

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19525

研究課題名（和文）ヒト由来呼吸器細胞によるマウス肺の機能的置換

研究課題名（英文）Functional replacement of mouse lungs by human-derived lung cells

研究代表者

後藤 慎平（Gotoh, Shimpei）

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50747219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：まず、ヒトiPS細胞でレポーター細胞株を樹立し、マウスへの生着細胞を個体を生存させたまま可視化できるようにした。次に肺前駆細胞を分化誘導し、マウス用気管支鏡を用いた片肺挿管により左肺のII型肺胞上皮細胞のみをアブレーションして細胞移植の条件を検討した結果、半年以上生着する条件を見出した。しかし、アブレーション時の肺傷害が強かったため、両肺への細胞移植は断念して左肺でのヒト由来細胞への置換率の向上を優先した。マウス肺に生着したヒト肺胞上皮の機能評価のため、肺胞上皮を病態責任細胞とする疾患特異的iPS細胞から肺前駆細胞を分化誘導し、マウスに生着させたところ、一部の病態を再現することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト多能性幹細胞から分化誘導して得られた細胞が移植後に生体内で適切に機能しているかどうかを検証する手段には従来より限界があったが、本研究成果はこの問題の解決に向けたものである。ヒトiPS細胞から分化誘導した肺前駆細胞をマウス肺に移植し、様々な細胞間相互作用や呼吸や循環動態に伴う物理的な力も加わる生体内での機能再構築を試みた研究成果として、ヒトiPS細胞由来の肺胞上皮細胞が肺胞領域に生着して機能まで示せたのは世界初の画期的な知見といえる。呼吸器の再生医療の技術開発の突破口の一つであり、ヒト由来細胞の疾患モデルの今後の新しい展開も期待できる挑戦的萌芽研究に相応しい結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：First, a human iPS cell reporter line was established for visualizing the engrafted cells in the living mice. Next, we stepwise induced lung progenitor cells and transplanted them to the left lung of the host mice after ablating the left lung type II alveolar epithelial cells and intubation using a mouse bronchoscope. However, because of the severe lung injury caused by alveolar type II cell ablation, we decided to avoid cell transplantation into both lungs. Instead, we prioritized improving the replacement of the mouse lung cells by engrafted human cells in the left lung. To evaluate the function of human alveolar epithelium engrafted in the mouse lung, we transplanted the lung progenitor cells derived from the disease-specific iPS cells whose alveolar epithelium were responsible for the disease progression. We successfully engrafted them in the mice lung and were able to recapitulate a part of the disease.

研究分野：呼吸器学

キーワード：肺胞 iPS細胞 多能性幹細胞 移植 再生

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)から様々な臓器特異的な分化細胞を分化誘導することが可能になり、創薬や再生医療への応用が期待されている。しかし、分化細胞が臓器特異的な分化マーカー分子を発現しているにもかかわらず、一般的には成人由来の細胞よりも胎児段階に近い遺伝子発現パターンを示していることは肺でも同様と考えられてきた。申請者らはヒト多能性幹細胞から肺細胞への分化誘導にオルガノイド培養の技術を世界に先駆けて導入して分化誘導法を開発してきた[*Stem Cell Rep*, 2014; *Stem Cell Rep*, 2016]が、成人疾患のモデルにヒト多能性幹細胞から分化誘導した細胞を当てはめて解釈するには、細胞を長期培養したり[*Nat Methods*, 2017]、物理的な刺激を加える[*Sci Transl Med*, 2021]などして成熟させる過程を経てから疾患モデルとして用いる必要があると考えられてきた。また、肺におけるガス交換は肺胞表面を介して行われるが、その広大な表面積の大部分を覆うのは扁平な形をした I 型肺胞上皮であり、組織幹細胞である II 型肺胞上皮細胞が分化することによって補充されている。その分化制御因子については一部しか明らかになっていなかったが、申請者らはヒト iPS 細胞を用いた肺胞オルガノイドにより、古典的 WNT シグナル経路を遮断することが I 型肺胞上皮の分化に有用なことを見出した[*Stem Cells*, 2021]。ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肺胞上皮細胞が十分に機能的であることを証明するためには、I 型肺胞上皮への分化メカニズムを明らかにしつつ、究極的にはこれらの細胞が肺胞の恒常性維持に寄与し、ガス交換も行えて成人肺に近い肺を再構築できることを示す必要があるが、世界レベルで答えを見出せていなかった。

## 2. 研究の目的

これまでに免疫不全マウス(NOG)に対して、ナフタレン投与と放射線照射を組み合わせることで肺をあらかじめ前処理し、ヒト iPS 細胞由来の肺前駆細胞を大量に経気管的に移植することにより上皮細胞全体の 1%と低効率ながらマウス肺に細胞生着することが分かっていた[*Biomaterials*, 2021]。しかしながら、生着細胞の機能を評価できるようにするためにはより高い置換率が必要であり、最大 8 週間までの生着しか評価が難しかったことから、より多くの移植細胞を生着させ、長期間にわたって評価できるように、細胞側と宿主側の条件を詳細に検討する必要がある。細胞側についてはヒト肺組織から単離した初代肺胞上皮細胞とヒト iPS 細胞から分化誘導した肺前駆細胞のどちらがマウスへの同所性移植に適しているか、の検討をはじめ、iPS 細胞の利点がどのような点にあるか明らかにする必要があった。そこで、iPS 細胞を用いる利点として①細胞供給源として安定しており、必要十分量のヒト肺前駆細胞を分化誘導できること、②遺伝子改変が可能なことからレポーター細胞を作成して生着状態をモニターしてマウス肺での置換率を定量的に改善できること、③ドナーの選択余地があることから疾患特異的 iPS 細胞を移植すれば、疾患モデルとしても利用できること、を想定した。ヒト iPS 細胞由来肺胞上皮細胞によるマウス肺胞上皮細胞の機能的置換を実現するには、マウス肺胞上皮細胞の大部分をヒト由来肺胞上皮細胞に置き換えた状態でマウスに呼吸させる必要がある。ガス交換を証明するまでの十分な置換率が得られなかった場合に備えて、バックアッププランを用意した。③については肺胞上皮細胞が病態の責任細胞となる疾患

特異的 iPS 細胞を利用することで、マウス肺に生着したヒト iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞が生体内で機能していることの証明に役立つ。以上より、①②③を証明することで、マウス肺のヒト由来呼吸器細胞による機能的置換を実現できると考えて実験を進めた。

