

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10260

研究課題名(和文) iPS細胞から誘導した気管支肺胞幹細胞は障害肺の修復を加速させる

研究課題名(英文) Intratracheal administration of induced pluripotent stem (iPS) cells induced bronchioloalveolar stem cells (BASCs) can accelerate the repair of injured lung.

研究代表者

鳥羽 博明 (TOBA, Hiroaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：40403745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目標は、局所幹細胞である気管支肺胞幹細胞(BASCs)をiPS細胞から分化・誘導させ、気道内投与し障害肺の修復を促進させることであった。プロトコルをアレンジしながら、マウスiPS細胞を分化させ、それらの細胞群がSca-1+/CD45-/CD31-の細胞群(=BASCs)を含むこと、CCSP+/SP-C+であることを確認し、適切に分化・誘導させることができた。iPS細胞から誘導したBASCsを含む細胞群をナフタレン誘導気道上皮障害モデルに気道内投与したところ、投与したBASCsが気道上皮細胞に分化すること、コントロール群と比較して気道上皮の修復が加速されていることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれの研究では、iPS細胞を用いて障害された気道上皮細胞の回復を促進できるかどうかについて証明することを目的とした。マウスiPS細胞を気道上皮の前駆細胞(=一歩手前の細胞)に分化させ、ナフタレンという物質を用いて気道上皮細胞を障害させたマウスの気管内に投与したところ、投与した前駆細胞が障害された場所に行き、気道上皮細胞になり、気道上皮の再生を促進したことを確認した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to show whether the administration of iPS cells-induced bronchioloalveolar stem cells (BASCs), which are local stem cells at terminal bronchiole, can accelerate the repair of injured lung. We reproduced the isolation of BASCs from mouse whole lung. We made mouse iPS cells differentiate using various protocols rearranged, and confirmed that they are induced to BASCs appropriately by the results of FACS (Sca-1+/CD45-/CD31-) and immunofluorescence (CCSP+/SP-C+). Next, we administrated the group of cells containing iPS cells-induced BASCs to naphthalene-induced terminal bronchiole injury model. We showed that these progenitor cells differentiated to bronchial epithelial cells, and the repair of injury was accelerated compared to control group.

研究分野：医歯薬学

キーワード：iPS細胞 気管支肺胞幹細胞 終末気管支障害 急性肺障害 気道内投与

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺の再生は、(1)多数の細胞が構築に関与していること、(2)可能性の高い細胞 source の選択が難しいこと、(3)足場の構築・分化を促進する増殖因子や環境を整えるのが難しいこと、(4)組織を3D構築するのが難しいことなどから、これまで非常に困難な臓器と考えられてきた (Warburton D. Proc Am Thorac Soc 2008)。しかしながら近年、Embryonic Stem Cell (ES 細胞)や iPS 細胞の登場により、肺の再生に関しても新しい段階に入ったと思われる。実際、ES 細胞や iPS 細胞から気道・肺胞上皮細胞の性格を有する細胞への分化・誘導が確認されている。これらは画期的な進歩ではあるが、それらの細胞群を機能の有する臓器として構築するところまでは至っていない (Longmire TA, et al. Cell Stem Cell 2012)。今後急速に基礎的、また臨床応用も進んでいく可能性があるが、まだベースとなる知見は少ないのが現状である (Weiss DJ, Stem Cells 2014)。

これまでわれわれのグループでは、ラット胎仔肺組織を用いて肺胞領域の再生にアプローチし、胎仔肺組織が正常ラット肺だけではなく、プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおいても生着・分化することを証明し (Kenzaki K, et al. JTCVS 2006、Toba H, et al. JTCVS 2012)、肺への分化を方向付けられた細胞と足場となる間葉系細胞の重要性を示してきた。同時に、より効率的に肺の再生に寄与する新たな細胞 Source を探索する必要性も感じていた。一方、種々の肺疾患において、局所の幹細胞の障害が修復・再生を遅らせ、ひいては慢性的な肺障害や線維化を引き起こす可能性が指摘されている (Reynolds SD, et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004)。よって局所の幹細胞が障害からの修復には非常に重要な役割を果たしていることが示唆される (Coraux C, et al. Proc Am Thorac Soc 2008)。

そこで今回われわれは修復のための新たな細胞 Source として局所の幹細胞である気管支肺胞幹細胞 (BASCs) に着目した。BASCs は終末細気管支の Bronchioalveolar duct junction (BADJ) に存在し、局所の幹細胞と考えられている細胞である。BASCs はクララ細胞 (CCSP+) や II 型肺胞上皮細胞 (Sftpc+) などの性質を有しており、障害からの修復の際に必要なに応じてクララ細胞や II 型肺胞上皮細胞に分化することが知られている (Kim CF. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007)。

