

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16932

研究課題名(和文) iPS細胞を利用した杯細胞過形成機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of goblet cell hyperplasia mechanism using induced pluripotent stem cells (iPSCs)

研究代表者

吉江 進 (Yoshie, Susumu)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70705459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：喘息等の呼吸器疾患に伴う気道のリモデリングは、気道上皮細胞の杯細胞過形成や粘膜下腺過形成、基底膜下の線維化、平滑筋の肥厚を特徴とする。その中でも、杯細胞過形成による過剰な粘液産生は高度な気道閉塞を来し窒息死を招くことから、杯細胞過形成機構の解明は急務とされている。本研究は、iPS細胞から杯細胞過形成モデルを作製することで、杯細胞過形成機構の解明を目的とする。まず、マウスiPS細胞から気道上皮組織への分化誘導技術を利用しながら杯細胞過形成モデルを作製した。さらに、マイクロアレイ解析によって杯細胞過形成に関与する幾つかの候補遺伝子の抽出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究では、主に実験動物によって杯細胞過形成機構の解明が行われてきた。しかし、実験動物を用いた研究では、詳細な分子機序の解明が困難である上に種が異なるためヒトの病態を厳密に模倣することは難しく、病態解明ツールとして適さないと考える。本研究によって、iPS細胞から杯細胞過形成モデルを作製することができれば、実験動物の代替えとなる有効な杯細胞過形成モデルになり、杯細胞過形成機構を細胞レベルから追求していくことが可能になる。さらに、ヒトiPS細胞由来杯細胞過形成モデルを利用し杯細胞過形成機構を解明することができれば、ヒトに対して特異性の高い、新しい治療薬への開発に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Airway remodeling provoked by respiratory diseases such as asthma causes goblet cell hyperplasia, submucosal gland hyperplasia, fibrosis under basement membrane, and thickening of smooth muscle. In particular, excessive mucus production due to goblet cell hyperplasia causes severe airway obstruction and destruction of lung tissue, and therefore, elucidation of goblet cell hyperplasia mechanism is needed. The purpose of this study is to elucidate the mechanism of goblet cell hyperplasia by the use of goblet cell hyperplasia model from iPS cells. First, a goblet cell hyperplasia model was generated from mouse iPS cell-derived airway epithelium by the use of cigarette smoking solution. Furthermore, we succeeded in screening of some candidate genes involved in goblet cell hyperplasia by microarray analysis.

研究分野：生理学

キーワード：iPS細胞 気道上皮 杯細胞過形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息や習慣的なたばこ煙による気道のリモデリングは、気道上皮細胞の杯細胞過形成や粘膜下腺過形成、基底膜下の線維化、平滑筋の肥厚を特徴とする。その中でも、杯細胞過形成による過剰な粘液産生は高度な気道閉塞を来し窒息死を招くことから、杯細胞過形成機構の解明は急務とされている。喘息の気道では EGFR を介したシグナルが異常に活性化し、杯細胞への分化を促すことから、EGF シグナルが過形成を誘導している原因の一つとされている (Takeyama K et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1996)。また、Th2 細胞由来の IL4, IL13 等のサイトカインも杯細胞過形成との関連性が明らかになっており (Wills-Karp M et al., Science, 1998)。最近では、喘息気道の杯細胞にクロライドイオンチャネルである CLCA1 が発現していることから、イオンチャネルと病態の関与が注目視されている (Monica Sala-Rabanal et al., Mediators of Inflammation, 2015)。しかしながら、杯細胞過形成機構の全容は明らかになっていない。また、実験動物を用いた喘息や杯細胞過形成モデルの作製では、ヒトの病態を厳密に模倣しているとは言いがたく、病態解明や治療モデルとして適さないのではないかと考える。

2. 研究の目的

本研究では、マウス/ヒト両者の iPS 細胞から気道上皮組織を分化誘導し、in vitro で杯細胞過形成モデルを作製することで、病態メカニズムの解明に繋げる。特に、ヒト iPS 細胞を利用し、杯細胞過形成モデルを in vitro で作製することができれば、実験動物の代替えとなる有効なヒト病態モデルになると考えられる。

3. 研究の方法

1) マウス iPS 細胞から気道上皮組織への分化誘導

マウス iPS 細胞から気道上皮組織へ分化誘導させるために、マウス iPS 細胞 (20D17 株) を Primary MEF (初代マウス胎児線維芽細胞) 上で維持培養し、分化誘導させる前にマウス iPS 細胞及び MEF をゼラチンコートしたディッシュ上に播種することで、MEF を取り除いた。純化したマウス iPS 細胞から EB (胚様体) を 1000 cells/well の条件下で非接着性培養プレートに播種し、5 日間の浮遊培養を行った。形成された EB をトランスウェル上に播種し、100 ng/ml bFGF と 100 ng/ml Activin で 5 日間処理した後に、ALI (気相液相界面) 培養条件下で 15 日間の培養を行った。気道上皮組織への分化誘導培地は、Knockout DMEM、10% KSR、100 μ M 非必須アミノ酸、100 μ M メルカプトエタノール、2 mM L グルタミンからなる EB 培地を使用した。RT-PCR、HE 染色、走査電子顕微鏡によって iPS 細胞から分化誘導した気道上皮組織を評価した。また、気道上皮におけるクロライドイオンチャネルが輸送機能を持っているかどうかを確認するために、クロライドイオン感受性の蛍光タンパクを利用してクロライドイオンチャネルの機能を測定した。さらに、ハイスピードカメラによって線毛運動を可視化し、画像解析から線毛運動の周波数を解析した。

2) マウス iPS 細胞由来気道上皮組織を用いた杯細胞過形成モデルの作製

マウス iPS 細胞由来気道上皮組織にたばこ煙溶液等 (CSS) を含む EB 培地で 1 週間の ALI 培養を行うことで、杯細胞過形成モデルを作製した。リアルタイム RT-PCR によって杯細胞過形成モデルの遺伝子発現を解析した。また、HE 染色、アルシアンブルー染色、免疫染色によって、杯細胞過形成モデルの形態学的評価と粘液産生を評価した。さらに、杯細胞過形成に関与する候補遺伝子を抽出するためにマイクロアレイ解析を行った。

3) Foxj1 強制発現ヒト iPS 細胞株の作製

ヒト iPS 細胞から気道上皮組織へ分化誘導させるために、ヒト iPS 細胞 (253G1 株) に調節ベクターである pEF1 -Tet3G vector と、転写因子 Foxj1 を搭載した応答ベクターの pTRE3G-mCherry vector をエレクトロポレーションによって導入した。導入したヒト iPS 細胞を Neo 耐性の Primary MEF (初代マウス胎児線維芽細胞) 上で維持培養及び薬剤選択を行い、幾つかの耐性コロニーを顕微鏡下でピックアップした。

4) ヒト iPS 細胞から胚体内内胚葉への分化誘導

ヒト iPS 細胞から内胚葉の原基である胚体内内胚葉への分化誘導を行った。ゼラチンでコーティングした 24well plate に 1×10^5 cells/well の細胞密度で、Y27632 (Rock inhibitor) (10 μ M) で処理したヒト iPS 細胞を播種した。Activin (100ng/ml)、CHIR99021 (3 μ M)、Y27632 (10 μ M) を添加し、分化誘導 2 日目、4 日目で培地交換 (分化誘導培地 組成: DMEM/F12 に 2% fetal bovine serum、100 μ M nonessential amino acids、2mM L-glutamate、100 μ M 2-mercaptoethanol、100ng/ml Activin、3 μ M CHIR99021 を添加) を行った。リアルタイム RT-PCR 及び免疫染色によって分化細胞の評価を行った。

5) ヒト iPS 細胞由来胚体内内胚葉から前腸内胚葉への分化誘導

ヒト iPS 細胞由来胚体内内胚葉から気道上皮細胞の分化予定領域である前腸内胚葉への分化誘導を行った。bFGF (500ng/ml) と SHH (50ng/ml) を添加し、分化誘導 7 日目、10 日目で培地交換 (分化誘導培地 組成: DMEM/F12 に 2% fetal bovine serum、100 μ M nonessential amino

acids、2mM L-glutamine、100 μM 2-mercaptoethanol、500ng/ml bFGF、SHH 50ng/ml を添加) を行った。リアルタイム RT-PCR 及び免疫染色によって分化細胞の評価を行った。

