

令和元年6月19日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15457

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた家族性間質性肺炎由来肺胞上皮細胞の解析による肺線維化機構の解明

研究課題名(英文) Study for pulmonary fibrosis using iPS cells

研究代表者

伊藤 功朗 (Isao, Ito)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40447975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性間質性肺炎(SP-C遺伝子欠損症)患者3名から末梢血を採取し、iPS細胞研究所においてエピソーマルベクター法にてiPS細胞を作製した。核型解析を行った結果、核型正常の株もあるが、核型異常の株もみられた。正常核型iPS細胞から分化誘導を行ない、肺前駆細胞のマーカー蛋白が発現していることが確認でき、肺胞上皮細胞への分化効率の安定化を試みた、効率よくNKX2-1陽性細胞に分化するクローンを選定することができた。その後、CPM陽性細胞を単離し、三次元培養下にて肺胞上皮細胞に分化させた。電子顕微鏡で観察したところ、ラメラ体の形成と、免疫染色でもII型肺胞上皮細胞に分化していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症においては根本的・画期的治療薬がないのが現状である。その理由として、ヒトの肺疾患において肺胞上皮細胞の採取は侵襲的であるため行いにくく、また、細胞の培養・増殖が困難で研究が進めにくいことがある。その点でiPS細胞から分化誘導したAT2細胞を用いることで、その機能や生理学的側面を評価でき、また遺伝的肺疾患の表現型を再現できることが示され、さらに病態研究、治療薬スクリーニングに活かすことができれば、呼吸器疾患研究の新たな方法論の展開となり、本申請の肺線維症はもとより他の肺疾患においてもiPS細胞を用いた肺疾患研究の可能性が広がる。

研究成果の概要(英文)：We recruited three patients with interstitial pneumonia (pulmonary fibrosis) who has genetic surfactant protein-C deficiency. From monocytes of the patients, we produced disease specific iPS cells by using episomal vector. Among the iPS cells, we selected cells with normal karyotype. From the cells, we tried to induce alveolar type II cells through NKX2.1-positive cells efficiently. We observed lamellar bodies on electromicroscopy and we found SP-C positive cells in immunostaining.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：iPS細胞 SP-C 間質性肺炎 肺線維症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺胞組織において、Ⅱ型肺胞上皮細胞(AT2 細胞)はガス交換を担う細胞であり、Ⅰ型肺胞上皮細胞(AT1 細胞)は肺胞の虚脱を防ぐサーファクタントを産生し、これらの細胞は気道で最も遠位端に存在する上皮細胞である。surfactant protein-C (SP-C)はAT2 細胞に特異的なタンパクである。これまでにヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)からAT2 細胞を安定して誘導し、SP-C の発現を確実に示し、電子顕微鏡で lamellar body を示した報告はなかった。我々は、2011-2013 年度科学研究費基盤 C (伊藤功朗) などにて、多段階分化誘導法により ES/iPS 細胞から AT2 細胞を誘導し、その過程で SP-C ノックイン・レポーター iPS 細胞を作成し、誘導細胞の SP-C 発現を証明した(Gotoh S, *Stem Cell Reports* 2014)。

特発性間質性肺炎(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)は肺線維化が不可逆性に進行する原因不明の予後不良疾患である。IPF では、AT2 細胞の傷害やアポトーシスが報告されており、一見健常な部位の細胞でもアポトーシスが亢進し(Barbas-Filho JV, *J Clin Pathol* 2001)、アポトーシス関連蛋白の発現変化も見られる(Plataki M, *Chest* 2005)。IPF と同様の病理所見を呈する肺線維症を発症する希少な SP-C 遺伝子変異家族集積例が本申請分担研究者の森本らにより報告された(Ono S, *Eur Respir J* 2011)。ここでは cell line を用いて SP-C 遺伝子変異(G100S)により小胞体ストレスの増加とアポトーシスの誘導も示され、IPF による肺線維化の促進因子として肺サーファクタントや小胞体ストレスの重要性が示唆されている。実際の AT2 細胞で SP-C 遺伝子変異が小胞体ストレスを惹起するかは、世界的にも検討がなされていない。以上から、AT2 の小胞体ストレス、アポトーシスが肺線維化のカギと推測されているが、その機序は未解明である。また、「抗線維化薬」としては pirfenidone が発売されているが、まだ十分な臨床効果を期待できるものはない。

2. 研究の目的

間質性肺炎を呈する遺伝性疾患である surfactant protein-C (SP-C)遺伝子変異患者由来の iPS 細胞を用いて、その病態解析を行い、特発性間質性肺炎(IPF)における肺線維化の病態解明と新規治療法の開発を行う。その実現のために、以下の3点を研究の目的とする。

- (1) 疾患由来 iPS 細胞から分化したⅡ型肺胞上皮細胞が、特異な表現型である小胞体ストレスやアポトーシスを呈することを示す。
- (2) 疾患由来 iPS 細胞を用いた肺線維化発生の機序を解明し、治療薬候補化合物のスクリーニングを行う。
- (3) 遺伝子疾患での検討から一般的な IPF における病態理解へと発展させる。

3. 研究の方法

本研究の対象は、SP-C 遺伝子変異を持ち肺線維症を発症した患者さんで、長崎大学を受診している患者さんである。対象者からは京都大学ならびに長崎大学の医の倫理委員会に認められた方法でインフォームド・コンセントを取得し、採血にて末梢血単核球を採取する。

単核球を分離し、OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53-shRNA, EBNA 発現用エピソードベクターを用いて iPS 細胞を作成する。

