛護的に体外に出し, 自動縫合器を用いて肺部分切除を行った (図 12A)。残存肺に損傷があれば 4-0 prolene で縫合閉鎖した。左肺部分切除範囲のシェーマを図 12C に示した。

閉創して手術を終了した。吸入麻酔を中止し、自発呼吸が出現し、呼吸状態が安定したところで抜管した。覚醒したところで飼育室にレシピエントブタを戻した。

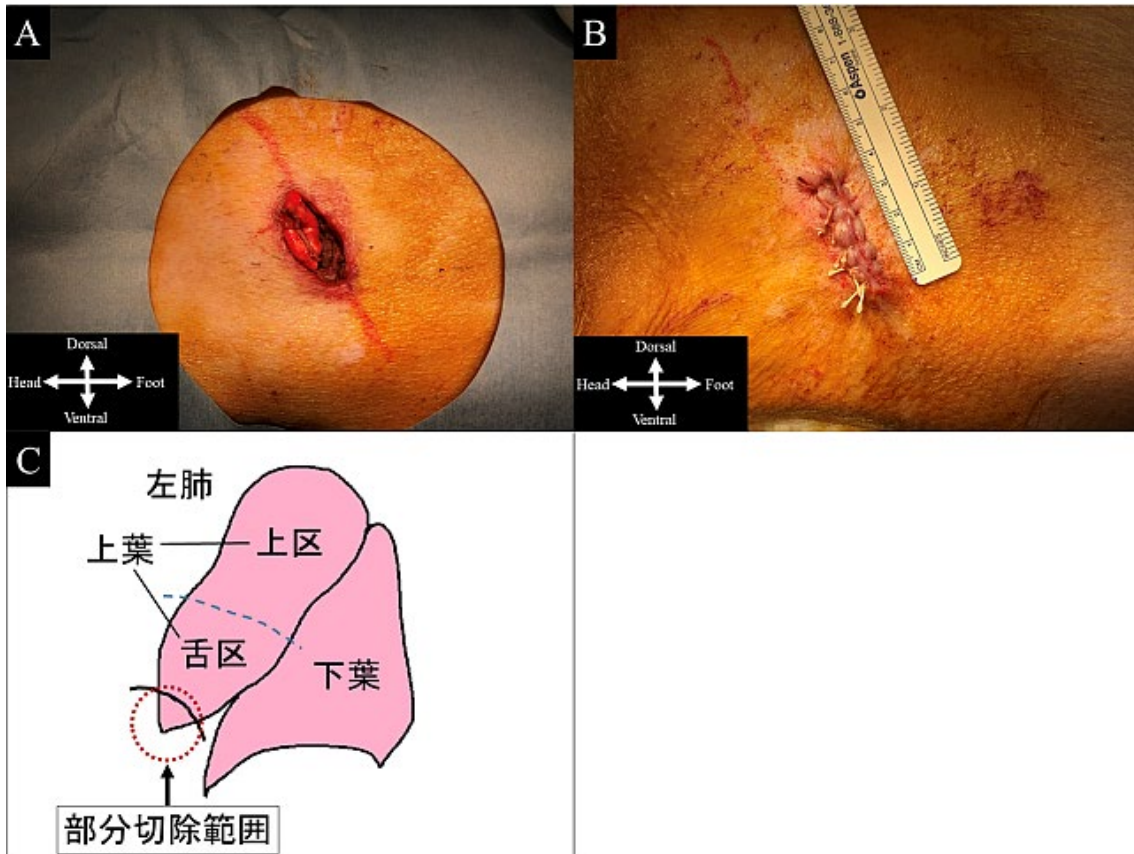


図 12 小開胸下肺部分切除
 (A) 小開胸下肺部分切除後
 (B) 3-4 cmの皮膚切開で手術を施行
 (C) 小開胸下肺部分切除の範囲

7-2. 気道上皮細胞の分離培養

部分切除で得られた肺を 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液入りの MEM (minimum essential medium) に 4°C 20 分間保管した。その肺組織を 1-3mm にまで小さく切り刻み、Pronase (Sigma-Aldrich) 28mg と DNase (Sigma-Aldrich) 2mg 入りの 20mL の MEM (minimum essential medium) に入れて 4°C で 24 時間から 48 時間の間保管した。細胞懸濁液を 100 μ m メッシュの cell strainer で濾過し、得られた懸濁液を 300g で 5 分間遠心分離を行った。上澄みを除去し、細胞を ACK lysing buffer (Lonza Japan, Tokyo, Japan) に再懸濁し、5 分間室温で保管した。得られた懸濁液を 300g で 5 分間遠心分離を行い、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液と 10 μ M の Rho-associated kinase inhibitor の入った small airway epithelial cell growth medium (SAGM) に再懸濁した。その懸濁液を 10 μ g/mL の collagen IV (Sigma-Aldrich) でコートしたフラスコに播種し培養器で培養した。翌日に、培地を 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液入りの SAGM に変えた。

その後最初の 1 週間は毎日培地交換を行い、2 週目からは 2 日ごとに培地を交換した。我々は長期間の培養中の感染を危惧し、細胞培養の期間を 3 週間までに設定した。3 週間後に細胞を剥がし、気道上皮細胞の Characterization を行った。

7-3. 気道上皮細胞の Characterization

レシピエント由来の気道上皮細胞は抗 KRT5 抗体ならびに抗 p63 抗体を用いた免疫染色ならびにフローサイトメトリーで Characterization を行った。

抗 KRT5 抗体ならびに抗 p63 抗体による免疫染色は次の手順で行った。培養細胞を 24 well plate に播種した。細胞の入った plate に冷蔵保存していた 100% メタノールを入れて -20°C で 15 分間静置し、固定した。固定後、固定液を除去して、phosphate-buffered saline (PBS) で 3 回リンスした。1% bovine serum albumin を添加し、室温 1 時間でブロックした。希釈した 1 次抗体を添加し、 4°C で一晩保存した。PBS でリンス後、希釈した色素の共役した 2 次抗体を添加し、室温 1 時間暗い場所に置いた。PBS でリンス後、検体を適切な励起波長を用いて蛍光顕微鏡で観察した。核の染色を行いたい場合には、検体を希釈した 4',6-diamigino-2-phenylidole (Wako) を添加し、室温で 3 分間暗い場所で静置し、PBS でリンスした。

抗 KRT5 抗体や抗 p63 抗体を用いたフローサイトメトリーは次のようにして行った。遠心して得られた培養細胞を 4%ホルムアルデヒドで 15 分室温に置き固定した。遠心を行って上澄みを除去した後に、細胞に 90%メタノールを添加して、氷上に 30 分間置き、浸透処理を行った。希釈した 1 次抗体を添加

し 4°C で 30 分間置いた。遠心を行って上澄みを除去した後に、希釈した色素共役の 2 次抗体を添加し、4°C で 30 分間置いた。得られた細胞群を遠心し、PBS で再懸濁し、fluorescence-activated cell sorting scan (Beckman Coulter) で解析を行った。

使用した抗体の希釈濃度は表 2, 表 3 にまとめた。

7-4. 血管内皮細胞の分離培養

血管内皮細胞は magnetic-activated cell sorting (MACS) を用いて分離を行った。MACS に先立って、抗 CD31 抗体でタグ付けされたビーズを、肺組織を得る前日に、準備した。1mg の anti-rat IgG Dynabeads (Invitrogen, 11035, Carlsbad, CA) を 500 μ L の MACS buffer (0.1% BSA を溶かした PBS) に溶解した。この溶解液を、1 分間マグネットの間に静置し、上澄みを完全に除去した。洗った Dynabeads を 500 μ L の MACS buffer で再懸濁し、1 分間マグネットで静置し、上澄みを完全に除去した。この作業を 2 回繰り返した。洗った Dynabeads を 10 μ g 入りの抗 CD31 抗体の入った 80 μ L の MACS buffer で再懸濁し、30 分間室温で回転させながら緩徐に攪拌した。100 μ L の MACS buffer を用いて上記の手順で、再び 3 回 Dynabeads を洗い、4°C で保存した。

肺組織を 1–3mm にまで小さく切り刻み、5mg の collagenase/dispase

(Sigma-Aldrich)入りの PBS 溶液に入れ, 室温で 45 分間水平に揺らしながら攪拌した. 懸濁液を 5ml の MEM (minimum essential medium) 溶液に溶解し, 100 μ m の Cell strainer で濾過した. Neubauer chamber を用いて細胞数計測後, 得られた懸濁液を 300g で 10 分間遠心し, 上澄みを除去した. 細胞ペレットを 1.0×10^7 細胞ごとに 1mL の MACS buffer で溶解した. 1.0×10^7 細胞毎に 25 μ L の Dynabeads を懸濁液に添加し, 30 分間 4°C で緩徐に回転させながら攪拌した. 細胞懸濁液に MACS buffer を加え濃度を半分に希釈し, 無菌的に 2 分間マグネットの中に静置した. 上澄みを除去した. 細胞を 1mL の MACS buffer で溶解し, マグネットの中に静置, 上澄みを除去するという操作を 4 回繰り返した. 細胞懸濁液を 300g で 10 分間遠心分離し, 上澄みを除去して得られた細胞ペレットを 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液入りの endothelial cell growth medium (ECGM)に再懸濁した. 懸濁液を StemSure 0.1 w/v% gelatin 溶液でコートしたフラスコに播種し, インキュベータで培養した.

我々は長期間の培養中の感染を危惧し, 細胞培養の期間を 3 週間までに設定した. 3 週間後に細胞を剥がし, 抗 CD31 抗体で Characterization を行った.