4. 研究成果

1) マウス iPS 細胞から気道上皮組織への分化誘導

マウス iPS 細胞から分化誘導した気道上皮組織は、各種気道上皮マーカー (Foxj1, Tubb4a, Muc5ac, Krt5, AQP3, AQP4, AQP5, CFTR, ENaC) の遺伝子発現が確認された (図 1A, B)。さらに、生体内の気管上皮と同様な多列円柱上皮組織が形成され (図 1C)、走査電子顕微鏡においても線毛構造を確認することができた (図 1D)。クロライドイオンチャネルである CFTR は、気道上皮においてクロライドイオンを細胞内外へ輸送することによって、気道上皮内腔面の水分量を調節し、気道クリアランスを維持するための重要な生理機能を担っている。CFTR の輸送機能を評価するために、クロライドイオン感受性の蛍光タンパクと CFTR 活性化因子 (Forskolin, IBMX, dbcAMP) を利用することで、蛍光輝度の変化から CFTR を介したクロライドイオン輸送を明らかにした (図 2A)。また、ハイスピードカメラによって線毛運動を可視化し、画像解析から生体内の気管上皮と同等の周波数を持っていることを確認した (図 2B)。

2) マウス iPS 細胞由来気道上皮組織を用いた杯細胞過形成モデルの作製

マウス iPS 細胞から作製した杯細胞過形成モデルの遺伝子発現を解析した。その結果、杯細胞のマーカーである Muc5ac、AQP5、CLCA1 の発現が、CSS で処理した杯細胞過形成モデルにおいて発現が上昇した。また、基底細胞のマーカーである Krt5 は杯細胞過形成モデルにおいて発現が減少し、線毛上皮マーカーである Tubb4a においても発現が減少していた。杯細胞過形成モデルの形態を評価するために HE 染色を行った。コントロールでは線毛上皮細胞が確認されたが、杯細胞過形成モデルにおいては、線毛上皮細胞が確認されなかった。また、杯細胞過形成モデルの上皮層の厚みはコントロールに比べ薄くなっていた。アルシアンブルー染色や免疫染色においては、杯細胞過形成モデルで過剰な粘液や Muc5ac 陽性細胞を確認することができた。

杯細胞過形成の病態に関与する分子を抽出するためにマイクロアレイ解析を行った。スキャタープロット解析によって、iPS 細胞由来杯細胞過形成モデルの発現量が iPS 細胞由来気道上皮組織に比べ、2 倍以上上昇した変動遺伝子を幾つか抽出した。

3) Foxj1 強制発現ヒト iPS 細胞株の作製

ドキシサイクリン未添加のヒト iPS 細胞では、Foxj1 の発現は誘導されなかったが、ドキシサイクリンを添加したヒト iPS 細胞では、Foxj1 の発現が誘導された

4) ヒト iPS 細胞から胚体内内胚葉への分化誘導

分化誘導培地で分化誘導を行い、分化誘導 3 日目、5 日目の細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR で解析を行った。その結果、胚体内内胚葉マーカーである Goosecoid、Foxa2、Sox17、Cxcr4 の発現量が経時的に上昇した。特に、分化誘導 5 日目の細胞では、未分化状態のヒト iPS 細胞に比べ、胚体内内胚葉マーカーの発現量は 200 倍程度上昇した。さらに、個々の細胞レベルでも胚体内内胚葉への分化を評価するために、免疫染色を行った。E-cadherin/Foxa2 陽性の細胞を確認することができ、膜タンパクである E-cadherin は細胞膜に局在し、核内タンパクである Foxa2 は核に局在していた。

5) ヒト iPS 細胞由来胚体内内胚葉から前腸内胚葉への分化誘導

分化誘導培地で分化誘導を行い、分化誘導 8 日目、11 日目の細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR で解析を行った。その結果、前腸内胚葉マーカーである HNF1 と HNF4 の発現量が経時的に上昇したが、分化誘導 5 日目と分化誘導 11 日目では顕著な発現量の差を示さず、数倍程度であった。個々の細胞レベルでも前腸内胚葉への分化を評価するために、分化誘導 11 日目の細胞を免疫染色で解析した。その結果、Sox2/Nkx2.1 陽性の細胞を確認することができ、核内タ

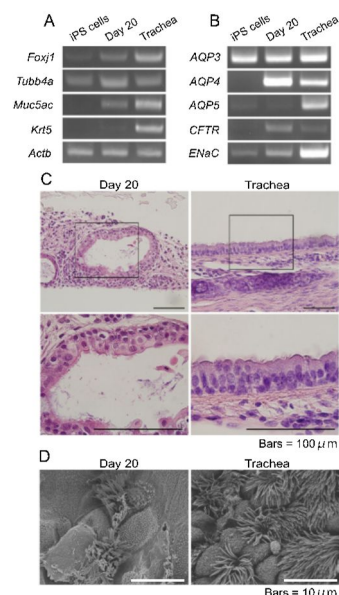


図 1. マウス iPS 細胞由来気道上皮組織の分化評価

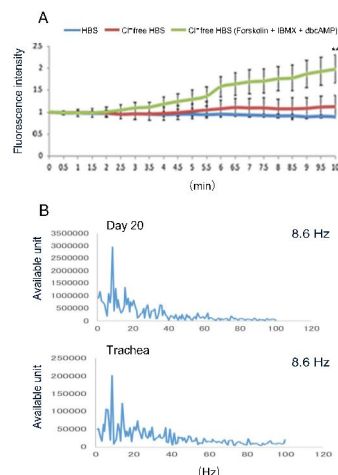


図 2. マウス iPS 細胞由来気道上皮組織の機能評価

ンパクである Sox2 と Nkx2.1 は核に局在していた。

< 結論 >

マウス iPS 細胞から機能的な気道上皮組織を作製し、それらを用いてマウス iPS 細胞由来杯細胞過形成モデルの作製に成功した。また、杯細胞過形成に関与している候補遺伝子を幾つか抽出した。ヒト iPS 細胞から気道上皮組織への分化誘導においては、前腸内胚葉までの分化を確認した。

< 今後 >

ヒト iPS 細胞由来前腸内胚葉から腹側前腸内胚葉や気道上皮組織へ分化誘導させるために、各種成長因子、サイトカイン、低分子化合物を組み合わせて分化誘導を行う予定である。また、薬剤誘導型発現システムを用いて、ドキシサイクリンを至適な時期で添加することで Foxj1 を分化細胞において一斉に強制発現させ、気道上皮組織の作製を行う。その後、ヒト iPS 細胞由来気道上皮組織からヒト特異的な杯細胞過形成モデルの作製を試み、杯細胞過形成機構の解明を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Yoshie Susumu, Omori Koichi, Hazama Akihiro | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Airway regeneration using iPS cell-derived airway epithelial cells with Cl ⁻ channel function | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Channels | 6. 最初と最後の頁 227-34 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336950.2019.1628550 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Yoshie Susumu, Nakamura Ryosuke, Kobayashi Daisuke, Miyake Masahiro, Omori Koichi, and Hazama Akihiro | 4. 巻 234 |
| 2. 論文標題 Functional characterization of various channel-expressing central airway epithelial cells from mouse induced pluripotent stem cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology | 6. 最初と最後の頁 15951-62 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/jcp.28254. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉江進、中村亮介、小林大輔、三宅将生、大森孝一、挟間章博 |
| 2. 発表標題 iPS細胞からCFTR機能を有する気道上皮組織への分化誘導 |
| 3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshie Susumu, Miyake Masao, Hazama Akihiro |
| 2. 発表標題 In vitro generation of goblet cell hyperplasia model using iPS cells and cigarette smoking solution |
| 3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshie Susumu, Nakamura Ryosuke, Kobayashi Daisuke, Miyake Masao, Omori Koichi, Hazama Akihiro |
| 2. 発表標題 Functional characterization of various channel-expressing airway epithelial cells with motile cilia generated from iPS cells |
| 3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉江進、中村亮介、小林大輔、三宅将生、大森孝一、挾間章博 |
| 2. 発表標題 多様なイオンチャネルを発現するiPS細胞由来気道上皮細胞の機能解析 |
| 3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Susumu Yoshie, Ryosuke Nakamura, Daisuke Kobayashi, Masao Miyake, Koichi Omori, Akihiro Hazama |
| 2. 発表標題 Functional characterization of various ion channels-expressing airway epithelial cells generated from induced pluripotent stem cells |
| 3. 学会等名 第95回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |