

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293199

研究課題名(和文) iPS細胞から誘導した肺胞上皮細胞利用への応用展開：表裏一体型培養システムの開発

研究課題名(英文) Double-face culture system for application of alveolar epithelial cells induced from human iPS cells

研究代表者

伊藤 功朗 (Isao, Ito)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40447975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性呼吸器疾患には重症化すると呼吸不全に至る疾患が多くあるが、その多くには有効な治療法が存在しないばかりでなく、病気の研究も進んでいない。ヒトiPS細胞を用いて肺の上皮細胞に分化させ、それを疾患研究や再生医療に用いることが可能であれば、この分野の医療は大きく進展するため、本研究ではヒトiPS細胞から肺上皮細胞を誘導し、ナノファイバーなどの工学的技術を用いることで、誘導技術の発展を試みた。iPS細胞から肺胞上皮細胞を三次元的に誘導したり、気道上皮細胞を二次元的に誘導したりすることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：There are many kinds of difficult-to-treat respiratory diseases. In such cases, many patients die from respiratory failure. For most of the respiratory diseases, no curable treatment has been developed so far, and researches of the diseases have not reached the pathogenesis. If we could develop lung epithelial cells from human iPS cells and utilize the developed cells for researches and regenerative medicine, medicine in this field would largely progress. As such, we developed lung epithelial cells from human iPS cells and further tried to enhance the technique by merging with engineering technology such as nanofibers in this research program. It became possible to develop alveolar epithelial cells from iPS cells in three-dimension and to develop bronchial epithelial cells in two-dimension.

研究分野：iPS細胞

キーワード：iPS細胞 肺胞上皮細胞 気道上皮細胞 肺前駆細胞 ナノファイバー

1. 研究開始当初の背景

肺は生体が呼吸をするために不可欠な vital organ である。肺胞の破壊性病変に対しては現存する薬物では治療不可能であり、病態研究の推進、新規治療薬の開発、また再生医療の発展が強く望まれている。肺胞再生の最大の鍵は II 型肺胞上皮(AT2)細胞と考えられている。肺は内胚葉臓器であり、未分化細胞から内胚葉を経て AT2 細胞を誘導する試みが世界中で行われていたが、AT2 細胞特異的タンパクである surfactant protein C が確実に発現する細胞を誘導した報告はなく、その前段階であった。我々は現在までにヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞で肺上皮の前駆細胞に発現する NKX2.1 の陽性率を 57-77.5%へ改善させた。しかしながら、二次元培養、三次元培養ともに肺胞上皮細胞の誘導効率は低く、まだ実用化には及ばない。

工学的に作成でき、生体適合性の高い素材によるナノファイバーは、バイオマテリアルとしての有用性が期待されている。上皮系の細胞では、生体内分解される高分子材料 poly-L-lactec-co-glycolic acid (PLGA)を材料としたナノファイバーによる足場で、唾液腺上皮系腺細胞を播種すると自己組織化して分岐構造をとったという報告があり、呼吸器系上皮細胞でも応用可能ではないかと考えられた。

微細加工技術を用いてコントロール可能な微小流路を作成してバイオ研究に用いる機器をマイクロ流体デバイスという。近年、マイクロ流体デバイスを用いて未分化細胞元様々な細胞の培養環境をアレンジした報告が相次いでいる。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞からの II 型肺胞上皮細胞の誘導効率改善をはかって、三次元培養から二次元培養への展開を行うこと、そして血管内皮細胞との共培養をナノファイバーシート上で行い、I 型肺胞上皮細胞の機能を評価することを目的とした。肺の上皮細胞への前駆細胞といえる NKX2.1 陽性細胞を nanofiber 上に生着させることを試みた。また、同時にマトリクスを塗布したほうが細胞生着率や培養効率が向上するのではないかと考え、種々のマトリクスをナノファイバーとともに用いた。マイクロ流体デバイスを用いて、肺胞上皮細胞と血管内皮細胞間のガス交換能を評価することも当初の目標とした。

3. 研究の方法

表面マーカーである CPM 陽性の肺前駆細胞を FACS ARIA II もしくは MACS (磁気ビーズ) システムを用いてソーティングし、ファイバーシートの表面に播種する。

肺胞上皮前駆細胞を分化誘導し、SPC 陽性細胞がナノファイバーシート上で高率に出現する条件を検討した。また、同時にマトリクスを塗布したほうが細胞生着率や培養効率が向上するのではないかと考え、種々のマトリクスをナノファイバーとともに用いた。

4. 研究成果

まず、ヒト未分化細胞 (ES/iPS 細胞) から発生の段階を踏んだ肺前駆細胞、II 型肺胞上皮細胞の誘導を行った。平面培養では、最終的に低効率ではあるが SPC 陽性細胞を誘導したが、誘導効率の改善が望まれた。そこで、肺前駆細胞の段階から三次元でヒト胎児肺線維芽細胞と肺前駆細胞の共培養を行なったところ、球状体が形成され、その一部に SPC の発現が確認できた。また、生体内ではガス交換を担う I 型肺胞上皮細胞のマーカーが、球状体の一部にみられた。引き続き、肺胞上皮細胞の誘導効率を上げる試みを行った。

二次元培養のため、ナノファイバー(NF)上に肺前駆細胞を生着させる方法の検討を行った。NF 上に細胞外マトリックスでコーティングを行うことで、より多くの細胞を接着させるのに有効であると思われた。4 種の基質の比較を行い、細胞の接着・増殖が最もよかったものを決定した。ついで、種々の培地条件で NF 上に肺前駆細胞を培養した結果、肺発生に重要な転写因子である NKX2.1+を維持したまま培養継続することができた。しかしながら、まだ肺胞上皮細胞の誘導効率は十分とはいえず、他の細胞が混在してしまう。一方、ヒト iPS 細胞から NKX2.1 陽性細胞を経て気道上皮細胞の誘導を試み、多種ある気道上皮細胞のなかで、生体内では吸入された異物排除に重要な線毛上皮細胞の高効率誘導が可能となり、三次元培養から二次元培養への展開、さらに線毛上皮運動の評価と線毛運動能の評価が可能となった。課題としては、細胞ごとに方向や時相的にランダムに運動している線毛の動きを、協調性のある一方向性の動きのある細胞シートを作成することがあり、克服できれば再生医療などに用いられる可能性が高まるであろう。

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12件)

1. Matsumoto H, Izuhara Y, Ito I, et al. Risks and Cough-Aggravating Factors in Prolonged Cough: Epidemiological Observations from the Nagahama Cohort Study. *Ann Am Thorac Soc* 2017 [Epub ahead of print] (査読有)
2. Matsumoto H, Kanemitsu Y, Ito I, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin sensitization involvement and its association with the CysLTR1 variant in different asthma phenotypes. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;118:197-203. (査読有)
3. Kanemitsu Y, Ito I, et al. Osteopontin and periostin associate with a 20-year decline of pulmonary function in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:472-4. (査読有)
4. Gotoh S, Ito I, et al. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2014;3:394-403. (査読有)
5. Iwata T, Ito I, et al. Mechanical Stimulation by Postnasal Drip Evokes Cough. *PLoS One* 2015;10:e0141823. (査読有)
6. Kamada T, Ito I, et al. Three-dimensional imaging forced oscillation technique to assess position-dependent airway obstruction in relapsing polychondritis; a case report. *Respir Investig* 2017;55:69-73. (査読有)
7. Nakaji H, Niimi A, Ito I, et al. Airway remodeling associated with cough hypersensitivity as a consequence of persistent cough: An experimental study. *Respir Investig* 2016;54:419-427. (査読有)
8. Ebisutani C, Ito I, et al. A case of non-specific interstitial pneumonia with recurrent gastric carcinoma and anti-Jo-1 antibody positive myositis. *Respir Investig* 2016;54:289-93. (査読有)
9. Inoue H, Ito I, et al. CT-assessed large airway involvement and lung function decline in eosinophilic asthma: The association between induced sputum eosinophil differential counts and airway

remodeling. *J Asthma*.

2016;53:914-21. (査読有)

10. Tajiri T, Matsumoto H, Ito I, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. *Allergy*. 2016;71:1472-9. (査読有)
11. Muro S, Tabara Y, Ito I, et al. Relationship among Chlamydia and Mycoplasma pneumoniae seropositivity, IKZF1 genotype, and chronic obstructive pulmonary disease in a general Japanese population: the Nagahama study. *Medicine (Baltimore)* 2016;15:e3371. (査読有)
12. Izuhara Y, Matsumoto H, Ito I, et al. Mouth Breathing, another Risk Factor for Asthma: the Nagahama Study. *Allergy*. 2016;71:1031-6. (査読有)

[学会発表など](計7件)

1. 伊藤功朗 招待講演 2015年8月22日 第18回間質性肺炎分子病態研究会, 東京「iPS細胞を用いた肺再生への試み」
2. 伊藤功朗 招待講演 2015年12月4日 20th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, at Kuala Lumpur. Symposium: Cell & Molecular Biology “Generation of lung epithelial cells from human iPS cells”
3. 伊藤功朗 招待講演 2016年5月23日 第23回京大連携わかさせミナー 小浜「iPS細胞を用いた肺疾患研究」
4. 伊藤功朗 招待講演 2016年4月7日 第37回日本呼吸器学会生涯教育講演会, 京都「iPS細胞を用いた肺疾患研究と治療戦略」
5. 伊藤功朗 招待講演 2016年4月8日 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 京都 会長特別企画 症例を臨床から分子レベルまで考える「COPD」:「喫煙・感染と気道リモデリング～気道上皮のEMTを含めて～」
6. 伊藤功朗 招待講演 2016年4月9日 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 京都 Inter-Assembly Symposium of Respiratory Cell and Molecular Biology “Generation of lung epithelial cells from human iPS cells”
7. 伊藤功朗 招待講演 2016年11月6日 第37回日本呼吸器学会生涯教育講演会, 大阪「iPS細胞を用いた肺疾患研究と治療戦略」

[図書](計1件)

肺炎の診かた, 考えかた. 伊藤功朗著. 中

〔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

伊藤 功朗 (ITO, Isao)
京都大学医学研究科呼吸器内科・助教
研究者番号：40447975

(2) 研究分担者

三嶋 理晃 (Mishima, Michiaki)
京都大学医学研究科呼吸器内科・名誉教授
研究者番号：60190625

小寺 秀俊 (Kotera, Hidetoshi)
京都大学工学研究科・教授
研究者番号：20252471

新宅 博文 (Shintaku, Hirofumi)
京都大学工学研究科・助教
研究者番号：80448050

劉 莉 (Li, Liu)
京都大学物質 - 細胞統合システム拠点・助教
研究者番号：50380093

長船 健二 (Osafune, Kenji)
京都大学 iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：80502947

平井 豊博 (Hirai, Toyohiro)
京都大学医学研究科呼吸器内科・教授
研究者番号：20359805

室 繁郎 (Muro, Shigeo)
京都大学医学研究科呼吸器内科・准教授
研究者番号：60344454

半田 知宏 (Handa, Tomohiro)
京都大学医学研究科呼吸器内科・助教
研究者番号：10432395

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()