7-5. 血管内皮細胞の Characterization

レシピエント由来の血管内皮細胞は抗 CD31 抗体を用いた免疫染色ならび

にフローサイトメトリーで Characterization を行った。

抗 CD31 抗体による免疫染色は次の手順で行った。培養細胞を 24 well plate に播種した。細胞の入った plate に 4%ホルムアルデヒドを添加し、室温で 15 分間固定した。固定後、固定液を除去して、phosphate-buffered saline (PBS)で 3 回リンスした。細胞に 0.1%の Triton X-100 を加え 15 分間室温で浸透処理をした。再度 PBS で 3 回リンスし、1% bovine serum albumin を添加し、4°Cで一晩ブロックした。希釈した 1 次抗体を添加し、4°Cで一晩保存した。PBS でリンス後、希釈した色素の共役した 2 次抗体を添加し、室温 1 時間暗い場所に置いた。核を染色するために、検体に希釈した 4',6-diamigino-2-phenylidole (Wako) を添加し、室温で 3 分間暗い場所で静置し、PBS でリンスした。検体を適切な励起波長を用いて蛍光顕微鏡で観察した。

抗 CD31 抗体を用いたフローサイトメトリーは次のようにして行った。培養細胞を PBS で再懸濁し、1 次抗体を添加し 4°Cで 30 分間置いた。遠心を行い、PBS で洗った後に、希釈した色素共役の 2 次抗体を添加し、4°Cで 30 分間置いた。得られた細胞群を遠心し、PBS で再懸濁し、fluorescence-activated cell sorting scan (Beckman Coulter)で解析を行った。

使用した抗体の希釈濃度は表 2, 表 3 にまとめた。

表 2 免疫細胞染色で使用した抗体

ターゲット	ホスト	Manufacturer	Catalogue number	希釈濃度
1 次抗体				
KRT5	Rabbit	Novus Biologicals	NB110-56916	1:100
p63	Rabbit	Fitzgerald	70R-50620	1:400
CD31	Rat	R&D Systems	MAB33871	1:100
2 次抗体				
Rabbit IgG	Goat, 488	Invitrogen	A11034	1:500
Rat IgG	Goat, 594	Invitrogen	A11007	1:500
Rabbit IgG	Goat, 546	Invitrogen	A11010	1:500

表 3 フローサイトメトリーで使用した抗体

ターゲット	ホスト	Manufacturer	Catalogue number	希釈濃度
1 次抗体				
KRT5	Mouse	Aviva Systems Biology	OAEE00379	1:50
p63	Rabbit	Fitzgerald	70R-50620	1:50
CD31	Rat	R&D Systems	MAB33871	*
Isotype	Rat	R&D Systems	MAB005	*
2 次抗体				
Rabbit IgG	Goat, 488	Invitrogen	A11034	1:1000
Rat IgG	Goat, 647	Invitrogen	A11007	1:1000
Mouse IgG	Goat, 647	Invitrogen	A21240	1:1000

* 10⁵ cells に対して 1.25 μL 使用.

7-6. 結果

レシピエントブタ (n=3) に対して合併症なく、肺部分切除を行うことができた。ブタと細胞の特徴を表 4 にまとめた。

3 週間の培養を経て、気道上皮細胞は平均 19.4×10^5 個まで得ることができた (表 4)。免疫細胞化学染色は、ほぼ全ての細胞が KRT5 ならびに p63 陽性細胞であることを示した (図 13)。さらに、フローサイトメトリーで 90%以上の細胞が KRT5 ならびに p63 ともに陽性であることを確認した (図 13)。

3 週間の培養を経て、血管内皮細胞は平均 34.9×10^5 個まで得ることができた。免疫細胞化学染色は、ほぼ全ての細胞が CD31 陽性細胞であることを示した (図 14)。さらに、フローサイトメトリーで 90%以上の細胞が CD31 陽性であることを確認した (図 14)。

表 4. ブタと細胞の特徴のまとめ

レシピエント 番号	トブタ体重 (kg)	細胞の種類	部分切除 した肺組 織量 (mg)	得られて播 種した自家 細胞数	肺スキャ フォルドの ドナーブタ体 重 (kg)
1	17.3	血管内皮細胞	706	4.4×10^5	17.6
		気道上皮細胞	501	38.3×10^5	
2	21.5	血管内皮細胞	257	8.7×10^5	18.0
		気道上皮細胞	144	14.0×10^5	
3	19.5	血管内皮細胞	1127	91.9×10^5	18.6
		気道上皮細胞	1376	6.0×10^5	

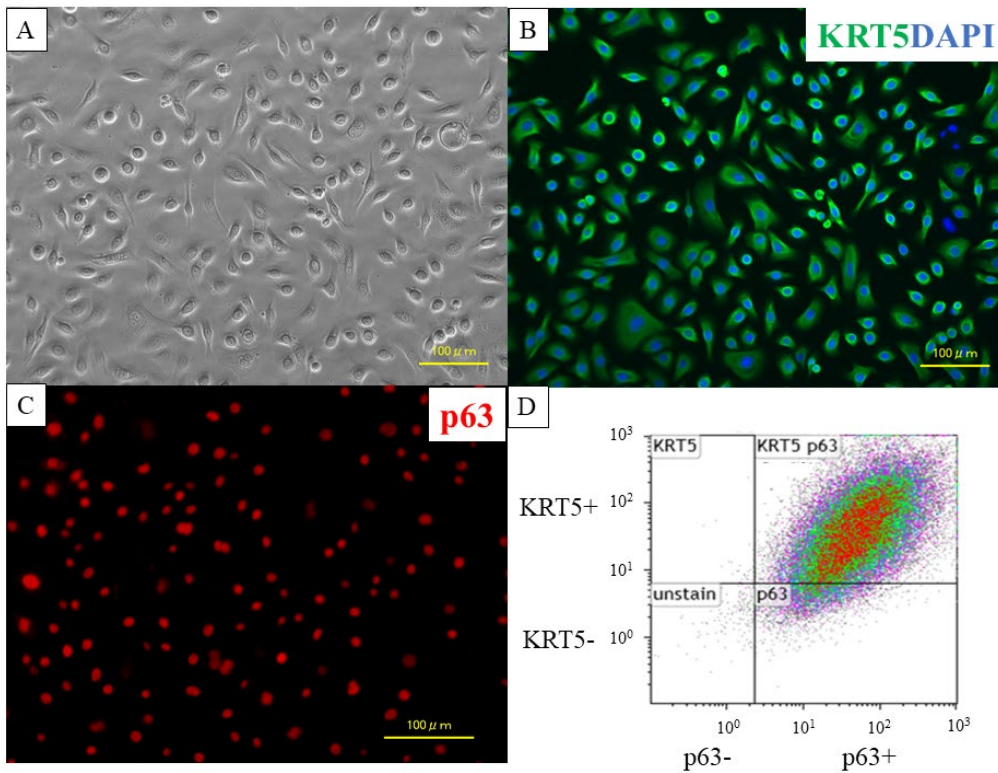


図 13 気道上皮細胞の Characterization

(A) 気道上皮細胞の位相差顕微鏡像

(B) KRT5 (緑) 陽性となる細胞群 (紫は核を染める対比染色)

(C) p63 (赤) 陽性となる細胞群

(D) フローサイトメトリーで 90%以上の細胞が KRT5+p63+であった

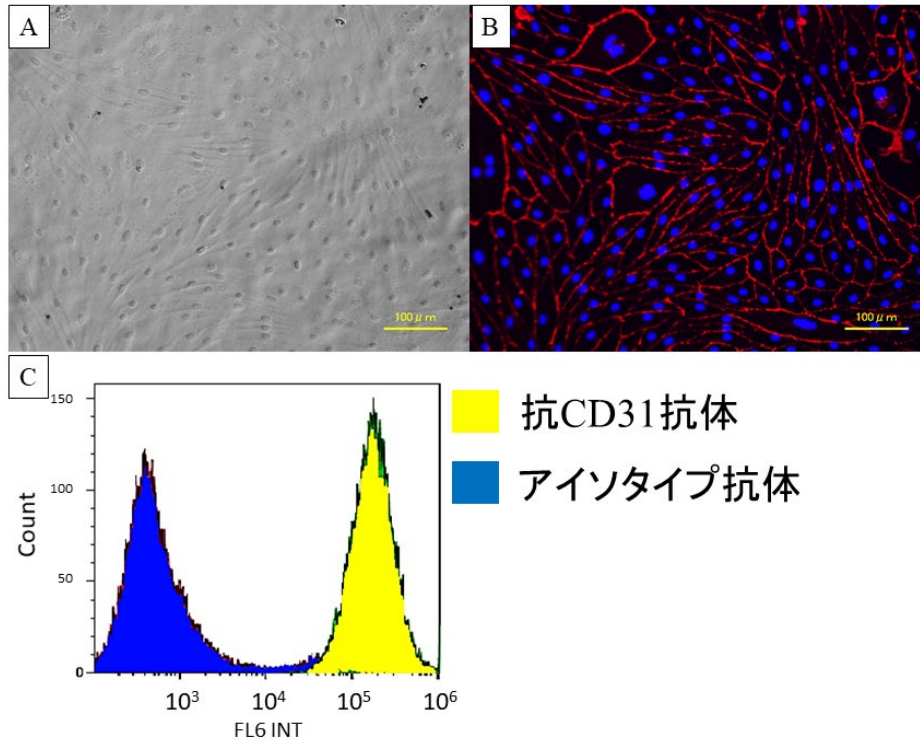


図 14 血管内皮細胞の Characterization

(A) 血管内皮細胞の位相差顕微鏡像

(B) CD31 (赤) 陽性となる細胞群 (紫は核を染める対比染色)

(C) フローサイトメトリーで 90%以上の細胞が CD31+であった

8. 再生肺グラフトの検討

8-1. 脱細胞化肺スキャフォールドの再細胞化

再細胞化は、肺動脈・肺静脈・気管支を通じて細胞を播種することのできるバイオリアクターを用いて行った。1%ペニシリン-ストربتマイシン溶液の入った 1,000 mL の Hank's balanced salt solution (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)を脱細胞化肺スキャフォールドに肺動脈・肺静脈を通じて 8 mL/min で流した。その後、インキュベータ内で ECGM (PromoCell GmbH)を肺動脈・肺静脈を通じて 0.2 mL/min で 2 時間流した。50mL の ECGM (PromoCell GmbH)に懸濁したレシピエント由来の血管内皮細胞を肺動脈・肺静脈を通じて 30 分かけて流した。スキャフォールドを肺動脈・肺静脈から ECGM (PromoCell GmbH)を用いて 0.2 mL/min で、2 日間インキュベータ内で灌流した。その後、50mL の SAGM に懸濁したレシピエント由来の気道上皮細胞を気管支から 30 分かけて流した。スキャフォールドを気管支から SAGM を用いて 0.2 mL/min で、1 日間インキュベータ内で灌流した。

先行研究 (46, 64-68) では培養期間は 3 日間から 30 日間と様々であるが、我々は長期間の培養によるグラフトの感染を危惧して、血管内皮細胞の培養期間を 2 日間、気道上皮基底膜細胞の培養期間を 1 日間の計 3 日間に設定した。

8-2. 結果

脱細胞肺スキャフォールドのドナーブタの体重と、播種したレシピエント由来の自家細胞数を表 4 にまとめた. 再細胞を行うことで肺スキャフォールドの色調は変化していった (図 15A, 15B).

