

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790899

研究課題名(和文) 気道上皮細胞の分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Differentiation into airway epithelial cells

研究代表者

齋藤 朗 (Akira, Saito)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：90591412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から肺上皮細胞への分化誘導を試みるため、阻害剤・増殖因子・ディッシュコーティングの条件検討を行った。TTF-1・TAZ・FOXA2遺伝子を発現するエピソーマルベクターを作成し、iPS細胞および皮膚線維芽細胞に対して、エレクトロポレーションによる遺伝子導入を行った。肺上皮細胞マーカーの発現上昇をqRT-PCRで確認し、さらに電子顕微鏡で細胞の形態観察も行った。

研究成果の概要(英文)：In order to promote differentiation of human iPS (induced pluripotent stem) cells into lung epithelial cells, we tested the effects of various culture conditions, including inhibitors, growth factors and culture dish coating. We generated episomal vectors for TTF-1 (thyroid transcription factor-1), TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) and FOXA2 (forkhead box A2), and these genes were transduced into iPS cells or human skin fibroblasts by electroporation. Upregulation of markers for lung epithelial cells were examined by qRT-PCR (quantitative RT-PCR), and cell morphology of differentiated cells were investigated by electron microscopy.

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：遺伝子導入 分化誘導

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 多能性幹細胞から特定の細胞への分化誘導は、再生医療の基盤となる技術である。神経細胞や血管細胞への分化誘導法は確立されつつあるが、内胚葉系細胞への分化誘導は困難とされてきた。特に気道上皮細胞への分化誘導法に関する報告は極めて限られていた。

(2) マウス ES 細胞から胚様体を形成させ、Activin 刺激を行った後に、気道上皮細胞に最適化された無血清培地 SAGM (small airway growth media) で培養を行うことで、気道上皮細胞マーカーである SPC (surfactant protein C) 陽性細胞への分化誘導に成功したとの報告があった。しかしこの手法では培養期間が 30 日に上り、誘導効率も 3~4% に止まっていた。

### 2. 研究の目的

(1) ヒト iPS 細胞およびマウス ES 細胞から、気道上皮細胞へと効率的に分化誘導させる培養法を確立し、肺の再生医療に資することを第一の目的とする。

(2) ヒト線維芽細胞から自ら iPS 細胞を作出し、由来する細胞の違いによる、気道上皮細胞への誘導効率の相違について検証する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚由来 iPS 細胞・マウス ES 細胞から気道上皮細胞の分化誘導

iPS 細胞研究所で樹立されたヒト皮膚由来 iPS 細胞、およびマウス ES 細胞から気道上皮細胞への分化誘導を試みる。

iPS 細胞の培養には、リプロセル社の霊長類 ES 細胞用の培地に FGF-2 を添加したものを用いる。フィーダー細胞として mitomycin 処理をした市販の MEF を使用する。

マウス ES 細胞は LIF 添加培地を使用し、フィーダーレスで培養する。分化誘導のため、以下の点を考慮して培養法を比較検討する。

細胞の分化誘導において、細胞外基質からのシグナルが重要である。iPS 細胞や ES 細胞の培養ではゼラチンコートディッシュを使用するが、分化誘導実験ではラミニン・コラーゲン I、コラーゲン、マトリゲルなどでコートしたディッシュも比較検証する。

分化誘導培地としては、気道上皮細胞の培養に最適化された無血清培地 BEGM (EGF、insulin、hydrocortisone などを含有) を使用するのが効果的と考えられるが、分化誘導の初期段階では細胞毒性が強いと予想される。したがって分化が進んだ段階で BEGM 培地に切り替えるのが望ましく、その最適なタイミングを探る。

内胚葉系細胞の分化誘導のために Activin/Nodal で刺激を加えるほか、新規薬剤 IDE-1 による分化誘導も試みる。Wnt や FGF などのリガンド刺激や TGF- $\beta$  阻害剤などの効果も検討する。

ES 細胞や iPS 細胞を三胚葉系の細胞に分化誘導する手法として、胚様体形成法がある。ハンギングドロップ法によって胚様体を形成させ、三次元培養によって初期の分化誘導を効率化する。この手法に平面培養法を組み合わせ条件を検討する。

