

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591146

研究課題名(和文) ヒト iPS 細胞を用いた肺組織幹細胞の探索と II 型肺胞上皮細胞誘導への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to search for lung progenitor cells and to develop alveolar type II cells from human iPS cells

研究代表者

伊藤 功朗 (Ito, Isao)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40447975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：治療方法がない呼吸器疾患で苦しみ、亡くなる患者さんは多い。ヒト iPS 細胞から肺胞上皮細胞を誘導できれば、それを再生医療や病態研究などに用いることができる。本課題では、肺胞上皮細胞の誘導と、その分化過程における肺組織前駆細胞を探索した。腹側前腸細胞とされる(NKX2.1+FOXA2+細胞)を30-60%の効率で誘導することができ、II型肺胞上皮細胞のマーカーであるSFTPC陽性の細胞も観察された。NKX2.1陽性細胞誘導過程で、表面抗原を同定し、抗原陽性細胞は肺の種々の細胞へ分化することがわかった。この抗原は細胞分別に使用できた。本課題の成果から、肺胞上皮細胞の誘導へ飛躍的に進歩したと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study grant, we have established original methods to develop iPS cells into alveolar cells. The induced population expressed marker proteins such as surfactant protein-C, which are required for alveolar type II cells. In the process of developing induction methods, we have identified a surface marker for NKX2.1 positive cells. The marker enables us to isolate these cells and cells positive for this marker developed into a range of airway and alveolar epithelial cells. Our findings would contribute much for further research on inducing alveolar cell population from undifferentiated cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：iPS細胞 肺胞上皮細胞 組織幹細胞 サーファクタント レポーター細胞 SPC NKX2.1

## 1. 研究開始当初の背景

肺は再生能力に乏しい vital organ であり、COPD や間質性肺炎などの呼吸器疾患が重症化すれば死に至るが、これらに対する根本的治療法はない。呼吸不全では肺移植が適用されるが、臓器移植には年齢制限、ドナー不足、手術リスク、移植後の免疫抑制療法など様々な制限があり、治療手段の一つとして再生医療の発展が望まれる。しかし、肺は複雑な構造で細胞の種類も多いため、再生研究が進んでいない。また、種々の肺疾患の病態には不明な点も多く、病態研究の発展も望まれる。

マウスにおける末梢肺の組織幹細胞は同定・単離されたが、ヒトには存在しない特異表面抗原 (Sca-1) を用いられており (Kim CF, *Cell* 2005)、それに該当するヒトでの肺組織幹細胞はまだ同定単離されていない。

## 2. 研究の目的

近年開発された induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) は、皮膚線維芽細胞などの比較的採取しやすい細胞から作成することが可能な多能性幹細胞であり、iPS 細胞からは様々な臓器特異的細胞が分化・誘導できることが期待される。また移植医療に用いた場合、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利点がある。そうした点から、iPS 細胞から肺組織幹細胞の同定や、肺胞上皮細胞の誘導が出来れば、呼吸器疾患の再生治療研究や病態研究に大いに生かされると考える。未分化なヒト iPS 細胞の中からこの両者が陽性となる細胞を分離することができれば、その一部が幹細胞としての機能を持つのではないかと考えた。

本研究では、2 種類のキー蛋白 (Clara Cell secretory Protein (CCSP), Surfactant protein-C (SPC)) の promoter ベクターを用いて、iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞の誘導と、肺組織幹細胞の探索を二大目標とした。

## 3. 研究の方法

すでに樹立されているヒト iPS 細胞を用いて SPC のレポーター細胞を樹立した。そして既報に基づき、薬剤耐性遺伝子を用いて II 型肺胞上皮細胞に分化した細胞を回収した。

の結果をうけて、他の臓器で行なわれているように、発生の各段階を再現しながら、分化誘導する手法を確立し、その上でレポーター細胞を利用することにした。

SPC のレポーター細胞を樹立した。最終段階まで誘導した細胞をこれを用いて解析した。

NKX2.1 陽性細胞の単離の目的で、ここ

まで誘導した細胞に特異的に発現する表面抗原を探索した。

の結果をうけて、三次元共培養を行なった。

## 4. 研究成果

免疫染色でごく少数の細胞については SFTPC, SFTPB 陽性とみられる細胞が確認でき、電子顕微鏡でも II 型肺胞上皮と思われる lamella body を持つ細胞を認めることができたが、誘導効率が悪く、増殖させたり維持することもできず、濃縮することもできなかった。

前腸細胞とされる FOXA2+SOX2+細胞を 90% 以上の高効率で誘導する技術を確立し、腹側前腸細胞とされる (NKX2.1+FOXA2+細胞) についても 30-60% の効率で誘導することができるようになった。NKX2.1+FOXA2+細胞は肺胞上皮細胞だけでなく、気道上皮細胞、甲状腺、副甲状腺といった組織に分化しうる能力を持つとされ、既報よりも効率よく、マウスではなくヒトで誘導できる技術が確立できたことは画期的である。

誘導細胞に SPC 陽性細胞が含まれることが証明された。しかし、二次元培養では肺胞上皮細胞の誘導効率に限界があった。

表面抗原 A を同定し、抗原陽性細胞が肺の細胞に分化することを示したことは、A 陽性細胞が肺組織幹細胞である可能性がある。また、A で細胞をソーティングすることができた。

三次元培養により、alveolosphere というべき構造が確認できた。また、SPC 陽性細胞の誘導効率が改善した。本成果は肺胞上皮細胞の誘導と立体化という観点から今後の再生医療の発展に寄与すると考える。

## 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15件)

Kanemitsu Y, Ito I, Niimi A, Izuhara K, Ohta S, Ono J, Iwata T, Matsumoto H, Mishima M. Osteopontin and periostin associate with a 20-year decline of pulmonary function in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 accepted.

