

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08151

研究課題名（和文）高性能免疫毒素を用いた肺上皮幹細胞の選択的培養法の開発

研究課題名（英文）Development of a selective culture method for pulmonary epithelial stem cells using high-performance immunotoxin

研究代表者

山口 美樹（Yamaguchi, Miki）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10530454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：呼吸器領域において、特発性肺線維症あるいは慢性閉塞性肺疾患などは治療法が確立されていない予後不良の慢性進行性疾患である。肺を構成する肺上皮幹細胞を移植することが出来れば、新たな治療法になり得ると考え免疫毒素を用いた選択的培養を考案した。CD90-DT3C（免疫毒素）を添加することで肺上皮前駆/幹細胞が選択的に培養することが可能であった。また、A83-01ならびにY27632を加えて培養することで更に培養効率が上がった。以上のことから免疫毒素を用いた選択的培養が完成した。この培養系を利用した慢性閉塞性肺疾患の治療法開発を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常ヒト肺組織由来細胞を用いた肺上皮幹細胞の培養については殆ど報告が無く、免疫毒素を利用した細胞の選択については皆無である。免疫毒素は内在化能を有する抗体があれば簡単に目的の細胞を排除することができ汎用性がある。この研究が成功することで国内外における培養技術は飛躍的な進化を遂げる可能性がある。

また、高齢者に多発する慢性閉塞性肺疾患の治療に応用可能で治療を受けている国内患者数で約26万人、推定患者数は実に500万人以上である。これらの特発性肺線維症、肺気腫などの慢性閉塞性肺疾患の治療に応用できる可能性が高い。今後は臨床応用に向けた研究を進めたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：In the respiratory field, idiopathic pulmonary fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease is a chronic progressive disease with a poor prognosis for which no cure has been established. We thought that if the lung epithelial stem cells that make up the lung could be transplanted, it could be a new therapeutic method, and devised a selective culture using immunotoxin. By adding CD90-DT3C (immunotoxin), lung epithelial precursors / stem cells could be selectively cultured. In addition, the culture efficiency was further improved by culturing with the addition of A83-01 and Y27632. From the above, selective culture using immunotoxin was completed. We will proceed with the development of a treatment method for chronic obstructive pulmonary disease using this culture system.

研究分野：呼吸器領域

キーワード：高性能免疫毒素 モノクローナル抗体 肺上皮前駆/幹細胞 選択的培養 慢性閉塞性肺疾患の治療

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

呼吸器領域において、特発性肺線維症あるいは慢性閉塞性肺疾患などは治療法が確立されていない予後不良の慢性進行性疾患である。最近、脳死者の肺組織から肺上皮細胞を取り出し特発性肺線維症患者に経気道的に移植することで症状の改善ないし生存期間の延長が報告された (Serrano MA, et al. CHEST. 2016 Sep; 150(3): 533-543)。この報告から、肺を構成する肺上皮幹細胞を移植することが出来れば、新たな治療法になり得ると考えられる。しかしながら脳死者からの肺細胞の移植は国内では難しく、移植できるほどの肺上皮幹細胞を含む肺細胞を健常者から得ることは極めて困難である。そこで私たちは、末梢肺組織から微量の肺細胞を取り出し、この中に含まれる肺上皮幹細胞の選択的かつ効率的な培養法を開発することを考えた。

私たちが所属する札幌医大附属フロンティア医学研究所・分子医学部門では、数年来、特発性肺線維症に特徴的に認められる線維芽細胞巣が上皮間葉移行 (epithelial to mesenchymal transition; EMT) した肺胞上皮に由来するとの仮説を検証するため研究を進めてきた。その研究の一環として当研究室では既に正常肺組織由来の上皮細胞 (Human Lung 細胞; HuL 細胞と命名した) の培養を確立している。3人の患者に由来するHuL4-HuL6は型肺胞上皮マーカー thyroid transcription factor 1 (TTF-1) とNapsin A を発現し、肺胞上皮として矛盾しない表現型を示し、TGF- signaling依存的に72時間で上皮型あるいは間葉型へと動的に表現型を変化させた。この結果はEMTを生じた肺胞上皮が線維芽細胞巣を形成しうることを支持する結果であった (Yamaguchi M, et al. Lab Invest. 2017 Mar; 97 (3) :232-242)。私たちはHuL細胞の中に肺上皮幹細胞が含まれていると考え長期的な培養を試みた。HuL細胞を長期間培養すると、EMTにより生じた線維芽細胞様の間葉系細胞が出現しHuL細胞の増殖が抑制された。TGF-signaling阻害剤であるEW7197あるいはA83-01を加えることで一時的に回復するが、再び間葉系細胞が出現しHuL細胞の増殖は抑制される。私たちは、培養過程で出現する間葉系細胞を除くことで、HuL細胞の長期的な培養が可能になると考えた。肺上皮幹細胞にダメージを与えず間葉系細胞のみを確実に除去する、新たな細胞除去法の開発が必要であった。

そこで着目したのが、抗体を用いた方法である。私たちはこれまでに難治性癌の治療を目的に標的分子ならびに抗体の探索を進めてきた。モノクローナル抗体に抗癌剤を結合することで直接的に癌細胞殺傷効果を示す抗体薬剤結合体 (Antibody Drug Conjugation; ADC) が注目され開発が進められている。ADC型抗体薬は抗体が細胞膜表面抗原と結合し内在化して抗癌剤を細胞内に届けるいわゆるイミュノトキシンである。私たちはこのイミュノトキシンを簡便に形成できるツールを開発し、ADC型抗体薬として有用な抗体の探索を進めてきた (Yamaguchi M, et al. BBRC 2014 Nov 28; 454(4): 600-603, Yamaguchi M, et al. BBRC 2017 Jun 3; 487(3):613-618)。

このツールは Catalytic domain および Translocation domain を含むジフテリア毒素(DT)と連鎖球菌プロテイン G のC1,C2,およびC3の3つのドメイン(3C)を含むリコンビナント複合タンパク質であり DT3C と名付けた。DT3C は単独では細胞毒性が無いのが特徴であり抗体と混ぜるだけで ADC 様の抗体-DT3C 結合体を簡便に形成できることから、このツールを用いて ADC 型抗体薬として有用な抗体の探索を行い 800 以上のモノクローナル抗体を樹立してきた。

私たちは、これらのモノクローナル抗体と DT3C でイミュノトキシンを作製し、培養液に加えることで目的の細胞 (ここでは間葉系細胞) を除くことができると考えた。この系を利用することで HuL 細胞の長期的な培養が可能になり、さらに肺上皮幹細胞を濃縮できると考えられる。また、この方法が確立されることで、iPS や ES 細胞の各系統への分化誘導およびあらゆる培養系における不要な細胞の除去に応用することが可能になる。

2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患 (特発性肺線維症など) の治療を目的としたイミュノトキシンを利用した肺上皮幹細胞の効率的かつ選択的な培養法の開発である。

3. 研究の方法

- (1) イミュノトキシンに用いるモノクローナル抗体の選択: 血液系、血管内皮系、上皮系および線維芽細胞系に対するイミュノトキシン抗体を選び出す。

- (2) ヒト由来フィーダー細胞の樹立：肺上皮幹細胞には NIH-3T3 などのマウス由来フィーダー細胞が必要である。このマウス由来フィーダー細胞をヒト由来フィーダー細胞に置き換える。
- (3) 肺上皮幹細胞の効率的且つ選択的培養の確立：肺上皮幹細胞の培養において悪影響を及ぼす細胞を除去するために適切な条件を評価する。a.免疫トキシンとして除去する細胞の選別、 b.培養液の選択、 c.各種阻害剤の選択 (TGF- シグナル阻害剤、ロック阻害剤など) を行う。

4. 研究成果

- (1) ヒト肺上皮幹細胞の基本的な培養法は無血清培地 (BEGM 培地) と NIH-3T3 を用いることで可能であった。しかしながら、2週間培養することで増殖効率が低下し線維芽細胞などの間葉系細胞が出現した。間葉系細胞の出現することで更に肺上皮幹細胞の増殖効率が低下した。私たちは線維芽細胞の除去を目的にヒト線維芽細胞を免疫原にしてモノクローナル抗体の樹立を試みた。16回の細胞融合を試み合計で86個線維芽細胞に対するモノクローナル抗体が樹立出来た。内訳は CD13(3個)、CD44(4個)、CD59(3個)、CD63(40個)、CD90(3個)、CD71(4個)、CD151(4個)、ITGA5(3個)、LAMP1(2個)、MHC-ClassI(4個)、ITGB1(1個)、IGF2R(1個)、LAMP2(1個)および抗原未同定抗体が13個含まれていた。この中で間葉系抗原は CD13、CD63、CD90 および CD151 であり、これらの間葉系細胞の除去について評価した。CD63 および CD151 については肺上皮細胞で発現が認められ断念した。一方、CD13 は間葉系細胞への内在化能が低く、それに伴い除去効率が悪かった。これらの抗原に対し CD90 は間葉系細胞に特異的に発現し、強力な内在化能を示した。この CD90 と DT3C で形成した免疫トキシンを添加することで肺上皮幹細胞の培養効率は格段に良くなった。
- (2) ヒト由来フィーダー細胞の有効性：BEGM 培地ベースで培養することで上記に示すように線維芽細胞様の間葉系細胞が出現する。この細胞は血清含有 DMEM 培地で容易に増幅が可能であり、私たちにとって都合の良い細胞であった。私たちはこの間葉系細胞をヒト肺上皮幹細胞の培養に利用することを考案し実験を試みた。間葉系細胞の増殖を止めるため、マイトマイシン C 処理をした。この細胞を凍結し各実験に用いた。その結果、マウス由来フィーダー細胞とヒト由来フィーダー細胞で肺上皮幹細胞の増殖に違い認められなかった。以上のことから、フィーダー細胞はヒト由来に置き換えることが可能であった。
- (3) 間葉系細胞の除去は CD90-DT3C で除去することが可能であった。更に TGF- シグナル阻害剤(A83-01 あるいは EW7197)およびロック阻害剤(Y-27632)を同時に添加することで肺上皮幹細胞の増幅が 10~1000 倍に増加した。
- (4) その他の培養系への応用：私たちはこれまでに内在化能を示すモノクローナル抗体を多数樹立している。A.造血前駆/幹細胞の純化には、分化抗原である CD13,CD38,MHC-Class を添加し培養することで造血前駆/幹細胞が濃縮可能である。B.肺由来血管内皮系細胞の純化には、上皮系細胞のマーカーである EpCAM,CD63,CD73 などを添加して培養することで肺由来血管内皮細胞が効率良く培養できる。C.線維芽細胞などを含む間葉系細胞の純化には、上皮系細胞のマーカーである EpCAM ならびに TROP2 を添加することで間葉系細胞の濃縮が可能である。

