

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659396

研究課題名(和文) iPS細胞による臓器肺再生の試み

研究課題名(英文) A challenge of lung regeneration by iPS cells

研究代表者

西條 康夫 (SAIJO, YASUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10270828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肺スキャフォールドに、肺胞上皮細胞へと分化させたiPS細胞を移植したところ、肺胞構造の再構築が認められ、肺胞II型細胞マーカーSP-Cおよび肺胞I型細胞マーカーT1aの発現が確認された。次にブレオマイシンによる肺傷害モデルマウスに分化iPS細胞を移入してその効果を解析した。気管支肺胞洗浄ではTNF-aやIL-6が正常肺レベルまで減少していた。組織学的にも肺の線維化の抑制が確認された。一方、PKH26でラベルした分化iPS細胞が移入12日後には少数の分化iPS細胞が肺胞上皮細胞として生存していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We transplanted alveolar differentiated iPS cells into the lung scaffolds. After 12 days culture in vitro, Differentiated iPS cells reconstructed the alveoli and over 10% cells were positive for SPC or T1a. In the bleomycin-induced lung injury model mouse, the cells were transplanted intratracheally. Bronchoalveolar lavage demonstrated IL-6 and TNF-a were drastically suppressed in the differentiated iPS cells group compared to the controls. Fibrotic changes were also suppressed in differentiated iPS cells group. SPC+/PKH26+ or T1a+/PKH26+ cells were observed in the differentiated iPS cells group, but positive cells were quite few. In this study, we demonstrated that alveolar differentiated iPS cells could reconstruct alveoli of the lung scaffold, and ameliorate lung fibrosis in the bleomycin-induced lung injury model mouse.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：iPS細胞 肺再生 肺障害

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を用いることにより、臓器再生研究が加速し、心筋や神経細胞・すい臓細胞への分化誘導に成功している。ES 細胞から複数の因子を培地に加えることにより、肺上皮細胞への分化が報告されているが効率は低い。肺は、肝臓や心臓のようにほぼ単一細胞からなる単純な臓器とは違い、複数の細胞種と立体的な3次元構造を持つ複雑な臓器である。そのため、気道系と血管系が複雑に入り組んだスカフォールドが必要である。ラット肺から細胞成分のみ除去したスカフォールドに、肺上皮細胞を気道系に、血管内皮細胞を血管系に移植し、肺組織を再構築し、更にはラットに戻すことにより、呼吸機能を再生させることに成功したとする画期的な報告がなされた。申請者らは、2年前よりマウス iPS 細胞研究を開始し、ES 細胞からの肺上皮細胞分化研究の実験条件を基に、*in vitro* における肺上皮細胞への分化を試みた。その結果、8%前後の細胞に SP-C 蛋白の発現が確認され、確かに肺上皮細胞への分化が可能であることを確信した。

2. 研究の目的

本研究では既に確立した iPS 細胞から *in vitro* で肺胞 II 型上皮細胞への分化誘導系を用いて肺再構築の可能性を検討する。具体的には、iPS 細胞に各種因子を加えず内胚葉系へと分化させ、さらに培地および因子を変えて、肺胞上皮細胞へ分化させる。また、マウス肺組織から無細胞のスカフォールドを作成し、スカフォールドに、iPS 細胞から分化した肺上皮細胞を気道系に移植し、肺組織の再生を試みる。2年目には、ブレオマイシン肺障害モデルマウスに肺胞上皮細胞へと分化させた iPS 細胞を移入し、その効果を解析する。

3. 研究の方法

1) マウス iPS 細胞の肺胞上皮細胞への分化誘導と肺胞上皮細胞マーカーの確認

マウス iPS 細胞の培地に Activin と Wnt3a を加えることにより、内胚葉へと分化させ、次のステップとして、SABM 培地に FGF2 を加えて更に培養を継続する。その後肺胞 II 型上皮細胞マーカーである、SP-A,B,C,D、肺胞 I 型上皮細胞マーカーであるアクアポリン、気道上皮マーカーである CCSP の発現をリアルタイム PCR で mRNA レベルで確認する。また、免疫蛍光法を用いて、SP-C や CCSP の発現を検討する。

2) 肺スカフォールドの作成と *in vitro* 肺再構築

摘出肺の気道から SDS と Triton-X を含む溶液を注入し細胞成分を取り除いた肺スカフォールドを作成する。このスカフォールドに肺胞上皮細胞に分化させた iPS 細胞を気道から移植し、厚さ 2mm に切り、培養を継続する。培養継続した肺を固定して組織学的に肺の再構築について解析する。

3) 分化 iPS による肺障害モデルの移植

マウスにブレオマイシンを腹腔内投与し、肺障害を誘発する。翌日に肺胞上皮へ分化させた iPS 細胞を経気道的に移入する。移入 12 日後に、気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液における細胞成分と炎症性サイトカインである TNF- α と IL-6 濃度を解析する。また、胚組織における炎症や線維化の程度、肺胞上皮細胞の状態を組織学的に解析する。移入した分化 iPS 細胞が肺胞上皮細胞として生着しているか解析する。

