

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670422

研究課題名(和文) 特異的転写因子発現による肺細胞への分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Direct reprogramming into pulmonary alveolar epithelial cells by defined transcription factors

研究代表者

斎藤 史武 (SAITO, Fumitake)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：30338040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞を起点として幹細胞を経ずに目的の細胞を直接的に誘導する手法(直接リプログラミング法)が、幹細胞を用いない新たな再生医療の手法として近年報告されている。我々はマウス線維芽細胞に3または4個の特異的因子遺伝子を強制発現させ培養した細胞が、II型肺胞上皮細胞に特異的なマーカーであるSurfactant Protein C (SP-C)を発現していることを免疫染色で確認した。さらにそれらの細胞内にII型肺胞上皮細胞に特異的とされるLamellar bodyの存在を電子顕微鏡で確認した。これらの結果から、直接リプログラミング法によってII型肺胞上皮細胞が誘導されたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming has been reported recently as one of the new methods of regenerative medicine. By direct reprogramming method, somatic cells are converted into other types of cells directly, not using stem cells. We induced 3 or 4 selected factors into fibroblasts of mice. After culturing, the induced cells were found to express Surfactant Protein C, which is a specific marker of type II alveolar cell (AT II) by immunofluorescence staining. The presence of "lamellar body", which is known as a specific structure of AT II, was detected in the cytoplasm of these induced cells by electron microscopy. These results suggested that induced AT II was obtained by direct reprogramming method.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：再生医療 リプログラミング 肺胞上皮

1. 研究開始当初の背景

再生医療において、再生する臓器・組織を構成する細胞を得ることは非常に重要である。従来は、胚性幹細胞や多能性幹細胞のような幹細胞を使用し、それらを起点として発生の各段階を辿るようにして培養条件を変更することで分化誘導を行い、最終的に目的の細胞を得る手法が主として用いられてきた。他方、体細胞を起点として、幹細胞を経ずに目的の細胞を直接的に誘導する手法である、「直接リプログラミング法」が、心筋細胞(文献)、肝細胞(文献)、神経細胞(文献)などにおいて近年報告されている。この手法は、分化誘導にかかる時間の長さや複雑さといった、従来からの再生医療の課題を解決する可能性を孕んでいる。これまでに、直接リプログラミング法によって肺の細胞を分化誘導させた文献上の報告はなされていない。再生医療が現実のものとして臨床応用されるために、シンプルで効率的な再生医療の手法は必須であり、これを具現化するにあたって、直接リプログラミング法による肺細胞の誘導法を探索することは一助となりうる。

2. 研究の目的

直接リプログラミング法によって、マウス線維芽細胞から肺上皮細胞を誘導することを目的とした。

すでに我々は予備実験にてマウス肺の発生に深く関連するとされる 14 の転写因子の中から、特に重要な 4 個の因子を選定した。これらの因子をマウス線維芽細胞に強制発現させ、培養を継続することによって分化誘導し、種々の方法にて得られた細胞のフェノタイプを特定、肺上皮細胞、特に II 型肺胞上皮細胞を得る手法を開発することを目指した。さらには、効率の良い培養条件を確定することを目的とした。

3. 研究の方法

前述のように、我々は予備実験にて、マウス発生に関連する転写因子の中から特に重要な 4 個の転写因子を選定した。これらの 4 個の転写因子の遺伝子を仔マウスの尾部由来の線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させることによって、II 型肺胞上皮細胞のマーカーである SP-C の mRNA 発現が、コントロールに対し 2000 倍以上に上昇することを見出した。

本研究では、SPC-GFP マウス (SP-C 依存性に GFP が共発現するトランスジェニックマウス) の胚性線維芽細胞を用いて、同様のプロトコルにて 4 因子を強制発現させ、さらに 3 次元培養を行うことで分化誘導を試みた。得られた細胞は、免疫染色にて GFP の発現を評価し、さらに SP-C の mRNA 発現を RT-PCR で評価した。また、電子顕微鏡にて、誘導細胞の形態を評価した。

これらの方法で得られた所見をもとに、肺上皮細胞を直接リプログラミング法によって得るための導入因子を確定し、さらに効率的な培養条件・培養期間などを検討した。

4. 研究成果

(1) 前述した選定済みの 4 因子を、レトロウイルスベクターを用いてマウス胚性線維芽細胞に導入して強制発現させ、マトリゲルを用いた 3 次元培養を行った。得られた培養細胞を免疫染色で評価したところ、SP-C 発現を示唆する GFP の発現は確認されなかった。

(2) 3 次元培養で使用する培地内に、Keratinocyte growth factor 等の液性因子を混合し、同様のプロトコルで培養を行ったところ、誘導した細胞の一部が GFP 陽性を示した。GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーでソーティングして免疫染色を行ったところ、SP-C および上皮細胞のマーカーである E-cadherin が陽性であること、間葉系のマーカーである Vimentin が陰性であること、ならびに RT-PCR にて SP-C が高発現していることが確認された。

(3) フローサイトメトリーにてソーティングした GFP 陽性細胞を電子顕微鏡にて形態学的に評価した。サーファクタントプロテインを産生する細胞内小器官とされる Lamellar body と考えられる層状の構造物が細胞質に存在することが確認された。これらの層状構造物は SPC-GFP マウスの肺から GFP 陽性細胞をソーティングすることによって得た II 型肺胞上皮細胞内に存在する層状構造物と類似した。その一方で分化誘導を行う前のマウスの胚性線維芽細胞内にそのような構造物は確認されなかった。これらの所見から、我々が誘導した細胞は形態的に II 型肺胞上皮細胞の特徴を有することが示唆された。

(4) 効果的な培養条件の検討として、低酸素条件下での培養、Feeder 細胞を添加した培養、低 Glucose 濃度の培地を用いた培養など

を検討したが、いずれも条件でも明らかな GFP 陽性細胞誘導効率の上昇効果を得られなかった。

(5) 選定した4因子から1因子を除外した3因子を同様にマウス胚性線維芽細胞に導入し同様の方法で強制発現させた。4因子での操作と同様に、液性因子を混合した培地を使用し3次元培養を行った。約14日の培養期間を経て、3因子導入線維芽細胞はGFP陽性の細胞集塊を形成した。これらの細胞集塊を構成する細胞は、SP-CとE-cadherinが陽性でVimentinが陰性であることが免疫染色にて確認された。誘導細胞が細胞集塊を形成することは、これらの細胞が自己増殖能を有することを示唆すると考えられた。

今後、今回の方法によって示唆された誘導効率のさらなる上昇のための培養条件の検討、および誘導細胞の詳細な機能評価を行う予定である。ヒト線維芽細胞への適用、およびin vivoへの応用法の開発に着手する予定である。

<引用文献>

Ieda M, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell. 2010; 142: 375-386

Sekiya S, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. Nature 2011; 475: 390-393

Vierbuchen T, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature 2010; 463: 1035-1041

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0件)

[学会発表](計2件)

四倉 正也, 石井 誠, 齋藤 史武, 家田 真樹, 浅村 尚生, 別役 智子「直接リプログラミングによる肺上皮細胞の分化誘導法の検討」第55回日本呼吸器学会学術集会 2015年4月27日 東京国際フォーラム(ミニシンポジウム)

四倉 正也, 石井 誠, 齋藤 史武, Ahmed E. Hegab, 浜本 純子, 南宮 湖, 家田 真樹, 浅村 尚生, 別役 智子「直接リプログラミングによる肺上皮細胞の分化誘導法の検討」第56回日本呼吸器学会学術集会 2016年4月8日 国立京都国際会館(ミニシンポジウム)

[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

齋藤 史武 (SAITO Fumitake)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 30338040

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

(4)研究協力者

四倉 正也 (YOTSUKURA Masaya)
慶應義塾大学・医学部・呼吸器外科・助教

石井 誠 (ISHII Makoto)
慶應義塾大学・医学部・講師

家田 真樹 (IEDA Masaki)
慶應義塾大学・医学部・講師