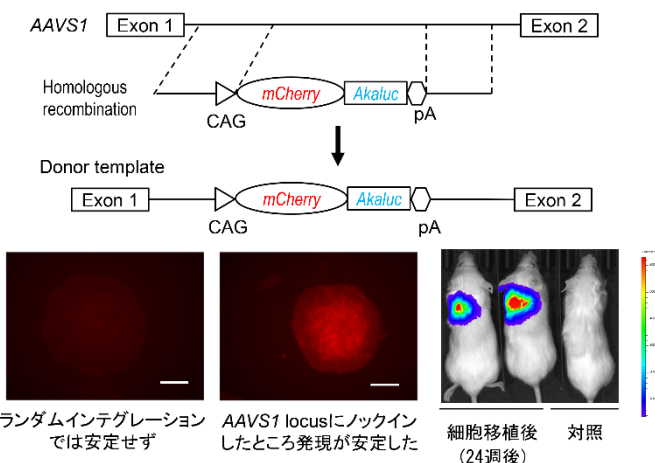
### 3. 研究の方法

まず、マウスの肺に生着したヒト iPS 細胞を可視化し、生着後に単離もできるようにレポーターiPS 細胞の開発を進めた。また、多能性幹細胞から分化誘導した呼吸器細胞を用いて細胞移植の条件検討を進め、ナフタレンと放射線照射による肺障害モデルのほかに II 型肺胞上皮細胞を選択的に除去できる免疫トキシンや遺伝子組み換えマウスを用いた II 型肺胞上皮細胞の細胞障害モデルの開発を進めた。次に幼弱な遺伝子発現パターンを呈すると考えられてきた多能性幹細胞由来の II 型肺胞上皮細胞が生体の肺環境下に安定的に生着し、肺胞上皮細胞として機能するかどうかを検討するため、比較用の細胞を得るために、初代細胞を拡大培養する方法を検討した。一方、移植用に用いる細胞集塊を均一なサイズに培養する方法を検討し、生体内での I 型肺胞上皮への分化制御を可能にするため、II 型から I 型肺胞上皮細胞への制御シグナルの探索にも取り組んだ。肺への生着を高める工夫としてニッチ機能が期待されるヒト iPS 細胞由来の肺胞間葉細胞の経静脈移植を行い、生着を評価した。さらに、生着後のヒト iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞の機能評価を行うため、疾患特異的 iPS 細胞の移植を行いマウスの生体内で病態を再現できるか検討した。

### 4. 研究成果

レポーター遺伝子を安定発現する細胞を樹立できたことで、マウスを飼育したまま、移植後に肺に生着した細胞を高感度に可視化できるようになった。同時に細胞移植できる個体数を増やすため、培養条件の検討により高感度レポーター細胞株由来の肺前駆細胞について培養条件の最適化を行い、一定のレベルでの量産化も可能となった。これにより、経気管的な細胞移植による生着条件の検討が格段と行いやすくなり、生体内での可視化が困難な初代細胞よりも利便性を高めることができた。マウス肺への細胞移植の条件検討では、これまでの肺胞上皮細胞の除去方法に細胞選択性の限界があったため、実中研の協力も得て、毒素により特異的に II 型肺胞上皮細胞を傷害後、レポーター機能を持つヒト iPS 細胞由来の肺前駆細胞および II 型肺胞上皮細胞を左肺特異的に移植する条件検討を始めた。左肺に選択的に毒素を投与するだけでも死亡する個体が多くみられたが、生存個体ではおおむねヒト iPS 細胞由来の肺前駆細胞の長期生着を確認できた。生存個体数を増やすため、毒素量を減らしたところ、生着細胞が減少したため、長期生着を実現するために最適な毒素投与量の幅は狭いことが分かったが、再現性を取ることも確認した。細胞移植の条件検討結果より、両肺への毒素投与は II 型肺胞上皮細胞の傷害程度を

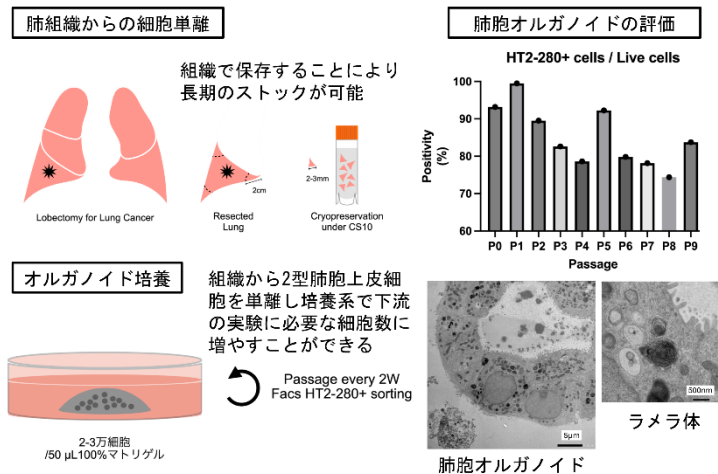
図1. レポーターiPS細胞株の樹立と生着細胞の可視化



弱くせざるを得ないことが容易に想定されたため、片肺のみでヒト由来細胞に置換していく方針とした。ヒト iPS 細胞由来の肺前駆細胞をマウス左肺に移植後、レポーター機能により経時的にモニターしたところ、半年以上にわたって生着することを確認することができた(図 1)。iPS 細胞と比較するために取り組んだ初代肺胞上皮細胞の単離とオルガノイドによる長期培養は複数回継代できることを確認したものの、凍結保存が困難であり、徐々に増殖しなくなったためさらなる培養や保存条件の改良を要することが分かった。初代 II 型肺胞上皮細胞の利便性を高めるため、取得したヒト肺組織を保存液に浸けて長期凍結保存し、必要時に解凍して II 型肺胞上皮細胞を単離し、オルガノイド培養を行う方法を確立した。この

方法で概ね 10 回程度くらいまでの継代培養が可能となった(図 2)。オルガノイド培養法の条件検討では、マイクロパターン加工された培養プレートを用いることにより、均一なサイズのアピカルアウト型の気道や肺胞オルガノイドを作成できることを見出した(図 3a)。温度感受性に細胞

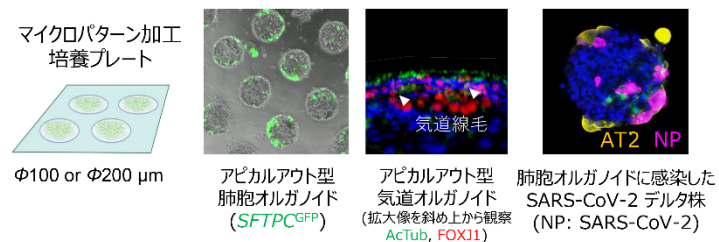
図2. 初代肺胞上皮細胞の単離と長期培養



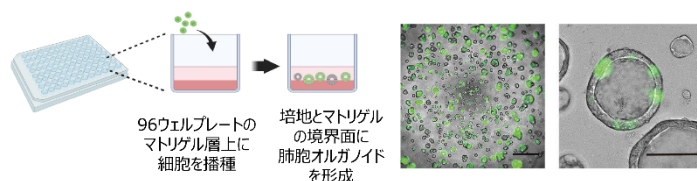
集塊を回収することを想定していたが、うまくはがれなかったので断念したが、この培養法は肺胞上皮だけでなく気道上皮への分化にも適しており、波及効果として新型コロナウイルスの変異株を見分けることのできる培養法の開発につながった[Stem Cell Rep, 2024a]。細胞移植後の肺胞上皮がガス交換に寄与できるようにするため、II 型肺胞上皮

から I 型肺胞上皮細胞に分化するための条件検討を *in vitro* で行った。その過程で肺胞オルガノイドを用いたスクリーニングに有用な培養法としてマトリゲル層の上に肺胞オルガノイドを培養して培地に直接曝露させることのできる on-gel 培養法を開発し(図 3b)、YAP/TAZ シグナルの活性化と PI3K/AKT シグナルの抑制が I

図3. (a) アピカルアウト型の気道や肺胞オルガノイドを作成



(b) 肺胞上皮分化の条件検討に適したon-gel 培養法を開発



型肺胞上皮細胞への分化と成熟に有用なことを見出すことができた[Stem Cell Rep, 2024b]。肺胞上皮細胞の niche を再構築する手段の開発では、ヒト iPS 細胞由来の肺胞間葉細胞の分化誘導法を確立し、上皮細胞だけでなく間葉細胞も同一ドナーから樹立された iPS 細胞由来肺胞オルガノイドを作成できるようになった[Cell Rep Methods, 2022]。この肺胞間葉細胞をマウスに経静脈的に移植したところ、肺への集積傾向を確認できたが、4 日以内には消失し長期生着は難しいことを確認した(図 4)。一方で、間



葉細胞を同時移植しなくても、移植前の肺胞上皮細胞の培養条件を最適化することにより、移植細胞数を減らし、生着後のヒト由来細胞によるマウス肺における置換割合を大幅に向上できたことから、マウスの左肺を肺胞上皮で置換する方針とした。特にマウス肺への細胞移植には1匹あたり  $5.0 \times 10^6$  個の細胞が必要だったが、移植前の培養条件の工夫により必要細胞を  $1/3$  以下に減らすことができた。しかしながら、