4. 研究成果

1) *In vitro* における肺の再構築

無細胞化した肺スカフォールドに、分化させた iPS 細胞を移入し、培養を継続した (Figure 1A)。その結果、分化 iPS 細胞はスカフォールドに生着し、肺胞上皮細胞様の形態を示した。一方、線維芽細胞は肺胞間質

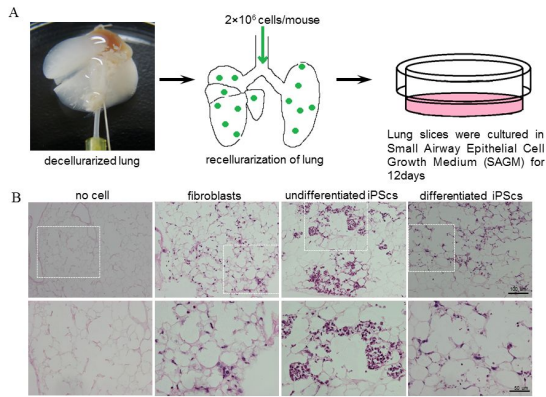


Figure 1. Recellularization of mouse lung

A: A photo and schematic illustration of decellularization and recellularization **B:** HE staining of sections of a decellularized mouse lung scaffold (no cell) and recellularized lung tissues reseeded with fibroblasts, undifferentiated iPSCs, or differentiated iPSCs on D12. Bottom panels show magnified views of the dotted line areas in upper panels.

に生着し、未分化 iPS 細胞は肺胞内にコロニーを形成していた (Figure 1B)。組織を肺胞 II 型細胞マーカー SPC と I 型マーカー T1a で染色を行ったところ、線維芽細胞移植群で全く染色されず、未分化 iPS 細胞移植群では極めて少数の陽性細胞を認めるのみであったが、分化 iPS 細胞群では陽性細胞を多数認め、約 13% の細胞が SPC 陽性であった。

2) プレオマイシン肺障害マウスへの分化 iPS 細胞移植効果

プレオマイシン肺障害モデルマウスに、経気道的に、PKH26 (赤色) でラベルした細胞を移入した。移入 12 日後に、肺を取り出して、移入細胞を観察した。線維芽細胞や未分化 iPS 細胞では肺内に移入細胞を認めるが、肺上皮細胞への分化は認めなかった。一方、分化 iPS 細胞群では、SPC 陽性細胞を認め、肺上皮として生着していることが示されたが、その数は少なかった。2 型肺胞上皮細胞数は他の群に比べて増えていた。

次に肺の線維化を検討したところ、分化 iPS 細胞投与群で、肺線維化の抑制が、Sirius Red/Fast Green 染色および Hydroxyprolin 定量で確認された (Figure 2)。

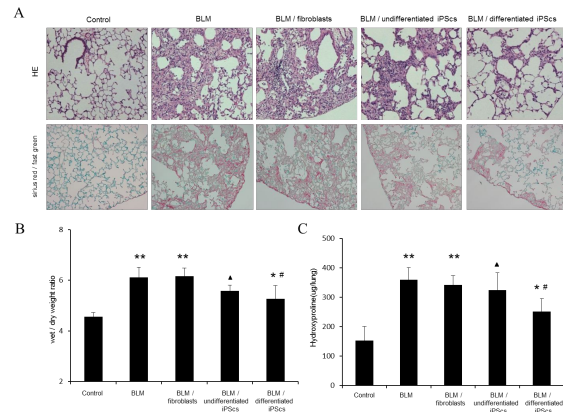


Figure 2. Amelioration of lung fibrosis by transplantation of iPSCs-derived AECs in BLM-treated mice.

Following intratracheal exposure of normal saline or 4U/kg BLM, fibroblasts, undifferentiated iPSCs, or differentiated iPSCs were instilled intratracheally into mice on day 2. The lung tissues were excised on day 12. **A:** HE and Sirius red/Fast green staining of lung sections. **B:** The wet/dry ratio of lungs on day 12. **C:** Collagen deposition in lung tissue was evaluated qualitatively by hydroxyproline assay.

更に、気管支肺胞洗浄を行ったところ、分化 iPS 細胞群で、好中球数の減少と炎症性サイトカインである TNF-a と IL-6 が base line まで低下していた (Figure 5)。一方、線維芽細胞では治療効果を認めず、未分化 iPS 細胞群では、軽度の低下を示すのみであった。移入した分化 iPS 細胞が生着して肺障害から回復させる以外に何らかの因子を分泌し、炎症を抑え、回復を促進している可能性が示唆された。

これらの実験結果から、肺胞上皮細胞へ分化させた iPS 細胞と肺スキャフォールドを用いて、肺の再構築が可能であること、肺障害モデルマウスに移入することで、生着を認め、肺障害の回復に寄与することが明らかと

なった。

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 1 件)

Zhou Q, Ye X, Sun R, Matsumoto Y, Moriyama M, Asano Y, Ajioka Y, Saijo Y. Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Into Alveolar Epithelial Cells In Vitro for Use In Vivo. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Apr 24. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 1 件)

ZHOU QILIANG, YE XULU, SUN RUOWEN, 松本吉史、浅野義哉、西條康夫。マウス iPS 細胞における肺上皮細胞への分化誘導 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 22 日 パシフィコ横浜

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

西條 康夫 (SAIJO YASUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 10270828

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: