

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21114

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来II型肺胞上皮細胞の量産化と遺伝性肺線維症の病態解析への応用

研究課題名(英文) Expanding human iPS cell-derived alveolar type II cells and their application to disease modeling of hereditary pulmonary fibrosis

研究代表者

後藤 慎平 (Gotoh, Shimpei)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50747219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞からII型肺胞上皮細胞への分化誘導とその量産化について、分化効率の改良と長期培養法を開発した。II型肺胞上皮細胞の分化マーカーであるSFTPCを発現した細胞を約50%の分化効率で誘導でき、3ヶ月以上にわたって遺伝子発現と形態を維持しつつ培養継続できた。また、開発した方法を用いて、Hermansky-Pudlak症候群(HPS)の疾患特異的iPS細胞をII型肺胞上皮細胞に分化させ、疾患モデリングについて検討したところ、サーファクタントを貯留するラメラ体の異常を確認することができた。ヒトiPS細胞はII型肺胞上皮細胞を用いた肺線維症の病態解明に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Efficient generation and expansion of human iPS cell-derived alveolar type II cells was achieved. The rate of SFTPC+ cells per total epithelial cells reached around 50% and iPS cell-derived SFTPC+ cells were long-term cultured for more than three months. We applied these methods to disease modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome. Abnormal lamellar body structure was observed in human iPS cell-derived alveolar type II cells. Human iPS cell-derived alveolar type II cells would be beneficial for disease modeling of pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：再生医学 iPS細胞 呼吸器 肺線維症 II型肺胞上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

成人肺は再生能力が極めて乏しい臓器であり、慢性閉塞性肺疾患や特発性肺線維症など肺移植以外に根治療法のない重篤な難病患者が多い。これらは疾患機序の未解明な点が多いため、治療薬やバイオマーカーの研究開発余地は大きい (Kotton DN. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012)。II 型肺胞上皮細胞は肺胞の組織幹細胞であり、これらの病態と密接に関わっているとされる (Barkauskas CE., et al. *J Clin Invest*, 2011)。しかしながら、入手に関しては以下の大きく 3 点の問題点が挙げられ、ヒト II 型肺胞上皮細胞を対象とした呼吸器疾患研究は遅れてきた。

- (a) ヒト肺組織からの II 型肺胞上皮細胞の単離は侵襲的な手術を必要とすること。
- (b) 再生不可能なヒトの肺組織を採取することは治療や診断上必要な場合を除いて倫理的にも困難なこと。
- (c) 単離手法自体が煩雑で、培養維持も難しいこと。

これらの問題点克服のため、II 型肺胞上皮細胞の供給源としてヒト iPS 細胞が期待され、発生の経路に従って段階的に分化誘導を行う手法が試みられた。そして、ヒト ES 細胞から内胚葉、前方前腸を経て肺の原基に相当する腹側前方前腸へと分化させる研究 (Green MD, et al. *Nat Biotechnol*, 2011) が報告されたのをきっかけにようやく前に進み始めた。2014 年までにヒト II 型肺胞上皮細胞を平面培養で分化誘導する研究が 2 報報告された (Ghaedi M, et al. *J Clin Invest*, 2013; Huang SX, et al. *Nat Biotechnol*, 2014) が、研究代表者らは平面培養では II 型肺胞上皮細胞の分化誘導が安定しないことに着目し、肺胞前駆細胞の段階で特異的な蛋白質表面抗原 CPM を目印に抗体で細胞を単離濃縮する方法を考案した。そして胎児肺線維芽細胞と 3 次元共培養することで、特徴的な lamellar body を持つ II 型肺胞上皮細胞を分化誘導し、SFTPC レポーター細胞を用いて単離できることを示した (Gotoh S, et al. *Stem Cell Reports*, 2014)。そして、この技術をさらに発展させ、ヒト ES/iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞を大量に分化誘導できる