コロニーを数十個増殖させ、核型解析、SP-C 遺伝子変異解析を行い、iPS 細胞の樹立

を確認する

iPS 細胞より AT2 細胞の分化誘導．誘導方法はすでに発表した方法を modify し，本 iPS 細胞で適切な誘導条件を，CPM 陽性細胞，NKX2-1 陽性細胞，SP-C 陽性細胞を指標として検討する．

電子顕微鏡で lamellar body を観察し，形態や数の増加を観察する．

小胞体ストレスやアポトーシスのマーカー発現を real-time PCR, Western-blot などで証明する．

4．研究成果

SP-C 遺伝子変異により肺線維化へ至る機序を解明し，より広い IPF の病態理解を深めると同時に，この難治性疾患に対する創薬の可能性を拓くための基盤となる知見を得るために研究を開始した．長崎大学にてリクルートした遺伝性間質性肺炎（SP-C 遺伝子欠損症）患者 3 名から，同意のもと末梢血を採取し，iPS 細胞研究所においてエピソードマルベクター法にて iPS 細胞を作製した．各患者から複数のコロニーを採取し，継代培養にて増加させ，保存した．保存した細胞株の複数を起こし，核型解析を行った結果，核型正常の株もあるが，核型異常の株もみられた．正常核型であることが確認された SP-C 変異の患者特異的 iPS 細胞から分化誘導を行ない，肺前駆細胞のマーカー蛋白が発現していることが確認できた．そこで，肺胞上皮細胞への分化効率の安定化を試みた．レチノイン酸濃度などの条件を検討したところ，効率よく NKX2-1 陽性細胞に分化するクローンを選定することができた．その後，CPM 陽性細胞を単離し，三次元培養下にて肺胞上皮細胞に分化させた．電子顕微鏡で観察したところ，ラメラ体の形成と，免疫染色でも II 型肺胞上皮細胞に分化していることを確認した．ER ストレスなどの異常については再現性を含め，更なる検討を要すると考えられた．今後は健常者由来 iPS 細胞との比較なども行なって II 型肺胞上皮細胞の異常についての詳細な解析を進めたい．

5．主な発表論文等

1. Nagasaki T, Sato K, Kume N, Oguma T, Sunadome H, Ito I, Izuhara Y, Okamoto K, Kobayashi S, Ohno T, Mizukami A, Kobayashi A, Kaise T, Kuroda T, Mishima M, Matsumoto H. The prevalence and disease burden of severe eosinophilic asthma in Japan. *J Asthma* 2019 Mar 1:1-12.
2. Cui S, Ito I, Nakaji H, Iwata T, Matsumoto H, Oguma T, Tajiri T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Izuhara H, Mishima M, Niimi A. Induction of airway remodeling and persistent cough by repeated citric acid exposure in a guinea pig cough model. *Respir Physiol Neurobiol* 2019;263:1-8.
3. Korogi Y, Gotoh S, Ikeo S, Yamamoto Y, Sone N, Tamai K, Konishi S, Nagasaki T, Matsumoto H, Ito I, Chen-Yoshikawa TF, Date H, Hagiwara M, Asaka I, Hotta A, Mishima M, Hirai T. In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids. *Stem Cell Reports* 2019;12:431-440.

4. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Oguma T, Nagasaki T, Ito I, Izuhara Y, Tajiri T, Iwata T, Mishima M, Niimi A. Independent Factors Contributing to Daytime and Nighttime Asthmatic Cough Refractory to Inhaled Corticosteroids. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019;29:30-39.
5. Horie H, Ito I, Konishi S, Yamamoto Y, Yamamoto Y, Uchida T, Ohtani H, Yoshida Y. Isolation of ESBL-producing bacteria from sputum in community-acquired pneumonia or healthcare-associated pneumonia does not indicate the need for antibiotics with activity against this class. *Intern Med* 2018; 57: 487-95.
6. Nagasaki T, Matsumoto H, Oguma T, Ito I, Inoue H, Iwata T, Tajiri T, Kanemitsu Y, Izuhara Y, Morimoto C, Ishiyama Y, Sunadome H, Niimi A, Hirai T. Sensitization to Staphylococcus aureus enterotoxins in smokers with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;119:408-414.
7. Matsuda Y, Chigusa Y, Kondoh E, Ito I, Ueda Y, Mandai M. A case of macrolide-refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pregnancy treated with Garenoxacin. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology* 2017; 2017:3520192
8. Inoue H, Ito I, Niimi A, Matsumoto H, Oguma T, Tajiri T, Iwata T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Morishima T, Hirota T, Tamari M, Wenzel SE, Mishima M. Association of interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with eosinophilic phenotype in Japanese adults with asthma. *Respir Investig* 2017;55:338-347.
9. 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* 2017;14:1097-1106.
10. Sunadome H, Matsumoto H, Petrova G, Kanemitsu Y, Tohda Y, Horiguchi T, Kita H, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Hirota T, Tamari M, Yokoyama T, Niimi A, Izuhara K, Mishima M. IL4Ra and ADAM33 as genetic markers in asthma exacerbations and type-2 inflammatory endotype. *Clin Exp Allergy* 2017;47:998-1006.

〔雑誌論文〕(計 10 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 森本浩之輔

ローマ字氏名: Konosuke Morimoto

所属研究機関名: 長崎大学熱帯医学研究所

部局名: 臨床感染症学分野

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50346970

研究分担者氏名: 浅香勲

ローマ字氏名: Isao Asaka

所属研究機関名: 京都大学 iPS 細胞研究所

部局名: 基礎技術研究部門

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10543639

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。