

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659160

研究課題名（和文） iPS 細胞における肺細胞誘導遺伝子同定と肺細胞細分化誘導の試み

研究課題名（英文） Identification of alveolar cell induction genes and differentiation of iPS cells into alveolar cells

研究代表者

西條 康夫 (SAIJYO YASUO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10270828

研究成果の概要（和文）：

マウス iPS 細胞を *in vitro* で肺胞上皮細胞に分化させることを目的に研究を行った。まず、培地に Activin A と Wnt3a を加え 7 日間培養することにより、iPS 細胞は内胚葉細胞へと分化し、SOX17 と Foxa2 の発現が確認された。次に、FGF2 を加えて更に 5 日間培養した。その結果、約 8% の細胞に SP-C の発現を認めた。また、電子顕微鏡での観察でも、肺胞 II 型上皮細胞に特徴的な微絨毛が観察された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to differentiate mouse iPS cells to alveolar cells *in vitro*. At first, iPS cells were cultured with Activin A and Wnt3a for 7 days. iPS cells differentiated into endodermal cells expressing Sox17 and Foxa2. iPS cells were further cultured with FGF2 for additional 5 days. Finally, about 8 % iPS cells differentiated into alveolar type II cells determined by SP-C expression and electron microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患、肺線維症、呼吸器感染症、その他

1. 研究開始当初の背景

山中らにより、体細胞に 4 つの遺伝子を組み込むことにより、ES 細胞と同様な多分化能を有する iPS 細胞が作製された。この iPS 細胞を用いることにより、臓器再生の夢が大きく膨らんでいる。事実、心筋や神経細胞・すい臓細胞への分化誘導に成功している。一方、Jacks らにより Brochoalveolar duct junction (BADJ) に肺幹細胞が存在することが明らかとなったが、その後研究の進展は遅く、iPS 細胞による肺再生研究は申請者が知る範囲では皆無である。

我々は独自に、肺幹細胞研究を開始し、実験を継続してきた。その結果、BADJ に肺幹細胞が存在すること、そして CD45-/CCSP+/SP-C+ の少数の肺幹細胞を定量化することに成功した。その結果、加齢に伴い肺幹細胞が減少することを明らかにした。

一方、ES 細胞を肺胞上皮細胞に分化誘導したとする報告が少数であるが散見されるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、ES 細胞の代わりに、各個体

から誘導可能な iPS 細胞に着目した。まずマウス iPS 細胞を入手し、その培養に習熟し多分可能を確認する。その後、既報に従い、iPS 細胞の肺胞上皮細胞への分化を *in vitro* で試み、各種遺伝子の発現や、その形態を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞の培養と幹細胞としての性質の保持の検討

理研から Nanog プロモーターで GFP を発現する iPS 細胞を入手する。入手した、iPS 細胞を feeder 細胞とともに、iPS 培地で培養・継代する。継代した iPS 細胞の GFP, SSEA1, OCT4 の発現をフローサイトメトリーで確認する。

2) iPS 細胞の肺胞上皮細胞への分化誘導
iPS 細胞に ActivinA (20ng/ml) と Wnt3a (10ng/ml) を加えた basic DM 培地で 7 日間培養し、まず内胚葉系細胞に分化させる。次に、basic DM 培地または small airway basic medium (SABM) 培地に FGF2 (50ng/ml) を加えて更に 5 日間培養し、肺胞上皮細胞への分化を誘導する。

Day 0 (D0)	Day 1 (D1)	Stage 1	Day 7 (D7)	Stage 2	Day 12 (D12)
iPS medium		① Basic DM+ Activin A (20ng/ml)+Wnt3a (10ng/ml)		① Basic DM+FGF2(50ng/ml) ② SABM+FGF2(50ng/ml)	
Single cell suspension		② Basic DM (no BSA) + Activin A (20ng/ml)+Wnt3a (10ng/ml)		③ Basic DM (no BSA)+FGF2(50ng/ml) ④ SABM+FGF2(50ng/ml)	

3) 細胞分化マーカーの検討

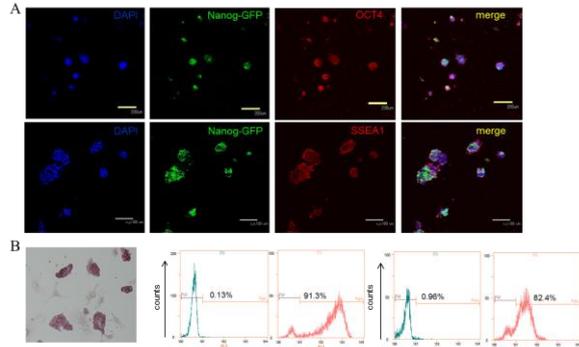
内胚葉マーカーとして、SOX17 と Foxa2 の発現をリアルタイム PCR と免疫蛍光法で検討する。

次に、肺胞上皮マーカーとして、SPA, SPB, SPC, SPD を、気道上皮マーカーとして CCSP の発現を同様にリアルタイム PCR で検討する。更に、SPC 蛋白の発現をフローサイトメーターおよび免疫蛍光染色法で検討する。肺胞 2 型上皮細胞の詳細な形態を電子顕微鏡で解析する。

4. 研究成果

1) iPS 細胞の幹細胞としての性質の維持
iPS 細胞を feeder 細胞とともに、培養継代し、30 継代後の iPS 細胞における GFP, SSEA1, OCT4 の発現を検討したところ、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーでもいずれの幹細胞マーカーも発現していることが明らかとなった (Figure 1A, 1C)。また、幹細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼも陽性であることが明らかとなった (Figure 1B)。このことより、長く継代しても幹細胞の機能が保持されていることが明らかとなった。

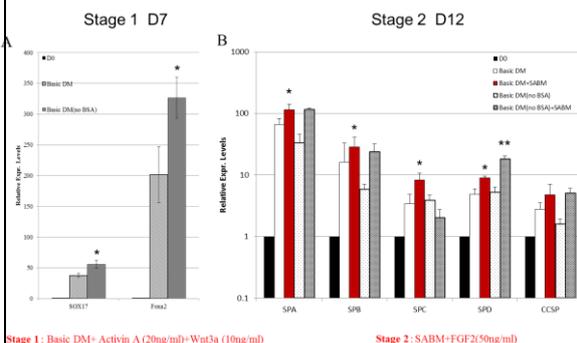
Figure 1. The pluripotency of undifferentiated iPS cells (D0) at passage 30th. A: Immunofluorescence staining of



mouse iPS cell undifferentiation markers OCT4 and SSEA1. The GFP gene was knocked-in under the Nanog promoter allowing detection of GFP (green) in undifferentiated cells. B: Alkaline phosphatase staining. C: Flow cytometry analysis of mouse iPS cell by undifferentiation markers SSEA1 and OCT4.

2) iPS 細胞の内胚葉細胞への分化誘導
まず、iPS 細胞を basic DM (±BSA) +ActivinA (20ng/ml)+Wnt3a(10ng/ml) で 1 週間培養後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR で、SOX17 と Foxa2 の発現を見たところ、BSA を含まない培地で、より発現が高まることが明らかとなると同時に、内胚葉への分化が起きていることが確認できた (Figure 2A)。また、SOX17 と Foxa2 蛋白の発現が、免疫蛍光染色で確認された (Figure 3)。

Figure 2. qRT-PCR analysis of endoderm markers and AT-II cell markers on D7 and D12. A: Endoderm marker (Sox17 and Foxa2) in basic DM or basic DM(BSA-)



treated iPS cells for 6 days. B: Lung epithelium markers expression in four types of differentiate media treated iPS cells for 11 days. Asterisk (* and **) indicate $P < 0.05$. Expression ratios were normalized to GAPDH expression level. Data presented representative of 3 independent experiments. Note that the y-axis is a logarithmic scale in graph B

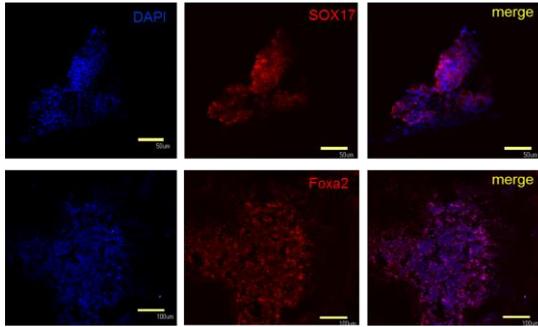


Figure 3. Immunofluorescence of endoderm markers Sox17 and Foxa2 in iPS cells on D7. The iPS cells differentiated for 6 days were immunostained by goat anti mouse Sox17 and Foxa2 antibodies (red) and nuclear-counterstained with DAPI (blue).

3) 次に、Basic DM または SAB に FGF2 (50ng/ml) を加えて 5 日間培養後に、リアルタイム PCR で、SPA, B, C, D および CCSP の発現をみたところ、すべての培養条件で肺胞上皮マーカーの発現が観察されたが、SABM+FGF2 で最も発現が高いことが明らかとなり、以降の実験はこれで行うこととした (Figure 2B)。

SPC 蛋白の発現を免疫蛍光法と、フローサイトメトリーで検討したところ、約 8% の細胞に SPC の発現が確認された (Figure 4)。

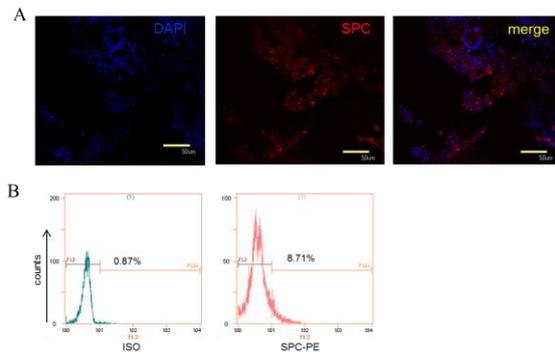
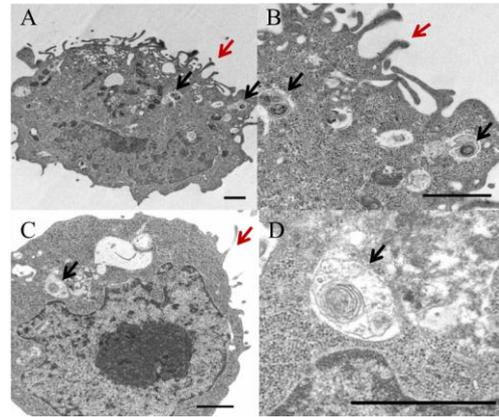


Figure 4. The expression of AT-II cells marker SPC in iPS cells on D12. A: iPS cells differentiated for 11 days were immunostained by rabbit anti mouse SPC antibody (red) and nuclear-counterstained with DAPI (blue). B: Flow cytometry analysis of proSPC expression.

次に分化細胞を電子顕微鏡で観察した。肺胞上皮細胞として、MLE12 細胞を用いた。肺胞上皮細胞に特徴的な微絨毛およびラミナル小体が確認された。

Figure 5. Transmission electron micrographs of MLE12 and mouse ATII-like cells differentiated from iPS cells. A:



MLE12 cells presenting characteristic lamellar bodies (a criterion traditionally used for the identification of AT-II cells, black arrows) and apical microvilli (another feature of AT-II cells, red arrows). B: Magnified view of image A. C: Mouse ATII-like cells showing similar lamellar bodies and microvilli as the MLE12 cells. D: Magnified view of image C. Scale bars: 1 μ m.

この結果より、効率を決して高くはないものの、iPS 細胞から肺胞 2 型上皮細胞の分化誘導が可能ながことが明らかとなった。

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 5 件)

- ① Sakakibara T, Inoue A, Saijo Y at all. Randomized phase II trial of weekly paclitaxel combined with carboplatin versus standard paclitaxel combined with carboplatin for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 査読有, Vol. 21, No. 4, 2010, pp. 795-799. doi: 10.1093/annonc/mdp401
- ② Maemondo M, Saijyo Y, at all. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with

mutated EGFR. New England of Journal of Medicine. 査読

有, Vol. 362, No. 25, 2010, pp. 2380-2388

doi: 10.1056/NEJMoa0909530

- ③ Katsha AM, Saijo Y, at all. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model.

Molecular Therapy, 査読有, Vol. 19,

No. 1, 2011, pp. 196-203

doi:10.1038/mt.2010.192

- ④ Suzuki K, Saijo Y, at all. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth Through the Enhancement of Neovascularization.

Molecular Medicine, 査読有, Vol. 17,

2011, pp. 579-587.

doi: 10.2119/molmed.2010.00157

- ⑤ Satoh H, Saijo Y, at all. Low-dose gefitinib treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer harboring sensitive epidermal growth factor receptor mutations. Journal of Thoracic Oncology, 査読有 Vol. 6, 2011, pp. 1413-1417.

doi:10.1097/JTO.0b013e31821d43a8.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 孫若文、マウス成長肺と傷害修復過程における肺幹細胞の動態解析、第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、2010 年 4 月 24 日、国立京都国際会館
- ② 周启亮、マウス iPS 細胞における in vitro 肺上皮細胞への分化誘導、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 21 日、神戸コンベンションセンター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

西條 康夫 (SAIJYO YASUO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：1 0 2 7 0 8 2 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：