再細胞化を行った再生肺グラフトのヘマトキシリンエオジン染色では, 脱細胞化肺スキャフォールドに比して, グラフト内に散在性に細胞が存在することを確認した (図 15C). 蛍光免疫染色では KRT5+p63+気道上皮細胞ならびに CD31+血管内皮細胞を確認した (図 15D, 15E, 15F). これらの所見から, レシピエント由来の自家細胞が再生肺グラフトにおいて存在していることを確認した.

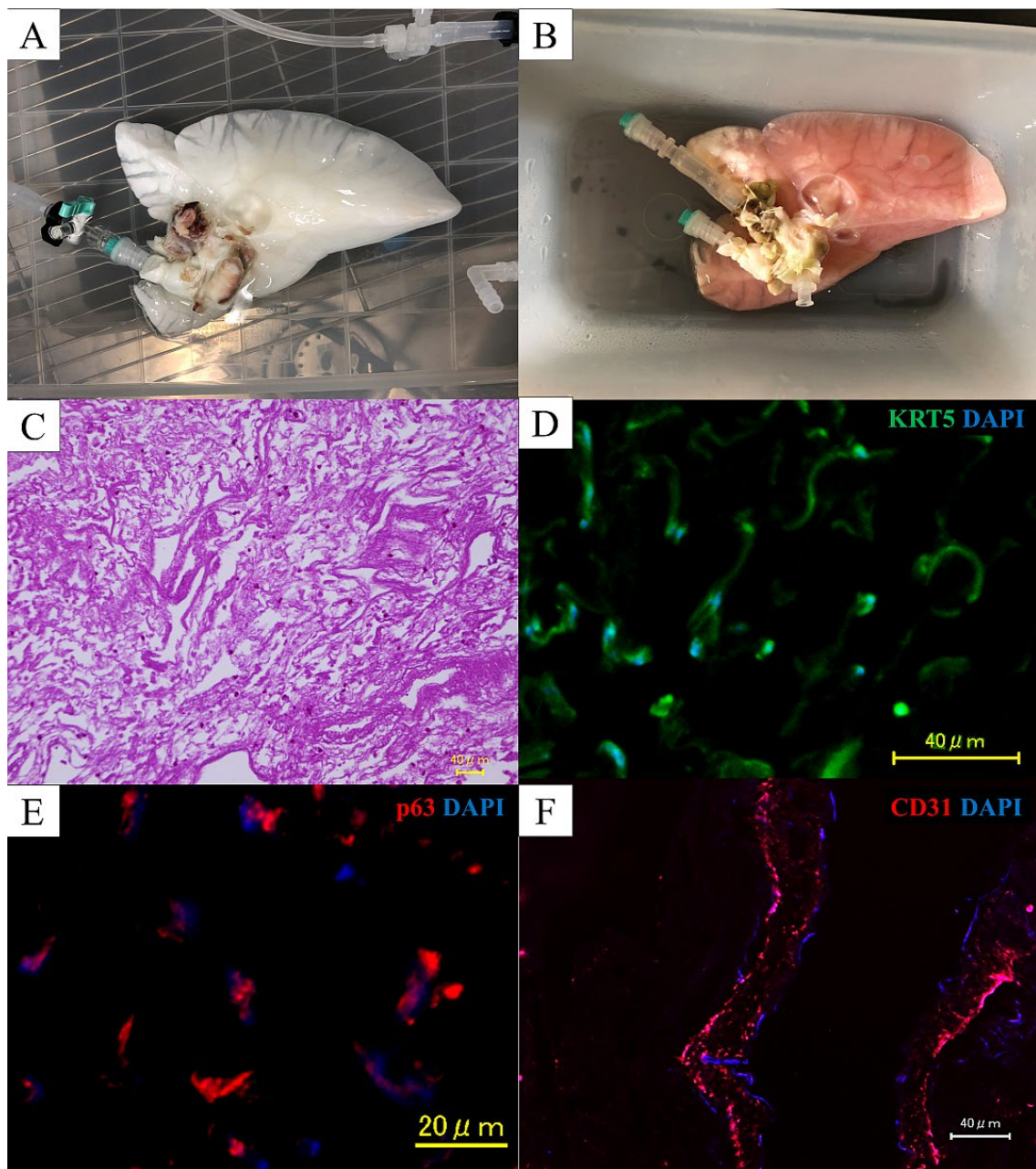


図 15 再生肺グラフトの Characterization

- (A) 再細胞化前の肺グラフト
- (B) 再細胞化後の肺グラフト
- (C) 再細胞化後の肺グラフト組織のヘマトキシリンエオジン染色
- (D) 再細胞化後の肺グラフト組織内における KRT5+細胞 (緑)
- (E) 再細胞化後の肺グラフト組織内における p63+細胞 (赤)
- (F) 再細胞化後の肺グラフト組織内における CD31+細胞 (赤)

9. 再生肺移植と再生肺の *in vivo* 機能

9-1. 再生肺移植

部分切除後 3 週間後に、レシピエントブタに対して、上記で作成した再生肺の左片肺移植を行った。麻酔導入と維持は部分切除時と全く同様である。左開胸を行い、400 U/kg のヘパリンを静脈投与後、左肺全摘を施行した。再生肺を胸腔内に置き、グラフトの左主気管支、左主肺動脈、左房カフをレシピエントの左主気管支、左主肺動脈、左房に 4-0 または 5-0 ポリプロレンを用いて、連続縫合で吻合した(79)。吻合した再生肺グラフトを再灌流し、再換気した。人工呼吸器を 1 回換気量 140mL、呼気終末陽圧を 10cmH₂O、呼吸回数 12 回/分、酸素濃度を 100%に設定した。ほぼ同等の体重のブタの同種他家肺移植でグラフト肺を膨らませるために 10cmH₂O の呼気終末陽圧を要したため、我々は本移植モデルにおいても、呼気終末陽圧を 10cmH₂O に設定した。血液ガス分析(G3+ i-STAT; Abbott Diagnostics, Chicago, IL)をグラフトの肺動脈・肺静脈から採取した血液をもとに、1 時間おきに吻合後 4 時間まで行った。我々は超急性期における、肺移植後のグラフト肺の *in vivo* 機能を評価するため、先行研究 (80) に従い、吻合後 4 時間まで血液ガスを採取した。吻合後 4 時間後にレシピエントブタを犠牲死させ、グラフトを摘出した。摘出した再生肺グラフトの wet-to-dry weight ratio (W/D ratio)を、60°C60 時間での保存前後での質量の

違いに基づいて算出した。

In vivo での再生肺グラフトのガス交換能の評価のために，肺静脈と肺動脈の酸素分圧較差ならびに二酸化炭素分圧較差を算出した。

再生肺移植までの一連の概略を図 16 にまとめた。

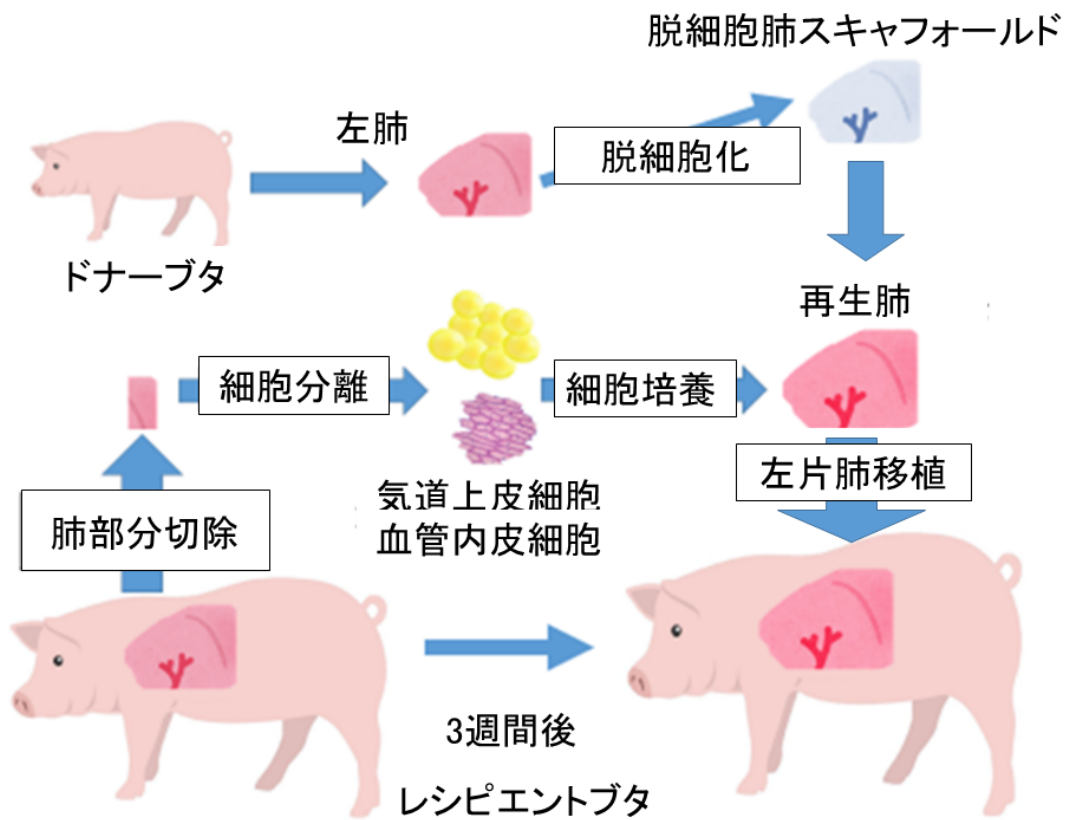


図 16 再生肺移植までの一連の流れ

9-2. 同種他家肺移植

同種他家左片肺移植をコントロール群として実行した。ドナー肺を全身麻酔下に胸骨正中切開で摘出した。400 U/kg のヘパリンをドナーブタに静脈投与し、肺動脈にカニューレションを置き、1L の ET-K (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc., Naruto, Japan) で灌流した(81)。両肺を摘出し、トリミングの上で左片肺をグラフトとして摘出し、保存した。

レシピエントブタは再生肺移植と同様の手順で左片肺移植を行った。呼吸器条件も再生肺移植と全く同一に設定を行った。血液ガス分析(G3+ i-STAT; Abbott Diagnostics, Chicago, IL)をグラフトの肺動脈・肺静脈から採取した血液をもとに、1時間おきに吻合後4時間まで行った。吻合後4時間後にレシピエントブタを犠牲死させ、グラフトを摘出した。摘出した他家肺グラフトの wet-to-dry weight ratio (W/D ratio)を、60°C60時間での保存前後での質量の違いに基づいて算出した。

グラフトのガス交換能の評価のために、肺静脈と肺動脈の酸素分圧較差ならびに二酸化炭素分圧較差を算出した。

9-3. 脱細胞肺移植

脱細胞化肺スキャフォールドの左片肺移植をコントロール群として実行し

た. 400 U/kg のヘパリン全身投与後, ドナーブタから両肺を摘出し, 上記に記した方法で脱細胞化を行った. 脱細胞化肺スキュフォールドは再細胞化の過程と同様に, インキュベータ内で肺動脈・肺静脈を通じて ECGM を 2 日間, 気管支を通じて SAGM を 1 日間, 細胞を播種させることなく灌流した.

培地で灌流を行った脱細胞化肺スキュフォールドを, レシピエントブタに再生肺移植と同様の手順で左片肺移植した. 呼吸器条件も再生肺移植と全く同一に設定を行った. 血液ガス分析(G3+ i-STAT; Abbott Diagnostics, Chicago, IL)をグラフトの肺動脈・肺静脈から採取した血液をもとに, 1 時間おきに吻合後 4 時間まで行った. 吻合後 4 時間後にレシピエントブタを犠牲死させ, グラフトを摘出した. 摘出した他家肺グラフトの wet-to-dry weight ratio (W/D ratio)を, 60°C60 時間での保存前後での質量の違いに基づいて算出した.

グラフトのガス交換能の評価のために, 肺静脈と肺動脈の酸素分圧較差ならびに二酸化炭素分圧較差を算出した.

9-4. 結果

再生肺の左片肺移植は 3 例全例において, 吻合後再灌流, 再換気後も縫合不全なくレシピエントブタは生存できた. さらに 3 例とも移植後 4 時間生存した. 再換気直後から再生肺グラフトは嚢胞性変化を呈していた (図 17).

酸素ガス交換能は移植直後, 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後, 4 時間後で, 352 ± 105 mmHg, 324 ± 69.6 mmHg, 376 ± 66.5 mmHg, 368 ± 115 mmHg, 397 ± 116 mmHg であった (図 18, 表 5). 二酸化炭素ガス交換能は移植直後, 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後, 4 時間後で, 21.1 ± 27.5 mmHg, 7.87 ± 9.87 mmHg, 21.2 ± 24.8 mmHg, 5.93 ± 3.76 mmHg, 3.93 ± 3.61 mmHg であった (図 19, 表 6).

コントロール群として行った同種他家肺移植も 3 例全例, 移植後 4 時間まで生存した. 同種他家肺移植における酸素ガス交換能は移植直後, 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後, 4 時間後で, 324 ± 56.5 mmHg, 338 ± 132 mmHg, 304 ± 128 mmHg, 327 ± 125 mmHg, 358 ± 62.1 mmHg であった (図 18, 表 5). 同種他家肺移植における二酸化炭素ガス交換能は移植直後, 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後, 4 時間後で, 18.7 ± 8.86 mmHg, 20.4 ± 14.2 mmHg, 21.8 ± 13.3 mmHg, 17.2 ± 17.5 mmHg, 21.1 ± 13.2 mmHg であった (図 19, 表 6).

各時間における 2 群間の平均値の比較を行った. 再生肺移植群における酸素ガス交換能は, 同種他家肺移植群と比して有意な違いを認めなかった (図 18). しかしながら, 再生肺移植群における二酸化炭素ガス交換能は, 移植後 4 時間の時点で低い傾向にあった (図 19).

さらに群間の違いと経時的な変化を考慮した反復測定分散分析を行った. 酸素ガス交換能は, モークリーの球面性検定で $P=0.89$ と帰無仮説は棄却されず,

時間で $P=0.81$ ，群間で $P=0.64$ でともに有意差は認めなかった（表 5）。さらに二酸化炭素ガス交換能は，モークリーの球面性検定で $P=0.15$ と帰無仮説は棄却されず，時間で $P=0.32$ ，群間で $P=0.50$ でともに有意差は認めなかった（表 6）。

移植後 4 時間後に摘出した再生肺グラフトの W/D ratio は，同種他家肺移植のアログラフトの W/D ratio に比して有意に低かった（ 6.21 ± 1.02 vs 7.38 ± 0.92 ， $P=0.007$ ）。

脱細胞肺グラフトの移植の手技は 2 例において，吻合後再灌流，再換気後も縫合不全なくレシピエントブタは生存できた。2 例ともに再換気後，嚢胞性変化を呈した（図 20A）。しかしながら，脱細胞肺移植においては，移植後 30 分以内に全例死亡した。

死亡後，移植された肺と正常肺を含めて摘出した。脱細胞肺グラフトにおいては気道出血の痕を認めた（図 20B）。さらに組織学的に顕著な肺出血を認めた（図 20C）。このような肺出血像は，移植後の再生肺グラフトにおいては見られなかった（図 20D）。

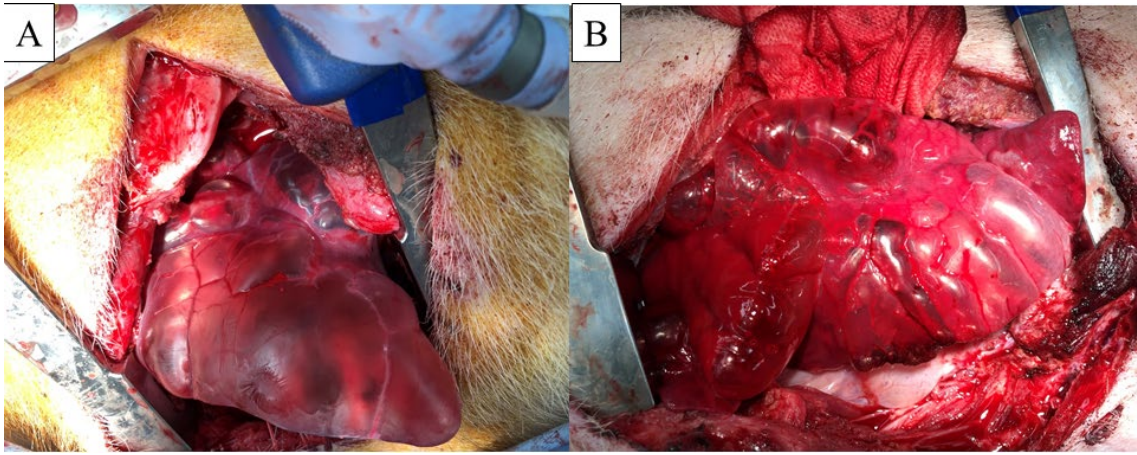


図 17 移植後の再生肺グラフト
(A) (B) 全例において嚢胞性変化を呈した.

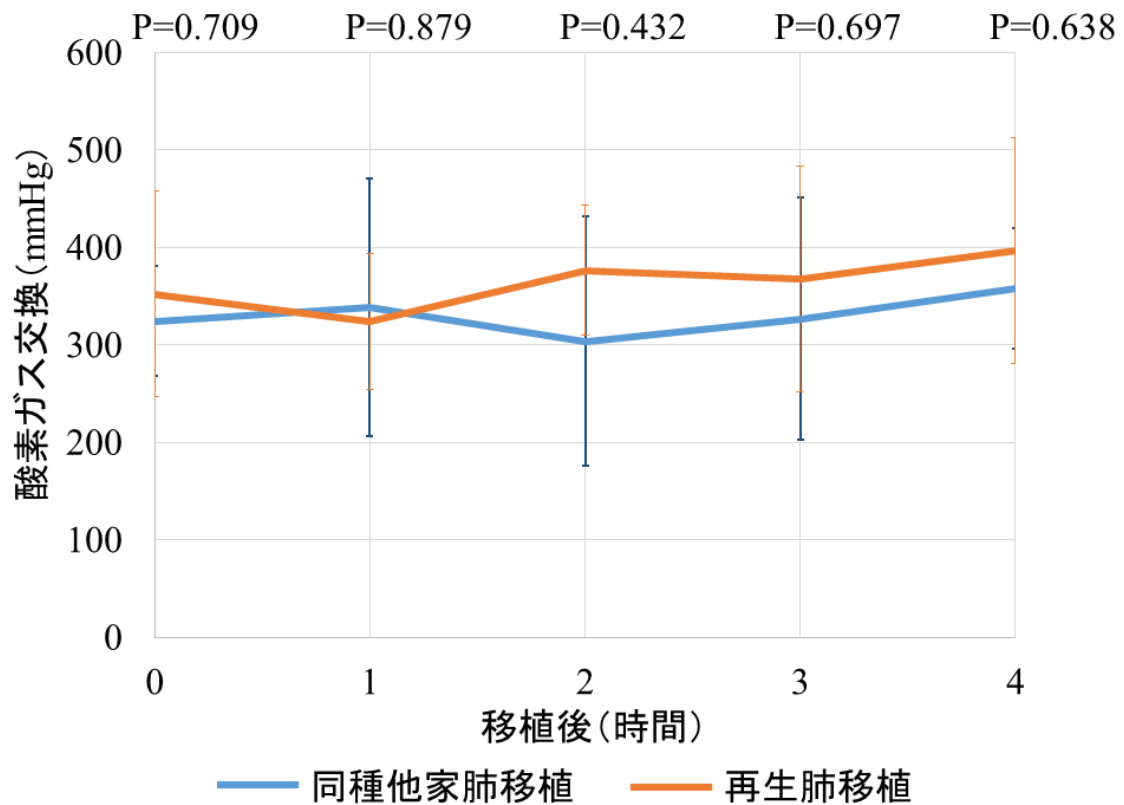


図 18 再生肺グラフトの酸素ガス交換能
移植後 4 時間の中で酸素ガス交換において、再生肺移植は同種他家肺移植と有意な違いを認めなかった。

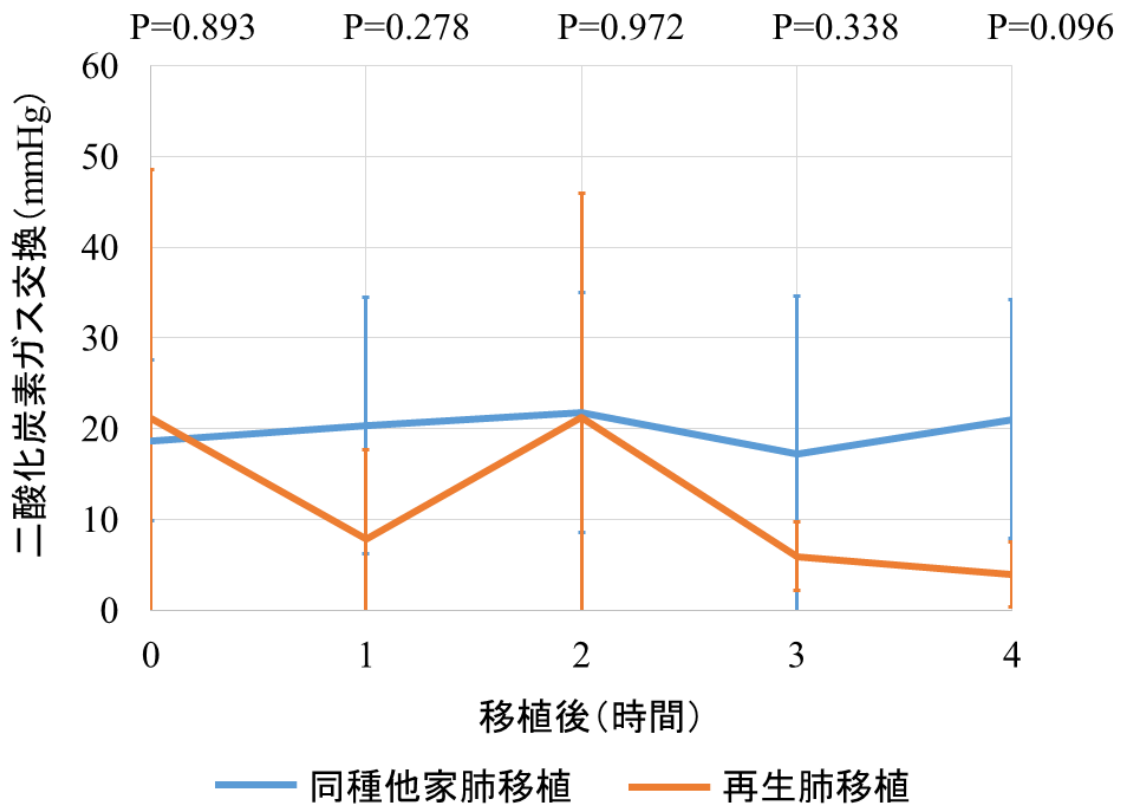


図 19 再生肺グラフトの二酸化炭素ガス交換能
 二酸化炭素ガス交換において、移植後 4 時間の時点で再生肺移植は同種他家肺移植に比して有意にガス交換能が低い傾向にあった (P=0.096)。

表 5. 酸素ガス交換能(mmHg)

移植群 \ 時間 (h)	0	1	2	3	4
再生肺移植①	319	329	452	469	530
再生肺移植②	267	252	327	242	342
再生肺移植③	470	391	350	392	318
同種他家肺移植①	264	334	247	356	402
同種他家肺移植②	376	472	450	434	385
同種他家肺移植③	333	208	214	190	287

表 6. 二酸化炭素ガス交換能(mmHg)

移植群 \ 時間 (h)	0	1	2	3	4
再生肺移植①	11.1	0.6	7.8	3.1	0
再生肺移植②	52.2	19.1	49.8	10.2	4.7
再生肺移植③	0	3.9	6	4.5	7.1
同種他家肺移植①	28.1	36	36.3	36.8	35.2
同種他家肺移植②	10.5	8.4	18.8	11.4	9.1
同種他家肺移植③	17.5	16.7	10.3	3.3	18.9

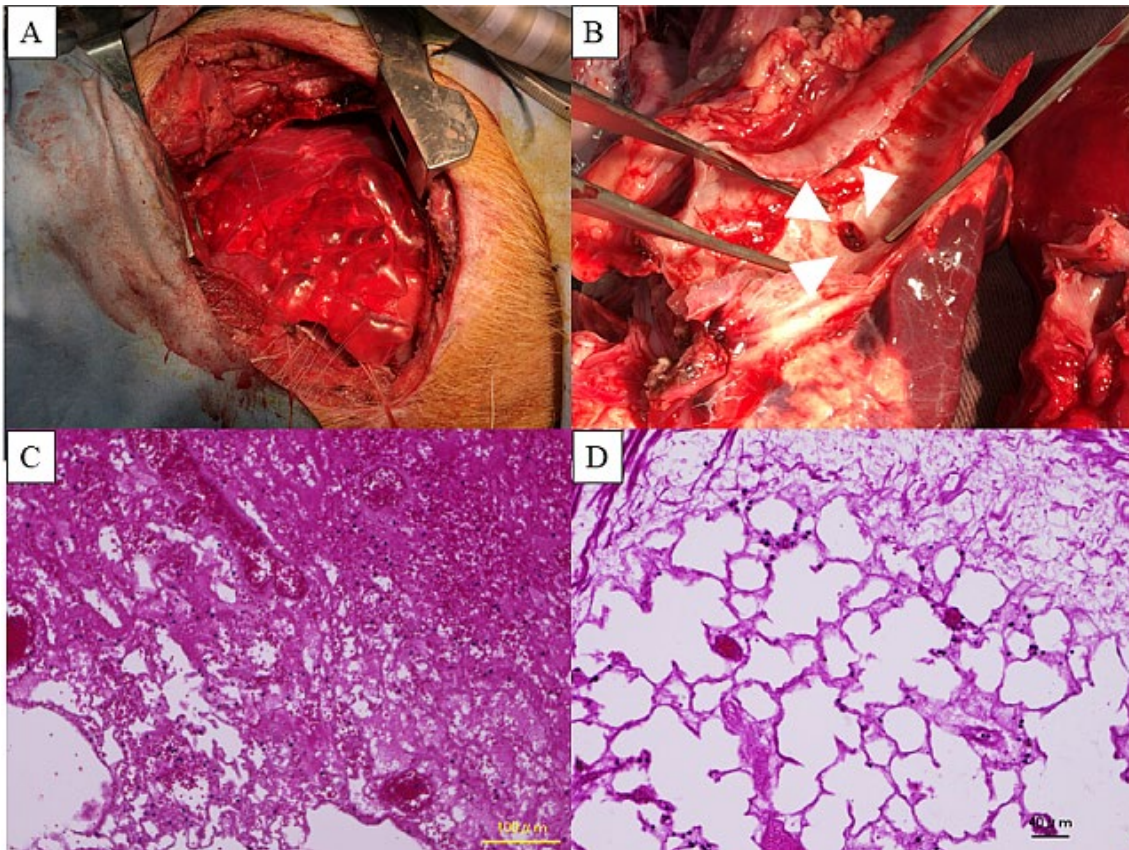


図 20 脱細胞肺移植

- (A) 再換気後の著明な嚢胞性変化
- (B) 死後に摘出した脱細胞肺グラフトで認められた気道内出血像（白印）
- (C) 肺出血像を呈する，死後に摘出した脱細胞肺グラフトのヘマトキシリンエオジン染色
- (D) 死後に摘出した再生肺グラフトのヘマトキシリンエオジン染色

10. 移植後の再生肺グラフトの組織学的評価

再生肺グラフトは移植後、顕著な嚢胞性変化をきたしていた（図 17）。移植後 4 時間後の安楽死後、グラフトを摘出し、組織学的評価を行った。

ヘマトキシリンエオジン染色で、肺組織は嚢胞性変化ならびに胸膜と肺胞との離断を示した（図 21A, 21B）。免疫組織化学染色では、胸膜と肺胞との離断部ではエラスチンの染色は悪かったが、胸膜が保持されていた部位ではエラスチンはよく染色されていた（図 21C, 21D）。さらに胸膜と肺胞との離断がみられた部位では細胞はわずかしか認められなかったが、胸膜が保持されていた部位では細胞は多く認められた（図 21C, 21D）。

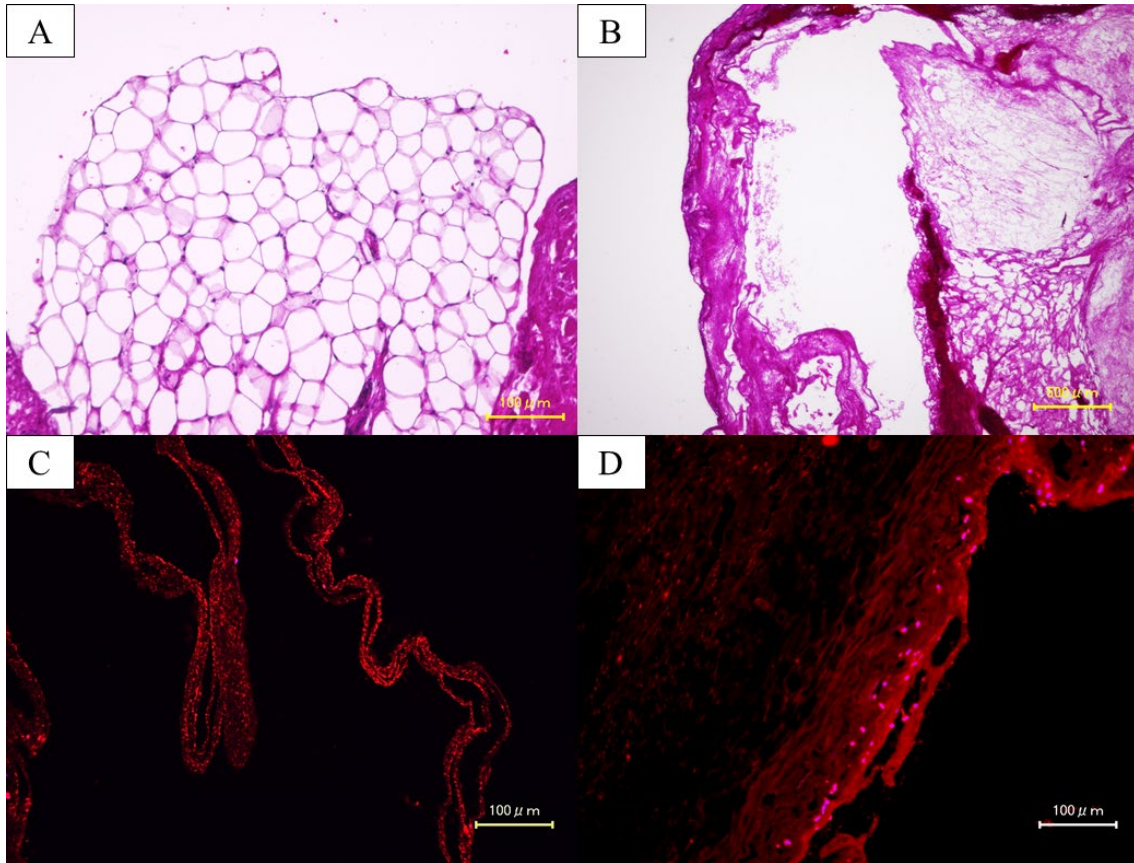


図21 再生肺グラフト移植後の組織学的評価

(A) 嚢胞性変化を認めた，移植終了後の再生肺グラフトのヘマトキシリンエオジン染色

(B) 胸膜と肺胞の離断を認めた，移植終了後の再生肺グラフトのヘマトキシリンエオジン染色

(C) 胸膜と肺胞の離断部におけるエラスチン（赤）蛍光免疫染色

(D) 胸膜非損傷部におけるエラスチン（赤）蛍光免疫染色（紫は核の対比染色）

考察

1. 肺の脱細胞化における気管支内生理食塩水注入の効果

今回の検討では、気管支生理食塩水注入は有意に肺グラフトの DNA 量とエラスチン量を低下させた。気管支内への生理食塩水注入を行った脱細胞化肺スキャフォールドの検討はあるが、実際に生理食塩水注入の有無での脱細胞化の違いを検討したのは本研究の新規性である。

気管支内への生理食塩水注入により肺グラフトの DNA 量が有意に低下したことは、気管支内生理食塩水注入が脱細胞化をより効果的に促進する手技だと言える。本手技が有効であったのは、気管支内に生理食塩水を注入することであらかじめ肺グラフトの末梢部位にトラップされていた空気を除去し、SDS や Triton X-100 が肺の末梢まで行き渡りやすくなり、細胞が効率的に除去されたのだと考えられる。

しかしながら、本手技は細胞の除去のみならず、細胞外マトリックスたんぱく質の一つであるエラスチンも有意に低下させた。これは生理食塩水を気管支内に注入することでグラフト肺の水腫を起こし、細胞外マトリックスの変性をもたらしたことによる可能性もある (77)。エラスチンは肺の弾性や可塑性を維持する重要な要素である (82)。エラスチンの低下は肺気腫につながるとも報告されている。エラスチンをできる限り保持することが脱細胞化肺スキャ

フォールド作成の上では重要である。そのため、エラスチン保持の観点において、気管支内生理食塩水注入は好ましくない手技であると言える。

2. 再生肺移植の実現可能性

脱細胞化肺スキャフォールドにおいては細胞をほとんど認めなかったが、自家細胞を培養後の再生肺グラフトにおいては細胞を数多く認め、自家細胞による再生肺グラフトが実現したと考えられる。

細胞成分のない脱細胞化肺スキャフォールドの左片肺移植では2例ともに、移植後30分以内に死亡した。その一方で、再生肺グラフトの左片肺移植では3例ともに4時間以上生存した。脱細胞化肺スキャフォールド移植例の死後の肺グラフトの組織像から肺出血ならびに気道出血が死因であったと推察される(図20B, 20C)。一方で、再生肺グラフト移植例の死後の肺グラフトの組織像では肺出血を認めなかった(図20D)。これらの結果から、脱細胞化を行った肺血管はレシピエントからの血流に耐えきれず、脱細胞化肺スキャフォールド移植例では肺出血をきたしたと考えられる。しかしながら、脱細胞化後に細胞を培養する再細胞化を行った場合には、肺血管はレシピエントからの血流に耐えることができ、4時間以上も生存することができたのだと推察される。我々の再生肺グラフト移植は、超急性期にはおいては実行可能性があったと言える。本研究と先行研究の違いについて表7にまとめた。脱細胞化肺移植と比較した先行研究はなく、自家血管内皮細胞により再細胞化を行った効果を示せたことは今後の再生肺研究を進めるうえで大きな一歩だと思われる。

さらに再生肺グラフト移植モデルの酸素ガス交換能は同種他家肺移植と比較して遜色のない結果であった。過去には片肺全摘モデルや対側肺との酸素ガス交換能を比較した検討があった(64, 65)が、同種他家肺移植モデルとの比較はほとんどなされていない。末期肺疾患における唯一の治療法である同種他家肺移植と比較して酸素ガス交換能に遜色がないことを示せたことは、再生肺移植の研究を前進させたと言える。さらに我々は部分切除肺から得た自家細胞をもとに再生肺を構築した。我々が施行した部分切除の範囲は左肺舌区の一部の切除である (図 12C)。ブタにおける肺容量の検討を行っていないが、ヒトの舌区の肺容量は左肺全体の約 16.6%~19.0%と報告されている (83)。右肺と左肺の容量が同等だと仮定すると左肺舌区は全肺容量の約 8.3%~9.5%程度と推測される。我々の行った左肺舌区部分切除は多く見積もっても約 8.3%~9.5%程度しか切除しておらず、仮に半分を切除したとしても約 4%から 5%程度の切除容量と考えられる。これは末期肺疾患患者においても施行可能な範囲と考えられる。

しかしながら、再生肺グラフトが再換気直後から顕著な嚢胞性変化をきたし、さらには通常と同種他家肺移植と比して、二酸化炭素ガス交換能が悪いことは、我々の再生肺グラフト移植モデルがまだまだ実臨床では使用できないことを示唆している。先行研究によれば肺における嚢胞は放射線診断で 2mm

未満の薄壁を有する, 円形状の肺実質における透亮像を嚢胞と定義されている

(84). 我々の検討では再生肺のレントゲンや CT 撮影を行っていないが, 組織の顕微鏡像で明らかに 2mm 未満の薄壁を有する構造物を確認しているため, 嚢胞性変化と判断した.

嚢胞性変化や二酸化炭素ガス交換能の不良は, 脱細胞化の過程でエラスチンが失われたことが一因と考えられる. エラスチンは細胞外マトリックスタンパクの一種であり, 肺の収縮性, 弾性, 可塑性を担う大切な要素である(82). 実際にエラスチンの低下は閉塞性肺疾患やリンパ脈管筋腫症, 先天性嚢胞性腺腫様奇形などを導く可能性が過去の報告で示唆されている(85-87). 肺の脱細胞化に伴うエラスチンの低下によって, 我々は偶発的に「気腫肺」を作ってしまったことになる. 再生肺の上では臨床使用には堪えないが, 肺気腫や肺嚢胞のモデル作成の上では我々のモデルは有用となる可能性はある.

エラスチンをはじめとする細胞外マトリックスタンパクの保持のためには, 我々が用いた SDS/Triton X-100 以外の方法を模索する必要があるかもしれない. CHAPS など他の方法で細胞外マトリックスタンパクを保持しながらの脱細胞化手技を行うのが良いのかもしれない(88).

肺スキャフォールドのエラスチン低下のみならず, 細胞についても課題が残ったと考える. 過去の報告では 15-20kg のブタ肺スキャフォールドにおい

て細胞を埋め尽くすのに、少なくとも 10^8 個必要と考えられた(67)が、我々はせいぜい 10^5 から 10^6 個の自家細胞しか播種させることができなかった。実際、上記の通り、我々は偶発的に「気腫肺」を作り上げてしまったが、これも気道系の細胞数が圧倒的に不足していたことに起因するかもしれない。この問題を解決するには短期間で多くの自家細胞を分離・増殖させる技術の開発が必要である。

さらには、今回我々は、KRT5+p63+の気道上皮細胞や CD31+血管内皮細胞を用いたが、本当にこれらの細胞が肺再生において必要十分であるかについても検討する必要がある。例えば、我々の再細胞化した肺グラフトの肺泡構造に気道上皮細胞を確認したが、これが適切な肺泡再生につながっているかは検討の余地があり、肺泡上皮細胞ないしは肺泡上皮細胞に分化しうる細胞を配置すべきだったと思われる。肺再生において有望な幹細胞の報告は多くあるが(89, 90)、臨床応用には程遠く、実用化するための研究が望まれる。

総括すると、今後の肺再生の研究においては2つの要素が重要になることが明らかになった(図22)。1つは肺スキヤフォールドの因子である。細胞外マトリックスたんぱく質をいかに保持したまま脱細胞化をいかに効果的に行なうかという検討が必須である。2つ目に細胞側の因子である。肺再生において必要十分な細胞の質と量については今後も大いに検討の余地がある。細胞は細

胞外マトリックスたんぱく質を産み出しており, 十分かつ質の良い細胞は適切な胞外マトリックスの創出につながると思われる. 逆に適切な胞外マトリックスは細胞の分化, 増殖につながる. 肺スキヤフォールドと細胞の因子は相互に関連した要素である.

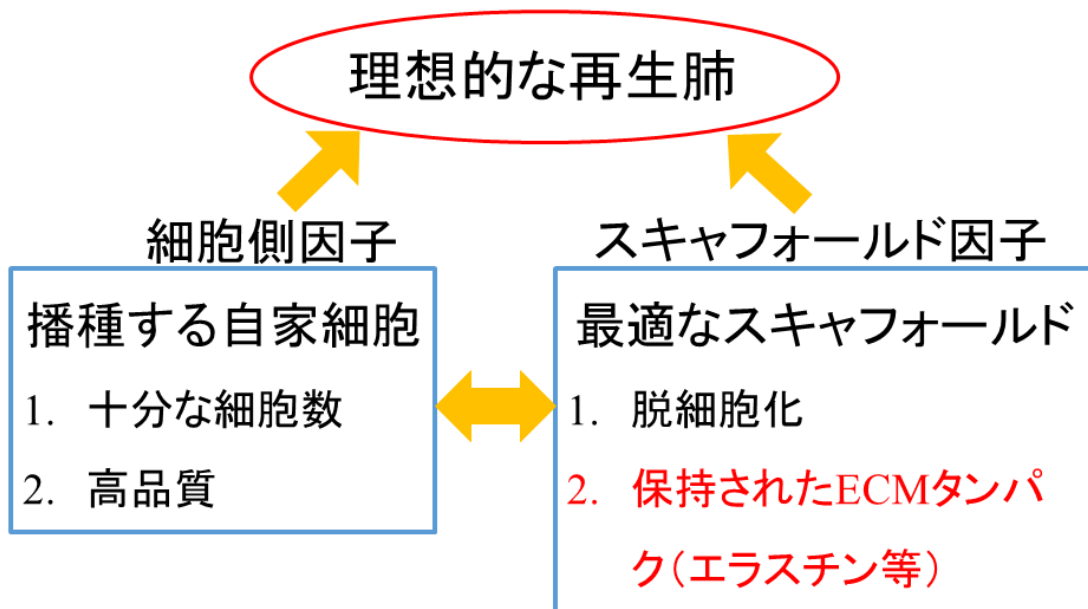


図 22 肺再生研究の今後の展望

表 7. 先行研究と本研究のまとめ

筆頭著者	年	動物	播種細胞	培養期間	コントロール群	移植後 観察期間
Ott HC(64)	2010	Rat	Human	9 日間	片肺全摘モデル	6 時間
Petersen TH(65)	2010	Rat	Rat (他家)	8 日間	対側正常肺	2 時間
Song JJ(66)	2011	Rat	Rat (他家), Human	7 日間	片肺全摘モデル, 同種他家肺移植	14 日間
Doi R(46)	2017	Rat	Rat (他家)	3, 5, 8 日間	なし	3 時間
Zhou H(67)	2018	Pig	Human	6 日間	対側正常肺	1 時間
Nichols JE(68)	2018	Pig	Pig (自家)	30 日間	なし	2 か月
The present study	2020	Pig	Pig (自家)	3 日間	同種他家肺移植, 脱細胞肺移植	4 時間

