

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02537

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた肺の臓器再生と疾患病態解明のための革新的バイオリソースの開発

研究課題名(英文) Application of iPS cell technology to lung regeneration and development of bioresource for elucidating the mechanisms of lung diseases

研究代表者

三嶋 理晃 (Michiaki, Mishima)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：60190625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞は細胞株によって分化効率が異なり、応用研究における大きなハードルだったが、表面抗原Carboxypeptidase Mを利用して呼吸器上皮幹細胞を単離し、三次元培養を行なって分化促進することで、気道や肺胞上皮細胞に安定して効率よく分化誘導が可能となった。II型肺胞上皮細胞については長期培養も可能になり、線維芽細胞との共培養なしでも分化誘導が可能となった。これを用いて、iPS細胞由来のII型肺胞上皮細胞を免疫不全マウスにオルガノイドとして移植する方法の開発を進め、疾患モデリングについては薬剤性肺障害、気道疾患、肺線維症、肺がんに対する領域別の応用研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：It has been troublesome to differentiate various human iPS cell lines into lung lineage cells, because different cell lines have different capacity of differentiation. In this project, we have established the robust and efficient methods of generating functional airway and alveolar epithelial cells from various human iPS cell lines by using Carboxypeptidase M-based lung progenitor cell sorting and organoid culture techniques. Moreover, we achieved long-term culture of human iPS cell-derived alveolar type II cells. Then, we applied these methods to animal transplantation studies and human disease modeling such as drug-induced alveolar epithelial injury, airway diseases, pulmonary fibrosis and lung cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子細胞呼吸学 iPS細胞 肺臓器再生 疾患モデリング

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患への医療の需要が拡大する中で、呼吸器は主要臓器の1つであるにも関わらず、ヒト由来細胞を使った研究は遅れてきた。成人肺は再生能力が極めて乏しく、不可逆的に損傷した肺を根治的に修復するには肺移植しかなく、限られた細胞ソースから初代細胞を取り出し培養することも容易ではなかったことから、iPS細胞は肺臓器の再生や創薬に向けた次世代医療につながる基盤技術として呼吸器分野への応用が期待されてきた。しかし、他臓器に比べると世界的に開発は遅れており、iPS細胞から気道・肺胞上皮細胞を分化誘導する技術は普及した方法がなかった。研究代表者らは呼吸器領域の次世代医療の開発に向けてヒトiPS細胞を用いた技術開発を進め、肺臓器再生と難治性呼吸器疾患の創薬開発のためのバイオリソースの拡充と普及を急ぐ必要があると考えた。肺は気道・肺胞上皮細胞、リンパ管・血管内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などが入り組んだ一見複雑な構造をしているが、研究代表者らは肺の臓器・組織としての構造を単純なルールの繰り返しとして解釈できるフラクタル工学理論をヒントとして、一定の条件を整えることで未分化な状態の幹細胞も自己作動性の機序によって気道や肺胞上皮細胞に分化するのではないかと仮説を立てた。そして、3次元培養が分化の促進に有用な可能性を考え、初期の検討として、ヒトiPS細胞から肺胞前駆細胞を経て、3次元で胎児肺線維芽細胞と共培養することにより、従来の平面培養よりもin vivoでの遺伝子発現や形態に近いII型肺胞上皮細胞に分化させ、単離する方法を開発してきた。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでのヒトiPS細胞を用いた基盤研究で、肺の原基とされるNKX2-1陽性の腹側前方前腸細胞を段階的に効率よく分化誘導し、細胞単離に利用できる表面抗原としてCarboxypeptidase M (CPM)を同定し、肺胞上皮細胞の分化誘導に利用できることや、遺伝子工学を積極的に応用することで、II型肺胞上皮細胞への

分化の検出や細胞単離に使えるノックインレポーターiPS細胞を樹立し論文発表してきた(Gotoh S, et al. Stem Cell Reports, 2014)が、分化効率が10%台と低かった。本研究計画では、これらの技術を発展させることで、ヒト多能性幹細胞から気道・肺胞上皮細胞のより効率よく安定した分化誘導法を確立すること、そして、これらの技術を応用することにより、大きく2種類のバイオリソースを構築し、これまでアプローチの難しかった呼吸器難治疾患研究がヒトiPS細胞の技術により前進することを目的とした。

(1) 肺臓器の再生：iPS細胞からの分化誘導技術を用いて、移植治療を代替もしくは補完できるような肺臓器構築のための細胞ツールを作成する。

(2) 疾患特異的iPS細胞を用いた病態研究：呼吸器疾患のカテゴリごとにiPS細胞を用いて早期診断や疾患活動性や予後予測などに応用できる新規バイオマーカーや、治療薬の開発に使える方法を開発する。

3. 研究の方法

細胞移植による肺の再生治療の可能性と難治性呼吸器疾患治療に向けての応用のため、以下の項目を有機的に組み合わせて研究を進める。

(1) 肺臓器の再生：細胞移植治療の目標を段階的に定めて、動物への移植実験を行なう。

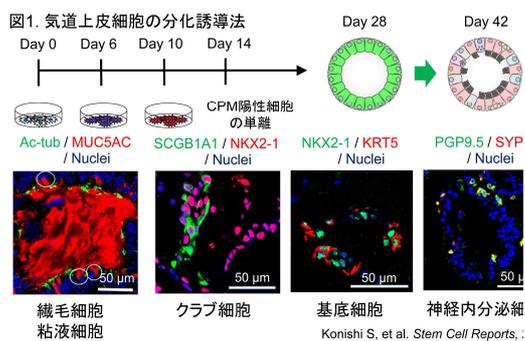
(2) in vitroでの疾患病態モデルの確立：疾患特異的iPS細胞株、もしくは健康者由来のiPS細胞を用いた疾患モデリングから病態機序の解明や新規バイオマーカーや治療薬の探索に向けたプラットフォームを確立する。

4. 研究成果

ヒトiPS細胞を肺臓器の再生と疾患特異的iPS細胞を用いた病態研究への応用を確実にするため、細胞株による分化効率の違いがアウトカムに影響する可能性を最小限化するため、単に気道や肺胞上皮細胞に分化したというだけではなく、安定して効率よく再現性の高い形で分化可能な方法の開発を進めた。

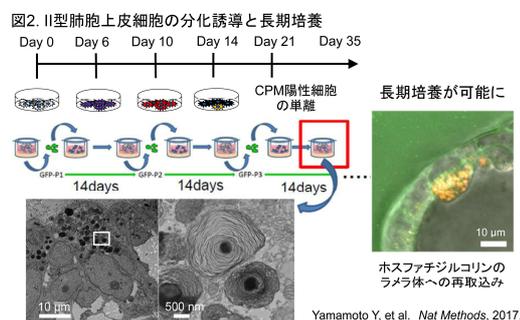
まず、ヒトiPS細胞から気道上皮細胞への

分化誘導を試みたが、平面培養では繊毛上皮細胞への分化がほとんど観察できなかったため、分化開始 14 日目の段階で、NKX2.1 陽性細胞を単離し、マトリゲル™ 基質に包埋した後、セルカルチャーインサートの乗せ、メンブレンの下層の培地条件を検討した。その結果、Y27632 (10 μ M)、CHIR99021 (3 μ M)、FGF10 (100ng/ml) を含む培地組成が、NKX2.1 陽性細胞の増殖に有効なことが分かった。ただし、2 週間たった段階では気道上皮細胞に向かって分化したことを示唆する結果が得られたものの、代表的な気道上皮細胞である繊毛細胞などへの分化は認められなかった。さらに分化を促進するため、市販の初代気道上皮細胞用の培地を検討したところ、さらに 2 週間培養することにより、繊毛細胞、粘液細胞、クラブ細胞、基底細胞、神経内分泌細胞といった気道上皮細胞に代表的な細胞成分の分化マーカーが陽性になることが分かった (図 1)。



また、この細胞成分の分化バランスは γ セクレターゼ阻害剤 DAPT を用いて Notch シグナル経路を抑制するとコントロールすることも分かった。この一連の成果については論文発表とプレスリリースを行った (Konishi S, et al. *Stem Cell Reports*, 2016)。次に肺胞上皮細胞については NKX2.1 陽性細胞に分化した後、三次元培養に進む前に CHIR99021 (3 μ M)、FGF10 (10ng/ml)、KGF10 (10ng/ml)、DAPT (20 μ M) を含む培地組成で 1 週間培養してから CPM 陽性細胞を単離し、胎児肺線維芽細胞との三次元共培養を開始すると、10% 台だった II 型肺胞上皮細胞への分化効率が 50% 程度にまで上昇することが分かり、2 週間おきに II 型肺胞上皮細胞を単離して長期培養すると 3

