

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17H04296
 研究課題名(和文) 幹細胞を用いた難治性肺疾患に対する肺再生治療の開発

研究課題名(英文) Stem cell based therapy for lung regeneration

研究代表者
 奥村 明之進 (Okumura, Meinoshin)
 大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：40252647
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患COPDの新たな治療法の開発は急務であり、今回COPDに対する細胞治療を用いた再生医療を考案することを目的とした。

COPD誘導マウスに対して、脂肪組織由来幹細胞ADSCまたはII型肺胞上皮へ分化誘導した人工多能性幹細胞iPSCを経静脈的に投与し傷害肺に対する治療効果を検討したところ、組織学的な肺破壊の抑制および呼吸機能の改善を認めた。投与したADSCおよびiPSCは傷害肺へ生着し、いずれにもII型肺胞上皮マーカーの発現を確認できた。投与した幹細胞によって肺実質細胞を補充できる可能性があり、肺の再生医療を考案する上で、ADSCやiPSCが重要なツールになり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患COPDの根治を目指した研究は少ない。効果的な肺胞再生をうながす細胞補充療法が確立できれば、COPDの新たな治療法となる可能性がある。さらに他の難治性肺疾患に対する肺再生・修復治療の開発や肺移植時に問題となる虚血再管流障害にも応用が可能となる。本研究におけるADSC・iPSC由来II型肺胞上皮細胞を用いた肺再生の基礎的な結果をふまえ、臨床応用に向けた、各幹細胞の肺胞細胞への分化誘導法の確立、分化細胞の安全性評価、移植方法の最適化、大量培養など幹細胞操作応用技術開発といったRegulatory Scienceに関する研究につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a progressive lung disease characterized by irreversible alveolar destruction. The aim of this study was to develop the therapeutic solution against COPD by the cell therapy. We used the COPD mice model induced by elastase inhalation. The adipose tissue-derived stem cell (ADSC) was prepared from wild type mice. Murine induced pluripotent stem cells (iPSC) was induced to differentiate into alveolar type II cells using embryoid body seeding and stepwise differentiation methods. These cells were administered into COPD model mice intravenously. The ADSC or iPSC accumulated the damaged area and significantly inhibited deterioration of the lung compliance and histologic changes.

Our data indicated that the administration of ADSC or iPSC improved the emphysema histologically and functionally. These cells could be engrafted into the injured tissue in COPD lung, thus they may have a therapeutic potential against COPD by regenerative medicine.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺再生 脂肪幹細胞 人工多機能性幹細胞 慢性閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

呼吸不全とは、動脈血ガスが異常な値を示し、それがために生体が正常な機能を営みえない状態である。さまざまな疾患の結果として呼吸機能が低下し、十分な酸素を各臓器に送れなくなった状態は致命的病態になりうる。急性呼吸不全の原因として、肺炎や急性呼吸窮迫症候群などがあり、慢性呼吸不全には慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) が約半数を占め、ほかに肺結核後遺症、間質性肺炎などが挙げられる。COPD は非可逆性の肺泡破壊を特徴とする慢性進行性の肺疾患であり、世界の全死因の第 3 位になると予測されている。そのほかに肺動脈性肺高血圧症、気管支拡張症、肺サルコイドーシス、肺リンパ脈管筋腫症などの肺移植適応疾患が慢性呼吸不全の原因になる。重症臓器不全に対して臓器移植という置換型治療が最も有効であるが、臓器移植の機会はまだまだ少ないことから、呼吸不全に対する新たな治療法の開発が期待されている。

肺は感染や喫煙など様々な刺激により傷害を受け、血管内皮細胞が障害され肺胞上皮細胞脱落が生じる。傷害が反復された場合には、線維芽細胞や平滑筋細胞の増生、細胞外マトリックス産生による過修復状態となり、不可逆的な肺泡破壊や肺線維化につながる。しかし、小動物を用いたエラストラーゼ PPE 誘発肺気腫モデルで all-trans retinoic acid (ATRA) 投与により解剖学的、生理学的に改善が認められることが報告され、肺実質の再生が可能であることが示唆された。また、成人肺においても障害を受けた肺組織が新しい細胞に置き換えられ、修復されることが報告され、肺再生医療が本格的に注目されるようになってきている。

我々は、慢性呼吸不全に対する治療手段の可能性の一つとして、hepatocyte growth factor (HGF) に注目し、動物モデルを用いて HGF の外的補充による肺気腫の病態改善の可能性について検討した。肺気腫の病態進展に伴う内因性 HGF 産生の低下が肺気腫の病態進展に関与しており、HGF が枯渇する時期に合わせて HGF を経静脈的に遺伝子導入すると、肺血管床・肺胞上皮細胞の増加を認め、組織学的変化に一致してガス交換能及び運動耐容能が改善した。また、肺切除による代償性肺再生動物モデルにおいて、HGF 投与が残存肺の代償性再生を誘導することを示した。同様に、肺再生を促す因子として、fibroblast growth factor (FGF)、insulin like growth factor (IGF)、keratinocyte growth factor (KGF)、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) などが報告されている。

