

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15316

研究課題名(和文) ヒト誘導性細気管支前駆細胞(iBP細胞)の創製

研究課題名(英文) Production of human induced bronchiolar progenitors

研究代表者

菊地 利明(KIKUCHI, Toshiaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10280926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス誘導性細気管支前駆細胞(induced BP、以下「iBP細胞」)細胞への脱分化誘導法を確立し、その知見を応用することにより、ヒトiBP細胞の樹立を目指す。本研究の成果は、気道上皮細胞に特異的な脱分化機構の解明につながるだけでなく、再生医療に不可欠な生体材料を提供することで、革新的な医療技術の開発にも寄与する。三年間にわたる研究により、iBP細胞の形質特性、およびiBP細胞への脱分化を誘導する分子機構を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish the method of preparing mouse induced bronchiolar progenitor cells (referred to in the text as “iBP cells”), which will be applied to that of preparing human iBP cells. The achievement of this study is expected not only to provide mechanistic insights into the cell dedifferentiation specific to respiratory tract epithelial cells, but also to contribute to development of innovative medical technology by offering biomaterial indispensable for regenerative medicine. This grant support for 3 years enabled us to elucidate the characteristic feature of iBP cells and the molecular mechanism controlling the dedifferentiation step toward iBP cells.

研究分野：医学

キーワード：前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

細気管支病変を伴う肺疾患は、感染や炎症による細気管支炎から慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や気管支拡張症まで、多岐に及んでいる。そのため、その気道修復に関与する細気管支前駆細胞 (bronchiolar progenitor、以下「BP 細胞」) は気道上皮の恒常性維持に重要である。BP 細胞には、異型クラブ細胞と基底細胞が含まれている (Cell Stem Cell 15:123-138, 2014; Nat Med 20:822-32, 2014)。このいずれの細胞も細気管支上皮細胞 (クラブ細胞、基底細胞、線毛細胞) への多分化能だけでなく、自己複製能を有している (図 1)。

われわれはこれまで、異型クラブ細胞からクラブ細胞への分化機構を研究してきた。そしてその過程で、「クラブ細胞をシンデカン存在下で 3 次元培養すると、異型クラブ細胞に脱分化する」という事象を見出した。すなわち、BP 細胞からの分化は双方向性であり、一旦分化した細胞を効率的に脱分化させることができれば、誘導性細気管支前駆細胞 (induced BP、以下「iBP 細胞」) を創製できるのではないかと、という着想に至った。

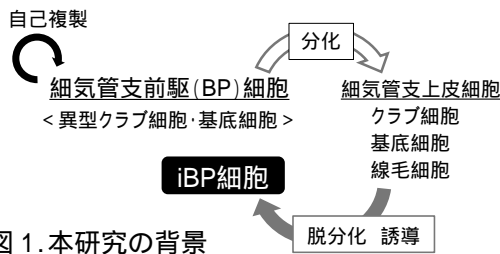


図 1. 本研究の背景

2. 研究の目的

当該研究では、ヒト iBP 細胞の創製を目指して、マウス iBP 細胞としての形質特性を評価し、マウス iBP 細胞への誘導条件を最適化しながら、マウス iBP 細胞への脱分化誘導に関わる分子機構を解明する。

3. 研究の方法

iBP 細胞の形質特性

作製するマウス iBP 細胞と成体から分離するマウス BP 細胞とを比べながら、多分化能と自己複製能を評価し、マウス iBP 細胞の形質特性を明らかにする。

iBP 細胞への誘導条件を最適化

シンデカンの 4 つのサブファミリーについて、それぞれ細胞外ドメインの組換え蛋白質を用いながらの実験を繰り返し、マウス iBP 細胞への誘導条件を最適化する。

脱分化誘導に関わる分子機構

シンデカンに関連するシグナル因子をそれぞれ阻害しながら、最適化したマウス iBP 細胞への誘導実験を繰り返し、脱分化誘導に関わる分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

iBP 細胞の形質特性

20 μ g のシンデカン組換え蛋白質を経静脈的にマウスに投与することにより、iBP 細胞の誘導をマウス体内で試みた。その結果、[Lin 陰性、Sca-1 陽性、低い自己蛍光]を特徴とする BP の数は、28 万個から 44 万個へと増加することがわかった (図 2)。さらに、別のマーカーである [proSP-C 陽性、CCSP 陽性] を指標に免疫染色を行ったところ、シンデカン組換え蛋白質を投与したマウスでは、[proSP-C 陽性、CCSP 陽性] の細胞が細気管支で増加していることが確認された。

