

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18279

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来気道上皮シート移植の鼻副鼻腔への応用

研究課題名（英文）Application of transplantation of hiPSC-derived airway epithelial sheets to nasal sinuses

研究代表者

北田 有史 (Kitada, Yuji)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：50869584

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）：本研究の目的は、ヒトiPS細胞由来気道上皮を免疫不全ラットの鼻腔粘膜欠損部に移植し、鼻腔粘膜機能不全に対する治療法の基盤技術と病態メカニズム解析に必要な鼻腔粘膜ヒト化モデルを作製することである。このため、搔把部の深度や面積などの鼻腔呼吸上皮剥離条件、使用する細胞株や足場、レシピエントラットなどの移植条件の最適化を行った。確立された条件で6匹の免疫不全ラットへの移植を行ったところ、4匹のラットでヒトiPS細胞由来細胞の生着が見られ、これらヒトiPS細胞由来生着細胞は気道上皮構成細胞種を含むことが確認できた。以上、免疫不全ラット鼻腔にヒトiPS細胞由来気道上皮を生着させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は遺伝性疾患や外傷などによる粘膜機能不全に対する移植治療のための基盤技術の確立として有用であり、移植細胞を嗅上皮に変えることで嗅覚異常への応用も可能であり、波及効果が期待できる。また鼻腔は管腔面が気層で呼吸の刺激にさらされる特殊な環境であるため、鼻腔ヒト化ラットは培養細胞を用いた培養液中での治療薬の検証よりもより生体に近い効果を検証可能であり、創薬研究にも有用である。COVID-19における嗅覚障害の発症メカニズムの解析や治療薬の検証にも応用可能であり、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to create a nasal mucosal humanized rat model, which was necessary for the establishment of basic technology of treatment for nasal mucosal dysfunction and the analyses of pathological mechanisms by the transplantation of human iPS cell-derived airway epithelia into the nasal mucosal defect of the immunodeficient rat. For this purpose, we optimized the conditions for nasal respiratory epithelial exfoliation such as depth and area of the scraping area, and the conditions for transplantation such as cell lines, scaffolds, and recipient rats. After transplantation into six immunodeficient rats, four rats showed human iPS cell-derived engrafted cells, and it was confirmed that these human iPS cell-derived engrafted cells contained the cells that constitute the airway epithelia. In conclusion, we succeeded in engraftment of human iPS cell-derived airway epithelia in the nasal cavity of immunodeficient rats.

研究分野：鼻科学

キーワード：鼻・副鼻腔 移植治療 ヒトiPS細胞 線毛上皮細胞 コラーゲンビトリゲル ノードラット

1. 研究開始当初の背景

鼻副鼻腔は呼吸の際の空気の通り道として重要な役割を担う。鼻副鼻腔の管腔面の気道上皮で覆われた領域は呼吸上皮と呼ばれ、分泌細胞から分泌される粘液と線毛上皮細胞の線毛運動により、呼気中の微生物や微粒子を体外へ排出する役目を担っている。この機能が阻害されると異物が排出されなくなると易感染性を呈し、QOL を損なうだけでなく、生命にかかわる危険性がある。線毛機能不全症候群では線毛構成タンパク質をコードする遺伝子の異常により線毛運動障害が起こり、嚢胞性線維症では遺伝子変異による陰イオンチャネルの機能低下により塩化物イオンと水の輸送が障害され管腔内の粘液の粘性が過度に高くなり管腔が閉塞し、共に易感染性を示す。これらの疾患には根本的治療法がない。近年このような根本的治療法のない遺伝子疾患等への治療法の一つとしてヒト iPS 細胞由来細胞の移植治療に関する研究が進められている。申請者の所属する研究室では、疾患や外傷により生じた気管欠損部への再生治療の基盤的研究の一つとして、人工気管による再生治療を行ってきた。しかし、人工気管は管腔面上皮化に時間がかかり感染の危険性が増す。そこで、人工気管移植部の上皮化促進を目指し、ヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞シートのヌードラットへの移植を試み、移植細胞の生着に成功している (Okuyama et al., 2019)。そこで、この気道上皮細胞を鼻腔、副鼻腔へ移植し、高効率に生着させられれば根本的治療法のない鼻副鼻腔疾患への治療につながる可能性があると考え本研究に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、線毛機能不全症候群や嚢胞性線維症など根本的治療法のない遺伝性疾患により呼吸上皮の線毛運動機能が阻害されて異物が排出されず生命にかかわる危険性がある患者に対し細胞移植による治療を行うための基盤技術の開発として、ヒト iPS 細胞から分化誘導した気道上皮細胞シートを鼻腔、副鼻腔へ移植し、高効率に生着させることである。鼻副鼻腔の呼吸上皮部へヒト iPS 細胞由来細胞を移植・生着させた報告はなく、本研究独自の試みである。また、高効率にヒト細胞が生着すれば、鼻・副鼻腔の治療薬のヒト細胞での検証にも用いることができる。鼻、副鼻腔は管腔面が気層となる特殊な環境であるため、現在他の組織でヒト iPS 細胞を用いて培養液中で行われている *in vitro* の薬剤検証では検証を行う環境として不十分であり、動物個体の一部として生着したヒト細胞で検証を行えば、より正確な効果の検証が可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト iPS 細胞をコラーゲンビトリゲルの足場上で気道上皮細胞シートへ分化誘導し、免疫不全ラットの鼻、副鼻腔へ移植し高効率に生着させることを目指した。

(1) 鼻腔呼吸上皮組織剥離モデルの確立

移植先となる部分の鼻腔粘膜の搔把条件について、剥離層の深度、搔把する面積、鼻腔の気流の遮断につき搔把後 1 週間目の組織を HE 染色で検討し、組織の自然回復が起こりにくい条件を選定した。

(2) 移植条件の最適化

既報のヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞分化誘導法 (Gotoh, 2014, Konishi, 2015) を用い、コラーゲンビトリゲル膜上で分化誘導を行い、移植可能な気道上皮細胞シートを作製し、免疫不全ラットに移植した。移植部位の搔把条件は 1 の 1. で検討した結果を採用し、細胞株 2 種、足場となるビトリゲルの成分 2 通り、コラーゲン量 2 通り、UV 照射の有無など各条件につき 2 匹ほどの少数で検討した。ヒト iPS 細胞由来組織の生着率は、回収した組織の凍結切片を抗ヒト核抗体及び上皮細胞マーカーである抗 E-Cadherin 抗体で免疫染色し、上皮細胞層に占めるヒト核陽性細胞の割合によって評価した。また、レシピエントラットについても Nude ラットと XSCID ラットを比較検討した。

(3) 鼻腔へのヒト iPS 細胞由来気道上皮移植法の確立

(1) と (2) の検討をあわせて最適化された移植条件で 8 匹の移植を行った。(2) で最も生着効率が高かった条件で移植を行い、1 週間後に移植部組織を回収し、10 日間の脱灰後、凍結切片を作製し、抗ヒト核抗体により移植後生着した細胞を同定した。また、主な気道上皮構成細胞種のマーカー抗体で共染色し、生着細胞の細胞種の同定も行った。

(4) 改良誘導法による移植と検証

(3) の結果、移植部位でのヒト iPS 細胞由来気道上皮の生着が管腔に面した粘膜には見られなかったことから、移植法の改良を行った。奥山らの気道へのヒト iPS 細胞由来気道上皮シート移植と同様に、鼻腔背側管腔面に粘膜を含む欠損を作製し、ヒト iPS 細胞由来気道上皮シートで人工気管を覆ったものを移植した。1 週間後に移植部組織を回収し、10 日間の脱灰後、凍結切片

を作製し、移植後生着した細胞を抗ヒト核抗体で同定し、さらに、主な気道上皮構成細胞種のマーカー抗体で免疫染色し、生着細胞の細胞種の同定も行った。

4. 研究成果

研究の主な成果

本研究では、ヒト iPS 細胞をコラーゲンビトリゲルの足場上で気道上皮細胞シートへ分化誘導し、免疫不全ラットの鼻へ移植し生着させることに成功した。

(1) 鼻腔呼吸上皮組織剥離モデルの確立

移植先となる部分の鼻腔粘膜の掻把条件について検討した結果、剥離層の深度は間葉層まで、掻把する面積は 3x4 mm の掻把、鼻腔の気流は遮断しない条件で自然治癒が起こりにくいことが分かった。

(2) 移植条件の最適化

コラーゲンビトリゲル膜上でヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞分化誘導を行い、移植可能な気道上皮細胞シートを作製し、免疫不全ラットに移植した。201B7, 253G1 細胞株 2 種、足場となるビトリゲルの成分 2 通、コラーゲン量 2 通り、UV 照射の有無の各条件について検討したところ、253G1 由来のシートで、用いるコラーゲンビトリゲルはブタアテロコラーゲンを 5mg/ml 用いて UV 照射したものが最適であることが分かった。ラットの系統間比較ではヌードラットで生着が見られたため以降、ヌードラットを用いた。

(3) 鼻腔へのヒト iPS 細胞由来気道上皮移植法の確立

(1)と(2)の検討をあわせて最適化された移植条件で 8 匹の移植を行った。4 匹で移植部に抗ヒト核抗体で標識された上皮細胞が見られたが、いずれも移植部で増殖した肉芽様組織内に嚢胞状の構造体を形成した状態で検出された。これらのヒト由来上皮細胞を気道上皮構成細胞マーカーで染色したところ、線毛細胞、クラブ細胞、基底細胞が存在することが明らかとなった。この結果をまとめ、Tissue Engineering Part A に受理された。本論文内の図は掲載号の表紙に採択された(右図)。



(4) 改良誘導法による移植と検証

(3)の結果では移植細胞による機能回復は望めなかったため、移植法の再検討を行った。奥山らの気道へのヒト iPS 細胞由来気道上皮シート移植と同様に、鼻腔背側管腔面に粘膜を含む欠損を作製し、ヒト iPS 細胞由来気道上皮シートで人工気管を覆ったものを 8 匹のラットに移植した。そのうち 4 匹で鼻腔管腔面に面した上皮層にヒト核陽性細胞の生着が確認された。また、主な気道上皮構成細胞種のマーカーとして知られるタンパク質に対する抗体で免疫染色し、生着細胞の細胞種の同定も行った。この結果を論文にまとめ、現在投稿中である。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクトとしては、根治療法のない線毛機能不全症候群や嚢胞性線維症などの遺伝子疾患に対する移植治療のための基盤的研究として、鼻腔粘膜へのヒト iPS 細胞由来細胞の生着を示したことが成果として挙げられる。国内外を問わず、ヒト iPS 細胞由来気道上皮を鼻副鼻腔に移植し生着させた報告はない。移植細胞の生着効率が上がれば、鼻副鼻腔ヒト化ラットとして、大気中に存在する有害物質による障害や呼吸からの微生物感染症などのメカニズム解明や吸引薬を中心とした治療薬の開発にも有用である。また、この移植法は気道上皮部のみならず、嗅上皮移植にも応用が可能であり、嗅覚障害に対するメカニズム解明や治療法開発にも応用が可能であり波及効果は大きい。

今後の展望として、移植条件の再検討により、鼻腔粘膜表層に生着が確認できたが、機能回復の検討までは行えなかった。移植部位における移植細胞の生着率を見ると未だ完全に機能回復できるレベルではない。よって、生着率向上のための検討が必要である。より免疫抑制の強いレシピエントラットとして、112rg/Rag2 ダブルノックアウトラットを用いた検討や、移植時に細胞死抑制や免疫抑制効果のある薬剤などを添加するなどさらなる工夫を重ねたい。これらの検討により移植細胞生着率を向上させたのち、蛍光タンパク質を発現するヒト iPS 細胞株を用いた移植を行い、ハイスピードカメラを用いた繊毛運動の評価や生着部位でのヒト細胞由来分泌タンパク質の発現等を検討し、機能回復に関する検討を行う。さらに、以上の検討結果を生かし、副鼻腔へのヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞移植の検討を行う。

<引用文献>

Okuyama, H., Ohnishi, H., Nakamura, R., et al. Transplantation of multiciliated airway cells derived from human iPS cells using an artificial tracheal patch into

rat trachea. *J Tissue Eng Regen Med* 13, 1019, 2019.

Gotoh, S., Ito, I., Nagasaki, T., et al. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 394, 2014

Konishi, S., Gotoh, S., Tateishi, K., et al. Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 6, 18, 2016.

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 Kuwata F, Ohnishi H, Yamamoto N, Takezawa T, Yamashita M, Okuyama H, Hayashi Y, Yoshimatsu M, Kitada Y, Tada T, Kobayashi M, Omori K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Airway Cells on Vitrigel Membrane into Rat Nasal Cavity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Engineering PartA	6. 最初と最後の頁 77-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑田文彦、山本典生、奥山英晃、多田剛志、吉松誠芳、林泰之、北田有史、山下勝、小林正佳、大森孝一
2. 発表標題 コラーゲンピトリゲル膜を用いたヒトiPS細胞由来気道上皮細胞のラット鼻腔への移植
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑田文彦、大西弘恵、山本典生、奥山英晃、多田剛志、吉松誠芳、林泰之、北田有史、山下勝、小林正佳、大森孝一
2. 発表標題 コラーゲンピトリゲル膜を用いたヒトiPS細胞由来気道上皮細胞のラット鼻腔への移植
3. 学会等名 第 22 回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------