Naphthalene は気道上皮細胞のなかでもクララ細胞のみを選択的に障害し、終末細気管支障害モデルとしてよく使用される。障害された気道上皮を数少ない線毛上皮細胞が扁平上皮化して覆い、その後クララ細胞が増殖して修復が完了する。その修復機転において、BASCs が重要な役割を果たしている。実際、Naphthalene 投与 5 日目において、BADJ における BASCs (CCSP+/Sftpc+) の細胞数が有意に上昇していることを証明した。(Figure3, 矢印が BASC) このことから、BASCs の気道内投与が終末細気管支障害の修復を加速させる可能性に着目した。すでにマウス肺からの BASCs の単離法に関しては確立されているが (Driscoll B, et al. Method Mol Biol 2012)、BASCs はマウス肺から採取した細胞群のうち、FACS でソーティングしても約 1% 程度の割合でしかなく、大量に細胞 Source を得るのには多くのマウス肺を摘出する必要があり、限界がある。そこで、今回われわれは iPS 細胞から BASCs を誘導して細胞 Source として使用するという着想に至った。iPS 細胞からうまく BASCs に誘導することができれば、効率的に大量に細胞 Source を得ることができると考えた。

実際、KGF などの増殖因子を使用し、II 型肺胞上皮細胞への分化を誘導する過程において気道・肺胞上皮細胞の前駆細胞を經由していることが示唆されていることから (Schmeckebier S, et al. Tissue Engineering: Part A 2013)、iPS 細胞からの BASCs の誘導成功への高い可能性を裏打ちする。さらには Naphthalene 誘導終末細気管支障害モデル以外にも、Lipopolysaccharide (LPS) 誘導急性肺障害モデルも作成し、iPS 細胞誘導 BASCs の肺胞領域再生の可能性についても検討したいと当初は考えていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず(1)マウス肺から BASCs を単離し、終末細気管支・肺障害マウスモデルに気道内投与して BASCs の生着の有無を評価する。次いで、(2) induced Pluripotent Stem cell (iPS 細胞) から BASCs を誘導して、肺の再生に寄与できる細胞 Source を大量に獲得する。最終的には(3) iPS 細胞から誘導した BASCs を種々の終末細気管支・肺障害マウスモデルに気道内投与し、修復を加速させるかどうかについて検討する。以上より、iPS 細胞から誘導した BASCs が終末細気管支の再生に寄与できることを証明し、iPS 細胞を用いた肺の再生医療の発展につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス肺からの BASCs 単離と気道内投与

Driscoll らの方法 (Method Mol Biol 2012) に準じて行う。まず、GFP マウス肺を摘出し、1% アガロース溶液を気管内に注入し、PBS を添加したチューブ内で細切する。Collagenase/dispase を加えた後、遠心分離する。DNase を加えて室温で放置した後、100um のフィルターを通した後、10% FCS 添加 PBS (PF10) を加えて遠心分離する。Lysis 液で処理後、DMEM 液で中和する。PF10 を加えて遠心分離後、再懸濁し細胞数を数える。その後、3% BSA-PBS を加えて、4℃で一晩放置する。0.5 × 10<sup>6</sup> に調整し、1 次抗体 (Sca-1-FITC, CD31-APC, CD45-APC, DAPI; 希釈濃度 1:100) を加える。FACS を行い、Sca-1(+)/CD31(-)/CD45(-) の細胞群を BASCs と

する。B6 マウスを使用した。予め、Naphthalene(200 mg/kg)を腹腔内投与し、気道障害モデルを作成し、翌日 Ketamine/Acepromazine の腹腔内投与下に 20G 気管内挿管し、BASCs 懸濁液 0.1ml を投与した。投与後 7 日目に犠牲死させ、左肺を摘出した。無染色にて終末細気管支での GFP(+) 細胞の分布を観察し、投与した BASCs が生着したかどうか評価した。

(2) iPS 細胞から BASCs への誘導

Schmeckeber ら (Tissue Engineering: Part A 2013) の方法に準じる。マウス GFP 導入 iPS 細胞を basal differentiation medium(BM)内に 20-100ng/ml の KGF を添加し培養し、10 日で気道肺胞上皮前駆細胞への分化が誘導するというプロトコルを用いた。分化させた細胞に FACS を行い、Sca-1(+)/CD31(-)/CD45(-)の細胞群を BASCs とし、その割合を同定と分化効率を評価した。加えて、FACS にてソーティングした細胞を CCSP/Sftpc 二重染色にて validation した。本プロトコルにて分化誘導させた BASCs を含む細胞群をドナーとした。

(3) Naphthalene 誘導終末気管支障害マウスモデルに iPS 誘導 BASCs を気道内投与

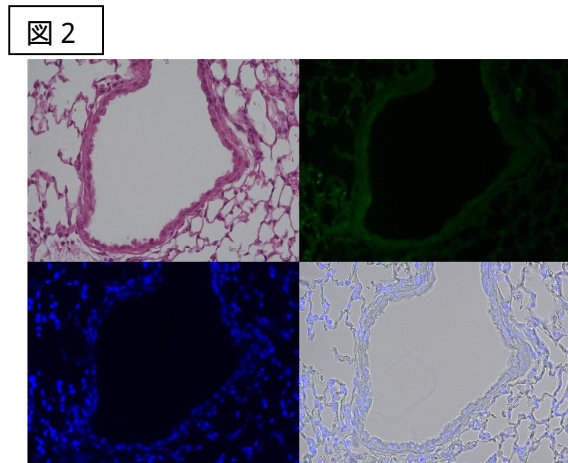
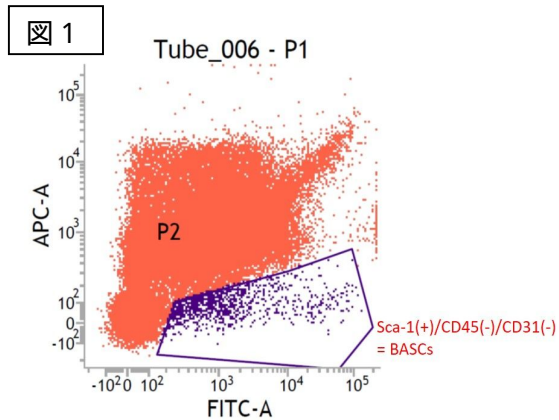
レシピエントには B6 マウスを使用し、以下の 4 群に分けた。Corn oil 群(コーン油のみ)、Naphthalene 群(Naphthalene のみ)、Control 群(Naphthalene + DMEM)、BASCs 群(Naphthalene + BASCs)。それぞれの群にコーン油もしくは Naphthalene(200mg/kg)を腹腔内投与する。翌日に気管内挿管し、DMEM を 0.1ml(Control 群)もしくは  $1 \times 10^6$ /ml に調整した BASCs 懸濁液 0.1ml(BASCs 群)を投与し、経時的に犠牲死させ、各群について組織学的に比較検討した。

4. 研究成果

(1) マウス肺からの BASCs 単離と気道内投与

まずは 8 週齢 B6 マウスから肺を採取し、プロトコルに沿って処理し、FACS にて Sca-1(+)/CD31(-)/CD45(-)の細胞群の同定を行ったところ、同細胞群の割合は 1.08% (図 1) 再現できたことを確認することができた。

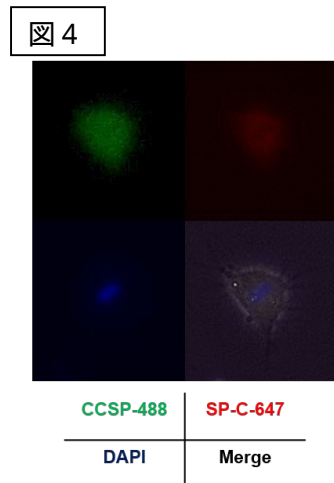
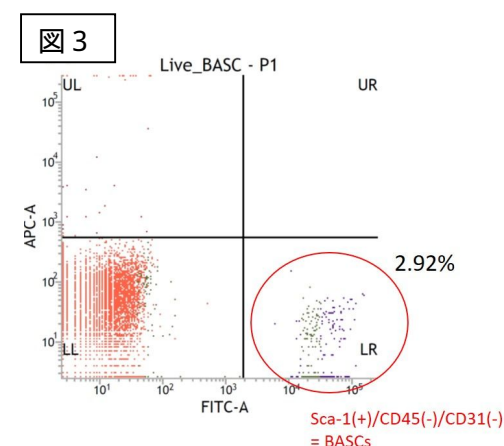
それを含む細胞群を Naphthalene 誘導マウス気道上皮障害モデル(図 2)に気道内投与し、投与後 7 日目に犠牲死させ確認したところ、ごくわずかではあるが生着したことを確認できた。



(2) iPS 細胞から BASCs への誘導

マウス iPS 細胞を培養・継代し、再度 iPS 細胞の quality が問題ないことを確認した後、三胚葉に分化することを確認した。その後、Schmeckeber らのプロトコルに沿って、分化・誘導実験を試みたが、うまく誘導できなかった。この過程に非常に時間を必要とした。

そこで、プロトコルを変更し、Zhou らのプロトコル (Stem Cells Transl Med 2013) に変更した結果、分化・誘導開始後 10 日目の FACS では、約 2.9%の BASCs (表面マーカー: Sca-1(+)/CD31(-)/CD45(-)) と思われる細胞群を同定することができた。(図 3) それらの細胞を免疫染色したところ、CCSP(+):緑/SP-C(+):赤(図 4)となり、BASCs が確実に分化・誘導できたことを確認することができた。



(3) Naphthalene 誘導終末気管支障害マウスモデルに iPS 誘導 BASCs を気道内投与  
それら BASCs を含んだ細胞群を Naphthalene 誘導マウス気道上皮障害モデルに気道内投与したところ、障害された気道上皮に生着し、気道上皮細胞に分化すること、またコントロール群と比較して、病理組織学的に修復が加速されることを確認することができた。

当初予定していたマウス iPS 細胞から誘導した BASCs を用いた LPS 誘導肺障害モデルでの検討に関しては遂行するまでには至らなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：川上 行奎

ローマ字氏名：KAWAKAMI, Yukiyo

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：特任講師

研究者番号(8桁)：00596249

研究分担者氏名：先山 正二

ローマ字氏名：SAKIYAMA, Shoji

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学系)

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60291986

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。