

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791561

研究課題名（和文）II 型肺胞上皮及び iPS 細胞を利用した肺再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of lung regeneration therapy with alveolar type II pneumocytes and iPS cells

研究代表者

坂入 祐一（SAKAIRI YUICHI）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30551949

研究成果の概要（和文）：

ヒト肺から分離した細胞は、電子顕微鏡および蛍光免疫染色で II 型肺胞上皮細胞の特徴を持つことが確認された。これは培養とともに I 型肺胞上皮細胞の形質を有し、左肺全摘モデルに経気道投与したところ、注入した細胞の一部が肺胞壁に組み込まれたり、壁を形成していることが確認された。この細胞を解析し、iPS 細胞から肺幹細胞を誘導することを目指したプロジェクトを進めている。

研究成果の概要（英文）：

We established an isolation method for lung cells from human resected lung; we verified it as alveolar type II pneumocyte by the electron microscopy and fluorescent immunostaining. These cells were induced expressing the characteristics of alveolar type I pneumocyte by the culture. This human cell source was trans-tracheally injected to pneumonectomized rat, and the integration to rat alveolar wall and construction of new alveolar wall were confirmed. We started new project of differentiation induction from iPS cells to alveolar stem cells, based on the analysis of these isolated cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学、肺再生、II 型肺胞上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、肺の再生に関しては造血幹細胞や間葉系幹細胞、肺臓器固有幹細胞を内包する II 型肺胞上皮細胞（AT2）を用いて動物レベルで検討され始めた。肺の再生が限局的にでも実現すれば、難治性肺疾患に対する新しい治療法となり、低肺機能症例での肺外科治療の適応拡大につながる可能性を秘めている。しかしながら、肺は多くの細胞を含有する組織であり、様々な段階の分化能や再生能をもった細胞を含んでいる。肺再生を考えたときに、どの細胞をソースとして肺再生の機構を明らかにするかという点は長らく論争の的と

なっており未だ一定の見解がない状況である [Proc Am Thorac Soc, 2008]。そこで、肺の再生医学の源流である代償性肺成長（Compensatory lung growth: CLG） [Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol, 1892] に振り返った。我々はこれまで、肺切除後残存肺の経時的变化として報告されている①気道の過膨張、②肺血流の増加、③新しい肺胞形成に寄与する AT2 の増殖、④線維芽細胞や内皮細胞などの間葉系細胞の増加の確認を行うとともに、⑤不明な点が多い CLG の分子機序の解析、についてラットを用いて研究を重ねてきた [2009 年度研究課題番号:21791315 代表者:和田]。CLG には

増殖関連遺伝子群は術後1週がピークの発現増強を認めたものの、形態学的には肺胞数の増加はなく、肺胞の過膨張にとどまった結果をもとに、分化能力のある AT2 細胞の経気道移入実験を行い、移入細胞を気道に定着させることに成功した [第 63 回日本胸部外科学会総会発表：和田・坂入]。細胞治療の観点からは我々以前にも、ラットのプレオマイシン傷害肺に対して同種ラットの AT-2 細胞を気管内注入することで肺修復が促進されることが報告されているが [Am J Respir Crit Care Med, 2007]、ヒトの AT2 (hAT2) を利用した治療の研究はいまだ報告されていない。

一方、2006 年に山中らにより報告 [Cell, 2006] された iPS (induced pluripotent stem cells) 細胞は生命倫理上の問題点が少なく、必要遺伝子が限定されつつあり、臨床応用可能に近い世界的注目の体細胞由来の人工多能性幹細胞である。ヒトにおいても iPS 細胞が樹立できることが明らかになったが [Cell, 2007]、作成・管理は困難であり肺に関する報告はやはり見当たらない。

以上のような背景より、組織幹細胞の役割のある AT2 の解析と iPS 細胞を用いた基礎的研究は肺胞再生療法の開発に結び付き、臨床応用への足懸りとなる研究であり研究価値があるものと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) ヒト切除肺からの II 型肺胞上皮細胞分離方法を確立する。
- (2) 分化誘導培地を用いた I 型肺胞上皮細胞への分化誘導を行う。
- (3) 免疫不全マウスに対し左肺全摘を行い、ヒト II 型肺胞上皮細胞の異種移植 (気道移入) モデルを作成する。
- (4) iPS 細胞の培養系を確立し、肺に分化させる培養系の確立をめざす。

3. 研究の方法

- (1) hAT2 の分離培養
 - ① 同意を得た肺切除患者の新鮮切除肺を部分切除し、動静脈および気管支にカニューレーションしたのち、生理食塩水にて十分灌流する。
 - ② 得られた肺を 1mm 角に細かく破碎したのち、0.25% trypsin にて蛋白分解し、DNase (7500U/100ml) に溶解する。これを 77 μ m のフィルターを通し、濾過液を遠心 (250G/20min/10 $^{\circ}$ C) する。
 - ③ ペレットを DNase 処理 (2000U/25ml) し、さらに遠心 (250G/20min/10 $^{\circ}$ C) し、Lysis Buffer を 2 回反応させて赤血球を除去する。

- ④ Optiprep を用いた重層遠心分離法により不要な細胞を除去し、40 μ m のフィルターで濾過して培養液 (DCCM-1) に懸濁のうえ 37 $^{\circ}$ C で短期培養する。
- ⑤ 分離された細胞群は、蛍光免疫染色やフローサイトメトリーで SP-C, AQP5 などの分化関連マーカーの分布を確認する。透過性電子顕微鏡所見により、AT2 であることを確認する。

(2) hAT1 への分化誘導実験

- ① DCCM-1 にデキサメタゾンを追加した分化誘導培地で、hAT2 の分化能を検索する。短期培養後 1 日目の細胞群と、7 日間培養した細胞群に関して表面マーカーの変化を蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーを行い、末梢肺構成細胞への分化の有無を確認する。
- ② 培養に伴う遺伝子発現の変化を、分化関連マーカーに関する RNA の発現解析 (RT-PCR 法) やマイクロアレイを用いて検討する。

(3) 異種移植による肺胞構築能の検討

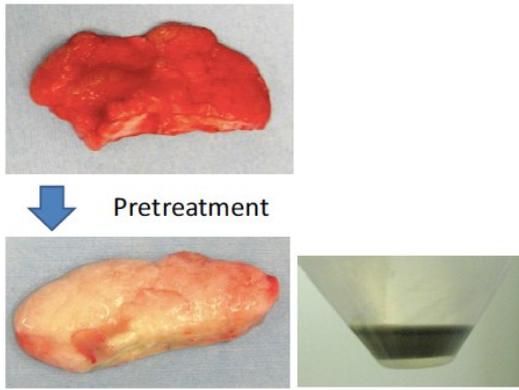
- ① 胸腺欠如ラット F344/NJcl-rnu/rnu (8 週齢) に対して、イソフルラン吸入による全身麻酔下に気管内挿管を行い、人工呼吸管理を行う。左第 4 肋間で開胸し、肺門の一括処理により左肺を切除し、肺全摘モデルを作成する (PNX: 肺全摘群および AT2/PNX: AT2 投与群)。
- ② 同様に、開胸のみ行う群 (Sham 群) を作成する。
- ③ 術翌日に、ヒト AT2 (分離培養後 1 日目または 7 日目) を気管内異種移入 ($2.5E+6$ /個体) し、1 ヶ月後に犠牲死することで異種移植モデル肺を作成する。
- ④ 上記 3 群 (PNX 群、hAT2/PNX 群、Sham 群) の右肺から病理組織学的な特徴を検索する。
- ⑤ AT2/PNX 群で得られたモデル肺に対し、ヒト特異的抗体を用いた免疫染色やヒト特異的配列を PCR 法で検索し、投与した AT2 の存在を確認する。

(4) iPS 細胞の培養系

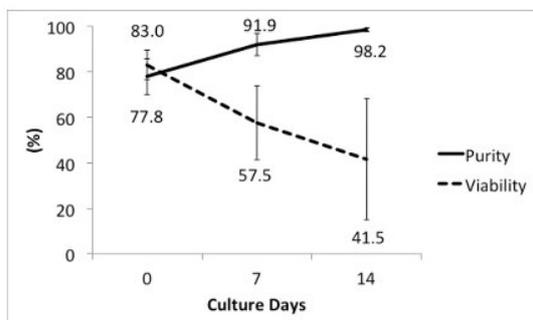
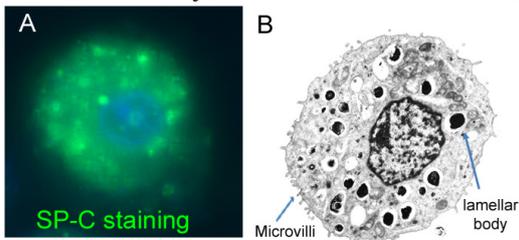
- ① ヒト由来の iPS 細胞株 (253G1) $3.0E+6$ の細胞を Rock inhibitor を添加した m-TeSR に懸濁し、37 $^{\circ}$ C/5%CO₂ で培養する。iPS としての多能性を保持したまま培養できる安定した培養系を確立する。

4. 研究成果

結果 (1) hAT2 の分離および培養



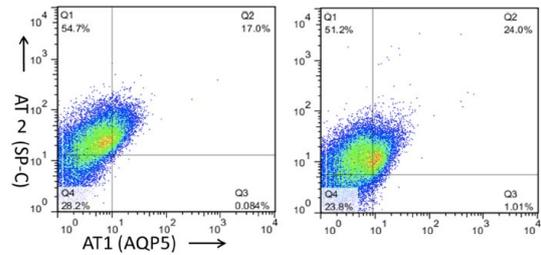
ヒト切除肺の一部を十分に前処理することで、黒灰色の細胞を単離した。これらの細胞に対し、II型肺胞上皮細胞に特異的に発現していると言われていた SP-C (サーファクタントプロテイン C) に対する蛍光免疫染色を行ったところ、下図Aのとおり細胞質内にまばらに高輝度を呈した陽性細胞を確認できた。電子顕微鏡では下図Bのとおり II 型肺胞上皮細胞に特徴的と言われる Microvilli や Lamellar body が検出された。



SP-C 陽性細胞をもとにして計算した AT2 の純度は7日間の短期培養後で91.9%に上昇したものの、培養とともにその viability は低下傾向にあった。

培養とともに数は減少傾向にあるものの、短期的な培養で純度を上げることが可能であった。

結果(2) 分化誘導実験



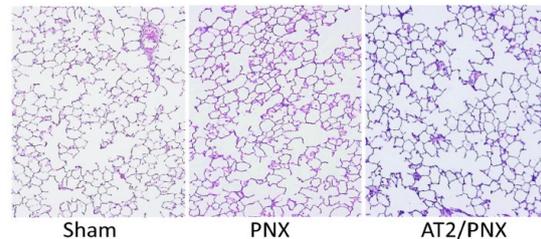
7日間の培養で、II型肺胞上皮細胞の表面マーカーである SP-C および I 型肺胞上皮細胞のマーカーである AQP5 の推移を、フローサイトメトリーを用いて検証した。SP-C を発現したまま AQP5 を発現する細胞が増加しており SP-C 陽性細胞中の AQP5 陽性細胞の割合は増加傾向にあった。

GO:	Gene	Fold Change
0060510	<i>TTF-1</i>	+1.03
AT2	<i>Gata6</i>	-4.64
differentiation	<i>FGF10</i>	-1.13

