

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461185
研究課題名(和文) 肺上皮細胞のリプログラミング法の開発

研究課題名(英文) Reprograming of lung epithelial cells

研究代表者

齋藤 朗 (SAITO, Akira)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：90591412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞・皮膚線維芽細胞でエレクトロポレーションの条件検討を行い、低い細胞毒性と高い遺伝子導入効率を得られた。TTF-1・YAP/TAZ・FOXA2の発現ベクターを作成し、これらの強制発現により細胞分化誘導を試みた。TGF-beta・BMP-4・FGF-2のリガンドおよび阻害剤、脱メチル化剤やHDAC阻害剤の効果も検証した。肺上皮細胞培養に適した無血清培地を活用し、さらにコラーゲンゲルに包埋した肺線維芽細胞との共培養、三次元培養、air-liquid interfaceの培養法も組合せた。肺上皮細胞マーカー(SPC、CC10、FoxJ1)の発現上昇を定量的PCRで確認できた。

研究成果の概要(英文)：We explored optimal settings for gene transduction by electroporation in human iPS cells and dermal fibroblasts, and determined the condition for low cytotoxicity and high transduction efficiency. We constructed expression vectors for TTF-1, YAP/TAZ, and FOXA2, and attempted to induce cellular differentiation via ectopic expression of these factors. We also tested the effects of TGF-beta/BMP-4/FGF-2 ligands/inhibitors, demethylating agent, and HDAC inhibitor. In an attempt to establish suitable conditions for lung epithelial cell differentiation, serum-free media, collagen gels embedded with lung fibroblasts, three-dimensional and air-liquid interface cultures were utilized. Elevated expression of lung epithelial cell markers (SPC, CC10, and FoxJ1) were confirmed by quantitative PCR, suggesting that lung epithelial cell differentiation with a certain level was achieved through combinations of gene transfer and culture methods.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：リプログラミング 遺伝子導入 肺上皮細胞 肺線維芽細胞 小細胞肺癌 非小細胞肺癌 肺線維症
トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性閉塞性肺疾患や肺線維症などの難治性呼吸器疾患において、気管支や肺胞における肺上皮細胞の傷害が認められる。これらの疾患に対して、肺上皮細胞や、その前駆細胞を移植することで、肺の再生が期待できる。ヒト iPS 細胞から肺上皮細胞への分化誘導に関する報告は、研究開始当初の段階で実質的に 10 報に満たず、何れも予備的な実験結果に止まっていた。2012 年には 2 つのグループから、Activin 刺激によって内胚葉系細胞に分化させ、さらに TGF- β シグナル阻害と BMP・FGF 刺激によって肺上皮細胞への誘導が可能であると示された (Mou H et al. Cell Stem Cell. 2012; Wong AP et al. Nat Biotechnol. 2012)。

(2) 申請者は同様の実験で条件検討を行っていたが、分化誘導効率や再現性の低さを経験していた。培養操作も煩雑で、数週間以上の時間を要するため、臨床応用の観点から実現可能性に疑問を抱かざるを得ない状況であった。そのため安定的かつ高効率に細胞分化を誘導する技術の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

転写因子導入と培養法の最適化により、ヒト iPS 細胞から肺上皮細胞へと効率的に分化誘導する培養法の確立を目指した。さらに線維芽細胞から肺上皮細胞へのダイレクトリプログラミングも試みることにした。

3. 研究の方法

(1) システム生物学の活用

肺の器官形成における転写因子・遺伝子発現制御の階層性を明らかにすべく、公開されているゲノムワイドなデータベースを活用して解析を進めた。CAGE シーケンスにより網羅的に転写開始点を同定する FANTOM5 プロジェクトのデータベースを活用し、肺上皮細胞などに特徴的な遺伝子群の抽出を試みた。

(2) 遺伝子導入法

密接な転写因子ネットワークを形成する TTF-1・YAP/TAZ・FOXA2・Smad2/3 は肺上皮細胞のリプログラミングを目指すうえでの中核的な因子群であると捉えた。さらに肺上皮細胞のサブタイプを規定するマスター転写因子として SOX2 や ASCL1 も重要であると考えた。エピソーマルベクター (染色体に組み込まれずに自己複製が可能なプラスミド) を活用し、これらの因子の発現ベクターを作成し、遺伝子強制発現による分化誘導を試みた。ヒト iPS 細胞や線維芽細胞への遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用いた。GFP 発現ベクターを用いてエレクトロポレーションの条件検討もを行い、低い細胞毒性と高い導入効率が見られる条件を探った。

(3) 培養法の工夫

肺の器官形成において上皮細胞と間葉系細胞の密接な相互作用が重要である。肺上皮細胞の分化を促進させるため、肺線維芽細胞と三次元で共培養する手法を活用し、さらに air-liquid interface (ALI) を組み合わせた培養法も試みた。

(4) マウス肺胞上皮細胞の初代培養

肺上皮細胞の最適な培養法を探るためのモデルとして、マウス肺から II 型肺胞上皮細胞の初代培養を行った。細胞極性や細胞接着を評価するため、セルチャンバーを使用した二層培養を行い、電気抵抗の測定や細胞接着分子の検出などを行った。

(5) 動物モデル

細胞移植による肺再生を目指すうえで、疾患動物モデルにおいて分化誘導させた細胞が個体に生着するか否かを確認することが肝要である。ブレオマイシンによる肺傷害や、片肺切除による肺再生モデルを検証した。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞に TTF-1・YAP/TAZ・FOXA2 を強制発現させ、TGF- β 阻害剤や BMP・FGF 刺激を組み合わせ、分化誘導のため肺上皮細胞用の無血清培地を使用した。肺上皮細胞マーカーの発現変化を定量的 PCR で確認し、電子顕微鏡による形態観察も行った。肺線維芽細胞との共培養や三次元培養・air-liquid interface については、コラーゲンゲルを用いた実験系を構築した。SPC、CC10、FoxJ1 などの発現レベルの上昇は transcript レベルで確認できたが、細胞免疫染色や電子顕微鏡での形態観察では、分化誘導を結論付けられるほどの結果を再現よく得られなかった。

(2) アデノウイルス・レトロウイルス・レンチウイルスの発現ベクターを作成し、GFP の発現をフローサイトメーターで検出して遺伝子導入効率の検定を行った。恒常的な発現を得るため、マウス ES 細胞・肺胞上皮細胞にはレトロウイルスが、ヒト iPS 細胞・肺癌細胞・線維芽細胞にはレンチウイルスが有効であることが確認できた。さらにレンチウイルスベクターを用いて、TGF- β に対する人工的 miRNA の発現システムを構築し、三次元共培養における効果を検証した。エレクトロポレーションの条件検討もを行い、低い細胞毒性と高い導入効率を得た。

(3) 肺上皮細胞と非小細胞肺癌細胞の CAGE データの比較解析を行い、さらにメチロームデータや脱メチル化剤による遺伝子発現変化を統合的に解析した。脱メチル化によって発現が制御され、肺上皮細胞の癌化に関連する遺伝子、non-coding RNA、さらに特異的な反復配列が同定された。非小細胞肺癌に特異的な cancer testis antigen (CTA) を網羅的

に同定するウプサラ大学のプロジェクトにも参画し、CTA が DNA メチル化による発現制御を受けている可能性について検証した。さらに非小細胞肺癌における TAZ の機能解析を行い、TAZ が ErbB リガンドの発現制御を介して癌促進的な作用をもつことが判明した。

(4) 肺小細胞癌のトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現パターンに基づくサブタイプの存在を明らかにした。神経内分泌マーカーの発現レベルが高い ASCL1 陽性群、NEUROD1 陽性群、さらに細胞接着性の高い YAP・TAZ 陽性群のサブタイプを同定し、各群で遺伝子発現・細胞形態・薬剤感受性パターンが異なることを見出した。肺小細胞癌では ASCL1 により TTF-1 が制御されており、TTF-1 は様々な遺伝子や miRNA の発現調節を通じて小細胞癌の形質を制御することが判明した。

(5) FANTOM5 データベースを活用し、様々な組織由来の線維芽細胞の CAGE データの比較解析を行い、肺線維芽細胞に特徴的な転写因子群を同定した。ENCODE の H3K27ac ChIP-seq データを活用してスーパーエンハンサーを定義したところ、さらに 8 個の転写因子のゲノム領域と重なり、これらが肺線維芽細胞のマスター因子として転写ネットワークの中核となっていることが示唆された。さらに TAZ の肺線維芽細胞における機能について探究し、組織染色、マウスモデル、培養実験、RNA-seq、LGRC データベースを活用した臨床情報との統合、などの多面的解析により、TAZ が肺線維症の病態形成に関与することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Suzuki HI, Katsura A, Mihira H, Horie M, Saito A, Miyazono K. Regulation of TGF- β -mediated endothelial-mesenchymal transition by microRNA-27. **J Biochem.** 2017.
2. Noguchi S, Saito A, Mikami Y, Urushiyama H, Horie M, Matsuzaki H, Takeshima H, Makita K, Miyashita N, Mitani A, Jo T, Yamauchi Y, Terasaki Y, Nagase T. TAZ contributes to pulmonary fibrosis by activating profibrotic functions of lung fibroblasts. **Scientific Reports.** 2017;7:42595.
3. Djureinovic D, Hallström BM, Horie M, Mattsson JS, La Fleur L, Fagerberg L, Brunnström H, Lindskog C, Madjar K, Rahnenführer J, Ekman S, Stähle E, Koyi H, Brandén E, Edlund K, Hengstler JG, Lambe M, Saito A, Botling J, Pontén F, Uhlén M, Micke P. Profiling cancer testis antigens in non-small-cell lung cancer. **JCI Insight.** 2016;1(10):e86837.

