

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04183

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から誘導した機能的気道線毛上皮細胞シートの作製

研究課題名(英文) Development of functional bronchial ciliated cell sheet from human iPS cells

研究代表者

伊藤 功朗 (Ito, Isao)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40447975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの初代上皮細胞を用いた肺胞上皮のin vitroモデル作成を行った。マウス肺から上皮細胞を単離した。フィーダー細胞株と共培養し、ヒト細胞における治験と同様に倍加時間が約2.7日の高効率増殖を確認し、不可逆性の不死化(腫瘍化)ではなく培養条件による可逆性の増殖亢進であると考えられた。マウス肺の初代上皮細胞のシート形成は得られなかった。マトリゲル溶液を真空乾燥させることにより約5マイクロメートルの均一な薄膜を作ること成功し、これを培養基質として十分な強度へと発展させた。この上にマウス肺上皮細胞の気液界面培養を行い、細胞シートの統合性が維持されていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的な気道上皮細胞シートの開発につながり、気管欠損患者に対する細胞移植への応用展開が期待できる。また、本システムは稀少疾患(例えば原発性纖毛運動不全症)のみならず様々なcommon diseaseの病態研究(例えば後天性気管支拡張症)の病態を模倣することができるため、これらの疾患病理学的な研究のほか、薬剤スクリーニングに応用することができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a culture system for future application of bronchial epithelial regeneration using bronchial epithelial cell sheet. Although we first planned to achieve such sheet with induced ciliary bronchial epithelial cells from human iPS cells, there turned out to be multiple uncontrolled problems. Then, we used mouse lung epithelial cells derived from mouse lungs. As a scaffold for cell culture, mesh sheet of a variety of hole sizes were used and also we developed ultra-thin membrane-spread mesh sheet. As a basement scaffold, the sheet with ultra-thin membrane turned out to be appropriate to culture the cells. the undifferentiated cells from mouse lung cell expanded and developed into bronchial epithelial cells.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：未分化細胞 メッシュシート 気液界面培養

## 1. 研究開始当初の背景

肺は生体が呼吸をするために不可欠な vital organ である。悪性や良性の腫瘍そのもの、また腫瘍の手術治療や放射線治療によって気管の一部を欠損する患者、呼吸不全などにより気管切開術を施行され、気管の再建が必要な患者は小児から成人にわたり、国内に年間 15 万人いると推定されている。中枢気道は単に換気のためだけでなく、気道線毛上皮細胞による異物排除機能という重要な感染防御機構がある。気道は外界と接するため、その感染防御機構が破たんしていると、欠損部位に病原体が生着することに加え、病原体の下気道への侵入を許し、容易に呼吸器感染症をきたす。気管の欠損部位を補うには現存する薬物では治療不可能であり、再生医療の発展が強く望まれている。未分化細胞を用いた気管軟骨再生研究はなされているが、気道上皮は未分化細胞からの誘導が困難であった。

気管再生を目指した上皮細胞シートの試みは cell line などで行われてはいるが、気管移植・再生の難点は拒絶反応であり、そこでは気道上皮細胞が主要な役割をもっている。従って iPS 細胞の有用性が考えられてきたが、ヒト iPS 細胞から気道線毛上皮を誘導したこと自体が他に類はなく、気道上皮細胞移植はこれから発展すべき領域である。

従来の培養はフラットな Air-liquid interface 法によるものであり、このままでは目標となる細胞シート移植などの再生医療には適用できないという課題があるため、移植にまで適用可能性を広げるデバイスの開発が必要である。

## 2. 研究の目的

本申請では医学と工学の技術的連携を行うことで、気道線毛上皮細胞の異物排出機能の確立を試み、血管内皮細胞と分化誘導気道上皮細胞との共培養シートを作成することを目的とする。その方法として、マイクロメッシュやマイクロ流体デバイスなどの医工学技術により、生体内に近い微小環境を模倣する。

## 3. 研究の方法

本来、ヒト iPS 細胞から誘導した NKX2.1 陽性細胞を用いて、気道線毛上皮細胞を誘導可能なメッシュシートを開発することを目的としていたが、ヒト多能性幹細胞からスタートすることはメッシュとの適合性など様々な問題があったためマウス肺由来未分化細胞を分離して用いることとした。さらに、メッシュ径と幅を調整したが、十分な生着は困難であったため、メッシュを基本構造として

開口部をマトリゲル超薄膜で障子紙のように張った培養基盤を作成した。これを用いて肺由来未分化細胞を培養・分化させ、気液界面培養に移行して成熟させることを試みた。

#### 4. 研究成果

##### マウス肺を用いた肺胞シート作成

メッシュシートを用いた上皮シート作成技術確立の一環として、マウスの初代上皮細胞を用いた肺胞上皮の *in vitro* モデル作成を行った。

##### ・ヒト肺腺癌細胞株 NCI-H441 を用いた細胞シート作成

初代細胞使用前の予備実験として、分担者のオケヨはヒト肺腺癌細胞株 NCI-H441 やヒト細静脈内皮細胞 HUVEC を用いた細胞シート作成を行った。接種した細胞の大半はメッシュの開口部を通過し液体培地内に落下するが、一部はメッシュのグリッド部に定着して開口部を埋めるように増殖し多層の細胞シートを形成した。

##### ・マウス肺の初代上皮細胞単離と培養

再生医療への応用を視野に入れた上皮シート作成には、限られた材料から再現性をもって十分な細胞数を確保する必要があるため、また必要十分の細胞数確保のため、12 週齢のマウス肺からトリプシンとエラスターゼに処理により上皮細胞を単離した。NIH3T3 から樹立したフィーダー細胞株と共培養し、過去のヒト細胞における経験と同様に倍加時間が約 2.7 日の高効率増殖を確認した。また、フィーダーを除去し一般の液体培地に継代すると増殖が速やかに停止することから、不可逆性の不死化(腫瘍化)ではなく培養条件による可逆性の増殖亢進であると考えられた。

##### ・初代上皮細胞シート作成のための基質改良

マウス肺の初代上皮細胞の旺盛な増殖はフィーダーとの共培養下に限定されており、NCI-H441 のようにグリッドに定着した少数の上皮細胞の増殖によるシート形成は得られなかった。メッシュ開口部からの落下による喪失を防止するための方策として、オケヨはメッシュ上に滴下した 2% v/v マトリゲル™溶液を真空乾燥させることにより約 5 マイクロ・メートルの均一な薄膜を作ることに成功した。さらにこれを 4%パラホルムアルデヒド溶液処理することにより培養基質として十分な強度を得ることに成功した。

これらを経て開口部径 200 マイクロ・メートルのメッシュシートにマトリゲル膜を付加したものを作成し、培養したマウス肺上皮細胞の気液界面培養を行った。肺胞上皮への分化誘導を行ったもの、行わなかったものを  $3.3 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup>

で接種し、48 時間後に細胞シートを気液界面培養条件に移行した。引き続き 7 日間の観察を行い細胞シートの統合性が維持されていることを確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito A, Ito I, Inoue D, Marumo S, Ueda T, Nakagawa H, Taki M, Nakagawa A, Tatsumi S, Nishimura T, Shiota T, Ishida T.	4. 巻 92
2. 論文標題 The utility of serial procalcitonin measurements in addition to pneumonia severity scores in hospitalized community-acquired pneumonia: A multicentre, prospective study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 228, 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2020.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oi I, Ito I, Tanabe N, Konishi S, Hamao N, Yasutomo Y, Kadowaki S, Hirai T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Cefepime vs. meropenem for moderate-to-severe pneumonia in patients at risk for aspiration: An open-label, randomized study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 181, 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cui S, Ito I, Nakaji H, Iwata T, Matsumoto H, Oguma T, Tajiri T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Izuhara H, Mishima M, Niimi A.	4. 巻 263
2. 論文標題 Induction of airway remodeling and persistent cough by repeated citric acid exposure in a guinea pig cough model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Physiol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 1, 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resp.2019.02.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Korogi Y, Gotoh S, Ikeo S, Yamamoto Y, Sone N, Tamai K, Konishi S, Nagasaki T, Matsumoto H, Ito I, Chen-Yoshikawa TF, Date H, Hagiwara M, Asaka I, Hotta A, Mishima M, Hirai T.	4. 巻 12
2. 論文標題 In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 431, 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.01.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	オケヨ ケネディオモンディ  (Okeyo Kennedyomondi)  (10634652)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・講師   (14301)	
研究分担者	小寺 秀俊  (Kotera Hidetoshi)  (20252471)	国立研究開発法人理化学研究所・科技ハブ産連本部・本部長   (82401)	削除：2019年3月6日
研究分担者	鷺津 正夫  (Washizu Masao)  (10201162)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授   (12601)	
研究協力者	松島 晶  (Matsushima Aki)		