Ito I, Mishima M. Isolation of drug-resistant pathogens does not always require use of broad-spectrum antibiotics in pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:756-7.

Tajiri T, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Oguma T, Otsuka K, Takeda T, Nakaji H, Inoue H, Iwata T, Nagasaki T, Mishima M. Prevalence and clinical relevance of allergic rhinitis in

patients with classic asthma and cough variant asthma. *Respiration* 2014;87:211-8.

Tajiri T, Matsumoto H, Niimi A, Ito I, Oguma T, Nakaji H, Inoue H, Iwata T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Petrova G, Mishima M. Association of eosinophilic inflammation with FKBP51 expression in sputum cells in asthma. *PLoS One* 2013;8:e65284.

Daido S, Nakai A, Kido A, Okada T, Kamae T, Fujimoto K, Ito I, Togashi K. Anticholinergic agents result in weaker and shorter suppression of uterine contractility compared with intestinal motion: time course observation with cine MRI. *J Magn Reson Imaging* 2013;38:1196-202.

Nagasaki T, Matsumoto H, Nakaji H, Niimi A, Ito I, Oguma T, Muro S, Inoue H, Iwata T, Tajiri T, Kanemitsu Y, Mishima M. Smoking attenuates the age-related decrease in IgE levels and maintains eosinophilic inflammation. *Clin Exp Allergy* 2013;43:608-15.

Tanizawa K, Handa T, Nagai S, Sato H, Yamada R, Ito I, Kubo T, Ito Y, Watanabe K, Aihara K, Ikezoe K, Mishima M, Izumi T. Interferon regulatory factor 5 polymorphisms in sarcoidosis. *Mod Rheumatol* 2013;23:1158-65.

Nakaji H, Petrova G, Matsumoto H, Iwata T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Niimi A, Mishima M. Effects of 24-week add-on treatment with ciclesonide and montelukast on small airways inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013;110:198-203.

Nakai A, Reinhold C, Noel P, Kido A, Rafatzand K, Ito I, Togashi K. Optimizing cine MRI for uterine peristalsis: A comparison of three different single shot fast spin echo techniques. *J Magn Reson Imaging* 2013;38:161-7.

Azuma M, Ito I, Matsumoto R, Hirai T, Mishima M. Pulmonary hemorrhage induced by epileptic seizure. *Heart Lung* 2012;40:290-3.

Imai S, Ito Y, Hirai T, Imai H, Ito I, Maekawa K, Chin K, Ichiyama S, Uemoto S, Mishima M. Clinical features and risk factors of tuberculosis in living-donor liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012;14:9-16.

Otsuka K, Matsumoto H, Niimi A, Muro S, Ito I, Takeda T, Terada K, Yamaguchi M,

Matsuoka H, Jinnai M, Oguma T, Nakaji H, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Chin K, Mishima M. Sputum YKL-40 Levels and Pathophysiology of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration* 2012;83:507-19.

Tanizawa K, Handa T, Nagai S, Ito I, Takeshi K, Ito Y, Watanabe K, Aihara K, Mishima M, Izumi T. A CD40 single nucleotide polymorphisms affects the lymphocyte profiles in the bronchoalveolar lavage of Japanese patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2011;78:442-5.

Kanatani KT, Ito I, Al-Delaimy WK, Adachi Y, Mathews WC, Ramsdell JW, Toyama Asian Desert Dust and Asthma Study Team. Desert-dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1475-81.

Ito I, Kadowaki S, Tanabe N, Haruna A, Kase M, Yasutomo Y, Tsukino M, Nakai A, Matsumoto H, Niimi A, Chin K, Ichiyama S, Mishima M. Tazobactam/piperacillin for moderate-to-severe pneumonia in patients with risk for aspiration: comparison with imipenem/cilastatin. *Pulm Pharmacol Ther* 2010;23:403-10.

〔学会発表〕(計2件)

後藤慎平、伊藤功朗 他。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

Gotoh S, Ito I, et al. Generation of alveolar epithelial cells from human pluripotent stem cells. (accepted for presentation in ISSCR 2014 and given a Travel Award)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計1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：国立大学法人京都大学  
出願番号：特願 2013-084034  
出願年月日：平成 25 年 4 月 12 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
伊藤功朗 (Isao Ito, いとう いさお)

研究者番号：40447975

(2)研究分担者

長船健二 (Kenji Osafune, おさふね けんじ)

研究者番号：80502947

新実彰男 (Akio Niimi, にいみ あきお)

研究者番号：30252513

三嶋理晃 (Michiaki Mishima, みしま みちあき)

研究者番号：60190625

室 繁郎 (Shigeo Muro, むろ しげお)

研究者番号：60344454