

**【目的】** II型肺胞上皮細胞 (AT2) は I 型肺胞細胞に分化しうる組織幹細胞であり、肺胞構造及び機能の恒常性維持で最も重要な細胞である。慢性閉塞性肺疾患 (COPD) で、AT2 における細胞死、細胞老化、治癒過程での機能異常などが病態進展に関与する可能性は過去に報告されている。AT2 は不均一な表現型の細胞集団である可能性があり、表現型の変化や幹細胞性低下が COPD 病態進展に関与する可能性がある。さらに AT2 表現型不均一性の相違が COPD 病態における肺気腫及び細気道病変の混在における多様性の原因となる可能性もあるが、その不均一性の詳細は解明されていない。近年の single-cell transcriptomic analysis 手法の確立により、個々の細胞における遺伝子発現の違いをベースにした cell clustering により、様々な病態に関与する新規細胞集団が同定されている。肺から分離した AT2 のみに focus した single-cell transcriptomic analysis により AT2 の表現型や組織幹細胞の不均一性を明らかにすることは、COPD 病態を理解する上での重要な知見となる可能性がある。AT2 の表現型不均一性や、その機能評価をするためには、患者肺由来 AT2 の大量培養系の確立が必要である。近年、肺組織から分離した AT2 としての形質を維持しながら増殖可能な、3 次元培養系がいくつか報告されている。そこで、より効率的に AT2 の増殖が可能な 3 次元培養系を確立し、正常、COPD 肺組織から分離した AT2 を 3 次元培養系で増殖させた上で、single-cell transcriptomic analysis を行うことを目的とした検討を行うこととした。AT2 の stemness を含む表現型不均一性を評価し、COPD 病態進展に、より特異的に関与する AT2 の cell cluster を同定し、さらに細胞死や細胞老化の制御機構で、COPD 病態変化に関与が報告されている蛋白恒常性維持機構能の役割を明らかにすることを最終的な目的とする。

**【方法】** 手術肺検体から Lung Dissociation Kit を使用し single cell suspension を作製した。CD45microbeads を用いて血球成分を除去し、AT2 マーカーである EPCAM と HT2-280 を用いて、両者の陽性細胞を cell sorter にて回収した。細胞懸濁液とマトリゲルを混合し 3D ドーム構造を形成し、マトリゲルを固形化してから培地を投与し 3 次元培養を行った。3D ドーム構造を形成するヒト AT2 の 3 次元培養系の報告は過去に 3 報あり、より効率的な増殖が得られる medium、inhibitor、growth factor の組み合わせを、それらの報告をもとにして検討した。1. 培地に SAGM を使用し 3 日毎に medium 交換し、マトリゲルに Jagged-1 を加えた方法、2. 培地に Advanced DMEM/F-12 を使用し 3 日毎に medium 交換し、Nicotinamideなどを添加した方法、3. 培地に Advanced DMEM/F-12 を使用し 3 日毎に medium 交換し、多種の inhibitor、growth factor を添加した方法を比較検討した。

**【結果】** 三つの培養法すべてで AT2 増殖が得られたが、3. の方法が他と比較し有意差をもって、AT2 の形態を維持しながら最も効率的な細胞増殖が得られた (培養開始 21 日目の 10 個のオルガノイド径、細胞増殖が得られた比率 (colony-forming efficiency : CFE) にて評価)。以上より、3. の方法が、より増殖能がある患者肺由来の AT2 の 3 次元培養系として有用である結果を得た。

3 種類のオルガノイド 3 次元培養法の比較 (day21 評価)