() 内は引用文献の番号

3. 本研究の限界

我々の研究の限界は、第一に移植検討を行ったブタの個体数が少ないことである。我々の検討では少数ながらも、再生肺グラフトにおいて嚢胞性変化や明らかな二酸化炭素ガス交換能の低下を呈したため、臨床応用に堪えるモデルではないと判断し、さらに動物愛護の観点を鑑みて、同じモデルによる実験を3件でとどめた。しかしながら、再生肺移植と同種他家肺移植において二酸化炭素ガス交換能において有意差を示せなかったのは、検討個体数の不足による第二種過誤と考えられる。

第二に観察期間の不足である。今回我々は移植後4時間のみの観察を行った。しかしながら、同種他家肺移植における拒絶反応がないと予測される自家細胞の役割を真に評価するには、移植後生存させ、さらに免疫抑制剤なしで長期間観察する検討が必要である。我々のモデルは4時間という短い時間の中でも嚢胞性変化という臨床使用に堪えない所見を認めたために、長期間の検討を行わなかった。今後短期間において臨床応用に堪えられる確信が得られれば、グラフト肺の肺水腫についても、長期生存での評価を行うべきである。

第三に肺部分切除の容量の検討を行わなかったことである。本来であれば部分切除前後でCT撮影を行い、**Volumetry**を測定することで切除容量を算出し、末期肺疾患患者に適応可能な術式であったかを検証すべきであった。

第四に自家細胞の培養期間が 3 週間と短かったことである。必要細胞数は 10^8 個以上であることを分かっていたながら 10^6 個の細胞数まで増殖させなかったのは、長期間の培養で自家細胞が感染することを危惧したからである。今後は培養期間をより長くすることで細胞数を増やし、より良い再細胞化を行うことを目指すべきである。また、分離した段階での細胞数を計測していなかったことも適切な培養期間を見極められなかった要因である。

第五に肺移植実験において、シングルルーメンによる気管内挿管での呼吸管理を行っていたことである。グラフト肺の換気量を一定にするためにも、本来はダブルルーメンチューブによる分離片肺換気をする方が望ましかったと考える。

第六に再細胞化後に細胞の分化について検討しなかった。脱細胞化肺スキャフォールドに細胞を配置した後、細胞が実際にどのように分化するかについては今後の検討課題と言える。

最後に移植肺の血流評価を行わなかったことである。移植されたグラフトの血流により血液ガスや血行動態は影響される。血流による影響を正確に見きわめるためにも、グラフト肺の血流をカテーテルによる圧モニターまたは超音波による評価は必要だったと思われる。

結語

ブタ動物モデルにおいて、脱細胞化技術をもとに自家細胞を利用して構築した再生肺の移植が超急性期において実現可能であることを示した。しかしながら、嚢胞性変化や二酸化炭素ガス交換能不良といった問題点が浮き彫りになった。細胞外マトリックスの保持と自家細胞の検討が今後の肺再生研究における重要な課題であることを我々の研究結果は示した。

謝辞

本研究にあたり，多大なる御高配と御指導，御鞭撻を賜りました，東京大学医学部附属病院呼吸器外科中島淳教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり，終始直接の御指導，御鞭撻を賜りました，東京大学医学部附属病院呼吸器外科北野健太郎助教に深く感謝いたします。

本研究において多くの実践的なご指導を頂きました，東京大学医学部附属病院免疫細胞治療学講座垣見和宏特任教授に深く感謝いたします。

終わりに臨み，本研究に数々の御助言，御協力を賜りました東京大学医学部附属病院心臓外科朝比奈大道先生ならびに東京大学医学部附属病院免疫細胞治療学講座の諸氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papan A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I; Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*, 5, 020415 (2015).
2. Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Curtin SC, Arias E. *Natl Vital Stat Rep*, 66, 1-75 (2017).
3. Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, Johkoh T, Martinez FJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schünemann HJ; American Thoracic Society; European Respiratory society; Japanese Respiratory Society; Latin American Thoracic Association. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*, 192, e3-19 (2015).
4. Iwai K, Mori T, Yamada N, Yamaguchi M, Hosoda Y. Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Respir Crit Care Med*, 150, 670-5 (1994).
5. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial

lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 150, 967-72 (1994).

6. Karakatsani A, Papakosta D, Rapti A, Antoniou KM, Dimadi M, Markopoulou A, Latsi P, Polychronopoulos V, Birba G, Ch L, Bouros D; Hellenic Interstitial Lung Diseases Group. Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece. *Respir Med*, 103, 1122-9 (2009).

7. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, Offord KP. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, 199-203 (1998).

8. Flaherty KR, Toews GB, Travis WD, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, Jain A, Strawderman RL 3rd, Paine R, Flint A, Lynch JP 3rd, Martinez FJ. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J*, 19, 275-83 (2002).

9. Nicholson AG, Colby TV, du Bois RM, Hansell DM, Wells AU. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, 2213-7 (2000).

10. Rudd RM, Prescott RJ, Chalmers JC, Johnston ID; Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. British

Thoracic Society Study on cryptogenic fibrosing alveolitis: Response to treatment and survival. *Thorax*, 62, 62-6 (2007).

11. King TE Jr, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA Jr, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 1025-32 (2001).

12. Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis. A rational clinical approach. *Chest*, 92, 148-54 (1987).

13. King TE Jr, Behr J, Brown KK, du Bois RM, Lancaster L, de Andrade JA, Stähler G, Leconte I, Roux S, Raghu G. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 177, 75-81 (2008).

14. Luppi F, Cerri S, Taddei S, Ferrara G, Cottin V. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: a clinical review. *Intern Emerg Med*, 10, 401-11 (2015).

15. Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, Suga M, Abe S, Nakata K, Taguchi Y, Nagai S, Itoh H, Ohi M, Sato A, Kudoh S. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 171, 1040-7 (2005).

16. Yanagiya M, Sato M, Kawashima S, Kuwano H, Nagayama K, Nitadori J, Anraku M, Nakajima J. Flat Chest of Pleuroparenchymal Fibroelastosis Reversed by Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg*, 102, e347-9 (2016).
17. Reddy TL, Tominaga M, Hansell DM, von der Thusen J, Rassl D, Parfrey H, Guy S, Twentyman O, Rice A, Maher TM, Renzoni EA, Wells AU, Nicholson AG. Pleuroparenchymal fibroelastosis: a spectrum of histopathological and imaging phenotypes. *Eur Respir J*, 40, 377-85 (2012).
18. Munshi L, Keshavjee S, Cypel M. Donor management and lung preservation for lung transplantation. *Lancet Respir Med*, 1, 318-28 (2013).
19. Nathan SD. The future of lung transplantation. *Chest*, 147, 309-316 (2015).
20. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. LUNG HOMOTRANSPLANTATION IN MAN. *JAMA*, 186, 1065-74 (1963).
21. Veith FJ, Kamholz SL, Mollenkopf FP, Montefusco CM. Lung transplantation 1983. *Transplantation*, 35, 271-8 (1983).
22. Hardy JD. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc*, 31, 25-9 (1999).
23. Bhorade SM, Stern E. Immunosuppression for lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc*, 6, 47-53 (2009).

24. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med*, 306, 557-64 (1982).
25. Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 314, 1140-5 (1986).
26. Patterson GA, Todd TR, Cooper JD, Pearson FG, Winton TL, Maurer J. Airway complications after double lung transplantation. Toronto Lung Transplant Group. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 99, 14-20 (1990).
27. Pasque MK, Cooper JD, Kaiser LR, Haydock DA, Triantafillou A, Trulock EP. Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. *Ann Thorac Surg*, 49, 785-91 (1990).
28. Kistler KD, Nalysnyk L, Rotella P, Esser D. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review of the literature. *BMC Pulm Med*, 14, 139 (2014).
29. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report--2010. *J Heart Lung Transplant*, 29, 1104-18 (2010).

30. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, Wagnetz D, Chaparro C, Singer LG, Hutcheon MA, Keshavjee S. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*, 30, 735-42 (2011).
31. Higo H, Kurosaki T, Ichihara E, Kubo T, Miyoshi K, Otani S, Sugimoto S, Yamane M, Miyahara N, Kiura K, Miyoshi S, Oto T. Clinical characteristics of Japanese candidates for lung transplant for interstitial lung disease and risk factors for early death while on the waiting list. *Respir Investig*, 55, 264-269 (2017).
32. Japan Organ Transplant Network [Internet], Tokyo. Available from: <https://www.jotnw.or.jp/index.html> [Accessed 31 October 2016].
33. Valapour M, Skeans MA, Smith JM, Edwards LB, Cherikh WS Uccellini K, Israni AK, Snyder JJ, Kasiske BL. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Lung. *Am J Transplant*. 17 Suppl 1, 357-424 (2017).
34. Date H. Current status and problems of lung transplantation in Japan. *J Thorac Dis*, 8(Suppl 8), S631-6 (2016).
35. Starnes VA, Lewiston NJ, Luikart H, Theodore J, Stinson EB, Shumway NE. Current trends in lung transplantation. Lobar transplantation and expanded use of single lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 104, 1060-5 (1992).

36. Japan Organ Transplant Network [Internet], Tokyo. Available from: <http://www.asas.or.jp/jst/general/qa/lungs/qa3.php> [Accessed 20 October 2019].
37. Date H, Sato M, Aoyama A, Yamada T, Mizota T, Kinoshita H, Handa T, Tanizawa K, Chin K, Minakata K, Chen F. Living-donor lobar lung transplantation provides similar survival to cadaveric lung transplantation even for very ill patients†. *Eur J Cardiothorac Surg*, 47, 967-72 (2015).
38. Date H, Yamane M, Toyooka S, Okazaki M, Aoe M, Sano Y. Current status and potential of living-donor lobar lung transplantation. *Front Biosci*, 13, 1433-9 (2008).
39. Chen F, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Takahagi A, Menju T, Sato T, Sonobe M, Omasa M, Date H. Postoperative pulmonary function and complications in living-donor lobectomy. *J Heart Lung Transplant*, 34, 1089-94 (2015).
40. Sato M, Okada Y, Oto T, Minami M, Shiraishi T, Nagayasu T, Yoshino I, Chida M, Okumura M, Date H, Miyoshi S, Kondo T; Japanese Society of Lung and Heart–Lung Transplantation. Registry of the Japanese Society of Lung and Heart–Lung Transplantation: official Japanese lung transplantation report, 2014. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 62, 594-601 (2014).
41. Magruder JT, Crawford TC, Grimm JC, Kim B, Shah AS, Bush EL, Higgins RS, Merlo CA. Risk Factors for De Novo Malignancy Following Lung Transplantation. *Am*

J Transplant, 17, 227-238 (2017).

42. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds.

Trends Mol Med, 17, 424-32 (2011).

43. Moser PT, Ott HC. Recellularization of organs: what is the future for solid organ transplantation? *Curr Opin Organ Transplant*, 19, 603-9 (2014).

44. Rana D, Zreiqat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M.

Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 11, 942-965 (2017).

45. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs.

Biomaterials, 27, 3675-83 (2006).

46. Doi R, Tsuchiya T, Mitsutake N, Nishimura S, Matsuu-Matsuyama M, Nakazawa Y,

Ogi T, Akita S, Yukawa H, Baba Y, Yamasaki N, Matsumoto K, Miyazaki T, Kamohara

R, Hatachi G, Sengyoku H, Watanabe H, Obata T, Niklason LE, Nagayasu T.

Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells. *Sci Rep*, 7, 8447 (2017).

47. Auger FA, Gibot L, Lacroix D. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 15, 177-200 (2013).

48. Booth AJ, Hadley R, Cornett AM, Dreffe AA, Matthes SA, Tsui JL, Weiss K,

- Horowitz JC, Fiore VF, Barker TH, Moore BB, Martinez FJ, Niklason LE, White ES. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med*. 186, 866-76 (2012).
49. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 33, 1771-81 (2012).
50. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*, 14, 213-21 (2008).
51. Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng*, 10, 1046-53 (2004).
52. Park KM, Hussein KH, Hong SH, Ahn C, Yang SR, Park SM, Kweon OK, Kim BM, Woo HM. Decellularized Liver Extracellular Matrix as Promising Tools for Transplantable Bioengineered Liver Promotes Hepatic Lineage Commitments of Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part A*, 22, 449-60 (2016).
53. Aebischer P, Ip TK, Panol G, Galletti PM. The bioartificial kidney: progress towards an ultrafiltration device with renal epithelial cells processing. *Life Support Syst*, 5, 159-68 (1987).

54. Humes HD, Buffington DA, MacKay SM, Funke AJ, Weitzel WF. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nat Biotechnol*, 17, 451-5 (1999).
55. Humes HD, Weitzel WF, Fissell WH. Renal cell therapy in the treatment of patients with acute and chronic renal failure. *Blood Purif*, 22, 60-72 (2004).
56. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Renal tissue engineering with decellularized rhesus monkey kidneys: age-related differences. *Tissue Eng Part A*, 17, 2891-901 (2011).
57. Conrad C, Schuetz C, Clippinger B, Vacanti JP, Markmann JF, Ott HC. Bio-engineered endocrine pancreas based on decellularized pancreatic matrix and mesenchymal stem cell/islet cell coculture. *Journal of the American College of Surgeons*, 211, S62 (2010).
58. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G, Balasubramani M, Johnson SA, Sicari BM, Kollar E, Badylak SF, Banerjee I. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*, 34, 6760-72 (2013).
59. Hashemi J, Pasalar P, Soleimani M, Arefian E, Khorramirouz R, Akbarzadeh A, Ghorbani F, Enderami SE, Kajbafzadeh AM. Decellularized Pancreas Matrix Scaffolds

for Tissue Engineering Using Ductal or Arterial Catheterization. *Cells Tissues Organs*, 205, 72-84 (2018).

60. Mirmalek-Sani SH, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M, Farney AC, Stratta RJ, Atala A, Opara EC, Soker S. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*, 34, 5488-95 (2013).

61. Kitano K, Schwartz DM, Zhou H, Gilpin SE, Wojtkiewicz GR, Ren X, Sommer CA, Capilla AV, Mathisen DJ, Goldstein AM, Mostoslavsky G, Ott HC. Bioengineering of functional human induced pluripotent stem cell-derived intestinal grafts. *Nat Commun*, 8, 765 (2017).

62. Clough A, Ball J, Smith GS, Leibman S. Porcine small intestine submucosa matrix (Surgisis) for esophageal perforation. *Ann Thorac Surg*, 91, e15-6 (2011).

63. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater*, 10, 5043-5054 (2014).

64. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, Kotton D, Vacanti JP. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*, 16, 927-33 (2010).

65. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, Gavrilov K, Yi T, Zhuang ZW, Breuer C, Herzog E, Niklason LE. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 329, 538-41 (2010).
66. Song JJ, Kim SS, Liu Z, Madsen JC, Mathisen DJ, Vacanti JP, Ott HC. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann Thorac Surg*, 92, 998-1005 (2011).
67. Zhou H, Kitano K, Ren X, Rajab TK, Wu M, Gilpin SE, Wu T, Baugh L, Black LD, Mathisen DJ, Ott HC. Bioengineering Human Lung Grafts on Porcine Matrix. *Ann Surg*, 267, 590-598 (2018).
68. Nichols JE, La Francesca S, Niles JA, Vega SP, Argueta LB, Frank L, Christiani DC, Pyles RB, Himes BE, Zhang R, Li S, Sakamoto J, Rhudy J, Hendricks G, Begarani F, Liu X, Patrikeev I, Pal R, Usheva E, Vargas G, Miller A, Woodson L, Wachter A, Grimaldo M, Weaver D, Mlcak R, Cortiella J. Production and transplantation of bioengineered lung into a large-animal model. *Sci Transl Med*, 10, pii: eaao3926 (2018).
69. Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs*, 195, 222-31 (2012).
70. Tebyanian H, Karami A, Motavallian E, Aslani J, Samadikuchaksaraei A, Arjmand B, Nourani MR. A Comparative Study of Rat Lung Decellularization by Chemical Detergents for Lung Tissue Engineering. *Open Access Maced J Med Sci*, 5, 859-865

(2017).

71. Bonvillain RW, Scarritt ME, Pashos NC, Mayeux JP, Meshberger CL, Betancourt AM, Sullivan DE, Bunnell BA. Nonhuman primate lung decellularization and recellularization using a specialized large-organ bioreactor. *J. Vis. Exp*, 82: e50825

(2013).

72. Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, Korkmaz S, Li S, Soos P, Ishtok R, Chaimow N, Pätzold I, Czerny N, Schmack B, Popov AF, Simon AR, Karck M, Szabo G. Perfusion-decellularization of porcine lung and trachea for respiratory bioengineering. *Artif. Organs*, 39, 1024-32 (2015).

73. Zuo W, Zhang T, Wu DZ, Guan SP, Liew AA, Yamamoto Y, Wang X, Lim SJ, Vincent M, Lessard M, Crum CP, Xian W, McKeon F. p63(+)Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature*, 517, 616-20 (2015).

74. Alphonse RS, Vadivel A, Zhong S, McConaghy S, Ohls R, Yoder MC, Thébaud B. The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs. *Nat Protoc*, 10, 1697-708 (2015).

75. Wang J, Niu N, Xu S, Jin ZG. A simple protocol for isolating mouse lung endothelial cells. *Sci Rep*, 9, 1458 (2019).

76. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for

medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48, 452-8 (2013).

77. Yanagiya M, Kitano K, Yotsumoto T, Takai D, Asahina H, Nagayama K, Nakajima J. Effect of normal saline flush injection into a bronchus on lung decellularization. *J Thorac Dis*, 11, 5321-5327 (2019).

78. Burgstaller G, Oehrle B, Gerckens M, White ES, Schiller HB, Eickelberg O. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur Respir J*, 50, 1601805 (2017).

79. Boasquevisque CH, Yildirim E, Waddell TK, Keshavjee S. Surgical techniques: lung transplant and lung volume reduction. *Proc Am Thorac Soc*, 6, 66–78 (2009).

80. Iskender I, Sakamoto J, Nakajima D, Lin H, Chen M, Kim H, Guan Z, Del Sorbo L, Hwang D, Waddell TK, Cypel M, Keshavjee S, Liu M. Human α 1-antitrypsin improves early post-transplant lung function: Pre-clinical studies in a pig lung transplant model. *J Heart Lung Transplant*, 35, 913-921 (2016).

81. Ikeda M, Bando T, Yamada T, Sato M, Menjyu T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, Date H. Clinical application of ET-Kyoto solution for lung transplantation. *Surg Today*, 45, 439–43 (2015).

82. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem*, 70, 437–61 (2005).

83. Dejima H, Takahashi Y, Hato T, Seto K, Mizuno T, Kuroda H, Sakakura N,

Kawamura M, Sakao Y. Mediastinal pulmonary artery is associated with greater artery diameter and lingular division volume. *Sci Rep*, 7, 1273 (2017).

84. Gupta N, Vassallo R, Wikenheiser-Brokamp KA, McCormack FX. Diffuse Cystic Lung Disease. Part II. *Am J Respir Crit Care Med*, 192, 17-29 (2015).

85. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, S49–52 (1999).

86. Steagall WK, Glasgow CG, Hathaway OM, Avila NA, Taveira-Dasilva AM, Rabel A, Stylianou MP, Lin JP, Chen X, Moss J. Genetic and morphologic determinants of pneumothorax in lymphangioliomyomatosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293, L800–8 (2007).

87. Jiang Y, Luo Y, Tang Y, Moats R, Warburton D, Zhou S, Lou J, Pryhuber GS, Shi W, Wang LL. Alteration of cystic airway mesenchyme in congenital pulmonary airway malformation. *Sci Rep*, 9, 5296 (2019).

88. Wallis JM, Borg ZD, Daly AB, Deng B, Ballif BA, Allen GB, Jaworski DM, Weiss DJ. Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and re-cellularization. *Tissue Eng Part C Methods*, 18: 420–32 (2012).

89. Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, Seki M, Konishi S, Ikeo S, Sone N, Nagasaki T,

Matsumoto H, Muro S, Ito I, Hirai T, Kohno T, Suzuki Y, Mishima M. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods*, 14, 1097–106 (2017).

90. Liu Q, Liu K, Cui G, Huang X, Yao S, Guo W, Qin Z, Li Y, Yang R, Pu W, Zhang L, He L, Zhao H, Yu W, Tang M, Tian X, Cai D, Nie Y, Hu S, Ren T, Qiao Z, Huang H, Zeng YA, Jing N, Peng G, Ji H, Zhou B. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nat Genet*, 51, 728–38 (2019).