

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22249031

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた難治性呼吸器疾患の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Researches using iPS cells on intractable respiratory diseases to elucidate their pathogenesis and develop novel therapy.

研究代表者

三嶋 理晃 (MISHIMA, MICHIAKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60190625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS/ES細胞を分化させ肺胞前駆細胞を誘導しその過程でCarboxypeptidase M (CPM)が有用な表面蛋白質であることを見出した。また肺胞を作るのに不可欠なII型肺胞上皮細胞の分化誘導のため、この細胞に特異性の高いSurfactant Protein C(SPC)のレポーターiPS細胞を作成した。さらにCPMを使って単離した肺胞前駆細胞を3次元培養することでSPC陽性かつ電顕でlamellar body様構造がみられる肺胞上皮細胞を分化誘導しレポーター細胞を用いてこれらの細胞を単離できた。また複数種の疾患患者細胞から疾患特異的iPS細胞を作成した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we focused on establishing methods to induce alveolar type II cells from human iPS/ES cells. First, in the stepwise induction of NKX2-1-positive “ventralized” anterior foregut endoderm cells (VAFECS), we identified carboxypeptidase M (CPM) as a surface marker of the cells and fetal human and murine lungs. CPM-positive cells were successfully purified from VAFECs. To overcome difficulty in determining surfactant protein-C positive cells, we generated SFTPC-GFP reporter human iPS cells. Using the reporter cells, a three-dimensional co-culture with fetal human lung fibroblasts was performed. CPM-positive cells purified from VAFECs differentiated into GFP-positive alveolar type II cells within spheroid structures, showing lamellar body-like structures by electron microscopy. We generated disease specific human iPS cells of Hermansky-Pudlak syndrome and cystic fibrosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：iPS細胞 ES細胞 II型肺胞上皮細胞 surfactant protein C carboxypeptidase M 3次元培養 Hermansky-Pudlak 症候群 嚢胞性線維症

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患の多くは、長期的あるいは短期的な生命予後に関わる場合が多いにも関わらず、根本的治療法に乏しい。若年者において呼吸不全をきたした場合に肺移植が適用されることがあるが、臓器移植には年齢的制限、移植後の免疫抑制療法、移植術そのもののリスク、ドナーの不足など様々な制限があり、根本的な治療手段として再生医療の発展が望まれる。また、稀少疾患をはじめとする肺の難治性疾患は、その病態に不明な点も多く、比較的若年で呼吸不全を呈することもあって、その病態解明、新規治療戦略の開発が望まれる。また、特に肺細胞という臨床検体を採取することについては侵襲性があり、ある特定の細胞種に特化した検討が困難である。iPS 細胞は、再生医療のみならず、疾患の病態解明・治療法の開発にも有用であることが示唆されている。iPS 細胞の応用により、非侵襲的に疾患症例由来の細胞を入手することができ、また単一細胞種に限定した検討が可能となり、既存の病態研究の問題点が克服される。また再生治療においても、同一症例の細胞を利用することで拒絶のリスクを大幅に低減出来るというメリットがある。

2. 研究の目的

iPS 細胞から疾患関連の細胞種、とくに肺胞上皮細胞への分化誘導法を確立すること。また、疾患症例からの iPS 細胞作成～バンク作りを行うこと。以上を目的とした。

3. 研究の方法

研究開始の段階で、肺胞上皮細胞を未分化細胞から誘導する方法は報告がなかった。このため、ヒト ES/iPS 細胞から段階的に肺胞上皮細胞を分化誘導するプロトコルを作成した。主に、蛋白発現は免疫染色法で行った。内胚葉の誘導は平面培養法で行い、そこから既報を改変して NKX2.1 陽性細胞の誘導を行った。研究を進めるにつれ、NKX2.1 陽性細胞のより効率的な誘導法が発表されたが、レチノイン酸と CHIR99021 と BMP4 の濃度を最適化した。その先の肺胞上皮細胞までの誘導法も発表されてきたが、それらを改変するなどして平面培養で誘導を行ったが、肺胞上皮細胞の誘導は低率で困難であった。NKX2.1 陽性細胞の純化を目的として、前方前腸段階と腹側前方前腸段階の細胞をマイクロアレイで比較したところ、carboxypeptidase M (CPM) を同定し、NKX2.1 陽性細胞や、胎児肺のマーカーであることが判明したため、これを純化の表面抗原として利用して以下の研究を進めた。

また、II 型肺胞上皮細胞に特異性の高い surfactant protein C (SPC) のレポーター・ヒト iPS 細胞をノックイン法で作成した。作成細胞の validation には、全ゲノム SNP アレイの方法を用いた。

次いで、表面抗原 CPM により純化した NKX2.1

陽性の肺前駆細胞を、胎児肺線維芽細胞との 3 次元共培養法を用いて誘導を継続し、spheroid の形成を確認した。形成した spheroid に存在する SPC 発現 GFP 陽性細胞の割合を、FACS を用いて検討した。また、これらの細胞の単離が可能かを検討した。型肺胞上皮細胞が誘導されたことを示すために、電子顕微鏡で lamellar body を検索した。疾患特異的 iPS 細胞の作製には、患者から採取した皮膚線維芽細胞を用いたほか、バンク組織から購入した疾患患者由来の皮膚線維芽細胞を用いた。誘導は主にエピソーマルベクターを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 発生の段階を踏んだ肺前駆細胞の誘導と、それを経た 型肺胞上皮細胞の誘導。

京都大学 iPS 細胞研究所の長船健二教授のご協力を得て、ヒト ES/iPS 細胞から段階的に肺胞上皮細胞を分化誘導した。内胚葉を平面培養で 80% 以上の効率で誘導し、次いで前方前腸を 88% 以上の効率で分化誘導した。NKX2-1 陽性腹側前方前腸細胞 (肺前駆細胞) の誘導のためにはレチノイン酸と CHIR99021 と BMP4 の濃度を個々に最適化し、ES 細胞を含めた 7 種類の細胞株で 57.0~77.5% の誘導効率で NKX2-1 陽性細胞を誘導した。Surfactant protein C (SPC) は II 型肺胞上皮細胞に特異性が高い。NKX2-1 陽性細胞から平面培養を継続し、最終的に 1% 以下程度の効率で SPC 陽性細胞を誘導した。しかしながら、誘導効率のさらなる改善がのぞまれた。

(2) 肺前駆細胞に特異的に発現する表面抗原の発見と濃縮への応用。

NKX2-1 陽性腹側前方前腸のマーカーとなる候補を見つけるため、201B7 ヒト iPS 細胞株を用いてマイクロアレイを行ない、10 日目の前方前腸と 14 日目の腹側前方前腸の遺伝子発現を網羅的に比較したところ、Carboxypeptidase M (CPM) と NKX2-1 が腹側前方前腸で発現が著明に上昇していた。免疫染色でも CPM 陽性細胞と NKX2-1 陽性細胞はほぼ一致していることが確認できた。CPM が NKX2-1 陽性細胞に発現していることはヒトやマウスの胎児肺でも確認でき、その一方で甲状腺では NKX2-1 陽性細胞で陰性だったことから、CPM は肺系統の表面抗原であると考えられた。次に CPM は細胞外膜結合蛋白なので、14 日目に腹側前方前腸を分離して抗 EPCAM 抗体と抗 CPM 抗体で FACS を行なったところ、CPM 陽性細胞のほとんどが EPCAM 陽性だったので、その後は CPM 単独でソーティングを行なった。CPM 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ FACS で回収し NKX2-1 陽性率をみると、90% と 4.5% であった。これらの結果から、CPM は肺前駆細胞に発現するマーカーであり、これを濃縮するために有用であることが示された。

(3) II 型肺胞上皮細胞に特異的な

Surfactant Protein C (SPC) の遺伝子座を利用したヒトノックイン SPC レポーター iPS 細胞株の樹立。

誘導した II 型肺胞上皮細胞から SPC が発現していることを証明するために、SPC のノックインレポーター細胞をヒト iPS 細胞で樹立した。京都大学医学研究科腫瘍生物学講座の小川誠司教授のご協力で、SNP array を用いて樹立したレポーター細胞解析し、レポーター遺伝子の挿入を確認いただいた。

(4)3次元共培養による II 型肺胞上皮細胞の誘導。

平面培養で II 型肺胞上皮細胞の誘導効率が低かったため、3次元でヒト胎児肺線維芽細胞と肺前駆細胞の共培養を行なった。3次元培養に移す段階で、CPM により濃縮した NKX2-1 陽性細胞を用いた。球状体が形成され、その一部に SPC の発現が確認できた。共培養に用いた線維芽細胞を含めても 4%の効率で II 型肺胞上皮細胞を分化誘導できた。線維芽細胞をのぞくと、10%の誘導効率となった。球状体の一部には、II 型肺胞上皮細胞のマーカーである T1 の発現も観察された。作成した SPC レポーター細胞を用いると、誘導した II 型肺胞上皮細胞を単離できることが可能であった。

(5) レポーター細胞を使ってヒト II 型肺胞上皮細胞を単離。

GFP 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ単離して免疫染色を行ない、SFTPC との相関関係を確認し、レポーター細胞が誘導効率の測定や単離に使えることを証明した。その後、ドナーの異なる 4 株のヒト ES/iPS 細胞で CPM を用いた 3次元共培養法を試み、うち 3 株で同程度の SFTPC、SFTPB の遺伝子発現が確認できた。

(6) 難治性呼吸器疾患に対する取り組みとしては、京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究でこれまでに重症 COPD を呈する 1 アンチトリプシン欠損症、若年時から重度の呼吸不全を呈する気道上皮細胞を責任細胞とする嚢胞性線維症、難治性の気胸を呈する Birt-Hogg-Dube (BHD) 症候群、致命的な肺線維症を呈する Hermansky-Pudlak 症候群の、単一遺伝子異常の患者から iPS 細胞を樹立した。

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 11 件)

1. Hasegawa K, Sato S, Tanimura K, Fuseya Y, Uemasu K, Sato A, Hirai T, Mishima M, Muro S. Emphysema and airway disease affect within-breath changes in respiratory resistance in COPD patients. *Respirology*. 2015 Mar 30. doi: 10.1111/resp.12535. [Epub ahead of print]

2. Ikezoe K, Handa T, Tanizawa K, Kubo T, Ito I, Sokai A, Nakatsuka Y, Nagai S, Izumi T, Mishima M. A toll-like receptor 3 single nucleotide polymorphism in Japanese patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 2015 Mar;85(3):204-8.

3. Gotoh S, Ito I, Nagasaki T, Yamamoto Y, Konishi S, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Funato M, Mae S, Toyoda T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Osafune K, Mishima M. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014 Sep 9;3(3):394-403.

4. Kanemitsu Y, Ito I, Niimi A, Izuhara K, Ohta S, Ono J, Iwata T, Matsumoto H, Mishima M. Osteopontin and periostin are associated with a 20-year decline of pulmonary function in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Aug 15;190(4):472-4.

5. Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, Tanabe N, Sato A, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. p38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *BMC Pulm Med*. 2014 May 7;14:79.

6. Nagasaki T, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1474-7, 1477.e1-2.

7. Ikezoe K, Handa T, Mori K, Watanabe K, Tanizawa K, Aihara K, Tsuruyama T, Miyagawa-Hayashino A, Sokai A, Kubo T, Muro S, Nagai S, Hirai T, Chin K, Mishima M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2014 Jun;43(6):1807-9.

8. Tanabe N, Hoshino Y, Marumo S, Kiyokawa H, Sato S, Kinose D, Uno K, Muro S, Hirai T, Yodoi J, Mishima M. Thioredoxin-1 protects against neutrophilic inflammation and emphysema progression in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *PLoS One*.

2013 Nov 11;8(11):e79016.

9. Tanabe N, Muro S, Sato S, Tanaka S, Oguma T, Kiyokawa H, Takahashi T, Kinose D, Hoshino Y, Kubo T, Hirai T, Mishima M. Longitudinal study of spatially heterogeneous emphysema progression in current smokers with chronic obstructive pulmonary disease. PLoS One. 2012;7(9):e44993.

10. Suzuki M, Muro S, Ando Y, Omori T, Shiota T, Endo K, Sato S, Aihara K, Matsumoto M, Suzuki S, Itotani R, Ishitoko M, Hara Y, Takemura M, Ueda T, Kagioka H, Hirabayashi M, Fukui M, Mishima M. A randomized, placebo-controlled trial of acupuncture in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): the COPD-acupuncture trial (CAT). Arch Intern Med. 2012 Jun 11;172(11):878-86.

11. Tanabe N, Muro S, Hirai T, Oguma T, Terada K, Marumo S, Kinose D, Ogawa E, Hoshino Y, Mishima M. Impact of exacerbations on emphysema progression in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2011 Jun 15;183(12):1653-9.

〔学会発表〕(計 9件)

1. 星野勇馬。iPSと呼吸器再生医療の現状。第53回日本呼吸器学会総会 2013年4月19日 東京

2. 後藤慎平、伊藤功朗、長崎忠雄、船戸道徳、豊田太郎、前伸一、小西聡史、山本佑樹、長船健二、三嶋理晃。ヒトiPS細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導。第53回日本呼吸器学会総会 2013年4月21日 東京

3. Michiaki Mishima Towards the clinical application of iPS cells in the respiratory field. APSR 2013 2013年11月12日 横浜

4. Shimpei Gotoh, Isao Ito, Tadao Nagasaki, Yuki Yamamoto, Satoshi Konishi, Yohei Korogi, Hisako Matsumoto, Shigeo Muro, Toyohiro Hirai, Michinori Funato, Shin-Ichi Mae, Taro Toyoda, Aiko Sato-Otsubo, Seishi Ogawa, Kenji Osafune, Michiaki Mishima Generation of alveolar epithelial cells from human pluripotent stem cells. ISSCR 2014 2014年6月20日 Vancouver, Canada

5. Michiaki Mishima Clinical application of iPS cell in the respiratory field including COPD and asthma. APSR 2014 2014

年11月14日 Bali, Indonesia

6. 三嶋理晃。会長講演：COPD（慢性閉塞性肺疾患）の研究をふり返って～デジタル画像解析からiPS細胞研究まで～ 第112回日本内科学会講演会 2015年4月11日 京都

7. 山本佑樹、後藤慎平、興梠陽平、小西聡史、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、三嶋理晃ヒトiPS細胞から型肺胞上皮細胞への分化誘導効率の改善第55回日本呼吸器学会総会 2015年4月17日 東京

8. 後藤慎平、伊藤功朗、三嶋理晃他。遺伝性呼吸器疾患の疾患特異的iPS細胞樹立。第55回日本呼吸器学会総会 2015年4月19日 東京

9. 小西聡史、後藤慎平、山本佑樹、興梠陽平、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、三嶋理晃。ヒトiPS細胞から気道繊毛上皮前駆細胞への効率の良い分化誘導法の確立 日本呼吸器学会総会 2015年4月19日 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2件)

名称：肺胞上皮前駆細胞の誘導方法
発明者：長船健二、後藤慎平、伊藤功朗、三嶋理晃
権利者：京都大学
種類：特許権・特願
番号：2013-084034
出願年月日：平成25年4月12日
国内外の別：国内

名称：肺胞上皮前駆細胞の誘導方法
発明者：長船健二、後藤慎平、伊藤功朗、三嶋理晃
権利者：京都大学
種類：特願
番号：PCT/JP2014/058142
出願年月日：平成26年4月14日
国内外の別：国外

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 理晃 (Michiaki Mishima)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：60190625

(2) 研究分担者

小川 恵美子 (Emiko Ogawa)
滋賀医科大学・学内共同利用施設等・講師
研究者番号：00378671

瀬山 邦明 (Kuniaki Seyama)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10226681

半田 知宏 (Tomohiro Handa)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：10432395

平井 豊博 (Toyohiro Hirai)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20359805

伊藤 功朗 (Isao Ito)
京都大学・医学研究科・特定病院助教
研究者番号：40447975

室 繁郎 (Shigeo Muro)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60344454

松本 久子 (Hisako Matsumoto)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：60359809

平家 俊男 (Toshio Heike)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90190173

陳 和夫 (Kazuo Chin)
京都大学・医学研究科・特定教授
研究者番号：90197640

(3) 連携研究者

()

研究者番号：