

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19919

研究課題名（和文）難治性肺疾患の革新的治療技術の開発

研究課題名（英文）Development of innovative therapy for intractable lung diseases

研究代表者

栗崎 晃（Kurisaki, Akira）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：60346616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：現在のところ、慢性閉塞性肺疾患に対する有効な治療法は存在しない。本研究では、様々な肺の機能性上皮細胞の元となる肺の前駆細胞を作製する新たな方法を検討し、肺前駆細胞の材料として新生児皮膚線維芽細胞は不適であること、肺前駆細胞の維持培地についてはBIRB796を含まないのが望ましいことを見出した。さらに作製した肺前駆細胞には弱いながらもある程度の分化能があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺気腫や慢性気管支炎などの慢性閉塞性肺疾患は、タバコの煙などの有害物質を長期間吸入することによって発症する肺の炎症性疾患であり、毎年世界で300万人以上がこの病で命を落としている。現在のところ、上述の肺疾患に対する有効な治療法は存在しない。本研究では、様々な肺の機能性上皮細胞の元となる肺の前駆細胞を作り出す新たな技術を開発中であり、今後再生困難な肺組織を作り出す技術への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Currently, there is no effective treatment for Chronic obstructive pulmonary diseases. In this study, we explored a new method for producing lung progenitor cells, which serve as the precursors to various functional epithelial cells in the lungs. As a result, we found that neonatal skin fibroblasts are unsuitable as material for lung progenitor cells, and it is preferable to exclude BIRB796 from the maintenance medium for lung progenitor cells. Furthermore, we confirmed that the produced lung progenitor cells, although weak, possess a certain degree of differentiation ability.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：肺 前駆細胞 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんや最近増加している肺結核の後遺症に苦しむ患者は多く、死亡原因の 10%は肺疾患に関連している。特に、肺気腫や慢性気管支炎などの慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、タバコの煙などの有害物質を長期間吸入することによって発症する肺の炎症性疾患である。これらの疾患は、咳や痰、息切れなどを引き起こし、慢性的な呼吸不全を伴って生活の質 (QOL) を低下させる難治性の病であり、毎年世界で 300 万人以上がこの病で命を落としている。現時点では、この疾患に対する治療法は、気管支拡張剤や去痰剤による対症療法、酸素吸入による延命措置以外にはなく、悪化を防ぐための予防的対策に頼るしかない不治の病である。

肺は毛細血管や平滑筋に加え、気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞など、多様な細胞集団が組み合わさって構成される複雑な臓器である。これらの多様な細胞群を成体の肺組織と同等のレベルで作製する方法は、これまでのところ存在しない。肺は自己再生能力が低く、自然治癒能力にも限界があることが知られている。骨髄幹細胞の投与による肺再生も検討されているが、その効果は限定的である。現在のところ、上述の肺疾患に対する有効な治療法は存在しない。これまでに ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞を用いて肺組織細胞を作製する試みが行われているが、分化効率は十分に高くなく、さらに、肺組織には多様な細胞が存在するため、それらを作り分けることも容易ではない。

最近我々は様々な肺の機能性上皮細胞の元となる肺の前駆細胞を作製する新たな方法を開発中である。

2. 研究の目的

本研究では、様々な肺の機能性上皮細胞の元となる肺の前駆細胞を作製する新たな方法を開発することで、再生困難な肺組織を作り出す細胞材料の新たな調製方法を検討した。

3. 研究の方法

本研究では、まず肺前駆細胞の培養条件を細胞源や培地組成の観点で見直すとともに、肺前駆細胞の作製効率を向上させる追加因子を検討した。また、ヒト肺前駆細胞の作製についても検討した。

4. 研究成果

肺前駆細胞を作製する細胞源として我々は成体マウス表皮由来線維芽細胞を使用しているが、細胞増殖能が高く、容易に調製可能な新生児マウスの表皮の線維芽細胞についても検討した (図 1)。新生児の線維芽細胞は、マウス新生児の皮膚を切り取り、トリプシン溶液で一晩浸した後、37℃でさらに処理して上皮組織を外して真皮を分けとり、さらに 37℃で 2~3 時間コラゲナーゼ処理して真皮由来の線維芽細胞を調製した。実際に新生児の真皮からは大量に線維芽細胞を調製することができた。ところが、肺特異的転写因子を導入したところ、成体皮膚線維芽細胞からは球形で中空のオルガノイドや細胞塊が観察されたが、新生児皮膚線維芽細胞からは、ひも状の細胞塊が形成され、全く異なる形態の細胞集団が観察されることが判明した (図 2)。また、遺伝子発現を確認したところ、新生児皮膚線維芽細胞から作製したこれらのオルガノイドでは、qRT-PCR で肺前駆細胞マーカーの発現がほとんど観察されなかった。これらの結果から、理由は現時点で不明であるものの、新生児皮膚由来の線維芽細胞は細胞材料として不適と考えられた。

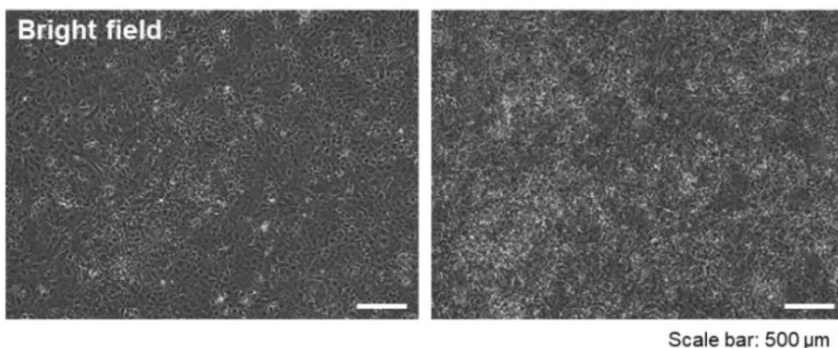


図1 成体マウス表皮由来線維芽細胞(左)と新生児マウス表皮由来線維芽細胞(右)の明視野像。形態的に大きな違いはないように見える。

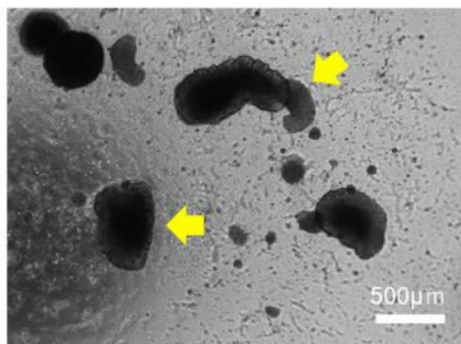


図2 新生児マウス表皮由来線維芽細胞から肺前駆細胞作製条件で誘導した細胞集団の明視野像。黄色矢印は特徴的なひも状の細胞塊。

次に、肺前駆細胞の維持培地について最適化すべく検討を行った。現在使用している肺前駆細胞の維持培地の中で特に低分子化合物に着目し、A83-01、BIRB796、Y-27632 についてその必要性を検討した。実際にこれらの低分子化合物を除去した培地でマウス皮膚線維芽細胞から肺前駆細胞の作製を試みたところ、BIRB796 を添加しない培地で培養した際に、肺前駆細胞マーカーの発現が高い傾向がみられた(図3)。

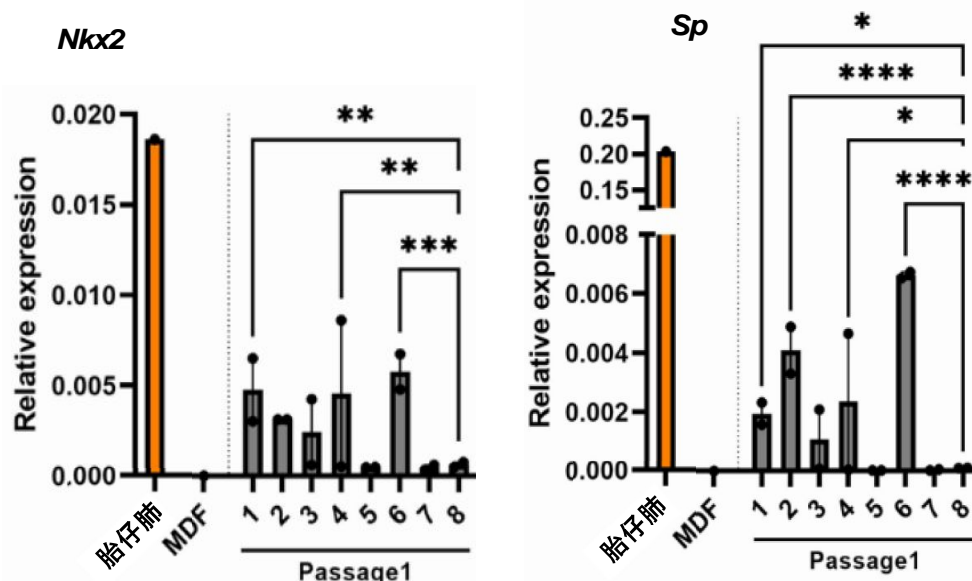


図3 肺前駆細胞維持培地の最適化。BIRB796 を除去した肺前駆細胞維持培地(条件6)で培養し、肺前駆細胞マーカーの発現を qRT-PCR で解析した。各肺前駆細胞マーカーの遺伝子発現は *Actb* の遺伝子発現で補正して表示した。

また、マウス線維芽細胞から作製した肺前駆細胞と胎仔期の肺前駆細胞の遺伝子発現を比較したところ、発現レベルが 1/2 以上低い遺伝子として 45 個の遺伝子が確認された。これらの内のいくつかを発現ベクターにクローニングして、既存の 5 因子と共に線維芽細胞に導入してみたところ、2 - 3 の因子に関して肺前駆細胞マーカーの発現が qRT-PCR レベルで向上する傾向が見られた。現在それらの因子を組合せることで、さらに肺前駆細胞を効率的に作製できないか検討を進めている。

次に、作製した肺前駆細胞が実際に肺の様々な細胞に分化するのか、その分化能についても検討した。その結果、4 週間の分化培養で肺胞上皮 I 型細胞や II 型細胞、基底細胞の分化マーカーの上昇が qRT-PCR で弱いながらも確認された。今後コントロールとなる肺前駆細胞と比較しながら、分化能の詳細な解析を進める予定である。

さらにヒト細胞についても検討を行うため、市販のヒト線維芽細胞 4 種を培養し、5 因子を遺伝子導入して観察を行った。なお、遺伝子導入はレトロウイルス受容体である mSic7a1 遺伝子をあらかじめレンチウイルスで導入した後にエコトロピックレトロウイルスを感染させる 2 段階法

と、パントロピックレトロウイルスを用いて1段階で感染させる方法を用いて検討した。コントロール GFP ウイルスで遺伝子導入効率を比較した結果、エコトロピックレトロウイルスよりもパントロピック法の方が効率的に遺伝子を導入できることが確認された。しかしながら、パントロピックレトロウイルスで5因子を導入したヒト線維芽細胞では、肺前駆細胞マーカーの上昇がみられるものの、非常に弱く、さらなる作製効率の向上が必要と考えられた。

今後追加因子を最適化し、肺前駆細胞の作製効率を向上させることで、ヒトの肺前駆細胞の作製を実現できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsushi Intoh, Kanako Watanabe-Susaki, Taku Kato, Hibiki Kiritani, Akira Kurisaki	4. 巻 in press
2. 論文標題 EPHA2 is a novel cell surface marker of OCT4-positive undifferentiated cells during the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stcltm/szae036	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	印東 厚 (Intoh Atsushi) (70779058)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	
研究分担者	高田 仁実 (Takada Hitomi) (80641068)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------