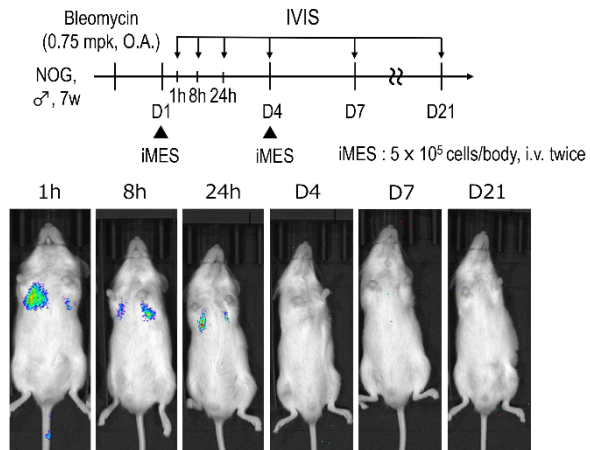
ヒト iPS 細胞によるマウス肺胞上皮細胞の機能的置換を実現するためには、ヒト由来肺胞上皮のマウス肺への生着率と置換率をより一層高める必要があった。マウスの両肺にヒト由来細胞を生着させるには両肺を傷害する必要があったが、左肺を傷害するだけでもマウスが死亡してしまうケースが多かったため、両肺への細胞生着や左肺だけにして右肺を切除する処置は断念せざるを得なかった。このため、ヒト由来肺胞上皮がガス交換を証明することは現状では難しいと判断し、バックアッププランとして想定していた II 型肺胞上皮細胞の機能評価を別の観点で行うことにした。II 型肺胞上皮細胞には

細胞特異性の高いリントランスポーターとして NaPi2b (SLC34A2) を発現し、その機能が損なわれると肺胞腔内のリンおよびカルシウム濃度のバランスが損なわれることで難治性呼吸器疾患の1つとして知られる肺胞微石症を発症する。高感度レポーター細胞を用いて NaPi2b 欠損 iPS 細胞を樹立し、マウス肺に

生着させたところ、約半年ほどの経過により生着細胞の近傍に微石が生じることを確認できた (図5) ことから、ヒト iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞がマウス肺において機能的な役割を果たしていると考えられた。

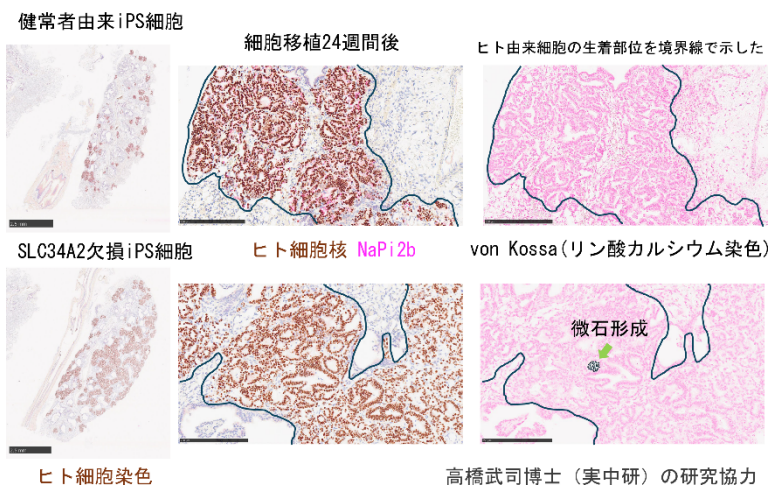
以上の研究成果はヒト iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞が宿主の肺に正所性に生着することによって、肺胞の本来の機能を再構築できる可能性を示しており、生着率や置換率をより一層高めることにより、肺胞を再生できる可能性が期待できるほか、マウス肺の構成細胞をヒト由来細胞に置き換えることにより、*in vitro* では再現困難な難治性呼吸器疾患モデルを *in vivo* モデルで再現できる可能性を示唆している。

図4. BLMマウスに対する iMES 経静脈投与後の生着評価



ブレオマイシン肺傷害マウス (NOG) に対して、高感度レポーター-iPS細胞から分化誘導した iMES を経静脈的に移植したが、iMES の長期生着は認められなかった

図5. 肺胞微石症の疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した肺前駆細胞の移植後に認められた肺胞微石形成



高橋武司博士 (実中研) の研究協力

## 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 4件）

1. 著者名 Tamai Koji, Sakai Kouji, Yamaki Haruka, Moriguchi Keita, Igura Koichi, Maehana Shotaro, Suezawa Takahiro, Takehara Kazuaki, Hagiwara Masatoshi, Hirai Toyohiro, Gotoh Shimpei	4. 巻 2
2. 論文標題 iPSC-derived mesenchymal cells that support alveolar organoid development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100314 ~ 100314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100314	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 Masui Atsushi, Hashimoto Rina, Matsumura Yasufumi, Yamamoto Takuya, Nagao Miki, Noda Takeshi, Takayama Kazuo, Gotoh Shimpei	4. 巻 19
2. 論文標題 Micro-patterned culture of iPSC-derived alveolar and airway cells distinguishes SARS-CoV-2 variants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 545 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2024.02.011	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 Ohnishi Yuko, Masui Atsushi, Suezawa Takahiro, Mikawa Ryuta, Hirai Toyohiro, Hagiwara Masatoshi, Gotoh Shimpei	4. 巻 19
2. 論文標題 Screening of factors inducing alveolar type 1 epithelial cells using human pluripotent stem cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 529 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2024.02.009	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 Hosokawa Motoyasu, Mikawa Ryuta, Hagiwara Atsuko, Okuno Yukiko, Awaya Tomonari, Yamamoto Yuki, Takahashi Senye, Yamaki Haruka, Osawa Mitsujiro, Setoguchi Yasuhiro, Saito Megumu K., Abe Shinji, Hirai Toyohiro, Gotoh Shimpei, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Cryptotanshinone is a candidate therapeutic agent for interstitial lung disease associated with a BRICHOS-domain mutation of SFTPC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107731 ~ 107731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107731	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 Mikawa Ryuta, Gotoh Shimpei	4. 巻 -
2. 論文標題 Past and future of alveolar organoids for lung regenerative medicine	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxae024	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10件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 From in vitro to in vivo generation of human lung models using iPS cells
3. 学会等名 第6回ヒト化マウス国際ワークショップ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 難治性呼吸器疾患の克服に向けて
3. 学会等名 京都大学医学研究支援センター10周年記念セミナー (第10回) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 呼吸器オルガノイドを用いた創薬・再生への挑戦
3. 学会等名 国立高度専門医療研究センター医療研究連携推進本部 横断的研究推進事業シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tamai K, Sakai K, Yamaki H, Moriguchi K, Igura K, Maehana S, Suezawa T, Takehara K, Hagiwara M, Hirai T, Gotoh S
2. 発表標題 Generation and application of iPSC-derived mesenchymal cell-dependent alveolar organoids
3. 学会等名 2023 RIKEN BDR-CuSTOM Joint Organoid Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 Organoid and Clinical Key Pathogenesis in the Lung-Fibrosis
3. 学会等名 KSSCR 2024 Winter Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた呼吸器疾患モデルのニューパラダイム
3. 学会等名 日本組織培養学会 第95回大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた肺胞オルガノイドの開発と疾患モデリング
3. 学会等名 日本リウマチ学会近畿支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた呼吸器研究の実用化に向けて
3. 学会等名 第16回iPS細胞産学合同研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 基礎研究の現状と展望
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会 会長特別企画（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤慎平
2. 発表標題 肺オルガノイド研究の新たな展開
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会 教育講演（招待講演）
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
研究分担者	濱路 政嗣  (Hamaji Masatsugu)  (70782142)	京都大学・医学研究科・講師    (14301)	

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
研究協力者	高橋 武司  (Takahashi Takeshi)	公益財団法人実中研・実験動物基礎研究部・部長	

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