

令和元年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17853

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた気道上皮細胞における細胞間の繊毛協調運動の確立

研究課題名(英文) The establishment of intercellular co-ordination of ciliary movement by using human iPS cell-derived airway epithelial cells

研究代表者

小西 聡史 (Konishi, Satoshi)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10789564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：気道上皮細胞シートの粘液繊毛クリアランスの異常は、多くの気道疾患と関わり重要である。研究代表者はヒトiPS細胞から気道繊毛上皮細胞の分化誘導法を確立したが、in vitroの気道粘液繊毛疾患のモデリングに必要な「一方向性の粘液流を生み出す細胞間の繊毛協調運動の確立」は未だ達成できていなかった。本課題で、研究代表者は、原発性繊毛機能不全症の疾患モデルiPS細胞由来の気道繊毛上皮細胞を用いて、繊毛機能の評価解析系を樹立し、トランスジェニックマウスの初代培養の気管多繊毛上皮細胞のライブセルイメージングを軸にして、多繊毛協調機構に平面極性コア蛋白とアピカル細胞骨格が重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道上皮細胞シートにおいて一方向性の粘液流を生み出す多繊毛協調運動は、気道を介した生体防御システムの根幹を担うが、多繊毛協調の解析評価システム、並びに多繊毛協調の形成モデルは、確立されていなかった。本研究では、気道上皮細胞シートにおける繊毛機能の解析系を樹立し、多繊毛協調の形成機構に迫った。このことは、今後、粘液繊毛クリアランス異常の気道疾患患者の診断や治療のみならず、これまで評価が難しかった多繊毛協調を軸とした新たな疾患分類に繋がる可能性がある。また、本研究終了時では、論文投稿準備段階であるが、多繊毛協調運動の形成機構の新たなモデルを提示したことは学術的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multiple-ciliated airway epithelial cells have a pivotal role for mucociliary clearance in host defense of the respiratory system and are associated with various airway diseases. It has been challenging to establish co-ordination of airway multiple cilia to generate the unidirectional mucociliary flow in vitro. In the current research, the system of analyzing ciliary function was established based on the comparative analysis between the human iPS cells of healthy donor derived airway multiple-ciliated cells and primary ciliary dyskinesia specific human iPS cells derived airway multiple-ciliated cells. And, the pivotal role of planar cell polarity core protein and apical cytoskeleton was indicated by investigating the formative process of coordination of multiple cilia by using the live cell imaging of primary culture of murine tracheal airway epithelial cells.

研究分野：気道疾患モデリング

キーワード：多繊毛協調運動 粘液繊毛クリアランス 気道疾患モデリング ヒトiPS細胞 初代培養マウス気管上皮細胞 ライブセルイメージング

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

### 1. 研究開始当初の背景

気管組織上の気道上皮細胞シートは、繊毛上皮細胞と、クラブ細胞や杯細胞などの粘液産生細胞などがバランスよく配置されて構成される。繊毛上皮細胞は、個々の細胞の繊毛運動と、細胞間の繊毛協調運動によって、一方向性の粘液流を生み出し、気道内の異物や病原体の除去を行う(粘液繊毛クリアランス)。粘液繊毛クリアランスの異常は遺伝性希少疾患から身近な一般疾患まで多くの呼吸器気道疾患と密接に関わる。このような疾患の *in vitro* でのモデリングは、新規診断法や創薬につながる可能性があり、マウスやヒトの気道上皮の初代培養細胞を用いて行われてきた。しかしながら、初代培養細胞は、感染や薬剤などの後天的な影響を受けており、増殖能に限りがあること(Mou et al, *Ped Pulmonol.* 2015)、細胞培養シート全体においては気管組織と異なり一方向性の繊毛協調運動が認められないことから(Matsui et al, *J Clin Invest.* 1998)、「後天的な障害を受けていない大量の細胞の準備」、「一方向性の粘液流を生み出す細胞間の繊毛協調運動の確立」を解決することが *in vitro* の疾患モデリング研究において大きな課題であった。

研究代表者は、ヒト iPS 細胞を用いた研究で、肺の原基とされる NKX2-1 陽性の腹側前方腸細胞を段階的に分化誘導し、単離に利用できる表面蛋白質抗原である Carboxypeptidase M(CPM)の同定(Gotoh et al, *Stem Cell Reports.* 2014)に関わった。また、世界に先駆けて三次元培養下での分化誘導を行い、気道繊毛上皮細胞を含む気道上皮細胞への効率的な分化誘導法を確立し(Konishi et al, *Stem Cell Reports.* 2016)、特許出願(特願 2015-056791,PCT/JP2016/059786)も行った。ヒト iPS 細胞からの分化誘導というツールを用いることで「後天的な障害を受けていない細胞の大量の準備」は解決の見通しを立てることができ、*in vitro* での気道疾患モデリングの研究領域に寄与できた。しかしながら、ヒト iPS 細胞から分化誘導した気道繊毛上皮細胞は、個々の細胞では繊毛運動機能を示すことができたが、「一方向性の粘液流を生み出すための細胞間の繊毛協調運動の確立」は未達成であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は *in vitro* での気道上皮細胞シート上の一方向性の粘液繊毛クリアランスの確立であり、その達成を目指す具体的アプローチとして、以下の2点を柱として、研究を行った。

- (1)ヒト iPS 細胞由来の気道上皮細胞における細胞間の繊毛協調運動の確立。
- (2)ライブセルイメージングを用いた細胞間の繊毛協調運動の形成過程のメカニズムの解明。

### 3. 研究の方法

(1)多繊毛協調運動が阻害される疾患をモデルとして、健常者由来細胞との比較解析系を樹立するため、研究協力者の京都大学後藤慎平特定准教授のグループで開発された一細胞レベルで繊毛運動異常が生じる原発性繊毛機能不全症の疾患モデル iPS 細胞(CRISPR-CAS9 システムを用いて健常者由来細胞から疾患原因遺伝子をノックアウトした細胞)由来の気道繊毛上皮細胞を評価対象として用い、健常者由来 iPS 細胞から分化誘導した気道繊毛上皮細胞との比較により、繊毛運動の解析系の樹立を試みた。また、多繊毛協調運動の形成を意図したメカニカル刺激も加えて、多繊毛協調運動形成の可能性に関して検討を行った。

(2)マウス初代培養系で多繊毛上皮細胞の成熟過程において、スピニングディスク共焦点超解像顕微鏡を用いた高分解能長時間の独自のライブセルイメージング系と得られたデータの数理モデル解析を用いて、繊毛の根元の基底小体(Basal Body: BB)と繊毛の運動方向性を規定する基底足(Basal Foot: BF)がダイナミックに動きながら、その配向と配列を秩序化する過程のメカニズムについて検討を進めた。BB 特異的遺伝子である *centrin* を緑色 GFP ラベル、BF 特異的遺伝子を赤色 mRuby3 ラベルした GFP / mRuby3 の2色トランスジェニックマウスを樹立し、気管組織・初代培養細胞の繊毛上皮細胞で繊毛運動の方向性を検出できることを確認し、ツールとして用いた。

### 4. 研究成果

(1)原発性繊毛機能不全症の疾患モデル iPS 細胞由来の気道繊毛上皮細胞において、ハイスピードカメラによる繊毛運動パターン解析と蛍光ビーズの細胞シート上の動態解析を行い一細胞/細胞集団レベルでの機能の表現型を抽出・解析する方法を確立した。具体的には、変異遺伝子によって、異なる繊毛運動のパターン(hyperkinetic, circular, akinetic)をハイスピードカメラ上で検出し、差別化できた。また、気道上皮細胞シート上の培地に蛍光ビーズを希釈し、粘液繊毛流によって輸送される経過をトラッキングし、拡散能を始めとし、定量化したパラメーターで、健常者由来ヒト iPS 細胞から分化誘導した気道繊毛上皮細胞と疾患モデル iPS 細胞から分化誘導した気道繊毛上皮細胞を差別化できた。

上記の評価系を確立した上で、実際に、ヒト iPS 細胞由来細胞にメカニカル刺激を加え、多繊毛協調運動が細胞シートレベルで再現できるかどうかも検討し、蛍光免疫染色による平面極性コア蛋白の細胞シート内での細胞内局在の向きの揃い具合、蛍光ビーズの細胞シート内での進行方向性の揃い具合の2点の評価項目を新たに解析系として確立し、一定のメカニカル刺激で、それらのパラメーター値が上昇することを確認でき、多繊毛協調運動が起きることを確認できた。

(2)初代培養のマウスの気管多繊毛上皮細胞シートにおいて、ライブセルイメージングで得られたデータから、一細胞レベル/複数個の細胞集団レベルでの多繊毛協調運動の確立過程を数理解析した。平面極性コア蛋白の経時的な細胞内の発現の局在の変化とBBとBFで規定される繊毛の方向性の細胞内での揃い具合の相関を確認し、細胞内多繊毛協調に、平面極性コア蛋白とアピカル細胞骨格(図 1)に依存する細胞内多繊毛協調形成の新たなモデルを確立した。また、気道多繊毛上皮細胞内のBB配列・配向が細胞シートレベルで粘液繊毛輸送に与える影響も超解像顕微鏡を用いた同時画像取得系を構築し解析した(図 2)。モデルの正当性を平面極性コア蛋白のノックアウトマウスと、アピカル細胞骨格に介入する薬剤を投与して確認し、データを集積し、現在、論文投稿準備中である。

### The intracellular polarization of apical cytoskeleton in airway multi-ciliated cells depending on PCP

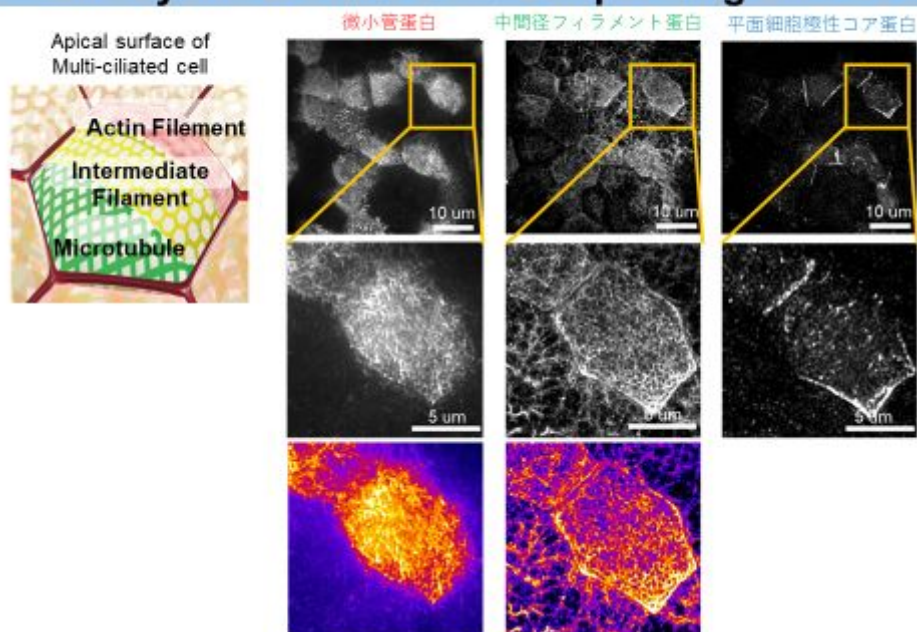


図 1：多繊毛協調運動形成に関する気道繊毛上皮細胞のアピカル細胞骨格の細胞内分極

### The relationship between BB-alignment and mucociliary Transport (The physiological meaning of BB alignment)

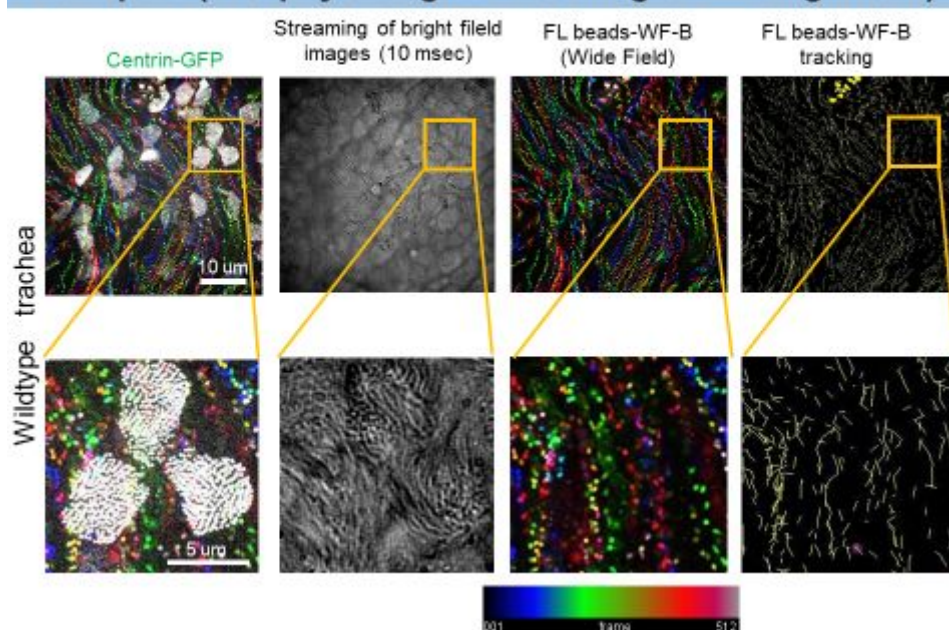


図 2：気道多繊毛上皮細胞の基底小体配列の粘液繊毛輸送の相関解析実験系

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

小西 聡史、後藤 慎平、肺のオルガノイドとその医学応用への可能性-呼吸器における幹細胞研究の新展開、医学のあゆみ(医歯薬出版株式会社)、査読無、264 巻、2018、664-668.

〔学会発表〕(計 5 件)

後藤 慎平、小西 聡史、他、Application of human induced pluripotent stem cells to disease modeling of primary ciliary dyskinesia. Gordon Research Conference. 2019. 2.17-2.22. イタリア

月田 早智子、長時間高分解能ライブセルイメージングによる気管多繊毛上皮細胞の繊毛配列メカニズムの解析、第 11 回呼吸機能イメージング研究会学術集会. 2019.1.25. 東京

曽根 尚之、後藤 慎平、小西 聡史、他、Disease Modeling of Primary Ciliary Dyskinesia using Human Induced Pluripotent Stem Cells, 2018. 1.20-1.23. オーストラリア

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：月田 早智子  
ローマ字氏名：Tsukita Sachiko  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：生命機能研究科  
職名：教授  
研究者番号(8 桁)：00188517

研究協力者氏名：後藤 慎平  
ローマ字氏名：Gotoh Shimpei  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：特定准教授  
研究者番号(8 桁)：50747219

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。