気道上皮分化には間葉系細胞 (線維芽細胞) との相互作用が重要であることから、iPS 細胞ないし ES 細胞と線維芽細胞を混合培養する手法も活用する。さらにコラーゲンゲルに肺線維芽細胞を包埋し、ゲル表面に分化誘導を行った細胞ないし胚様体を培養する手法も検討する。具体的には、コラーゲンゲル表面上に培養した細胞が空気と接触することにより (air-liquid interface)、気道上皮の分化が促進される可能性もある。

(2) 気道上皮細胞への分化の検定には以下の手法を用いる。

型肺胞上皮細胞、気管支肺胞幹細胞マーカーである SPC の発現を定量的 RT-PCR やウエスタンブロットにより確認し、培養条件のスクリーニングを行う。

ある程度培養条件が定まってきたら、免疫細胞染色により気道上皮細胞のコロニーの SPC 発現を確認する。cytokeratin、aquaporin、TTF-1 など (気道) 上皮マーカーの発現も調べる。

分化誘導法が確立したら、電子顕微鏡による形態学的観察を行う。

(3) ヒト繊維目細胞由来 iPS 細胞の作出  
iPS 細胞研究所のプロトコールに従い、線維芽細胞に Oct3/4、Sox2、KLF4 遺伝子を導入して iPS 細胞を樹立する。iPS 細胞の多分化能・未分化性の検定には以下のアッセイ系を用いる。

iPS 細胞コロニーのアルカリフォスファターゼ染色や TRA-1-60 染色

ウエスタンブロットや RT-PCR での ES 細胞マーカーの発現確認 (Oct3/4、Rex1、Nanog 等)

ヌードマウスに皮下移植し奇形腫が形成されることの確認

#### 4. 研究成果

(1) CCD カメラ (アトー株式会社) の購入  
この機器を活用することにより、ウェスタン  
ブロット法・ゲルシフトアッセイ・サイトカ  
インアレイを立ち上げることができ、実験の  
幅が大きく広がった。

(2) ヒト肺癌細胞の上皮間葉転換モデルに  
おける mRNA・miRNA の網羅的発現解析  
ヒト肺癌細胞の上皮間葉転換モデルを活用  
して、上皮細胞の形質に特徴的な遺伝子発現  
プロファイルの抽出を試みた。

mRNA とマイクロ RNA (miRNA) のトランスクリ  
プトームの統合的解析により、上皮間葉転  
換を制御する、多彩な遺伝子・miRNA のセ  
ットを抽出することができた。この解析の過  
程で、パスウェイ解析・Gene Ontology 解析・  
GSEA・クラスタリングなどの、様々な in  
silico 解析手法を習得することができた。

(3) 様々な遺伝子導入法の比較検討  
アデノウイルス・レトロウイルス・レンチウ  
イルスの発現ベクターを作成し、GFP の発現  
をフローサイトメーターで検出して導入効  
率の検定を行った。

恒常的な発現を得るため、マウス ES 細胞・  
肺胞上皮細胞にはレトロウイルスが、ヒト  
iPS 細胞・肺癌細胞・線維芽細胞にはレンチ  
ウイルスが有効であることが確認できた。さ  
らにレンチウイルスベクターを用いて、  
TGF- $\beta$  に対する人工的 miRNA の発現システ  
ムを構築し、三次元共培養における効果を  
検証した。

エレクトロポレーションの条件検討も  
行い、低い細胞毒性と高い導入効率を得ら  
れる条件を見出した。TTF-1、TAZ、FOXA2  
の各遺伝子のクローニングを行って発現ベ  
クターを作成した。

(4) iPS 細胞の作出および分化誘導の試  
み  
ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、エピソーマ  
ルベクターを iPS 細胞研究所より入手し、  
エレクトロポレーションによって遺伝子導  
入し、iPS 細胞を独自に作出した。未分化  
マーカー (Oct3/4、SOX2 など) の発現を  
qRT-PCR で確認し、SSEA4・TRA-60 などの  
表面抗原を蛍光免疫染色で確認した。ゲノ  
ム PCR により、ベクター配列が染色体に  
組み込まれていないことも確認できた。



図 1. 自作の iPS 細胞 (ALP 染色陽性)