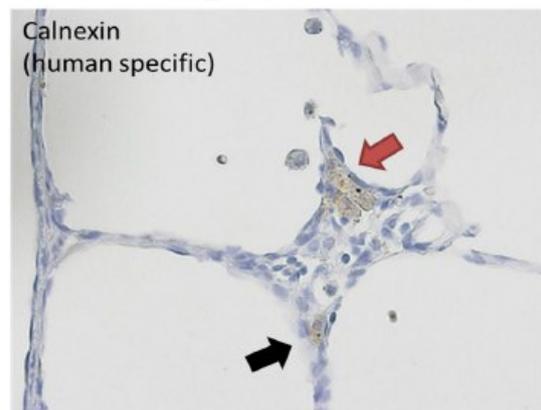
また、マイクロアレイのデータのうち、GOタームによる分類を行ったところ AT2 分化に関係した遺伝子の発現レベルが培養とともに低下していることが確認された。

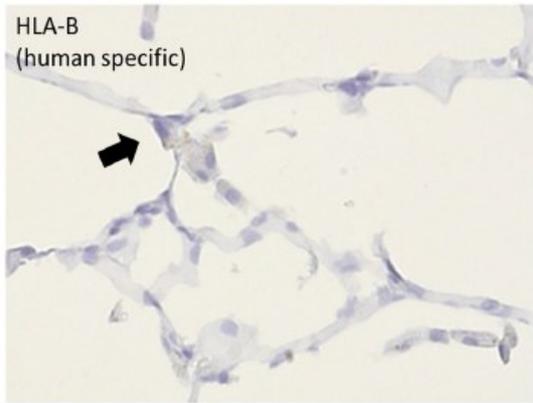
今回の条件で培養したところ、AT2 としての形質を維持する一方、一部の細胞は AT1 に分化し AT1 および AT2 両方の形質を持つ細胞となったことが確認された。

結果(3) 異種細胞移入モデル

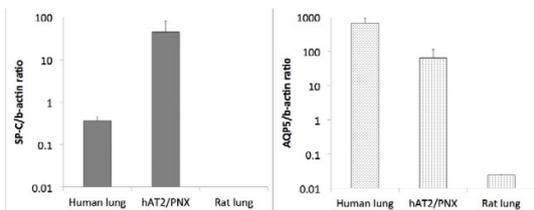


HE 染色標本による組織学的な検索において、試験開胸、全摘、全摘後細胞投与の3群間に明らかな差は認められなかった。

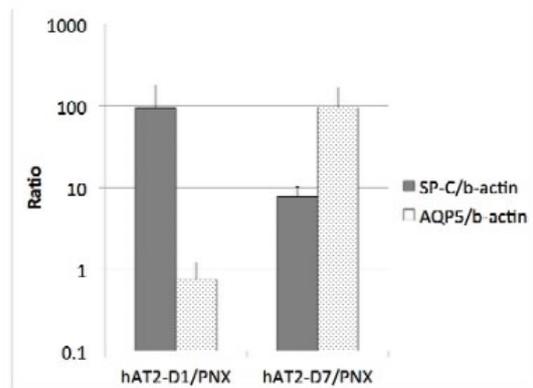




しかし全摘後に細胞投与を行ったラットの肺に対して、ヒト特異的な抗体を用いて投与細胞の検出を行ったところ、肺胞内に組み込まれている細胞（黒矢印）のほか、ごく少数ながら肺胞壁の一部を形成している像（赤矢印）も確認された。



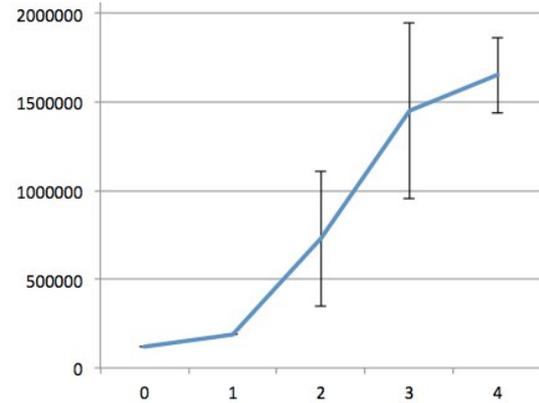
さらに RT-PCR で AT2 移入後の肺の遺伝子発現を確認したところ、ヒト特異的なプライマーで AT1 (AQP5: 右)、AT2 (SP-C: 左) 両方のマーカーが発現していることが確認された。



培養後 1 日目の細胞を投与した群 (hAT2-D1/PNX) に比べて、培養後 7 日目の細胞を投与した群 (hAT2-D7/PNX) では AQP5 の発現が高かった。経気道投与前にしばらく培養することで、分化の方向性につき肺胞構築をとりやすくなっている可能性がある。

本研究で得られた AT2 を主とする細胞ソースは肺胞構築能を有しており、術後肺に AT2 を補充することは肺手術後の再生や保護に有用となる可能性が示唆された。

結果 (4) iPS 細胞の安定培養



培養開始後、約 4 日でコンフルエントに達した。現在、条件を統一し安定した培養・継代することが可能となった。

これらの iPS 細胞をもとにした II 型肺胞上皮細胞の分化誘導法の確立、および人工的に作成された cell source を用いて同様のモデルを作成し、肺胞上皮細胞としての機能の検証、さらに miRNA をもとにした癌化および分化調整因子の解析を次の研究課題 (#20648349) にて継続して検討中である。

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)

[学会発表] (計 5 件)

① 坂入祐一、和田啓伸、吉田成利、豊田行英、畑敦、田中教久、山本高義、森本淳一、鎌田稔子、千代雅子、長門芳、山田義人、岩田剛和、田川哲三、溝渕輝明、本橋新一郎、吉野一郎、II 型肺胞上皮を用いた肺再生・保護療法を目指した基礎研究、第 11 回日本再生医療学会、2012 年 06 月 12 日～2012 年 06 月 14 日、横浜

② 坂入祐一、和田啓伸、吉田成利、豊田行英、畑敦、山本高義、田中教久、鎌田稔子、森本淳一、長門芳、鈴木秀海、山田義人、岩田剛和、田川哲三、千代雅子、溝渕輝明、本橋新一郎、吉野一郎、呼吸器外科手術における肺再生・保護療法を目指した基礎研究、第 29 回日本呼吸器外科学会総会、2012 年 05 月 17 日～2012 年 05 月 18 日、秋田

③ 坂入祐一、和田啓伸、吉田成利、豊田行英、畑敦、山本高義、鎌田稔子、森本淳一、鈴木秀海、山田義人、岩田剛和、田川哲三、千代雅子、溝渕輝明、本橋新一郎、吉野一郎、異種細胞の気管内移入による肺再生モデルの作成、第 112 回日本外科学会総会、2012 年 04 月 12 日～2012 年 04 月 14 日、千葉

④ 坂入祐一、和田啓伸、吉田成利、稲毛輝長、森本淳一、石橋史博、岩田剛和、千代雅子、

溝渕輝明、米谷卓郎、守屋康充、星野英久、
本橋新一郎、吉野一郎、ヒト肺細胞の気管内
移入による肺再生モデルラットの作成、第28
回 日本肺および心肺移植研究会、2012年1
月28日、仙台

⑤ Yuichi Sakairi, Hironobu Wada,
Shigetoshi Yoshida, Jyunichi Morimoto,
Yoshito Yamada, Takekazu Iwata, Masako
Chiyo, Teruaki Mizobuchi, Shinichiro
Motohashi, Ichiro Yoshino, Isolation
method of human alveolar type II cells for
the lung regeneration therapy, The 64th
Annual Scientific Meeting of JATS, 2011
年10月9日-11日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂入 祐一 (SAKAIRI YUICHI)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30551949