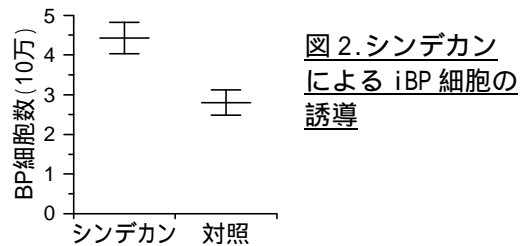


図 2. シンデカンによる iBP 細胞の誘導

そこで、この誘導された BP 細胞の形質特性として、抗炎症効果を評価した。ナフタレン肺炎モデルおよびプレオマイシン肺炎モデルにおいて、誘導された BP 細胞の抗炎症効果が明らかになった。すなわち、BP 細胞数の増加に伴って、ナフタレンとプレオマイシンのいずれの肺炎モデルにおいても、肺炎は軽減され、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は有意に減少した (図 3)。

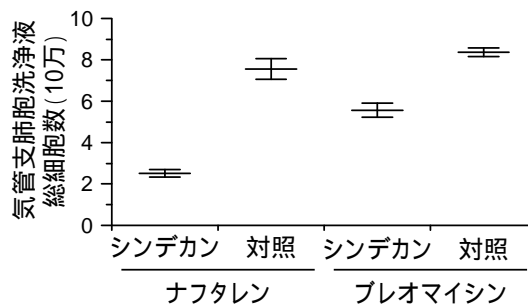


図 3. iBP 細胞の誘導に伴う肺炎の軽減

iBP 細胞への誘導条件を最適化

培養実験を in vitro で繰り返し、マウス iBP 細胞の形質特性をさらに解析した。具体的には、[Lin 陰性、Sca-1 陽性、高い自己蛍光] を指標に、マウス肺から細気管支上皮細胞を分離し、3 次元 in vitro 培養を行った。その結果、「1300 個の細気管支上皮細胞を 100 μ l の 50%マトリゲルに懸濁し、24 ウェルのトランスウェルプレートにインサート内で、10 万個の MLg 肺線維芽細胞と共培養する」という培養条件が、細気管支上皮細胞から iBP 細胞への脱分化を誘導するのに最適であることがわかった。さらに、この培養条件に、シンデカン 1、2、3、4 と 4 つのサブファミリーを有するシンデカンのうち、シンデカン 4 の組換え蛋白質を 5 μ g/ml から 10 μ g/ml の間の濃度で添加することによって、細気管支上皮細胞から iBP 細胞への脱分化誘導は促

進されることも明らかになった。3次元 in vitro 培養の結果を図4に示す。10 µg/mlのシンデカン4を添加したところ、iBP細胞への脱分化が誘導され、CCSPとSPCの共陽性細胞が出現してきた。

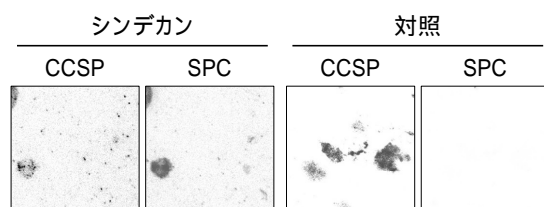


図4. iBP細胞への脱分化誘導 (in vitro)

脱分化誘導に関わる分子機構

iBP細胞への脱分化を誘導する分子機構に、酸化ストレス応答の Keap1-Nrf2 システムがどのように関わっていることを明らかにした。Nrf2は、プロテオグリカンのシンデカン4によって、Keap1との結合によるプロテオソーム分解から逃れて酸化ストレス防御遺伝子の転写を活性化するようになり、iBP細胞への脱分化を誘導していた。そのため、Nrf2欠損マウスに図2と同様にシンデカンを投与しても、iBP細胞は誘導されず、BP細胞数の増加は認められなかった(図5)。

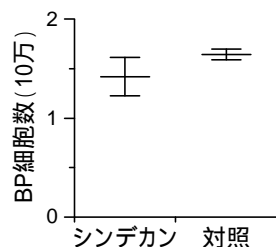


図5. iBP細胞への誘導のNrf2依存性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計32件)

- Mitomo H, Sakurada A, Matsuda Y, Notsuda H, Watanabe T, Oishi H, Niikawa H, Maeda S, Noda M, Sado T, Amemiya T, Yoshida Y, Kikuchi T, Kamei K, Okada Y, Endobronchial topical amphotericin B instillation for pulmonary chromomycosis after lung transplantation: A case report, *Transplant Proc*, 査読有, 50巻, 2018, 939-942
DOI:10.1016/j.transproceed.2017.12.028
- Okamoto T, Takada K, Sato S, Toyokawa G, Tagawa T, Shoji F, Nakanishi R, Oki E, Koike T, Nagahashi M, Ichikawa H, Shimada Y, Watanabe S, Kikuchi T, Akazawa K, Lyle S, Takabe K, Okuda S, Sugio K, Wakai T, Tsuchida M, Maehara Y, Clinical and genetic implications of mutation burden in squamous cell carcinoma of the lung,

Ann Surg Oncol, 査読有, 25巻, 2018, 1564-1571
DOI:10.1245/s10434-018-6401-1

- Miyashita N, Horita N, Higa F, Aoki Y, Kikuchi T, Seki M, Tateda K, Maki N, Uchino K, Ogasawara K, Kiyota H, Watanabe A, Diagnostic predictors of Legionella pneumonia in Japan, *J Infect Chemother*, 査読有, 24巻, 2018, 159-163
DOI:10.1016/j.jiac.2017.12.009
- Ueda T, Sakagami T, Kikuchi T, Takada T, Mycophenolate mofetil as a therapeutic agent for interstitial lung diseases in systemic sclerosis, *Respir Investig*, 査読有, 56巻, 2018, 14-20
DOI:10.1016/j.resinv.2017.11.004
- Sato S, Nagahashi M, Koike T, Ichikawa H, Shimada Y, Watanabe S, Kikuchi T, Takada K, Nakanishi R, Oki E, Okamoto T, Akazawa K, Lyle S, Ling Y, Takabe K, Okuda S, Wakai T, Tsuchida M, Impact of concurrent genomic alterations detected by comprehensive genomic sequencing on clinical outcomes in East-Asian patients with EGFR-mutated lung adenocarcinoma, *Sci Rep*, 査読有, 8巻, 2018, 1005
DOI:10.1038/s41598-017-18560-y.
- Kondo R, Watanabe S, Shoji S, Ichikawa K, Abe T, Baba J, Tanaka J, Tsukada H, Terada M, Sato K, Maruyama Y, Makino M, Hirata A, Tanaka H, Koya T, Yoshizawa H, Kikuchi T, A Phase II study of irinotecan for patients with previously treated small-cell lung cancer, *Oncology*, 査読有, 94巻, 2018, 223-232
DOI:10.1159/000486622
- Hirano T, Ohkouchi S, Tode N, Kobayashi M, Ono M, Satoh T, Mitsuishi Y, Watanabe A, Tabata M, Irokawa T, Ogawa H, Sugiura H, Kikuchi T, Akasaka K, Tazawa R, Inoue Y, Nakata K, Kurosawa H, Ichinose M, Peripheral alveolar nitric oxide concentration reflects alveolar inflammation in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis, *ERJ Open Res*, 査読有, 4巻, 2018, 00071-2017
DOI:10.1183/23120541.00071-2017
- Miyashita N, Kobayashi I, Higa F, Aoki Y, Kikuchi T, Seki M, Tateda K, Maki N, Uchino K, Ogasawara K, Kurachi S, Ishikawa T, Ishimura Y, Kanesaka I, Kiyota H, Watanabe A, In vitro activity of various antibiotics against clinical strains of Legionella species isolated in

- Japan, *J Infect Chemother*, 査読有, 24 卷, 2018, 325-329
DOI:10.1016/j.jiac.2018.01.018
9. Aoki A, Sakagami T, Yoshizawa K, Shima K, Toyama M, Tanabe Y, Moro H, Aoki N, Watanabe S, Koya T, Hasegawa T, Morimoto K, Kurashima A, Hoshino Y, Trapnell BC, Kikuchi T, Clinical significance of interferon- neutralizing autoantibodies against disseminated nontuberculous mycobacterial disease, *Clin Infect Dis*, 査読有, 66 卷, 2018, 1239-1245
DOI:10.1093/cid/cix996
10. Seino Y, Hasegawa T, Koya T, Sakagami T, Mashima I, Shimizu N, Muramatsu Y, Muramatsu K, Suzuki E, Kikuchi T, A cluster analysis of bronchial asthma patients with depressive symptoms, *Intern Med*, 査読有, 2018, 印刷中
DOI:10.2169/internalmedicine.9073-17
11. Hayashi M, Kikuchi T, Takada T, Mycophenolate mofetil for the patients with interstitial lung diseases in amyopathic dermatomyositis with anti-MDA-5 antibodies, *Clin Rheumatol*, 査読有, 36 卷, 2017, 239-240
DOI:10.1007/s10067-016-3443-2
12. Shima K, Koya T, Tsukioka K, Sakagami T, Hasegawa T, Fukano C, Ohashi-Doi K, Watanabe S, Suzuki E, Kikuchi T, Effects of sublingual immunotherapy in a murine asthma model sensitized by intranasal administration of house dust mite extracts, *Allergol Int*, 査読有, 66 卷, 2017, 89-96
DOI:10.1016/j.alit.2016.05.012
13. Ohshima Y, Nakayama H, Matsuyama N, Hokari S, Sakagami T, Sato T, Koya T, Takahashi T, Kikuchi T, Nishizawa M, Shimohata T, Natural course and potential prognostic factors for sleep-disordered breathing in multiple system atrophy, *Sleep Med*, 査読有, 34 卷, 2017, 13-17
DOI:10.1016/j.sleep.2017.01.020
14. Hori Y, Aoki N, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, De S, Kabasawa H, Kaneko R, Aoki H, Tanabe Y, Kagamu H, Narita I, Kikuchi T, Saito A, Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity, *J Am Soc Nephrol*, 査読有, 28 卷, 2017, 1783-1791
DOI:10.1681/ASN.2016060606
15. Tode N, Kikuchi T, Sakakibara T, Hirano T, Inoue A, Ohkouchi S, Tamada T, Okazaki T, Koarai A, Sugiura H, Niihori T, Aoki Y, Nakayama K, Matsumoto K, Matsubara Y, Yamamoto M, Watanabe A, Nukiwa T, Ichinose M, Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer, *Cancer Sci*, 査読有, 108 卷, 2017, 1263-1270
DOI:10.1111/cas.13233
16. Koizumi T, Tsukada H, Ito K, Shibata S, Hokari S, Tetsuka T, Aoki N, Moro H, Tanabe Y, Kikuchi T, A-DROP system for prognostication of NHCAP inpatients, *J Infect Chemother*, 査読有, 23 卷, 2017, 523-530
DOI:10.1016/j.jiac.2017.04.013
17. Tanaka T, Watanabe S, Takahashi M, Sato K, Saida Y, Baba J, Arita M, Sato M, Ohtsubo A, Shoji S, Nozaki K, Ichikawa K, Kondo R, Aoki N, Ohshima Y, Sakagami T, Abe T, Moro H, Koya T, Tanaka J, Kagamu H, Yoshizawa H, Kikuchi T, Transfer of in vitro-expanded naïve T cells after lymphodepletion enhances antitumor immunity through the induction of polyclonal antitumor effector T cells, *PLoS One*, 査読有, 12 卷, 2017, e0183976
DOI:10.1371/journal.pone.0183976
18. Tsukioka K, Koya T, Ueno H, Hayashi M, Sakagami T, Hasegawa T, Arakawa M, Suzuki E, Kikuchi T, Phenotypic analysis of asthma in Japanese athletes, *Allergol Int*, 査読有, 66 卷, 2017, 550-556
DOI:10.1016/j.alit.2017.02.009
19. Miyashita N, Higa F, Aoki Y, Kikuchi T, Seki M, Tateda K, Maki N, Uchino K, Ogasawara K, Kiyota H, Watanabe A, Clinical presentation of Legionella pneumonia: Evaluation of clinical scoring systems and therapeutic efficacy, *J Infect Chemother*, 査読有, 23 卷, 2017, 727-732
DOI:10.1016/j.jiac.2017.09.001
20. Matsuba S, Yabe-Wada T, Takeda K, Sato T, Suyama M, Takai T, Kikuchi T, Nukiwa T, Nakamura A, Identification of secretory leukoprotease inhibitor as an endogenous negative regulator in allergic effector cells, *Front Immunol*, 査読有, 8 卷, 2017, 1538
DOI:10.3389/fimmu.2017.01538
21. Watanabe S, Arita M, Takahashi M, Saida

- Y, Koya T, Kikuchi T, Effect of lymphodepletion on donor T cells and the role of recipient cells persisting after cytotoxic treatments in cancer immunotherapies, *Crit Rev Immunol*, 査読有, 37 巻, 2017, 59-73
DOI:10.1615/CritRevImmunol.2018019497
22. Abe K, Sugiura H, Hashimoto Y, Ichikawa T, Koarai A, Yamada M, Numakura T, Onodera K, Tanaka R, Sato K, Yanagisawa S, Okazaki T, Tamada T, Kikuchi T, Ichinose M, Possible role of Krüppel-like factor 5 in the remodeling of small airways and pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease, *Respir Res*, 査読有, 17 巻, 2016, 7
DOI:10.1186/s12931-016-0322-y
23. Santoso A, Kikuchi T, Tode N, Hirano T, Komatsu R, Damayanti T, Motohashi H, Yamamoto M, Kojima T, Uede T, Nukiwa T, Ichinose M, Syndecan 4 mediates Nrf2-dependent expansion of bronchiolar progenitors that protect against lung inflammation, *Mol Ther*, 査読有, 24 巻, 2016, 41-52
DOI:10.1038/mt.2015.153
24. Numakura T, Tamada T, Nara M, Muramatsu S, Murakami K, Kikuchi T, Kobayashi M, Muroi M, Okazaki T, Takagi S, Eishi Y, Ichinose M, Simultaneous development of sarcoidosis and cutaneous vasculitis in a patient with refractory Crohn's disease during infliximab therapy, *BMC Pulm Med*, 査読有, 16 巻, 2016, 30
DOI:10.1186/s12890-016-0193-5
25. Hirano T, Kikuchi T, Tode N, Santoso A, Yamada M, Mitsuhashi Y, Komatsu R, Kawabe T, Tanimoto T, Ishii N, Tanaka Y, Nishimura H, Nukiwa T, Watanabe A, Ichinose M, OX40 ligand newly expressed on bronchiolar progenitors mediates influenza infection and further exacerbates pneumonia, *EMBO Mol Med*, 査読有, 8 巻, 2016, 422-436
DOI:10.15252/emmm.201506154
26. Hashimoto Y, Sugiura H, Togo S, Koarai A, Abe K, Yamada M, Ichikawa T, Kikuchi T, Numakura T, Onodera K, Tanaka R, Sato K, Yanagisawa S, Okazaki T, Tamada T, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M, 27-Hydroxycholesterol accelerates cellular senescence in human lung resident cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 査読有, 310 巻, 2016, L1028-L1041
DOI:10.1152/ajplung.00351.2015
27. Shishikura Y, Koarai A, Aizawa H, Yamaya M, Sugiura H, Watanabe M, Hashimoto Y, Numakura T, Makiguti T, Abe K, Yamada M, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M, Extracellular ATP is involved in dsRNA-induced MUC5AC production via P2Y2R in human airway epithelium, *Respir Res*, 査読有, 17 巻, 2016, 121
<https://doi.org/10.1186/s12931-016-0438-0>
28. Hayakawa S, Furukawa E, Kawamura M, Kikuchi T, Hirano T, Watanabe A, Fujimura S, Exposure to reactive oxygen species and piperacillin leads to multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Clin Microbiol*, 査読有, 5 巻, 2016, 1000264
DOI:10.4172/2327-5073.1000264
29. Shibata S, Nishijima T, Aoki T, Tanabe Y, Teruya K, Kikuchi Y, Kikuchi T, Oka S, Gatanaga H, A 21-day of adjunctive corticosteroid use may not be necessary for HIV-1-infected pneumocystis pneumonia with moderate and severe disease, *PLoS One*, 査読有, 10 巻, 2015, e0138926
DOI:10.1371/journal.pone.0138926
30. Nakano Y, Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Ichinose M, Watanabe A, New sterilization method using plasma discharge against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* on the surface of contact lens, *J Med Biol Eng*, 査読有, 35 巻, 2015, 626-633
DOI:10.1007/s40846-015-0080-1
31. Tamada T, Sugiura H, Takahashi T, Matsunaga K, Kimura K, Katsumata U, Takekoshi D, Kikuchi T, Ohta K, Ichinose M, Biomarker-based detection of asthma-COPD overlap syndrome in COPD populations, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 査読有, 10 巻, 2015, 2169-2176
DOI:10.2147/COPD.S88274
32. Ito C, Okuyama-Dobashi K, Miyasaka T, Masuda C, Sato M, Kawano T, Ohkawara Y, Kikuchi T, Takayanagi M, Ohno I, CD8+ T cells mediate female-dominant IL-4 production and airway inflammation in allergic asthma, *PLoS One*, 査読有, 10 巻, 2015, e0140808
DOI:10.1371/journal.pone.0140808

〔学会発表〕(計3件)

菊地利明、ゲノム医学からみた肺感染症、第57回日本呼吸器学会学術講演会、2017

菊地利明、インフルエンザ感染、第31回日本糖尿病合併症学会、2016

菊地利明、呼吸器感染症のトピックス、第216回日本呼吸器学会関東地方会、2015

〔図書〕(計5件)

Moro H, Kikuchi T, Springer Nature Singapore Pte, Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis, 2018, 199 (165-174)

茂呂寛、菊地利明、メディカルレビュー社、診療ガイドライン UP-TO-DATE 2018-2019、2018、1037 (100-106)

茂呂寛、菊地利明、医薬ジャーナル、結核、2017、447 (355-367)

黒川允、菊地利明、羊土社、咳の診かた、止めかた、2016、246 (68-78)

菊地利明、ヴァン メディカル、抗菌薬パーフェクトガイド、2016、359 (211-216)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：抗ヒト OX40 リガンド抗体を用いたインフルエンザの新規治療法

発明者：菊地利明、平野泰三、一ノ瀬正和、石井直人、田中勇悦

権利者：国立大学法人東北大学、国立大学法人琉球大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/068920

出願年月日：2015年6月30日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/resp/welcome.html>

新潟大学大学院医歯学総合研究科

呼吸器・感染症内科学分野

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 利明 (KIKUCHI, Toshiaki)

新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10280926

(2) 連携研究者

兼平 雅彦 (KANEHIRA, Masahiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90374941

(3) 研究協力者

鈴木 拓児 (SUZUKI, Takuji)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80344670

五味 和紀 (GOMI, Kazunori)

米国コーネル大学

研究者番号：20400335