

II型肺胞上皮細胞の特徴を再現できる細胞の作製に成功し、 アミオダロン性肺障害を改善する化合物を同定

—肺線維症治療薬探索への活用を期待—

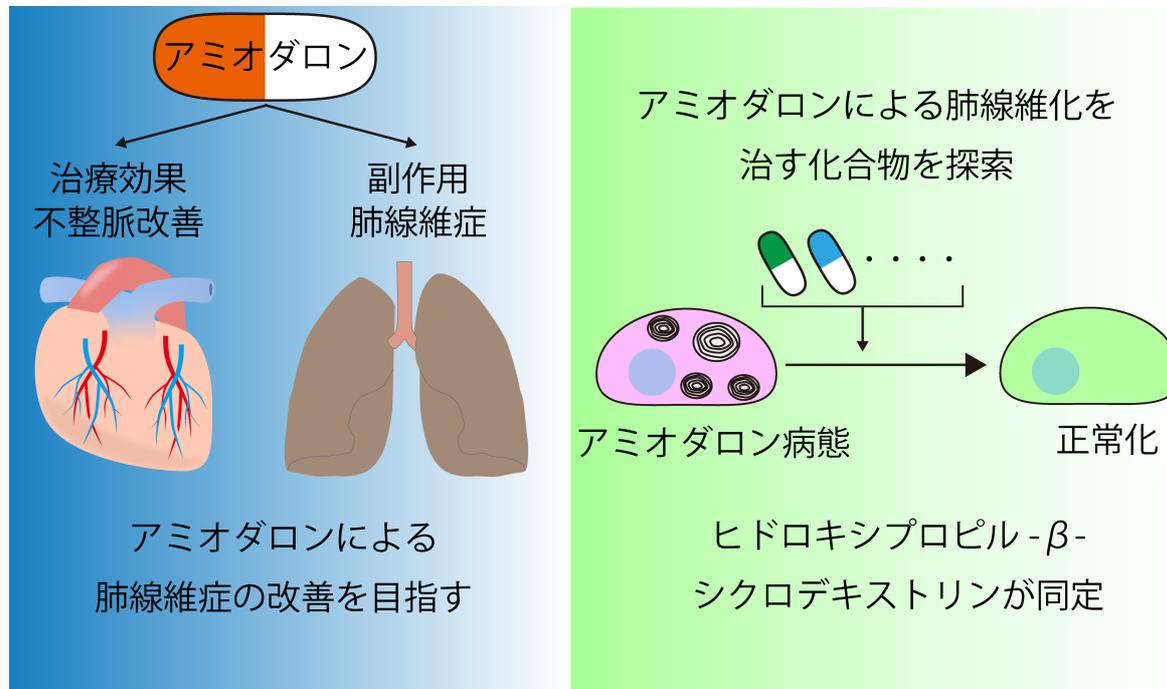
概要

京都大学大学院 医学研究科 呼吸器疾患創薬講座 後藤慎平 特定准教授、金墻周平 同研究員、形態形成機構学 萩原正敏 教授らのグループは、II型肺胞上皮細胞の一部の特徴を持つ細胞を作成し、この細胞を使用して、アミオダロンの副作用である肺線維症を改善する化合物を同定することに成功しました。

肺の機能維持にはII型肺胞上皮細胞が必須であり、この細胞は様々な呼吸器の病気に関係する細胞であることが知られています。しかし、II型肺胞上皮細胞の機能を模倣でき、たくさんの化合物の中から薬を選び出す作業のために低コストで簡便に利用可能な細胞が存在しなかったため、研究の大きな制約となっていました。

本研究では、複数の遺伝子を細胞に導入することで、II型肺胞上皮細胞の機能を一部模倣できる細胞の作製に成功しました。この細胞を用いて、不整脈の治療薬であるアミオダロンで誘発される肺線維症を改善する化合物を探索し、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを同定しました。今回作製した細胞は、II型肺胞上皮細胞の機能異常に関係した疾患の解明に役立つことが期待されます。本成果は2021年1月25日に米国胸部学会誌「American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology」にオンライン掲載されました。

研究の概略図



1. 背景

肺は、伸縮可能なスポンジのような構造で、数億個の肺胞からなる繊細な構造を保つことで、酸素と二酸化炭素の交換を可能にしています。その構造を保つためには、II型肺胞上皮細胞が放出する肺サーファクタントが必須であることが知られています。肺サーファクタントは、ラメラ体という構造を介して、II型肺胞上皮細胞から放出されます。ラメラ体の異常は、アミオダロンの副作用によって肺線維症になった患者で観察されることがあります。また、肺サーファクタント成分の遺伝子に変異が起こると肺線維症になります。そのため、ラメラ体と肺サーファクタントの異常は、肺線維症と関係があると考えられつつあります。本研究グループは、2014年にヒト iPS 細胞から肺前駆細胞を単離して、三次元培養を行うことでラメラ体を有し、肺サーファクタントを放出する II 型肺胞上皮細胞を分化誘導することに成功し、ヒト iPS 細胞を用いてアミオダロンによる II 型肺胞上皮細胞のラメラ体異常が再現できることを報告していました（文献 1、2、3）。しかし、ヒト iPS 細胞由来の II 型肺胞上皮細胞は、簡便かつ大量に用意することが難しく、研究の障壁となっていました。今回の研究は 2017 年 4 月に京都大学と杏林製薬株式会社によって設立された共同研究講座である呼吸器疾患創薬講座で最初のプロジェクトとして実施された研究で、ラメラ体を作り、肺サーファクタント成分を放出できる培養細胞を人工的に作製することで従来の研究の障壁を解決することを試み、アミオダロンによる肺線維化で観察されるラメラ体の異常を改善する薬の探索を行いました。

2. 研究手法・成果

i. ラメラ体と肺サーファクタントを放出する新規培養細胞の作製に成功

肺サーファクタントの産生に重要と考えられてきた SFTPB, SFTPC, ABCA3 の 4 つの遺伝子を培養細胞として広く利用されている A549 細胞にまとめて強制発現したところ、ラメラ体が形成され、肺サーファクタント成分が放出されることがわかりました（図 1）。この結果は、II 型肺胞上皮細胞の特徴の一部を持った細胞（LB 細胞）の作製に成功したことを示唆するものです。また、LB 細胞は長期間培養してもラメラ体を有し、肺サーファクタント成分を保持し続けることも分かり、低コストで簡便に使用できかつ大量に用意できる細胞であることがわかりました。さらに LB 細胞は、ヒトの肺にある II 型肺胞上皮細胞と似たような遺伝子発現パターンを示しており、LB 細胞が II 型肺胞上皮細胞の特徴であるラメラ体の形成と肺サーファクタントの放出を評価するのに適した細胞であることが示唆されました。

ii. アミオダロンによる肺線維化病変で観察されるラメラ体の異常を LB 細胞で模倣

アミオダロンによって薬剤性の肺線維化が認められた患者さんの肺の II 型肺胞上皮細胞では、ラメラ体の増大などの形態学的な異常が認められることが報告されており、LB 細胞にアミオダロンを加えたところ、同様のラメラ体の異常が起こることがわかりました（図 2）。これは、LB 細胞がアミオダロンによって認められるラメラ体の異常を模倣できたことを示唆しています。さらに、簡便かつ大量に用意できるという LB 細胞の特性を生かし、ラメラ体の異常を指標にした化合物の探索方法の構築にも成功し、LB 細胞を用いることで今までの研究障壁を打開できることを示しました（図 2）。

iii. ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンがラメラ体の異常を改善

アミオダロンによって認められるラメラ体の異常を改善する化合物を、既知の約 2000 個の化合物から探索したところ、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが同定されました（図 3）。さらに、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンは、iPS 細胞からできた II 型肺胞上皮細胞にアミオダロンを加えたときに起こるラ

メラ体の異常も改善することが分かりました (図 4)。これは、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが、アミオダロンによるメラ体の異常を治す可能性を示すものです。

3. 波及効果、今後の予定

今回の研究で、II 肺胞上皮細胞の一部の特徴を定量化でき、簡便かつ大量に利用できる LB 細胞の作製に成功しました。さらに LB 細胞を使用して化合物探索を行い、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが、アミオダロンによるメラ体の異常を改善することを発見し、ヒト iPS 細胞を用いた II 型肺胞上皮細胞でその有効性を確認できました。これらの研究結果から、LB 細胞は、メラ体異常を改善する化合物を探索することに有用と考えられます。LB 細胞を用いることで、簡便にメラ体と肺サーファクタントの放出を評価することが可能なため、今後、メラ体と肺サーファクタントの異常が原因と考えられるような肺線維症について、LB 細胞が治療薬の探索に役立つ可能性があります。今回見つかったヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンはアミオダロンで問題となる肺線維症の副作用を抑制できる可能性があり、今後アミオダロンによる線維化を抑制できか動物モデルでも評価していく予定です。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は京都大学大学院 医学研究科 呼吸器疾患創薬講座 (後藤慎平特定准教授)、同形態形成機構学 (萩原正敏教授)、杏林製薬株式会社により行われました。また、本研究は杏林製薬株式会社からの研究助成によって実施されました。

<研究者のコメント>

肺線維症は難治性・進行性の疾患で、苦しんでいる患者さんが多くいらっしゃいます。今回の研究によって、アミオダロンによる薬剤性の肺線維症で報告されているメラ体の異常や、肺サーファクタント放出能に着目した化合物スクリーニングが可能になりました。今後は肺線維症患者さんの進行を抑制させる薬を一日でも早く作るために、詳細な病態解明と治療薬開発につなげられる研究を進めていきたいと考えています。

<参考文献>

1. Gotoh et al. (2014). Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 394-403.
2. Yamamoto et al. (2017). Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods* 14, 1097-1106.
3. Korogi Y et al. (2019). In vitro disease modeling of hermansky-pudlak syndrome type 2 using human induced pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Stem Cell Reports* 12, 431-440.

<用語解説>

II 型肺胞上皮細胞：肺の構造の維持に必須な成分である肺サーファクタントを出す細胞です。この細胞の機能の低下が、種々の呼吸器疾患に関わるとされています。

肺サーファクタント：肺サーファクタントタンパク質と、リン脂質が含まれており、肺の虚脱を防ぎ、ガス交換能の維持に必要な成分です。

メラ体：II 型肺胞上皮細胞で観察される層状の構造体のことで、肺サーファクタントが含まれています。

アミオダロン: 不整脈の治療薬であり、代表的な副作用として肺線維症が知られています。

三次元培養: 平面培養とは異なり、厚さがある立方体内で培養する方法で、平面培養よりも生態環境に近いと言われています。

ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン: 環状オリゴ糖構造を持ち、医薬品や食品添加物としても広く使用される化合物で、ニーマンピック病 C 型の治療薬候補としても臨床試験が進んでいます。

<参考図表>

図1 ラメラ体を含みサーファクタントを放出する LB 細胞 (矢印がラメラ体を示す。スケール = 10 μm)

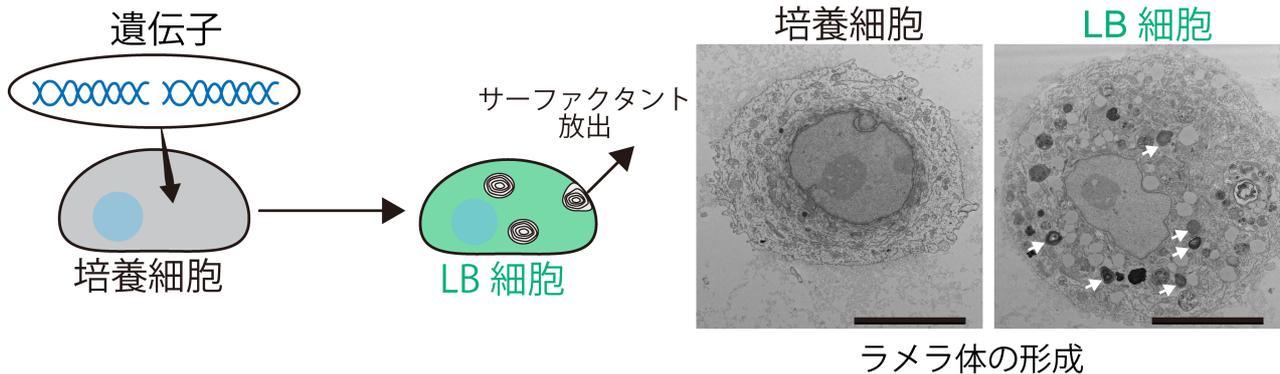


図2 LB 細胞にアミオダロンを加えたときのラメラ体の異常 (矢印がラメラ体を示す。スケール = 10 μm)

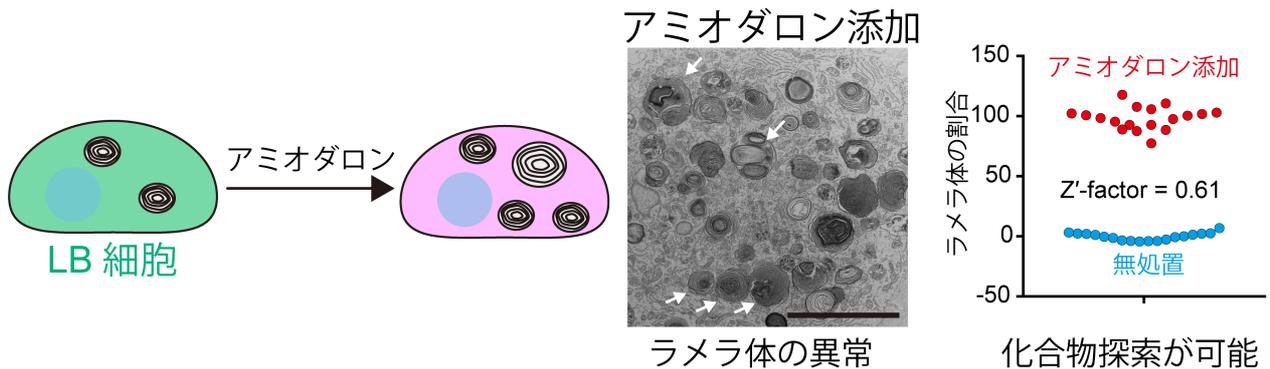


図3 アミオダロンのラメラ体異常に対するヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンの効果

(矢印がラメラ体を示す。スケール = 10 μm)

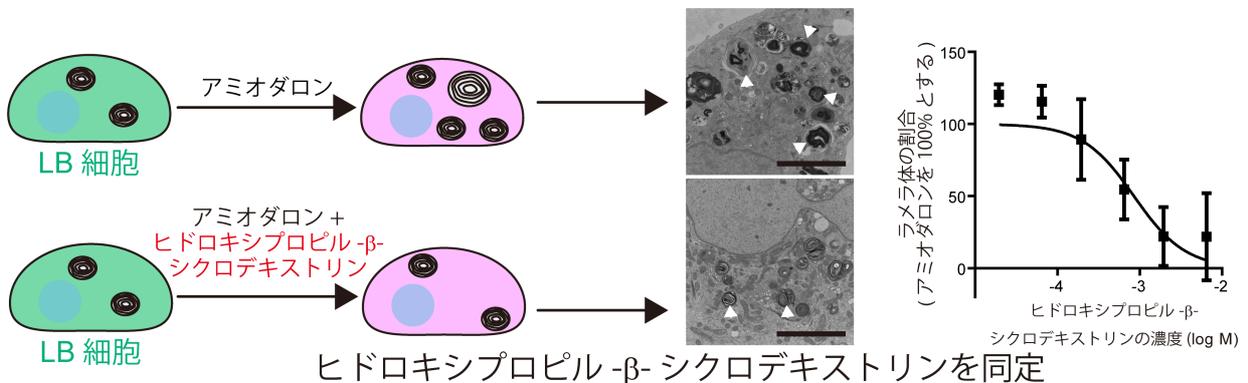
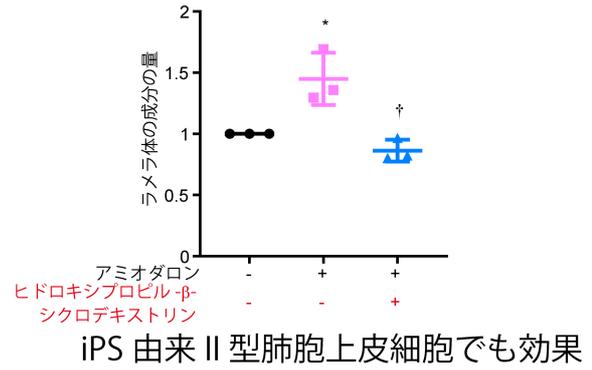
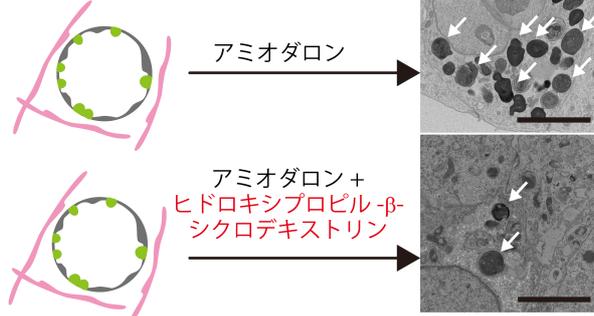


図4 iPS 由来 II 型肺胞上皮細胞でのアミオダロンのラメラ体異常に対するヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンの効果 (矢印がラメラ体を示す。スケール = 10 μm)

iPS 由来 II 型肺胞上皮細胞
を含む 3 次元培養体



iPS 由来 II 型肺胞上皮細胞でも効果

< 論文タイトルと著者 >

タイトル：Hydroxypropyl cyclodextrin improves amiodarone-induced aberrant lipid homeostasis of alveolar cells (ヒドロキシプロピルシクロデキストリンは、アミオダロンが誘導する肺胞上皮細胞の脂質異常を改善する)

著者：Shuhei Kanagaki, Takahiro Suezawa, Keita Moriguchi, Kazuhisa Nakao, Masayasu Toyomoto, Yuki Yamamoto, Koji Murakami, Masatoshi Hagiwara, Shimpei Gotoh

掲載誌：American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology

DOI：10.1165/rcmb.2020-01190C