細胞補充による肺再生として、以前より間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) が注目されてきた。肺障害モデルを用いた解析から、骨髄由来幹細胞が炎症刺激により損傷部位に動員されることが報告されている。骨髄由来幹細胞は HGF を含む多くの増殖因子を介して、免疫調節、抗炎症作用、組織修復を促し、さらに肺を構成する肺胞上皮、血管内皮、線維芽細胞などに分化するとされる。また、脂肪組織は大量の MSC を含み、脂肪組織より得られる同種脂肪組織由来幹細胞 (adipose tissue-derived stromal cell; ADSC) は増殖が速く細胞活性も高いため再生医療において有望な細胞ソースと考えられている。一方、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) を用いた再生医療は最も注目されている分野の一つである。iPSC を用いた肺再生にチャレンジするためには、iPSC を様々な肺胞上皮細胞に分化誘導させ、それぞれの細胞発現マーカーを用いて純化させる必要がある。さらに、細胞治療に見合うだけの大量培養を安全に行い、効率よく細気管支・肺胞へ生着させ機能を持たせる技術開発が必要である。iPSC の肺胞上皮への分化プロトコールや培養法について報告され始め、iPSC を用いた肺再生医療についても注目が集まっている。

2. 研究の目的

複雑な構造をもつ肺を再生するためには、克服すべき問題が多い。COPD などの慢性呼吸不全は、細気管支より末梢の気道域に不可逆的な組織破壊を伴っており、COPD に対する肺胞の組織再構築には、肺胞再生因子の同定に加え、細胞補充型の肺胞再生をめざす必要がある。したがって、本研究では、慢性呼吸不全の新しい治療法として、ADSC・iPSC を用いた肺再生医療を確立すること目的とした。

COPD に対する細胞治療法を考案することを目的として、以下の研究を計画した：

- (1) 肺胞再生因子の同定
- (2) ADSC・iPSC を用いた細胞補充型肺再生の検証
- (3) 肺胞再生細胞治療法の臨床応用に向けた技術開発

3. 研究の方法

(1) 肺胞再生誘発因子の解析

肺胞上皮細胞株、肺線維芽細胞株、肺微小血管内皮細胞株を用いた ON01301 による肺胞上皮細胞の増殖、生存シグナルの解析を行った。

(2) ADSC の採取・分析

マウスを過剰麻酔により安楽死させ、皮下白色脂肪組織を採取する。採取した組織をコラゲナーゼ溶液で消化して、ADSC を分取した。単離・培養した ADSC を、脂肪・骨・軟骨への分化誘導を

行い、幹細胞としての性質を検討した。また肺胞上皮細胞へ分化可能かを検討するため、末梢気道成長培地、気道上皮細胞成長培地を用いて、肺胞上皮細胞への分化誘導法を確立した。

(3) iPSC の II 型肺胞上皮への分化誘導法の確立

マウス iPSC_{iPS-MEF-Ng-20D-17} 細胞株 (20D-17) を、これまでの報告を参考にして胚様体法と段階的分化誘導法 (iPSC 胚性内胚葉 前方前腸 腹側前方前腸 型肺胞上皮細胞) で 26 日間 (0-26 日目) かけて II 型肺胞上皮細胞へと分化誘導した。さらに、未分化細胞の除去法として、Bromodomain-containing protein (BRD) 4 インヒビター JQ1 の効果を検証した。

(4) ADSC・iPSC の COPD 治療効果の検証

エラスターゼ (porcine pancreatic elastase; PPE) 気管内投与肺気腫モデルマウスに、ADSC (5×10^5 cells/匹) を 3 日目に尾静脈、または経気管的に投与を行う。PPE+/ADSC+, PPE+/ADSC-, PPE-/ADSC+, PPE-/ADSC- の 4 群に分け、1 週間後と 3 週間後に肺気腫の改善効果を組織学的・機能的に評価した。さらに、マウス肺気腫モデルに対する ADSC の集積を検討するために、PPE 吸引後に 3 日目に GFP-ADSC を尾静脈、または気管から投与した。投与 1 週間後と 2 週間後に肺を摘出し、ADSC の集積を評価した。さらに、肺胞上皮の発生初期マーカーである TTF-1 で免疫染色し、集積した ADSC の分化を検討した。また II 型肺胞上皮へ分化させた iPSC を用いて、細胞を蛍光標識した後に、同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肺胞再生誘発因子の解析

虚血性心疾患、肺高血圧症、閉塞性動脈硬化症、気管支喘息等にて、非臨床研究で有効性が示されているプロスタサイクリンアナログ ONO-1301 による肺再生におよぼす影響を検討した。PPE 気管内投与肺気腫モデルマウスへ ONO1301 を投与することで、肺組織内の HGF・stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) の発現が上昇し、組織学的解析により肺気腫誘導による肺胞破壊を抑制することを示した。また、ONO-1301 投与により、ガス交換能の改善を示すことを超偏極 ^{129}Xe MRI を用いて明らかにした。肺微小血管内皮細胞株、肺線維芽細胞株に対して、培養条件下に ONO-1301 を投与することで、HGF・SDF-1 発現が上昇することを qRT-PCR、ELISA を用いて明らかにした。HGF・SDF-1 投与または ONO1301 で刺激した肺微小血管内皮細胞株、肺線維芽細胞株の培養上清により肺胞上皮細胞の増殖が亢進することから、肺胞修復の過程で、肺胞上皮細胞周囲の細胞から分泌される HGF・SDF-1 が肺胞再生誘発因子として重要であると考えられた。

(2) ADSC の単離・培養および II 型肺胞上皮への分化能の解析

分取した ADSC は、分化誘導により脂肪、骨、軟骨へ分化した。また ADSC を肺胞上皮細胞への分化誘導培地で培養すると、分化前の ADSC で発現していない TTF-1 や Surfactant Protein B (SPB)、Surfactant Protein C (SPC) の肺胞上皮マーカーの発現を認めた。分化誘導した ADSC では電子顕微鏡で II 型肺胞上皮細胞の構造物である lamellar body 様の構造物を認めた。また、ADSC の培養上清中の SDF-1 は、II 型肺胞上皮への分化誘導により、減少した。以上より、ADSC は多分化能を有し II 型肺胞上皮細胞への分化能をもつことが示されたが、ADSC は分取後新鮮な状態で分化誘導を行わず、生体投与することにより、肺再生に有効な手段となる可能性が示唆された。

(3) iPSC の分化誘導法の確立

マウス iPSC を、胚様体法と段階的分化誘導法で 26 日間 (0-26 日目) かけて II 型肺胞上皮細胞へと分化誘導した。Activin A 20 ng/ml、Wnt3a 10 ng/ml の 4 日間投与 (3-7 日目) により Cxcr4、Sox17、Foxa2 の上昇を認め、胚性内胚葉への分化誘導を確認した。次に Noggin 100ng/ml、SB431542 5 μM の 2 日間投与 (7-9 日目) により Pax9、Tbx1 の上昇と Sox2 の再上昇を認め、前方前腸への分化誘導を確認した。次に Wnt3a 20 ng/ml、FGF10/KGF/EGF それぞれ 5 ng/ml の 7 日間投与 (9-16 日目) により Nkx2-1 の上昇を認め、腹側前方前腸への分化誘導を確認した。TTF-1 陽性細胞は全細胞の $36.2 \pm 5.9\%$ であった。さらに Wnt3a 20 ng/ml、FGF10/KGF それぞれ 5 ng/ml の 10 日間投与 (16-26 日目) により SPB、SPC の上昇を認め、II 型肺胞上皮細胞への分化誘導を確認した。proSPC 陽性細胞は $17.1 \pm 1.5\%$ であった。

一方、未分化マウス iPSC に対する JQ1 の効果を検討した。0.2 μM 以上の JQ1 添加で未分化 iPSC の増殖を抑制し、0.2 μM の JQ1 投与により多分化能マーカーである Klf4、Pou5F1、Sox2、cMyc が低下することを確認した。26 日間 (0-26 日目) かけて胚様体法と段階的分化誘導法で分化誘導した前記の細胞群を回収し、さらにマトリゲルで 14 日間 (26-40 日目) 3 次元培養した。3 次元培養の間に JQ1 を 4 日間 (28-32 日目) 添加して残存未分化 iPSC の除去を試みた。3 次元培養のみで 40 日目の SPC の発現は 26 日目と同レベルに維持されたが、JQ1 添加によりさらに増加した。JQ1 を添加した細胞群では、多分化能マーカーの Pou5F1、Sox2 の低下を認め、残存未分化 iPSC (Nang-GFP 陽性細胞) の減少を認めた。JQ1 を添加した細胞群の 40 日目の proSPC 陽性細胞は $39.4 \pm 16.8\%$ であった。

以上より、胚様体法と段階的分化誘導法を用いてマウス iPSC より II 型肺胞上皮細胞へ分化させることが可能であり、さらに JQ1 を添加した三次元培養で残存未分化 iPSC が除去され、II 型肺胞上皮細胞への分化誘導効率を改善した。

(4) PPE 気管内投与肺気腫モデルマウスに対する幹細胞投与効果の検証

PPE 気管内投与肺気腫モデルマウスに ADSC を投与し小動物呼吸機能検査を行ったところ、気

道コンプライアンスで PPE+/ADSC-群 60 μ l/cmH20; PPE+/ADSC+群 50 μ l/cmH2 と改善を認め (P<0.01)、超偏極 ^{129}Xe MRI ではガス交換率において PPE+/ADSC-群 4.8% ; PPE+/ADSC+群 7.8% と改善を認めた (P<0.05)。さらに組織学的評価で ADSC 投与による気腫性変化の改善を認めた。PPE +/ADSC+群では気腫肺内に ADSC 集積を認め、PPE-/ADSC+群と比較して多くの ADSC の集積を認めた。気腫肺内に集積した ADSC の一部に TTF-1、SPB、SPC 陽性細胞を認めた。以上より、ADSC は多分化能を有し生体内で II 型肺胞上皮細胞へ分化する可能性があり、生体投与により肺障害部位への集積し、ADSC は肺損傷修復の過程で、細胞供給源になる可能性が示唆された。

一方、未分化 iPSC、II 型肺胞上皮へ分化誘導した iPSC を、同様に PPE 気管内投与肺気腫モデルマウスへ尾静脈投与を行ったところ、II 型肺胞上皮へ分化誘導した iPSC が気腫肺により多く生着した。生着した蛍光標識細胞を摘出肺より分取し II 型肺胞上皮マーカーを解析したところ、II 型肺胞上皮細胞に特異的なマーカーである SPC を発現していることを確認した。したがって、分化誘導を行った iPSC が、効率よく傷害肺に生着し肺再生に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukui E, Funaki S, Kimura K, Momozane T, Kimura A, Chijimatsu R, Kanzaki R, Kanou T, Ose N, Minami M, Miyagawa S, Sawa Y, Okumura M, Shintani Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Adipose Tissue-Derived Stem Cells Have the Ability to Differentiate into Alveolar Epithelial Cells and Ameliorate Lung Injury Caused by Elastase-Induced Emphysema in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 5179172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Momozane T, Fukui E, Funaki S, Fujii M, Kinehara Y, Ito E, Miyagawa S, Ohno Y, Sawa Y, Okumura M, Shintani Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficient Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells into Alveolar Epithelium Type II with a BRD4 Inhibitor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 1271682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福井給里子、新谷 康、桃實 徹、神崎 隆、川村知裕、舟木壮一郎、南 正人、奥村明之進
2. 発表標題 肺気腫モデルマウスに対する脂肪組織由来幹細胞による細胞治療
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井給里子、新谷 康、桃實 徹、神崎 隆、大瀬尚子、川村知裕、舟木壮一郎、南 正人、奥村明之進
2. 発表標題 肺障害修復過程における脂肪組織由来幹細胞の役割
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井絵里子、新谷 康、神崎 隆、狩野 孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南 正人、宮川 繁、澤 芳樹、奥村明之進
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞の肺気腫モデルマウスに対する治療効果とその役割
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kunou H, Shintani Y, Minami M, Funaki S, Ose N, Kano T, Kanzaki R, Sawa Y
2. 発表標題 Construction of 3-dimentional lung interstitial model using Layer-by-Layer cell coating technique
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fukui E, Shintani Y, Kimura K, Momozane T, Kanzaki R, Kano T, Ose N, Funaki S, Minami M, Okumura M
2. 発表標題 Adipose derived-stem cells show ability to differentiate into alveolar epithelial cells and ameliorate elastase-induced emphysema in model mice
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Reserch (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井絵里子、新谷康、桃貫徹、神崎隆、川村知裕、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進
2. 発表標題 肺気腫モデルマウスに対する脂肪組織由来幹細胞による細胞治療
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新谷 康、舟木壮一郎、桃實 徹、福井絵里子、久能英法、大瀬尚子、狩野 孝、神崎 隆、南 正人、宮川 繁、澤 芳樹、奥村明之進
2. 発表標題 難治性肺疾患に対する 肺再生治療
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新谷 康、舟木壮一郎、桃實 徹、福井絵里子、久能英法、大瀬尚子、狩野 孝、神崎 隆、南 正人、宮川 繁、澤 芳樹、奥村明之進
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患に対する肺再生治療
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	南 正人 (Minami Masato) (10240847)	大阪大学・医学部附属病院・准教授 (14401)	
研究分担者	大瀬 尚子 (Oose Naoko) (10570559)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	舟木 壮一郎 (Funaki Soichiro) (50464251)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	狩野 孝 (Kanou Takashi) (70528455)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	新谷 康 (Shintani Yasushi) (90572983)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	神崎 隆 (Kanzaki Ryu) (10779060)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	川村 知裕 (Kawamura Tomohiro) (30528675)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	削除：平成30年1月5日