(1)、(2)および(3)に示すように慢性閉塞性肺疾患の治療に用いるための肺上皮幹細胞の選択的培養法は完成形に近いものとなった。今後は臨床応用に向けた安全性を含めた基礎検討を進めようと考えている。また、免疫トキシンを利用した細胞の除去や濃縮は、あらゆる細胞の培養に応用できる。例えば、iPS 細胞の分化誘導に利用することで効率の良い分化成熟が可能になると考えられる。今後は各種細胞の分化誘導を促すための選択的培養キットの商品化を目指すしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tanaka Yusuke, Yamaguchi Miki, Hirai Sachie, Sumi Toshiyuki, Tada Makoto, Saito Atsushi, Chiba Hirofumi, Kojima Takashi, Watanabe Atsushi, Takahashi Hiroki, Sakuma Yuji	4. 巻 372
2. 論文標題 Characterization of distal airway stem-like cells expressing N-terminally truncated p63 and thyroid transcription factor-1 in the human lung	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.09.020	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 Tada Makoto, Sumi Toshiyuki, Tanaka Yusuke, Hirai Sachie, Yamaguchi Miki, Miyajima Masahiro, Niki Toshiro, Takahashi Hiroki, Watanabe Atsushi, Sakuma Yuji	4. 巻 133
2. 論文標題 MCL1 inhibition enhances the therapeutic effect of MEK inhibitors in KRAS-mutant lung adenocarcinoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 88 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2019.05.014	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 -
1. 著者名 Hirai Sachie, Tada Makoto, Yamaguchi Miki, Niki Toshiro, Sakuma Yuji	4. 巻 526
2. 論文標題 EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells depend on Bcl-xL and MCL1 for survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 417 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.116	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 Yamaguchi Miki, Hirai Sachie, Tanaka Yusuke, Sumi Toshiyuki, Tada Makoto, Takahashi Hiroki, Watanabe Atsushi, Sakuma Yuji	4. 巻 528
2. 論文標題 Pericyte-myofibroblast transition in the human lung	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 269 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.091	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 Ikeda Hitomi, Uchida Hiroaki, Okubo Yu, Shibata Tomoko, Sasaki Yasuhiko, Suzuki Takuma, Hamada-Uematsu Mika, Hamasaki Ryota, Okuda Kosaku, Yamaguchi Miki, Kojima Masaki, Tanaka Masato, Hamada Hirofumi, Tahara Hideaki	4. 巻 95
2. 論文標題 Antibody Screening System Using a Herpes Simplex Virus (HSV)-Based Probe To Identify a Novel Target for Receptor-Retargeted Oncolytic HSVs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01766-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01766-20	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	佐久間 裕司 (SAKUMA Yuji) (10364514)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	内田 宏昭 (UCHIDA Hiroaki) (20401250)	東京大学・医科学研究所・特任准教授 (12601)	
研究分担者	角 俊行 (SUMI Toshiyuki) (60772291)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	田中 悠祐 (TANAKA Yusuke) (70792125)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	多田 周 (TADA Makoto) (00815441)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	高橋 素子 (TAKAHASHI Motoko) (00303941)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	藤谷 直樹 (FUJITANI Naoki) (10374191)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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