ようにして、呼吸器難治疾患の病態機序の解明に迫り、新しい創薬のターゲットやバイオマーカーの発見につなげることが次の重要な課題と考えられた。

研究開発代表者は常染色体劣性遺伝の単一遺伝子異常で肺線維症や肺気腫を発症する Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS) に注目した。HPS は常染色体劣性遺伝の疾患で世界的には 50-100 万人に 1 人が発症し、全身性白皮症、血小板の異常による出血傾向、セロイド色素沈着を 3 主徴とする珍しい疾患で、肺線維症が致死的な予後不良因子として知られている。HPS のコンディショナルノックアウトマウスを使った肺線維症の研究では、II 型肺胞上皮細胞の異常によって肺線維症が引き起こされることが証明されている (Young LR, et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012)。HPS の遺伝子変異と疾患表現型はマウスとヒトで異なり、創薬やバイオマーカーを探索する上ではヒト由来の細胞での HPS の病態機序の解明が特に重要と考えられ、ヒト iPS を用いた分化誘導技術が遺伝性肺線維症の疾患モデリングに有用と考えられた。

## 2. 研究の目的

2 年間で以下の項目の達成を目指した。

- (1) 大量培養に適した培養技術を確立する
  - (1-1) 誘導効率を改善する。
  - (1-2) 大量培養に適した三次元培養用の細胞外基質を検討する。
  - (1-3) 分化誘導に必要なフィーダー細胞の代替因子を同定する。
- (2) 肺胞前駆細胞および II 型肺胞上皮細胞のストック方法を確立する。
- (3) 遺伝性肺線維症 (Hermansky-Pudlak Syndrome) 患者由来の疾患特異的 iPS 細胞に分化誘導法を応用し、新規バイオマーカー開発や創薬のためのプラットフォームを確立する。

## 3. 研究の方法

- (1) II 型肺胞上皮細胞に特異性の高い SFTPC のレポーター細胞を用いて、分化効率の改善のための最適条件を決めるため、肺胞前駆細胞の準備方法や、培養条件を検討した。

(2) ヒト iPS 細胞から段階的に分化させた肺胞前駆細胞および II 型肺胞上皮細胞について、凍結保存液を複数検討し、凍結保存を試みた。細胞を起眠した後の評価は生存率と分化能や分化マーカーの陽性率で評価した。

(3) ヒト iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞を効率よく分化させる方法を用いて、遺伝性肺線維症 (Hermansky-Pudlak Syndrome) 患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を II 型肺胞上皮細胞に分化させ表現型を確認した。また、健常者由来 iPS 細胞に対して HPS 遺伝子欠損細胞株を用いて疾患モデリングを進めた。

#### 4. 研究成果

(1) 2014 年には SFTPC 陽性細胞の線維芽細胞を除いた誘導効率  $9.81 \pm 1.81\%$  だったが、NKX2.1+ 腹側前方前腸細胞に分化後、CHIR99021, FGF10, KGF などの因子を含む培養を一週間行なってから CPM 高発現細胞と胎児肺線維芽細胞を、三次元下にて共培養行なったところ、SFTPC+細胞の分化効率は、 $51.2 \pm 1.2\%$  に改善した。次に、SFTPC+細胞の量産化に向けて、長期培養に取り組んだ。平面に培養すると 2-3 日だけで、SFTPC をはじめとする分化マーカーの発現が低下してしまうため、II 型肺胞上皮細胞を分化させずに平面で長期培養することは容易ではないと考えられた。そこで、CPM 高発現細胞から SFTPC+細胞へと分化させたあとに、SFTPC+細胞を 2 週間ごとに FACS で単離して線維芽細胞との三次元共培養を繰り返したところ (図 1)、継

SFTPC 陽性率は 30% 程度まで落ち込むものの、SFTPC+細胞は 3 ヶ月以上にわたって遺伝子発現を維持しつつ培養継続できることが分かった。形態学的にも lamellar body を有する典型的な II 型肺胞上皮細胞の特徴を有していた (図 2)。また、SFTPC+細胞に分化してか