#### (5) iPS 細胞の多分化能の検定

多分化能の検定として、ヌードマウスでの奇  
形腫形成も行い、三胚葉系組織への分化を認  
めることができた (図 2)。iPS 細胞から気道  
上皮細胞への分化誘導を試みるため、阻害  
剤・増殖因子・ディッシュコーティングの条  
件検討を行った。メチル化阻害剤、HDAC 阻  
害剤の効果も検証し、一定の有効性を認め  
た。

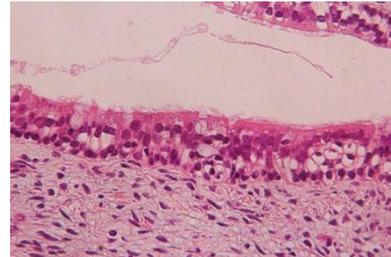


図 2. iPS 細胞から分化した線毛上皮

#### (6) 皮膚線維芽細胞への TTF-1・TAZ・FOXA2 遺伝子の導入

ヒト皮膚線維芽細胞に、エピソーマルベク  
ターを用いて TTF-1・TAZ・FoxA2 遺伝子を  
導入し (図 3) さらに肺上皮細胞用の培地でコ  
ラーゲン I コートディッシュにて培養を行っ  
たところ、肺上皮細胞のマーカーの上昇を  
qRT-PCR で確認した (図 4)。

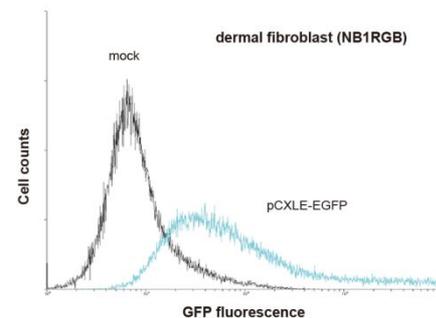


図 3. 皮膚線維芽細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入

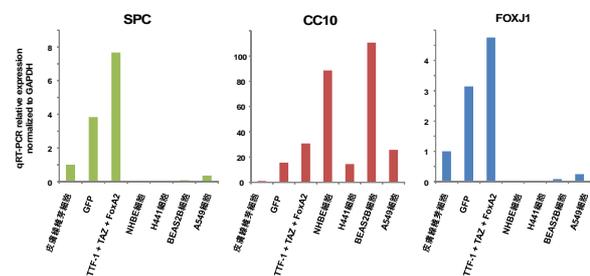


図 4. 皮膚線維芽細胞に GFP ないし  
TTF-1+TAZ+FOXA2 を遺伝子導入し、21 日後に  
qRT-PCR (ヒト気管支上皮細胞・肺癌細胞で  
の発現レベルと比較) を行うと、3 因子の導  
入で肺上皮細胞マーカーの発現上昇がみら  
れる。

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 5 件)

Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. *Exp Lung Res.* 2014 Jun;40(5):222-36. doi: 10.3109/01902148.2014.900155. 査読あり

Saito A, Suzuki HI, Horie M, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- and TNF- possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(2):e56587. doi:10.1371/annotation/874e0b87-0383-45ec-a250-3a4cd087dc86. 査読あり

Saito A. EMT and EndMT: regulated in similar ways? *J Biochem.* 2013;153(6):493-5. doi: 10.1093/jb/mvt032. 査読あり

Edlund K, Lindskog C, Saito A, Berglund A, Pontén F, Göransson-Kultima H, Isaksson A, Jirstrom K, Planck M, Johansson L, Lambe M, Holmberg L, Nyberg F, Ekman S, Bergqvist M, Landelius P, Lamberg K, Botling J, Ostman A, Micke P. CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2012;131(10):2264-73. doi: 10.1002/ijc.27518. 査読あり

Horie M, Saito A, Mikami Y, Ohshima M, Morishita Y, Nakajima J, Kohyama T, Nagase T. Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three-dimensional in vitro co-culture model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(1):158-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.104. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

Akira Saito. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF-beta and TNF-alpha possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells.

International Cancer Microenvironment Society 15/11/2012, Suzhou, China

Akira Saito. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF-beta and TNF-alpha possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *American Thoracic Society* 20/5/2013, Philadelphia, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

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

取得状況(計 0 件)

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

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
齋藤 朗(SAITO, Akira)  
東京大学 保健・健康推進本部 助教  
研究者番号: 90591412

(2)研究分担者  
該当なし( )  
研究者番号:

(3)連携研究者  
該当なし( )  
研究者番号: