

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12613

研究課題名(和文) 基底膜を利用したiPS細胞由来肺上皮細胞の分化培養法の開発

研究課題名(英文) Induction of iPS cell-derived lung epithelial cells by using the basement membrane substratum

研究代表者

伊藤 智彦 (Ito, Tomohiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：60391067

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)：人工多能性幹細胞(iPS細胞)から標的細胞を調製し、創薬や毒性解析に利用するためには、より高い効率で分化誘導できるかが重要である。iPS細胞の分化培養には既製品の基底膜成分でのコーティング下で行うことが一般的だが、本研究では生体内における細胞の環境に近い状態をin vitroで再現することでiPS細胞の分化をより効率よく誘導することができるか、基底膜成分から形成させた擬似的な基底膜構造体上でiPS細胞を培養することで検討した。本研究では特に分化が難しい肺上皮細胞について検討した結果、特定の分化過程において基底膜構造体上で培養することにより、分化効率が高くなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High efficient induction of target cells from iPS cells is important for utilizing iPS cells in the drug discovery and toxicological analysis fields. Generally, differentiation of iPS cells are performed by culture on the components of basement membrane, such as Matrigel. On the other hand, we used the synthesized basement membrane substratum (sBM) formed by alveolar epithelial cells in the presence of Laminin expressing cells, and studied the effectiveness of sBM on the differentiation. Our data suggest that use of Laminin511-based sBM improves the differentiation of iPS cells toward lung epithelial cells at the later stage.

研究分野：毒性学

キーワード：基底膜基質 肺上皮細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は組織を構築する様々な正常細胞のソースとして再生医療の観点から期待されている。同様に、創薬や環境科学における毒性学的な観点からも、ヒト iPS 細胞由来の正常細胞が将来的には重要なツールになると考えられる。従来は *in vitro* における毒性研究にヒトの不死化細胞や初代細胞が用いられてきているが、これらには幾つかの問題点がある。不死化細胞は扱いが容易であり世界で普及している細胞であるが、正常な体細胞が持つ本来の機能を不死化により喪失しているケースもあるため、得られた結果が実際に生体内での生理現象に反映されるか信頼性に問題がある。そのため、生体内により近い状態の初代細胞での再現性実験が求められることが多い。その初代細胞を用いた実験からは、より正確な影響をとらえていると解釈できるが、不死化細胞と異なり長期間の維持培養は基本的にできない。そのため、細胞の供給が問題となり、高価な細胞をメーカーから継続して購入することが必要となる。また、そうした事情から、同じ遺伝子配列を持つ同一のドナーからの細胞を使い続けることは難しいため、遺伝的な要因が毒性解析の結果に影響する可能性もある。この様な背景から、毒性学の分野において、安定的に初代細胞に近い正常細胞の安定的供給源として多能性幹細胞の活用が期待されている。多能性幹細胞から標的細胞が得られれば、特定の遺伝子配列を持った正常細胞が安定的に供給されることになり、上記の問題はクリアされることが期待できる。また、iPS 細胞については、多くの健常者由来のものや様々な疾患患者由来のものまでバリエーションが豊富で、遺伝的素因や疾患特異的な観点からも解析が可能な利点がある。一方で、多能性幹細胞から目的の細胞までの分化培養は細胞によっては容易ではなく、如何に効率よく目的の細胞まで分化誘導して活用していくことに繋げるかが課題となっている。

2. 研究の目的

生体内で組織を構築する細胞は、支持基盤となる細胞外マトリクス上で生育している。細胞外マトリクスは、単なる足場環境の役割だけでなく、細胞が適切な機能を維持・発揮するために、様々な情報を細胞に提供している。細胞外マトリクスには I 型コラーゲンの様な間充織に存在して形状保持の役割を果たすものもあるが、細胞に直接、接する基底膜にはラミニン等の接着分子が高密度に存在しており、細胞の接着を強化するだけでなく細胞にシグナルを送る役割を果たしている。

従来の細胞培養はこうした細胞外マトリクス成分をプラスチック状にコートして使用することで、培養が困難な細胞の研究にも適用できるように発展してきた。基底膜成分

によるコートとして代表的なのが、マウス肉腫から調製した Matrigel である。また、組換え体タンパクとしてラミニン等の接着分子も利用可能になった。こうした基底膜成分のコティングは iPS 細胞の維持や分化においても標準的に使用されている。一方で、こうした基底膜成分によるコートは生体組織における細胞外マトリクスを反映しているとは言えず、十分な固相環境を提供しているわけではない。そうした中、協力研究者の持立らは、肺胞上皮細胞と基底膜成分を供給する細胞とを共培養することで、培養基質として利用可能な基底膜基質を構築することに成功した (synthesized basement membrane (sBM) と命名)。また、従来の Matrigel がラミニン 111 を主体としているのに対し、持立らは上皮細胞の本来の基底膜環境下に存在するラミニン 511 を主成分とした sBM を作り出すことにも成功している。この sBM については、ラット基底細胞の初代細胞から繊毛細胞への分化成熟を効率的に促進することからも、生理学的な有効性も示されている (参考文献)。また、Higuchi らは sBM を使用することで、マウス ES 細胞から膵臓系列への分化に効果的であったことを報告している (参考文献)。この様に、培養細胞のコティング条件をより生体内での条件に近づけることで、細胞が本来有する性能を発揮させることができる可能性が示されている。同様に、iPS 細胞の様な多能性を持った細胞の分化培養についても、簡易的なコティング上では困難な分化でも基底膜基質を利用することで改善できることも期待できる。本研究では、比較的、分化培養が難しい iPS 細胞から肺上皮細胞までの分化培養の過程で、細胞を sBM 上で培養することで効率に影響を与えるか検討を行った。比較対象としては、ラミニン 111 を主体とした基底膜成分の Matrigel、断片化ラミニン 511 の組換えタンパクである iMatrix を用いた。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞の 201B7 および 409B2 は理化学研究所バイオリソースセンターから譲渡を受けた。iPS 細胞は、まずフィーダー細胞である SNL76/7 細胞 (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)) 上で Primate ES Cell Medium (ReproCELL) を用いて維持を行った後、mTeSR-1 培地 (StemCell Technologies) でフィーダーレスの状態にしてから使用した。分化実験は、フィーダーレスの iPS 細胞を Y27632 で 1 時間処置後、Accutase (Gibco) で 37、10 分間処理し、細胞をシングルセルの状態にしてから使用した。

ヒト iPS 細胞から内胚葉および肺前駆細胞への分化は、Goto らの報告に従い行った (参考文献)。具体的には、各コートの 24 well plate 上に細胞を 2×10^5 cells/well で播種した。培地は Activin A (100 ng/ml)、CHIR99021 (1

μM) B-27 supplement 含有 RPMI-1640 培地を用い、Day 1 から Day 4 まで酪酸ナトリウム (Day 1 は 250 μM、Day 2 から 125 μM) を添加した。Day 4 からは基本培地を B-27 supplement、L-ascorbic acid (50 μg/ml)、MTG (400 μM) 含有 DMEM/F12 とし、Day 4 では内胚葉を前方前腸化するため、SB431542 (10 μM) および Noggin (100 ng/ml) を添加した。Day 8 で培地を BMP4 (20 ng/ml)、all-trans retinoic acid (ATRA, 201B7 は 50 nM、409B2 は 100 nM)、CHIR99021 (3 μM) に交換して更に 4 日間 (Day 12 まで) 培養した細胞を肺前駆細胞とした。

得られた肺前駆細胞を含む細胞は更に分化を行うため single cell にした。平面培養する場合は、細胞を各コート上に播種し、Wong らの方法に従って更に分化を行った (参考文献)。具体的には、FGF7 (50 ng/ml)、FGF10 (50 ng/ml)、BMP4 (5 ng/ml) 含有培地で 6 日間培養後、FGF7、FGF10、FGF18 (各 10 ng/ml) で 6 日間、培養した。また、三次元培養で spheroid を形成させる場合には、細胞を等量の Matrigel と混合して 12 well culture insert 上に播いた (参考文献)。培地には CHIR99021 (3 μM)、FGF10 (10 ng/ml) および FGF7 (10 ng/ml) を添加した。14 日後、細胞をゲルから回収し、新たに各コートの 12 well culture insert 上に播種した。培地には DAPT (10 μM) 含有 PneumaCult-ALI (StemCell Technologies) を用い、14 日間、培養した。

リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析は、細胞から total RNA を NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) で精製した後、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) を使用して cDNA を合成した。リアルタイム PCR 解析は、GeneAmp SYBR qPCR Mix (NipponGene) および Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Bio) で行った。

各コーティングの方法は、Matrigel の場合は DMEM/F12 培地で 30 倍に希釈したものをプレートに添加し、37 °C で 1 時間、放置したものを使用した。iMatrix については、PBS で 100 倍に希釈してから 37 °C、1 時間のコーティングを行った。sBM は参考文献にある手順で作成した。

4. 研究成果

まず、iPS 細胞から内胚葉および肺前駆細胞までの分化誘導について、Matrigel、iMatrix、sBM の各コーティング上で培養した条件で比較を行った。その結果、内胚葉分化マーカーの FOXA2 の誘導は Matrigel と iMatrix で同程度であったが、sBM 上で培養した場合にはこれらと比べると低い結果となった (図 1)。また、肺前駆細胞マーカーの NKX2.1 の発現誘導は Matrigel 上で培養した時が最も高く、iMatrix および sBM 上の条件では比較的低い結果となった (図 2)。肺前駆細胞までの過

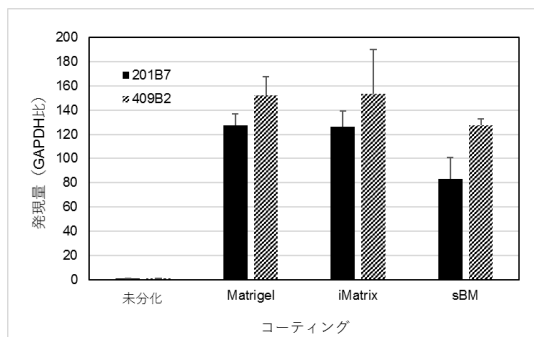


図 1. 各種コート上での FOXA2 の発現誘導

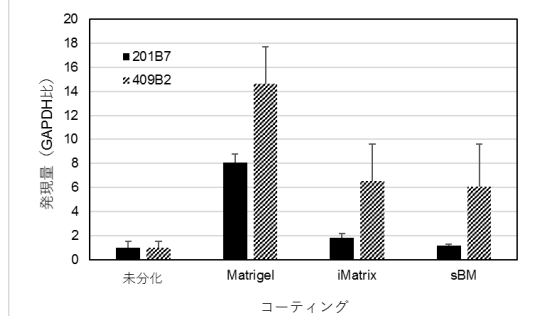


図 2. 各種コート上での NKX2.1 の発現誘導

程において Matrigel が最も効率が高いことを示した結果から、Matrigel に含まれる Laminin111 による刺激が未分化 iPS 細胞から内胚葉や肺前駆細胞への分化段階において有効な刺激となると推測されたが、iPS 細胞を未分化状態で維持する段階で同じ Matrigel を使用しているため、細胞がこれに馴化している可能性も考えられた。そのため、sBM を iPS 細胞分化に有効的に利用するためには、iPS 細胞の未分化状態の維持の条件から検討する必要があるかもしれない。

現在の条件では肺前駆細胞までの誘導において Matrigel 上で培養した場合が最も分化マーカーが高い値を示したため、次に、肺前駆細胞までを Matrigel 上で分化した後、更なる分化誘導を各コート上に継代して比較した。まず、肺前駆細胞を含む分化した細胞を各コートのプレートに播種して平面培養で継続して Wong らの報告に従って分化を行った。その結果、sBM 上での培養は Matrigel や iMatrix に比べて繊毛細胞のマーカーである FOXJ1 や基底細胞のマーカーである P63 の誘導は依然として低くなり、sBM 上での培養が有効である結果は得られなかった (図 3)。次に、肺前駆細胞まで誘導した細胞を Matrigel 中で 3 次元培養して spheroid を形成させて分化させ、その後、spheroid を single cell にして各コーティングの culture insert に播種してから気層培養を行う系で比較した。この実験の結果、繊毛細胞のマーカーである FOXJ1 や基底細胞のマーカーである P63 および KRT5 の誘導は sBM 上で培養した条件が最も高くなった (図 4)。これらのことから、Laminin511 を主体に構成された基底膜構造

体は肺上皮細胞までの後期分化段階において有効に作用する可能性が考えられた。

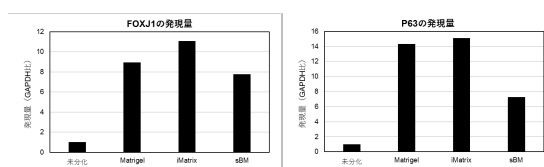


図3. 各種コート上での FOXJ1 および P63 の発現レベル (平面培養系)

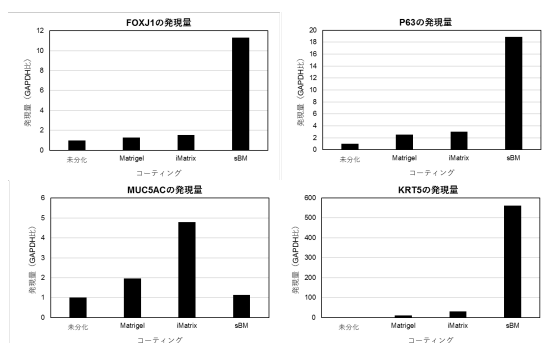


図4. 各種コート上での FOXJ1 および P63 の発現レベル (3次元系)

<引用文献>

- 永野麗子、細川剛、古山昭子、持立克身 (2008) 基底膜構造体を培養基質に用いた人口組織の構築. 移植, 43, 10-16.
- Higuchi Y., Shiraki N., Yamane K., Qin Z., Mochitate K., Araki K., Senokuchi T., Yamagata K., Hara M., Kume K., Kume S. (2014) Synthesized basement membranes direct the differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic lineages. J. Cell Sci., 123, 2733-2742.
- Goto S., Ito I., Nagasaki T., Yamamoto Y., Konishi S., Korogi Y., Matsumoto H., Muro S., Hirai T., Funato M., Mae S., Toyota T., Sato-Otsubo A., Ogawa S., Osafune K., Mishima M. (2014) Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports, 3, 1-10.
- Wong A.P., Bear C.E., Chin S., Pasceri P., Thompson T.O., Huan L.J., Ratjen F., Ellis J., Rossant J. (2012) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. Nat. Biotech., 30, 876-882.
- Konishi S., Gotoh S., Tateishi K., Yamamoto Y., Korogi Y., Nagasaki T., Matsumoto H., Muro S., Hirai T., Ito I., Tsukita S., Mishima M. (2016) Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports, 6, 18-25.

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

伊藤智彦、曾根秀子、培養細胞を用いて環境汚染物質の毒性影響を調べる、第 15 回環境研究シンポジウム、2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

伊藤 智彦 (ITO Tomohiro)
 国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
 研究者番号：60391067

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

持立 克身 (MOCHIDATE Katsumi)
 曾根 秀子 (SONE Hideko)