4. Horie M, Yamaguchi Y, Saito A, Nagase T, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Forrest AR, Hayashizaki Y, Suzutani T, Kappert K, Micke P, Ohshima M. **Scientific Reports.** 2016;6:33666.
5. Horie M, Saito A, Ohshima M, Suzuki HI, Nagase T. YAP and TAZ modulate cell phenotype in a subset of small cell lung cancer. **Cancer Science.** 2016;107(12):1755-66.
6. Kibinge N, Ono N, Horie M, Sato T, Sugiura T, Altaf-Ul-Amin M, Saito A, Kanaya S. Integrated pathway-based transcription regulation network mining and visualization based on gene expression profiles. **J Biomed Inform.** 2016;61:194-202.
7. Ohshima M, Yamaguchi Y, Ambe K, Horie M, Saito A, Nagase T, Nakashima K, Ohki H, Kawai T, Abiko Y, Micke P, Kappert K. Fibroblast VEGF-receptor 1 expression as molecular target in periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2016;43(2):128-37.
8. Saito A, Nagase T. Hippo and TGF- β interplay in the lung field. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2015;309(8):L756-67.
9. Horie M, Saito A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Nagase T. Three-dimensional Co-culture model for tumor-stromal interaction. **J Vis Exp.** 2015;(96).
10. Okazaki H, Ishikawa O, Iijima T, Kohira T, Teranishi M, Kawasaki S, Saito A, Mikami Y, Sugiura A, Hashimoto S, Shimada E, Uchikawa M, Matsushashi M, Tsuno NH, Tanaka M, Kiyokawa N, Fujimoto J, Nagase T, Tadokoro K, Takahashi K. Novel swine model of transfusion-related acute lung injury. **Transfusion.** 2014;54(12):3097-107.
11. Noguchi S, Saito A, Horie M, Mikami Y, Suzuki HI, Morishita Y, Ohshima M, Abiko Y, Mattsson JS, König H, Lohr M, Edlund K, Botling J, Micke P, Nagase T. An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.** 2014;20(17):4660-72.
12. Horie M, Saito A, Noguchi S, Yamaguchi Y, Ohshima M, Morishita Y, Suzuki HI, Kohyama T, Nagase T. Differential knockdown of TGF- β ligands in a three-dimensional co-culture tumor-stromal interaction model of lung cancer. **BMC Cancer.** 2014;14:580.
13. Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. **Exp Lung Res.** 2014;40(5):222-36.

14. Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Regulation of Smad4-dependent and independent transcription of Smad3 target genes by TTF-1/Nkx2-1. *Cell Res.* 2014;24(8):994-1008.

〔学会発表〕(計4件)

堀江真史、齋藤朗、長瀬隆英 肺小細胞癌のトランスクリプトーム解析 第56回日本呼吸器学会

野口智史、齋藤朗、三上優、漆山博和、寺崎泰弘、堀江真史、松崎博崇、竹島英之、槇田広佑、三谷明久、山内康宏、長瀬隆英 Hippo pathway の構成因子である TAZ の肺線維症における役割 第56回日本呼吸器学会

堀江真史、齋藤朗、長瀬隆英 肺小細胞癌のトランスクリプトーム解析 第75回日本癌学会

堀江真史、齋藤朗、野口智史、長瀬隆英 エピソーマルベクターを用いた肺上皮細胞へのダイレクトリプログラミングの試み 第35回日本炎症・再生医学会

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 朗 (SAITO, Akira)
東京大学 保健・健康推進本部 助教
研究者番号：90591412

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者

長瀬隆英 (NAGASE, Takahide)
大島光宏 (OHSHIMA, Mitsuhiro)
山口洋子 (YAMAGUCHI, Yoko)
鈴木洋 (SUZUKI, Hiroshi)
堀江真史 (HORIE, Masafumi)
野口智史 (NOGUCHI, Satoshi)
奥西勝秀 (OKUNISHI, Katsuhide)
小野直亮 (ONO, Naoaki)
Patrick MICKE
Bogumil KACZKOWSKI