

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17751

研究課題名（和文）肺の再生に向けた、iPS細胞から誘導した気管支肺胞幹細胞による細胞移植の可能性

研究課題名（英文）Potential of cell transplantation with bronchoalveolar stem cells derived from iPS cells for lung regeneration.

研究代表者

河北 直也（KAWAKITA, Naoya）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60522266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：iPS由来の気管支肺胞幹細胞(BASCs)の機能解析を進めており、iPS細胞を分化させ、表面マーカーのSca-1/CD45/CD31でソートしたBASCs細胞群のオルガノイド培養を行った。培養により既報告のマウス肺由来のBASCsと同様に、様々な形態を示すオルガノイドの形成を認めた。さらに形成されたオルガノイドを免疫染色およびフローサイトメトリー解析したところ、iPS由来BASCsが自己複製能を有することおよび、細気管支領域の各種上皮細胞に分化していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS由来のBASCsが生体内同様に多能性を持つことが示された。これまでiPS由来のBASCsの経気道投与が、気道上皮障害の修復を促進することは明らかとなっていたが、その機能解析がなされたことで、iPS由来BASCsが生体内BASCsに近い分化能を有する可能性が示唆されており、修復促進の機序の一因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Functional analysis of iPS-derived bronchoalveolar stem cells (BASCs) is ongoing, and organoid cultures of a group of BASCs cells differentiated from iPS cells and sorted by the surface markers Sca-1/CD45/CD31 were performed. The cultures showed the formation of organoids with various morphologies, similar to previously reported BASCs derived from mouse lungs. Further immunostaining and flow cytometric analysis of the organoids formed showed that iPS-derived BASCs had self-renewal potential and differentiated into various epithelial cells in the bronchiolar region.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：再生医療 iPS細胞 幹細胞 細胞移植 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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)可能性の高い細胞ソース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、非常に困難な臓器の一つである。近年、iPS細胞を用いた研究の発展により、幹細胞治療の可能性や、肝臓や小腸などでは、オルガノイドを代表とする3D培養研究の進歩により in vivoでの臓器再生の可能性も視野に入ってきた。しかしながら、依然として肺においてはまだ機能を有する臓器の再生には至っていない。

これまで研究代表者のグループでは、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およびブレオマイシン(BLM)誘導肺線維症モデルに生着・分化することを証明し(Kenzaki. JTCVS 2006, Toba. JTCVS 2012)、肺への分化を方向付けられた細胞と足場の重要性を示した。さらに効率的な細胞ソースおよび投与方法を探索しており、ラット、ブタの胎仔肺を用いたオルガノイドの経気道投与の研究も進め成果を上げている(H.28~R.2年度科研費 基盤研究(C)16K10685:川上行奎, H.31~R.2年度科研費 若手研究19K18219:松本大資, H.30~R.4年度科研費 基盤研究(C)18K08785:鳥羽博明)。

また、並行して、肺の発生における幹細胞の役割解明が、再生研究には不可欠と考え、胎生ラットの肺胞領域の幹細胞である bipotential 細胞の研究を進めている(H.29~R.1年度科研費 若手研究(B)17K16609:河北直也)。これら胎仔肺を用いた一連の研究は倫理的問題があるものの、肺の発生、修復、再生のメカニズムを探究する上で非常に有用な情報を与えてくれた。近年、マウス成体肺において、終末細気管支の Bronchioalveolar duct junction (BADJ)に存在する BASCs(CCSP/Sftpc 共陽性)が終末細気管支~肺胞領域における局所の幹細胞であり、障害時に活性化し、自己複製および分化し、同領域を構成する上皮細胞全てである、club細胞、線毛細胞、  
・ 型肺胞上皮細胞に分化すること示された(Kim. Cell 2005, Liu. Nat Genet 2019)。BASCsはBADJにしか存在せず、BADJが幹細胞の足場(幹細胞ニッチ)と考えられている。

これらを踏まえて、大量に細胞ソースを得るために iPS 細胞を用い、iPS 細胞から BASCs を誘導し、移植をする研究を行った(H.27~30年度科研費 基盤研究(C)15K10260:鳥羽博明)。iPS細胞から BASCs の誘導に成功し、ナフタレン障害マウスに経気道的投与することで、BADJで生着・分化することをはじめ確認した。この研究により iPS 細胞誘導 BASCs が幹細胞移植の有用な細胞ソースとなる可能性が示唆されたが、限定的な短期モデルであり、様々な環境での生着や、中長期における生着やその機能までは現時点ではまだ解明できていない。

本プロジェクトでは、iPS細胞誘導 BASCs が他の障害モデルにも生着し、レシピエントの幹細胞ニッチに保持され、継続して幹細胞としての役割を果たすかどうか「問い」である。

## 2. 研究の目的

本研究では iPS 細胞誘導 BASCs が幹細胞としての性質を、種々の環境において短期、長期に保持し続けることを証明することを目的とする。そのために、iPS細胞誘導 BASCs を、(1)BLM肺障害モデルに投与し、急性期および線維期において生着・分化を確認するとともに障害を軽減できるかどうかを検討する。(2)脱細胞マウス肺に投与し、終末細気管支~肺胞領域の上皮を再構成するかを検討する。(3)投与・生着し修復を完了したマウスに対し、再度終末細気管支障害を与えた際に、生着したドナーBASCsが修復に寄与するかどうか、レシピエントの BASCs はどのような動態を示すか検討する。

今回のプロジェクトでは、研究代表者が行ってきた、iPS細胞誘導 BASCs による終末細気管支障害モデルの細胞治療の域を越え、局所にとどまる幹細胞の移植を実現させることで「機能を有する肺を造る」大きな進歩になると考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS 細胞の分化と BLM 誘導肺障害モデル作成

iPS 細胞を BASCs へ誘導する方法は、これまで同様に Schmeckeber らの方法に準じて行う (Tissue Engineering: Part A 2013). Embryoid body を作成後、培地を IMDM+15% Knock out serum replacement+ Keratinocyte growth factor 20ng/ml に DCI (10nM Dexamethasone+0.1mM 8-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt+0.1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine) を 10 日目から添加し、24 日で分化を完了し細胞を回収する。BLM モデルは 8w-12w の雌 C57BL/6N マウスに対して経気道的に 4U/kg の BLM を投与し作成する。

#### (2) BLM 誘導肺障害マウスへの iPS 細胞誘導 BASCs の投与

以下の 4 群に分ける： PBS 群、BLM 群、BLM-Control 群 (BLM+DMEM)、BLM+BASCs 群。BASCs には PKH26 Red Fluorescent Cell Linker を結合させ、 $1 \times 10^6$  細胞を 50  $\mu$ l の DMEM で懸濁し、BLM 投与翌日に経気道投与する。経時的に (2 日・5 日・8 日・15 日・30 日) に犠牲死させ 4 群比較する。気管支肺胞洗浄液 (BAL) を採取後、左肺はホルマリンを注入固定し、組織診断に用い、右肺は細切し-80 で凍結保存し遺伝子解析に用いる。評価項目は、投与細胞の生着・局在を蛍光顕微鏡で評価、肺胞領域の構成細胞の局在・定量的評価：BASCs (CCSP/Sftpc)・型肺胞上皮 (PDPN)・型肺胞上皮 (Sftpc)・線毛細胞 ( $\alpha$ -tubulin)・club 細胞 (CCSP) の免疫染色と real time RT-PCR での mRNA 量、型肺胞上皮の増殖：Sftpc/Ki-67 染色、体重変化、肺の乾湿重量比、肺障害の程度と経時変化 (シリウスレッド/ファストグリーン染色、hydroxyproline assay, Masson trichrome 染色, Ashcroft スコア)、マイクロ CT による経時的画像変化、好中球・マクロファージの浸潤、細胞増殖・アポトーシス (Ki-67/Foxj1 染色)、BAL 中のサイトカイン測定。

#### (3) 脱細胞肺への iPS 細胞誘導 BASCs の投与

マウス肺脱細胞、再細胞化は Daly らの方法に準じて行う (Tissue Eng Part A, 2012)。犠牲死させたマウスの心肺を一塊に摘出後、右室と気管より 0.1% Triton X Sodium Deoxycholate 30  $\mu$ g/mL DNase+1.3mM MgSO<sub>2</sub>+2mM CaCl<sub>2</sub> を注入し作成する。脱細胞肺に未分化 iPS 細胞または iPS 細胞誘導 BASCs  $2 \times 10^6$  細胞を 3ml の 2% 低融点アガロースに 37 で懸濁し、気管より注入する。注入後、肺を 2mm 厚にスライスし、small airways growth medium 中で、7, 14, 28 日間培養する。得られた肺を上記 (2) と同様に左右分けて処理し、それぞれのタイムポイントで、以下の項目を 2 群間で比較する。H-E 染色にて組織構造評価、肺胞領域の構成細胞の局在・定量的評価：(2) と同様に免疫染色、mRNA 量の評価を行う。

\* BLM 障害肺モデルや、脱細胞肺への生着が不良な場合 予定ではこれまで同様に、BASCs を含む分化 iPS 細胞集団を投与するが、生着の状況により、表面マーカーの Sca-1, CD31, CD45 を用いた FACS で BASCs を単離し、単離 BASCs 懸濁液での投与をする。それでも不良な場合は、オルガノイドでの投与をする。単離 BASCs をマトリゲルで 1,000 細胞/ $\mu$ l となるように調整し、100  $\mu$ l の drop にし数日でオルガノイドを作成する。

ナフタレン障害マウスに iPS 細胞誘導 BASCs を経気道的投与し、生着、生存したマウスに再度ナフタレン障害を与えた場合、生着したドナー-BASCs (iPS 細胞誘導 BASCs) は幹細胞としての性質を示すかどうかを検討する。またドナー-BASCs、およびレシピエント BASCs (モデル動物本来の BASCs) はどのような動態を示すかを検討する。

移植した iPS 細胞誘導 BASCs の長期追跡を可能にするため、レシピエントに GFP マウスを用いる。ドナー細胞が非蛍光、レシピエント細胞が緑色蛍光を発することで区別する。まず、ナフタレンを 200mg/kg で腹腔内投与し障害モデルを作成。翌日に、DMEM、iPS 細胞誘導 BASCs を経気道投与する。障害から回復した 4 週後に再度ナフタレンを投与する。その後 2, 5, 8, 15 日目に犠牲死させ、(2) と同様に両肺を摘出する。以下の項目を 2 群間で比較する：体重変化、H-E 染色による組織構造、ドナー、レシピエントの細胞の分布・定量的評価：BASCs (CCSP/Sftpc)・型肺胞上皮 (PDPN/Sftpc)・線毛細胞 ( $\alpha$ -tubulin)・club 細胞 (CCSP) の免疫染色で評価、BADJ におけるドナー、レシピエントの club 胞数を数え、双方の修復寄与を比較、ドナー細胞を FACS で回収し、single cell RNA sequencing により遺伝子発現のパターンを、報告されているレシピエントの BASCs のパターン (Liu. Nat Genet 2019) と比較する。

#### 4. 研究成果

モデル作成と純度の高いBASCsの採取に務めた。BLMモデル作成において、均一な肺障害モデルを作成するために、噴霧器や、挿管投与、気管切開投与などの各種方法から肺障害の程度を評価し、均一かつ安定した障害モデルの作成を目指した。H&E染色およびMasson trichrome染色でAshcroftスコアを用いて線維化の分布および程度を評価した。噴霧や挿管投与では障害モデルが全く形成されないことがあったり、形成されても局所的、びまん性の変化であったりと、細胞移植のモデルとしては不十分な結果であった。一方で、気管切開投与は手技が煩雑ではあるものの、モデルの形成としては障害の程度も強く、びまん性にみられる例が多く、有望であったが、やや障害の程度が強い傾向が認められたが、細胞投与してその修復を評価できる再現性のあるモデル作成は困難であった。

またiPS細胞からBASCsの誘導に関してはこれまでどおり、Schmeckebierらの方法を用いて24日間で誘導した。分化手技に関しては安定して行えており、BASCsを誘導できている。これまで以上の純度の高いBASCsを得るためにSca-1, CD31, CD45に加えてCD34を最終のソートマーカーに用いるFACSを実行した。細胞の回収率は1%程度に落ちるものの、非常に純度の高いBASCsを得ることに成功しており、これらを用いた移植も検討している。また、並行してiPS細胞由来BASCsのMEFをフィーダー細胞とした継代培養を行ったが十分な継代培養には至らなかった。

一方でiPS由来の気管支肺胞幹細胞(BASCs)の機能解析も進めており、iPS細胞を分化させ、表面マーカーのSca-1/CD45/CD31でソートしたBASCs細胞群のAir Liquid Interface (ALI) 培養を主体にしてオルガノイド培養を行った。培養により既報告のマウス肺由来のBASCsと同様に、様々な形態を示すオルガノイドの形成を認めた。さらに形成されたオルガノイドを免疫染色およびフローサイトメトリー解析したところ、iPS由来BASCsが自己複製能を有することおよび、細気管支領域の各種上皮細胞に分化していることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawakita Naoya, Toba Hiroaki, Miyoshi Keiko, Sakamoto Shinichi, Matsumoto Daisuke, Takashima Mika, Aoyama Mariko, Inoue Seiya, Morimoto Masami, Nishino Takeshi, Takizawa Hiromitsu, Tangoku Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Bronchioalveolar stem cells derived from mouse-induced pluripotent stem cells promote airway epithelium regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 430-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-020-01946-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河北直也、鳥羽博明、三好圭子、坂本晋一、松本大資、高嶋美佳、青山万理子、井上聖也、森本雅美、西野豪志、滝沢宏光、丹黒 章
2. 発表標題 マウスiPS細胞由来気管支肺胞幹細胞は気道上皮再生を促進する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------