

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670606

研究課題名(和文) 傷害肺におけるiPS細胞を用いた肺胞再生療法の開発研究

研究課題名(英文) The study of lung regenerative medicine for the damaged lung by iPS cells

研究代表者

山本 高義 (YAMAMOTO, Takayoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・呼吸器外科・医長

研究者番号：20648349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はiPS細胞から肺幹細胞とされるⅡ型肺胞上皮細胞を効率的に分化・誘導し、疾患モデルマウスへ経気道的に移植、その治療効果を検討することを目標としている。研究期間において、マウスiPS細胞、ヒトiPS細胞の安定的な培養方法の確立、Ⅱ型肺胞上皮細胞への分化誘導を促進するとされる培養液を作成した。また、Ⅱ型肺胞上皮細胞に特異的とされるSP-Cを標識できる遺伝子を作成した。虚血再灌流障害マウスモデルの作成を行い、現在はAllograftでの同所性肺移植による慢性拒絶モデルマウスの作成実験を継続中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose is that we differentiate and induce the alveolar type Ⅱ cell. We transplant these cells to disease model mouse by air way and discuss the effect. In this duration, we could stable passage the mouse iPS cells and human iPS cells and produce the medium to differentiate and induce to the alveolar type Ⅱ cells. And we made the specific gene which could label the SP-C protein. We now make the ischemic and reperfusion mouse model, we continue to make the experiments of the chronic immunological rejection model mouse by allograft lung transplantation.

研究分野：肺再生

キーワード：肺再生 iPS マウス 肺移植

### 1. 研究開始当初の背景

肺疾患は世界的にも有病率、死亡率が高く、実際に肺移植をしなければ救命できないケースが多い。ドナー不足もあり十分な結果は残せていないが、肺を再生、作成できれば解決できる問題とされている。しかし、肺は、構造が複雑、間質を構成する細胞が多種多様、損傷部の修復におけるメカニズムが完全には解明されていないことから、肺の再生医療は他臓器に比べて遅れている。

肺の再生医学の源流は、約100年前の肺部分切除後の代償性肺成長の研究に始まる。機械的牽引をトリガーとして、様々な成長因子により促進されることが報告されているが、詳細な分子機序は不明であり、真の肺再生を伴う変化であるか否かが議論となっていた。一方、肺の再生で重要な役割を果たすと考えられる幹細胞は領域によって異なると考えられており、肺胞の傷害時には型肺胞上皮細胞が増殖し型肺胞上皮細胞に分化して肺胞上皮を修復することから型肺胞上皮細胞が肺胞レベルの幹細胞の役割をもつと考えられている。以上のような背景のなか、これまで肺再生療法の細胞ソースは骨髄由来幹細胞(BMSC)や間葉系幹細胞(MSC)が中心で、型肺胞上皮細胞を用いた肺再生モデルはBleomycinによる傷害肺に対して肺修復を促進させたとする報告のみであった。そしてヒトの型肺胞上皮細胞を利用した治療の研究はいまだ報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

2006年に山中らにより報告されたiPS細胞は生命倫理上の問題点が少なく、臨床応用の可能性をもつ人工多能性幹細胞である。ヒト細胞からもiPS細胞が樹立できることが明らかになり、心筋細胞などに分化誘導することが可能であると報告されつつあったが、当時iPS細胞から肺を分化誘導した報告はなかった。そこで、我々は肺再生に重要な役割を果たすと考えられる型肺胞上皮細胞に限定して分化誘導を試みることを検討した。ヒトES細胞から型肺胞上皮細胞などの肺胞細胞の分化誘導の一手法が報告された。この方法を応用することに加え、我々の研究室で得たヒト型肺胞上皮細胞のマイクロアレイデータを解析し、必要な因子を同定したのちにヒトiPS細胞に導入することで、安全かつ効率的なヒトiPSからの型肺胞上皮細胞分化誘導法を確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

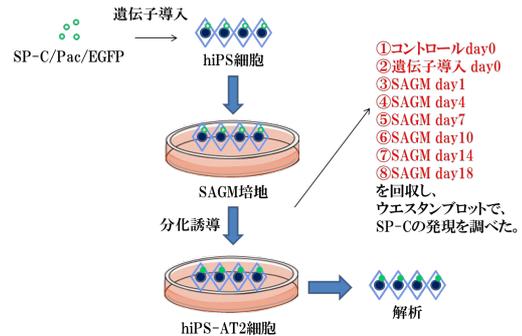
マウスiPS細胞、ヒトiPS細胞の安定的な培養方法の確立、型肺胞上皮細胞への分化誘導を促進するとされるSAGM(small airway growth medium)の調整を行った。

型肺胞上皮細胞に特徴的とされるSP-C遺伝子が発現した際に、リアルタイムで標識できるようにするため、SP-C/Pac/EGFP遺伝子

を作成した。

ヒトiPS細胞に上記遺伝子を遺伝子導入し、SAGM培地で分化誘導を行い、ヒトiPS細胞由来の型肺胞上皮細胞を作成し、時期に応じて細胞を採取し、ウエスタンブロットでSP-Cの発現を解析した。(図1)

図1

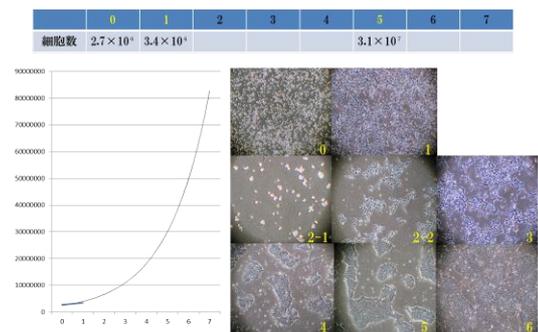


肺疾患モデルのマウスの作成を行い、経気道的にiPS細胞由来の型肺胞上皮細胞を注入し、効果を判定することを目指した。

### 4. 研究成果

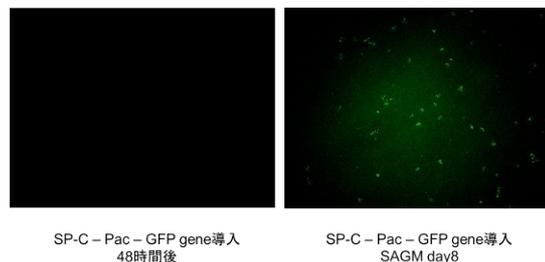
ヒトiPS細胞の安定的な培養方法を確立した。(図2)

図2



SP-C/Pac/EGFP遺伝子は、puromycinで選別することも可能とし、最終的な型肺胞上皮細胞が得られた際の回収率の向上が望めると考えられた。実際に、ヒトiPS細胞に遺伝子導入後、SAGMで分化誘導を行い、day8の段階で蛍光顕微鏡において発色することを確認した。(図3)

図3



SP-C - Pac - GFP gene導入  
48時間後

SP-C - Pac - GFP gene導入  
SAGM day8

SAGM 分化誘導前、分化誘導後の複数のタイミングで採取した細胞を、蛍光顕微鏡で SP-C の発現を確認するとともに ( 図 4 )、コントロールとしての Beta actin と、SP-C に対してウエスタンブロットを行い、培養 10 日目、14 日目のタイミングで SP-C の発現を確認した。( 図 5 )

図 4

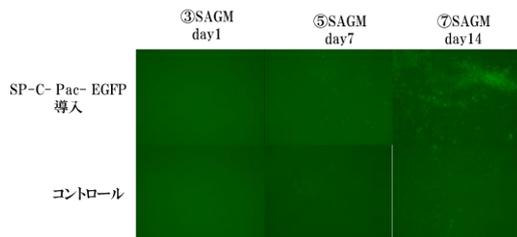
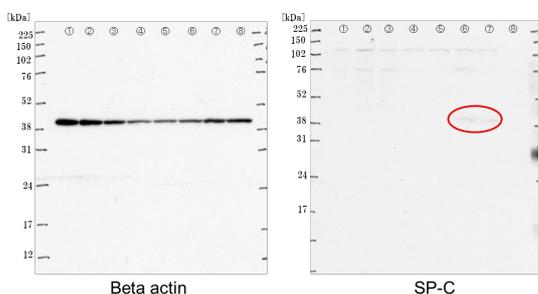


図 5



SP-C に対するウエスタンブロットにおいて、SAGM 分化培養 10、14、18 日目において、40 と 42kDa の分子量が確認できた。Anti-SP-C は 20kDa で検出されるといわれるが、2 量体の状態で検出されたものと考えられた。( 表 1 )

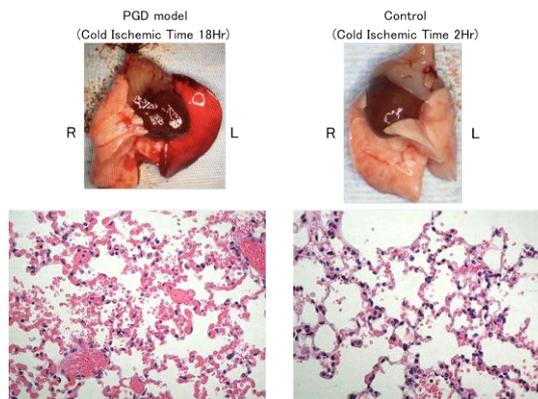
表 1・定量値

分子量 kDa	150	120	90	75	60	45	42	40	20
No.1		168		84					
No.2		416		199		77			
No.3		235		212		52			
No.4		216		71					
No.5		258		87					
No.6		265		243			51	399	
No.7		160		103			50	369	
No.8								48	

単位: pixels

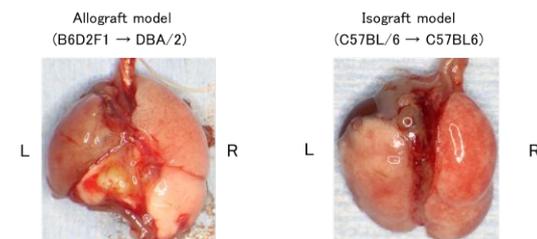
我々がこれまでに報告したカフテクニックを用いたラット肺移植の手技を応用し、マウスにおける同所性肺移植の手技を確立した。Cold ischemic time を管理することで、虚血再灌流障害マウスモデルの作成を行った。( 図 6 )

図 6



続いて、現在は Allograft での同所性肺移植による慢性拒絶モデルマウスの作成実験を継続中である。( 図 7 )

図 7



現在実験中であるマウス iPS からの 2 型肺胞上皮細胞の高収率での誘導が確立され次第、肺疾患マウスモデルに対する経気道投与を行い、治療効果を多角的な肺解析により検証予定である。

## 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 2 件 )

椎名裕樹、坂入祐一、鈴木秀海、伊藤祐輝、佐田諭己、畑敦、豊田行英、稲毛輝長、田中教久、藤原大樹、和田啓伸、中島崇裕、岩田剛和、千代雅子、吉野一郎  
iPS 細胞からの肺前駆細胞の誘導と、虚血再灌流障害に対する投与療法の試み  
第 1350 回千葉医学会 平成 28 年度第 15 回千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学 教室例会  
2017/2/11 千葉大学医学部附属病院ガ-ネットホール ( 千葉県千葉市 )

山本高義、坂入祐一、稲毛輝長、尹貴正、田中教久、鎌田稔子、森本淳一、中島崇裕、鈴木秀海、田川哲三、岩田剛和、溝淵輝明、吉田成利、吉野一郎  
iPS 細胞による 2 型肺胞上皮細胞の誘導の試み  
第 1262 回千葉医学会 平成 26 年度第 13

回千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病  
態外科学 教室例会  
2014/2/1 千葉大学亥鼻キャンパス/薬  
学部 120 周年記念講堂 (千葉県千葉市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山本 高義 (YAMAMOTO, Takayoshi )  
千葉県がんセンター・呼吸器外科・医長  
研究者番号 : 20648349

### (4)研究協力者

椎名 裕樹 (SHIINA, Yuuki )  
千葉大学・大学院医学研究院・医員  
研究者番号 : 30782304