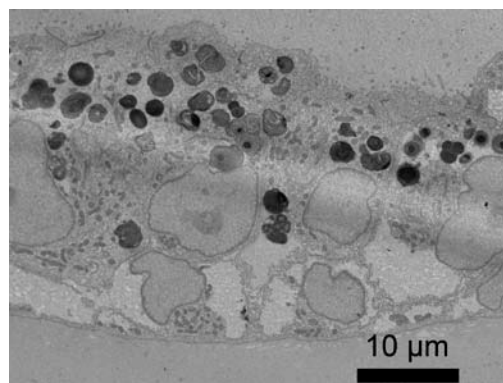


図 2. iPS 細胞由来 AT2 の透過型電子顕微鏡写真(84 日培養)

ら 10 週間後も正常核型と確認でき (図 3)、腫瘍化の徴候は認めなかった。その後も SFTPC+

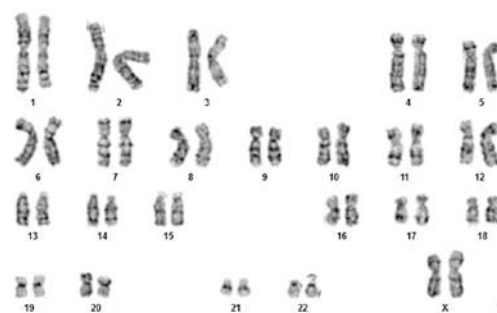


図 3. 70 日培養後の SFTPC+細胞の正常核型

細胞はサーファクタント産生能と自己複製能および分化能を併せ持ちながら、3 ヶ月以上増殖を続けた。

細胞外基質についてはマトリゲル以外に PuraMatrix やコラーゲンゲルを試したが、マトリゲルに比して決定的な成果を得るには至らなかった。また、培養後に細胞を回収するための工夫が必要と考えられた。次に、フィーダー細胞不要な SFTPC+細胞の分化誘導法を開発するために条件検討を重ね、一定の培養条件下において、フィーダー細胞がなくても SFTPC+細胞を効率よく誘導できることが分かった。

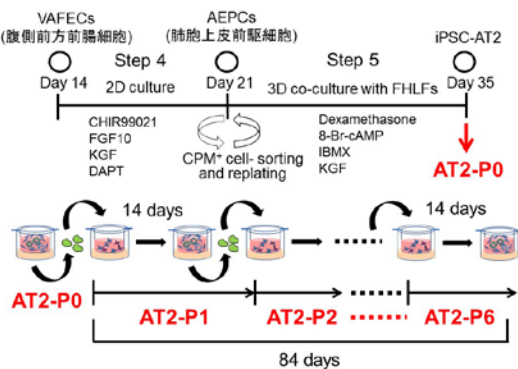


図 1. iPS 細胞由来 II 型肺胞上皮細胞 (AT2) の長期培養法の開発

代ごとに SFTPC が陰転化する細胞が現れ、

(2) CPM+肺胞前駆細胞やSFTPC+細胞について、細胞単離後に、DMSOを含有する培養液や複数の市販の試薬を用いて、凍結保存を試みた。細胞を凍結状態から起こした時点で60%程度の生存率が保たれる製品もあった。起眠後の状態については、肺胞前駆細胞については、SFTPC+細胞への分化効率が30%台へと低下するもののII型肺胞上皮細胞への分化能を維持していることが確認できた。SFTPC+細胞については三次元共培養後に30-50%程度のSFTPC陽性率を保つことができ(図4)、凍結

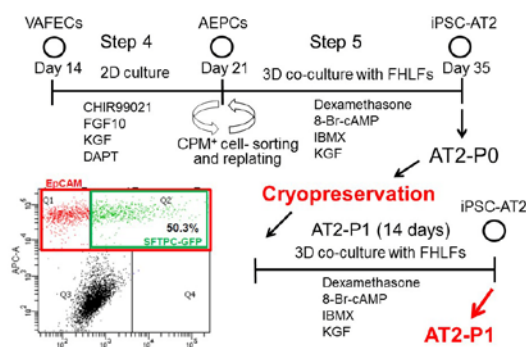


図4. SFTPC+細胞の凍結保存

操作を行わずに分化させた場合と比較して、SFTPC陽性率においては大きな差は認めなかった。以上より、分化細胞のストック方法については、起眠後の生存率や分化能の改善のため、更なる工夫の余地があると考えた。(3) 遺伝性肺線維症の疾患モデリングについてはHermansky-Pudlak症候群(HPS1およびHPS2)の患者由来iPS細胞に対して正常な遺伝子の発現を回復させるため、HPS1とHPS2の遺伝子を強制発現させようとしたが、それぞれの遺伝子を安定発現するiPS細胞株を得ることはできなかった。このため、iPS細胞研究所の堀田秋津博士の研究協力を得てゲノム編集技術を導入し(Li HL, et al. Stem Cell Reports, 2015)、HPS1、HPS2の遺伝子欠損株の樹立を先行して行なった。また、HPS患者由来のiPS細胞株についても、遺伝子相同組換えによる変異の修復を試みた。その結果、HPS2については遺伝子発現の正常化したiPS細胞株を得ることができた(図5)。次にHPS2の疾患特異的iPS細胞と遺伝子修復

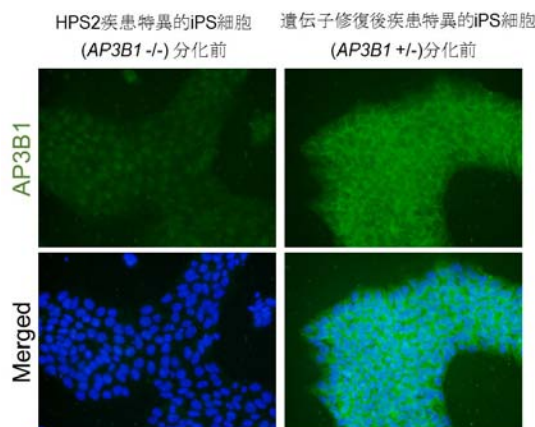


図5. HPS2 遺伝子修復前後の疾患特異的iPS細胞(分化前)

後のiPS細胞をII型肺胞上皮細胞に分化させ、比較を試みた。サーファクタントを貯留するラメラ体に異常を来していることが分かり、遺伝子修復によってこれらの異常が回復することも確認できた。HPS関連肺線維症の発症初期のII型肺胞上皮細胞における変化を再現できた可能性がある。

(1), (2), (3)の研究成果により、ヒトiPS細胞からII型肺胞上皮細胞への効率の良い分化と長期培養法の開発を行なった。ストックも出来るようになり、 $1-5 \times 10^6$ 個レベルのII型肺胞上皮細胞の量産化が可能になったと同時に、ヒトiPS細胞を用いた遺伝性肺線維症のモデリングに道筋をつけることが出来た。この成果を元に今後の更なる研究の発展が見込めるようになったといえる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 小西聡史、後藤慎平、立石和博 他、Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports、査読有、6巻、2016、18-25
- ② 小西聡史、後藤慎平、ヒトiPS細胞から気道上皮細胞への分化促進、呼吸と循環(医学書院)、査読無、64巻、2016、785-789

- ③ 後藤慎平、三嶋理晃、ヒト多能性幹細胞からII型肺胞上皮細胞への分化促進と単離、呼吸と循環(医学書院)、査読無、63巻、2015、651-655
- ④ 後藤慎平、呼吸器におけるヒトiPS細胞の応用、呼吸(一般財団法人呼吸研究)、査読無、34巻、2015、743-747

[学会発表] (計13件)

- ① 後藤慎平. Regulation of epithelial biological systems by ciliary functions “Future application of human pluripotent stem cell-derived multiciliated airway cells.” 第39回日本分子生物学会年会 2016.12.2 横浜
- ② 後藤慎平. ヒトiPS細胞の呼吸器研究への応用. 第29回日本動物代替療法学会 2016.11.17 福岡
- ③ 山本祐樹、後藤慎平、他. Long-term culture of alveolar epithelial type 2 cells derived from human induced pluripotent stem cells. 第14回国際幹細胞学会年会 2016.6.24 サンフランシスコ
- ④ 後藤慎平. ヒトiPS細胞から呼吸器上皮細胞への分化誘導技術 第56回日本呼吸器学会学術講演会 2016.4.10 京都
- ⑤ 山本祐樹、後藤慎平、他. ヒトiPS細胞より分化誘導したII型肺胞上皮細胞の長期培養 第56回日本呼吸器学会学術講演会 2016.4.8 京都
- ⑥ 小西聡史、後藤慎平、他. ヒトiPS細胞から機能的な気道線毛上皮細胞への分化誘導 第56回日本呼吸器学会学術講演会 2016.4.8 京都
- ⑦ 小西聡史、後藤慎平、他. Directed induction of functional multi-ciliated airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. CiRA/ISSCR 2016 International Symposium. 2016.3.23 京都
- ⑧ 小西聡史、後藤慎平、他. ヒトiPS細胞から気道線毛上皮細胞への分化誘導. 第38回

- 日本分子生物学会年会 2015.12.2 神戸
- ⑨ 後藤慎平、他. ヒト多能性幹細胞から呼吸器上皮細胞への分化誘導. 第15回日本細胞生物学会. 2015.7.2 東京
- ⑩ 小西聡史、後藤慎平、他. Generation of ciliated airway epithelial cells from human induced pluripotent stem cells. 第15回国際幹細胞学会年会 2015.6.26 ストックホルム
- ⑪ 後藤慎平、他. 遺伝性呼吸器疾患の疾患特異的iPS細胞樹立. 第55回日本呼吸器学会学術講演会. 2015.4.19 東京
- ⑫ 山本祐樹、後藤慎平、他. ヒトiPS細胞からII型肺胞上皮細胞への分化誘導効率の改善. 第55回日本呼吸器学会学術講演会. 2015.4.17 東京
- ⑬ 小西聡史、後藤慎平、他. ヒトiPS細胞から気道線毛上皮前駆細胞への効率の良い分化誘導法の確立. 第55回日本呼吸器学会学術講演会. 2015.4.19 東京

[図書] (計1件)

- ① 後藤慎平 (分担執筆) 「iPS細胞と呼吸器再生医療」, 永井厚志・巽浩一郎・桑野和善・高橋和久 (編) Annual Review 2016 呼吸器 (中外医学社)、査読無、2016年、35-40.

[産業財産権]

- 出願状況 (計2件)
- 名称: 肺胞上皮細胞の分化誘導法  
発明者: 後藤慎平、山本祐樹、小西聡史、三嶋理晃  
権利者: 国立大学法人 京都大学  
種類: PCT 出願  
番号: PCT/JP2016/057254  
出願年月日: 2016/03/02  
国内外の別: 国外
- 名称: 気道上皮細胞の分化誘導法  
発明者: 後藤慎平、小西聡史、山本祐樹、三嶋理晃  
権利者: 国立大学法人 京都大学  
種類: PCT 出願  
番号: PCT/JP2016/059786  
出願年月日: 2016/03/18

国内外の別： 国外

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 慎平 (GOTOH, Shimpei)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号： 5 0 7 4 7 2 1 9

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

堀田 秋津 (HOTTA, Akitsu)

浅香 勲 (ASAKA, Isao)