ヶ月以上に渡って増殖能と分化能を維持したまま II 型肺胞上皮細胞を長期培養できることも証明することができた。また、電子顕微鏡を用いた形態学的な観察も行い、肺サーファクタントを貯留する細胞小器官であるラメラ体は成熟度が不均一であり、継代を進めると成熟したラメラ体が多数観察されるようになることが分かった。また、ラメラ体に着目して II 型肺胞上皮細胞の機能を調べたところ、蛍光標識したリン脂質を培地に添加すると、iPS 細胞由来の II 型肺胞上皮細胞に取り込まれてラメラ体に集積することも分かり、重要な機能の一つである肺サーファクタントの主成分リン脂質の再取り込み能が証明された (図 2)。



さらにトランスクリプトームについても検討を進めた結果、iPS 細胞由来の II 型肺胞上皮細胞は成人肺由来の II 型肺胞上皮細胞と比べて、類似点が多く見つかった一方で、MHC class II に関連する遺伝子については発現していないといった違いもあることも確認できた。次に II 型肺胞上皮細胞の分化には肺線維芽細胞との三次元共培養が有効だったが、線維芽細胞の果たす役割を低分子化合物などで代替できるかどうか調べることにした。その結果、CPM 陽性肺胞前駆細胞を用いて、あらかじめ細胞集塊を作ってマトリゲル™ に包埋した後、周囲の培地を交換する方法で条件検討を行ったところ、CHIR99021 (3 μ M) と SB431542 (10 μ M) が II 型肺胞上皮細胞の分化誘導を相乗効果的に促進することが分かり、II 型肺胞上皮細胞の分化に必要な線維芽細胞の役割を担うシグナル伝達経路の一部を解明することができた。この一連の成果については論文発表とプレスリリースを行なった (Yamamoto Y, et al.

Nat Methods, 2017)

以上の成果により、分化効率の異なるヒト iPS 細胞でも NKX2.1 陽性呼吸器上皮前駆細胞までの分化が可能になれば、CPM を用いて NKX2.1 陽性細胞を単離し、三次元培養により気道および肺胞上皮細胞に効率よく分化できるようになった。

肺の臓器再生に向けては、ヒト iPS 細胞から分化誘導した II 型肺胞上皮細胞、HUVEC 細胞 (血管内皮細胞)、肺線維芽細胞を用いて肺オルガノイドの作成を試み、細胞集塊の状態 で免疫不全マウスへの移植を試みた。まず、腎被膜下への細胞移植を行なったところ 3 ヶ月に渡ってヒト iPS 細胞由来 NKX2.1 陽性細胞が定着することが確認できたが、II 型肺胞上皮細胞の分化マーカーの発現は確認できなくなった。オルガノイド移植後に II 型肺胞上皮細胞から他の細胞に分化したと考えられ、移植後の II 型肺胞上皮細胞を他の細胞に分化させないための条件検討が必要と考えられた。次に経気管投与による肺への細胞移植を試みたが、肺障害を起こさずに肺胞に定着させることは困難であり、ヒト iPS 細胞由来の呼吸器上皮細胞の定着にはより一層の工夫が必要と考えられた。

疾患病態モデルの確立については確立した分化誘導法を用いて、主に薬剤性肺障害 遺伝性気道上皮疾患、 遺伝性肺線維症の代表的疾患である Hermansky-Pudlak syndrome、 がん化モデルの開発に取り組んだ。まず、 についてはアミオダロンによる薬剤性肺線維症についての疾患モデリングのため iPS 細胞から分化誘導した肺胞オルガノイドにアミオダロンを曝露させ、II 型肺胞上皮細胞におけるトランスクリプトームの変化を調べ、その成果を論文報告した (Yamamoto Y, et al. Nat Methods, 2017)

については原発性繊毛機能不全症の患者から iPS 細胞を樹立するための研究協力を得たり、CRISPR-CAS9 を用いた遺伝子改変モデル iPS 細胞の作成に取り組んだ。 については特に HPS2 の欠損した iPS 細胞と同一のゲノムを背景とするコントロール iPS 細胞を比較することで、細胞病態の解析から蛍光プローブを用いた可視化とその定量化の技術

開発に取り組んだ。 についてはヒト iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞への分化後の長期培養の中で、任意のタイミングにがん化スイッチを入れることのできるシステムの構築に取り組んだ。

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 8 件)

Oguma T, Hirai T, Fukui M, Tanabe N, Marumo S, Nakamura H, Ito H, Sato S, Niimi A, Ito I, Matsumoto. Longitudinal shape irregularity of airway lumen assessed by CT in patients with bronchial asthma and COPD. Thorax 2015. 70(8). 719-24
DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206651

Sokai A, Handa T, Tanizawa K, Oga T, Uno K, Tsuruyama T, Kubo T, Ikezoe K, Nakatsuka Y, Tanimura K, Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res.2015.(16),120.
DOI: 10.1186/s12931-015-0280-9

Iwata T, Ito I, Niimi A, Ikegami K, Marumo S, Tanabe N, Nakaji H, Kanemitsu Y, Matsumoto H, Mechanical Stimulation by Postnasal Drip Evokes Cough. PLoS One 2015. 10(11)
DOI: 10.1371/journal.pone.0141823

Ikezoe K, Handa T, Tanizawa K, Kubo T, Ito I, Sokai A, Nakatsuka Y, Nagai S, Izumi T, Mishima M. A toll-like receptor 3 single nucleotide polymorphism in Japanese patients with sarcoidosis. Tissue Antigens 2015. 85(3) 204-8
DOI: 10.1111/tan.12535

後藤 慎平, 三嶋 理晃, ヒト多能性幹細胞から II 型肺胞上皮細胞への分化促進と単離、呼吸と循環、査読無、63 巻、2015、651-655

Konishi S, Gotoh S, Tateishi K, Yamamoto Y, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Ito I, Tsukita S, Mishima M. Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports. 2016. (6) 18-25
DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.11.010

小西 聡史, 後藤 慎平, ヒト iPS 細胞から気道上皮細胞への分化促進、呼吸と循環、査読無、64 巻、2016、785-789

Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, Konishi S, Nagasaki T, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Ito I, Mishima M. Long-term culture of alveolar epithelial type 2 cells derived from human induced pluripotent stem cells. Nat Methods 2018. 14 (11) 1097-1106. DOI: 10.1038/nmeth.4448

〔学会発表〕(計 15 件)

後藤慎平、伊藤功朗、興相陽平、山本佑樹、小西聡史、長崎忠雄、松本久子、佐藤篤靖、室繁郎、平井豊博、長船健二、浅香勲、瀬山邦明、三嶋理晃、遺伝性呼吸器疾患の疾患特異的 iPS 細胞樹立、第 55 回日本呼吸器学会、2015 年 04 月 17 日～2015 年 04 月 19 日、東京国際フォーラム

山本佑樹、後藤慎平、興相陽平、小西聡史、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、三嶋理晃、ヒト iPS 細胞から型肺胞上皮細胞への分化誘導効率の改善、第 55 回日本呼吸器学会、2015 年 04 月 17 日～2015 年 04 月 19 日、東京国際フォーラム

小西聡史、後藤慎平、山本佑樹、興相陽平、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、三嶋理晃、ヒト iPS 細胞から気道絨毛上皮前駆細胞への効率の良い分化誘導法の確立、第 55 回日本呼吸器学会、2015 年 04 月 17 日～2015 年 04 月 19 日、東京国際フォーラム

小西聡史、後藤慎平、山本佑樹、興相陽平、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、三嶋理晃、Generation of ciliated airway epithelial cells from human induced pluripotent stem cells、ISSCR 2015 annual meeting (国際学会) 2015 年 06 月 24 日～2015 年 06 月 27 日、Stockholm, Sweden

後藤慎平、伊藤功朗、興相陽平、山本佑樹、小西聡史、長崎忠雄、松本久子、佐藤篤靖、室繁郎、平井豊博、長船健二、浅香勲、瀬山邦明、三嶋理晃、ヒト多能性幹細胞から呼吸器上皮細胞への分化誘導、第 15 回日本細胞生物学会、2015 年 06 月 30 日～2015 年 07 月 02 日、タワーホール船堀

小西聡史、後藤慎平、立石和博、山本佑樹、興相陽平、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、月田早智子、三嶋理晃、ヒト iPS 細胞から気道線毛上皮細胞への分化誘導、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 01 日～2015 年 12 月 04 日、神戸ポ

ートアイランド

山本佑樹、後藤慎平、興相陽平、小西聡史、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、三嶋理晃、Long-term culture of alveolar epithelial type 2 cells derived from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting(国際学会) 2016 年 06 月 22 日～2016 年 06 月 25 日、San Francisco, USA

小西聡史、後藤慎平、立石和博、山本佑樹、興相陽平、長崎忠雄、松本久子、室繁郎、平井豊博、伊藤功朗、月田早智子、三嶋理晃、ヒト iPS 細胞から機能的な気道線毛上皮細胞への分化誘導、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 04 月 08 日～2016 年 04 月 10 日、国立京都国際会館

伊藤功朗、Generation of lung epithelial cells from human iPS cells、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 04 月 08 日～2016 年 04 月 10 日、国立京都国際会館

後藤慎平、ヒト iPS 細胞から呼吸器上皮細胞への分化誘導技術、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 04 月 08 日～2016 年 04 月 10 日、国立京都国際会館

伊藤功朗、iPS 細胞を用いた肺疾患研究と治療戦略、第 37 回日本呼吸器学会生涯教育講演会、2016 年 04 月 07 日、京都市国際交流会館

後藤慎平、ヒト iPS 細胞の呼吸器研究への応用、第 29 回日本動物実験代替法学会、2016 年 11 月 16 日～2016 年 11 月 18 日、九州大学百年講堂

後藤慎平、ヒト多能性幹細胞から分化した気道絨毛上皮の有用性、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 02 日、パシフィコ横浜

Korogi Y, Gotoh S, Yamamoto Y, Konishi S, Nagasaki T, Sone N, Ikee S, Matsumoto H, Muro S, Ito I, Asaka I, Hotta A, Hirai T. In vitro disease modeling of alveolar phenotype caused by AP3B1 deficiency using human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Research 15th Annual Meeting (国際学会) 2017 年

山本佑樹、後藤慎平、興相陽平、小西聡史、池尾聡、曾根尚之、玉井浩二、平井豊博、ヒト iPS 細胞を用いた型肺胞上皮細胞の量産化を目指して、第 53 回日本肺サーファクタント関連(界面)医学会、2017 年

〔図書〕(計 1 件)

後藤慎平(分担執筆) 中外医学社、Annual Review 2016 呼吸器 [永井厚志・巽浩一郎・桑野和善・高橋和久(編)] 「ヒトiPS細胞から気道上皮細胞への分化促進」の項、2016、35-40頁(6頁分)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三嶋 理晃(Mishima Michiaki)
京都大学・医学研究科・名誉教授
研究者番号: 60190625

(2)研究分担者

瀬山 邦明(Seyama Kuniaki)
順天堂大学・医学部・前任准教授
研究者番号: 10432395

半田 知宏(Hnada Tomohiro)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号: 10432395

浅香 勲(Asaka Isao)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号: 10543639

平井 豊博(Hirai Toyohiro)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 20359805

金 永学(Kim Younghak)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20456883

谷澤 公伸(Tanizawa Kiminobu)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20639140

佐藤 篤靖(Sato Atsuyasu)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 30706677

佐藤 晋(Sato Susumu)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40378691

伊藤 功朗(Ito Isao)
京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 40447975

長崎 忠雄(Nagasaki Tadao)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号: 40747862

堀田 秋津(Hotta Akitsu)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師
研究者番号: 50578002

小熊 毅(Oguma Tsuyoshi)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号: 50601324

後藤 慎平(Gotoh Simpei)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号: 50747219

室 繁郎(Muro Shigeo)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 60344454

松本 久子(Hisako Mtsumoto)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 60359809

小笹 裕晃(Ozasa Hiroaki)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80572015

永井 宏樹(Nagai Hiroki)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号: 80711605

陳 和夫(Chin Kazuo)
京都大学・医学研究科・特定教授
研究者番号: 90197640

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし