

# iPS 細胞を用いてヘルマンスキー・パドラック症候群の肺病態の解析に成功

—研究が困難な遺伝性疾患の治療薬開発の足がかりに—

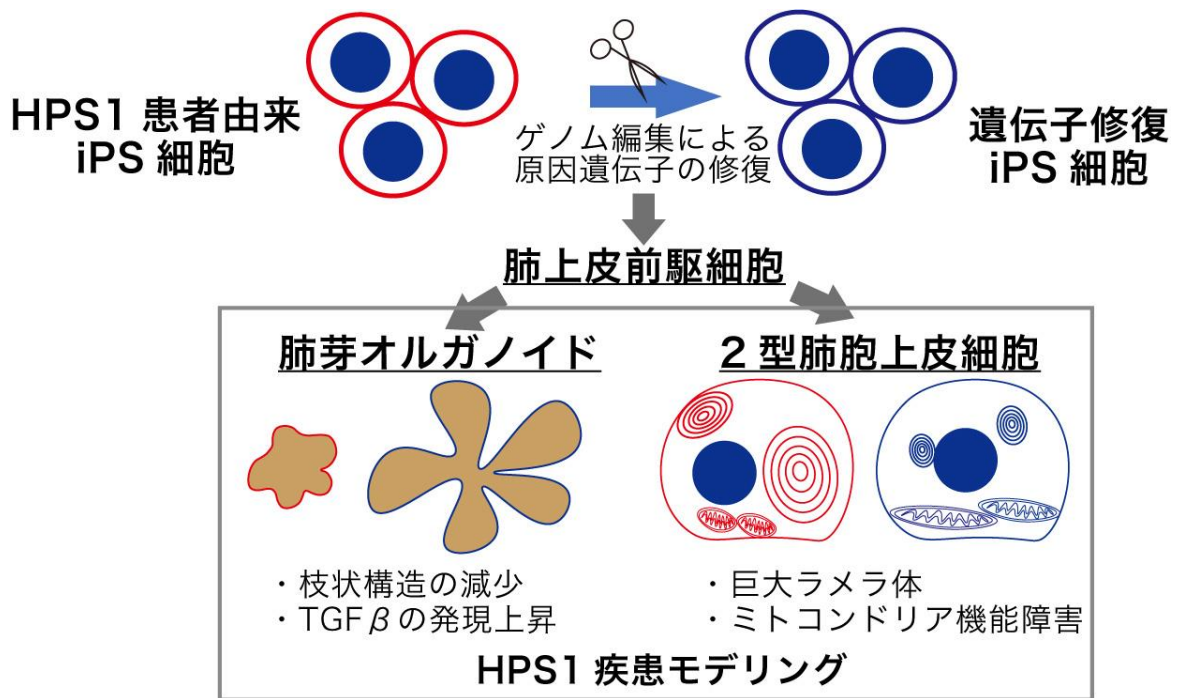
## 概要

間質性肺炎は呼吸時のガス交換を担う肺胞の壁が徐々に固くなることで、呼吸機能が低下する病気です。ヘルマンスキー・パドラック症候群 1 型の患者さんの多くは間質性肺炎になってしまうことが分かっていますが、患者さんから肺胞の細胞を単離・培養することは難しいため、この病気の研究は進んできませんでした。

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、末澤隆浩 同研究員らは、形態形成機構学 萩原正敏 教授、呼吸器内科 平井豊博 教授、杏林製薬株式会社創薬本部 村上浩二 創薬企画部長との共同研究において、ヘルマンスキー・パドラック症候群 1 型の患者さん由来の iPS 細胞から肺の上皮細胞を作製して病気の原因を探索しました。その結果、患者さんから作製した iPS 細胞では、肺の元となる肺芽オルガノイドにおいて枝状構造が減少すること、また肺胞上皮細胞において細胞内のエネルギー産生に重要なミトコンドリアの機能が低下していることを発見しました。本研究成果は、ヘルマンスキー・パドラック症候群 1 型の病気の発症メカニズムの解明や治療薬の開発に役立つことが期待されます。

本成果は、2021 年 11 月 4 日に国際学術誌「Respiratory Research」にオンライン掲載されました。

## 研究の概略図



## 1. 背景

間質性肺炎は肺のガス交換を担う肺胞に繰り返し炎症や損傷が起こることで、肺胞の壁が徐々に固くなり呼吸機能が低下する病気です。肺胞に障害が起きる原因はさまざまですが、遺伝的に肺胞上皮細胞<sup>注1</sup>に障害を受けやすい患者さんがいます。ヘルマンスキー・パドラック症候群（HPS）は、白皮症や視覚異常、出血時間の延長などを特徴とする遺伝性の病気です。HPS は原因となる遺伝子によって複数の型があり重症度も異なりますが、中でもヘルマンスキー・パドラック症候群 1 型（HPS1）は患者さんの数が最も多く、重篤な間質性肺炎を示すことが知られています。ヒトと実験動物（マウス）の肺には種差があるため、ヒトの細胞でも病気の原因を探索・検証することは重要です。一方で、患者さんから肺胞上皮細胞を採取すること、またその機能を維持したまま長期間培養することが困難であるため、HPS1 のヒト細胞を用いた研究は進んできませんでした。

2014 年に本研究グループはヒト iPS 細胞から肺上皮前駆細胞<sup>注2</sup>を効率よく作製することに成功しました（参考文献 1）。さらに肺上皮前駆細胞から機能的な気道上皮細胞や肺胞上皮細胞が作製できることを示しました（参考文献 2、3）。2019 年には幼少期から間質性肺炎を発症するヘルマンスキー・パドラック症候群 2 型（HPS2）の患者さん由来の iPS 細胞を用いて 2 型肺胞上皮細胞からの肺サーファクタント<sup>注3</sup>の分泌異常を報告しました（参考文献 4）。そこで今回の研究では成人してから特徴的な間質性肺炎を発症した HPS1 患者さんから作製した iPS 細胞を用いて肺胞オルガノイドに分化誘導し、その特徴を解析することで HPS1 患者さんが間質性肺炎を発症する原因を探したいと考えました。

## 2. 研究手法・成果

海外の細胞バンク（Coriell Institute for Medical Research）から入手した HPS1 患者さん由来の線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、ゲノム編集<sup>注4</sup>により HPS1 遺伝子の変異を修復した iPS 細胞を作製することで比較対照となる細胞を取得しました。それらの iPS 細胞から肺上皮前駆細胞を作製し、以下に示す 2 種類の培養方法を用いて作製した細胞の特徴を比較解析しました。

### i. 肺芽オルガノイド

肺の発生過程において、肺芽と呼ばれる肺の元となる構造が初めにでき、そこから枝分かれした気道の先端に肺胞構造が作られることで肺が完成すると考えられています。米国の研究チームからは、HPS1 遺伝子を欠損した ES 細胞<sup>注5</sup>を用いて肺芽オルガノイド<sup>注6</sup>を作製すると、肺芽の枝状構造が弱まることが報告されました（参考文献 5）。今回の研究では、まずは肺芽オルガノイドの作製法を改良した上で、HPS1 患者さんの iPS 細胞から分化誘導した肺芽オルガノイドを用いたところ、この枝状構造は弱まることが分かりました。さらに HPS1 患者さんの iPS 細胞から作製した肺芽オルガノイドでは、間質性肺炎を引き起こすと考えられている TGF $\beta$  が増えており（図 1 A）、またその作用を止めることで枝状構造が回復することを確認しました（図 1 B）。

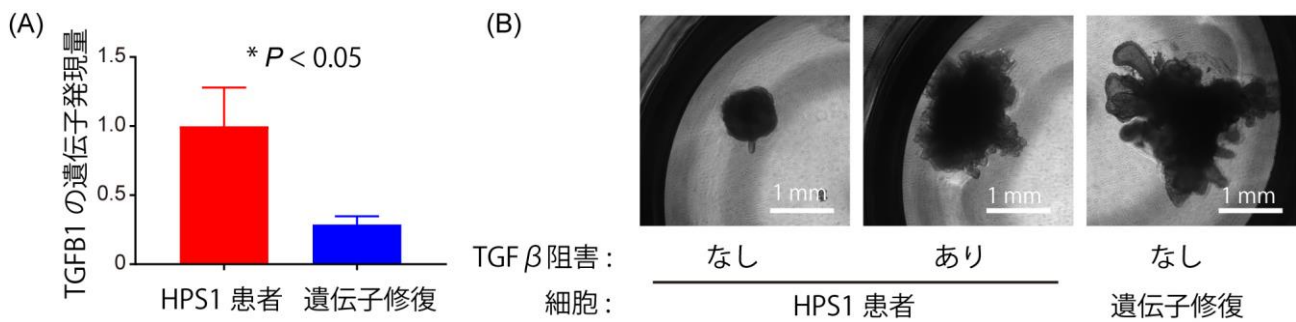


図 1：肺芽オルガノイドの解析 (A) TGFβ1 の発現量 (B) 形態の観察

## ii. 肺胞オルガノイド

本研究グループは、肺上皮前駆細胞と肺線維芽細胞<sup>注7</sup>を一緒に培養し肺胞オルガノイドとすることで、効率よく2型肺胞上皮細胞を作製できることを過去に報告しました(参考文献3)。HPS1患者さんの肺の2型肺胞上皮細胞では、肺サーファクタントを貯めるラメラ体<sup>注8</sup>が肥大化することが知られており(参考文献6)、今回本研究グループが作製したHPS1患者さん由来のiPS細胞から作製した2型肺胞上皮細胞においても同様の肥大化したラメラ体を観察することが出来ました(図2A)。さらにこの細胞の中のタンパク質を詳細に解析した結果、細胞内のエネルギー産生に重要な役割を持つミトコンドリアの機能が低下している可能性が示されました。ミトコンドリアの機能を示すものの一つにミトコンドリアの膜電位があります。実際に、HPS1患者さん由来のiPS細胞から作製した2型肺胞上皮細胞では、ミトコンドリアの膜電位が低下した細胞が増えていることが分かりました(図2B)。

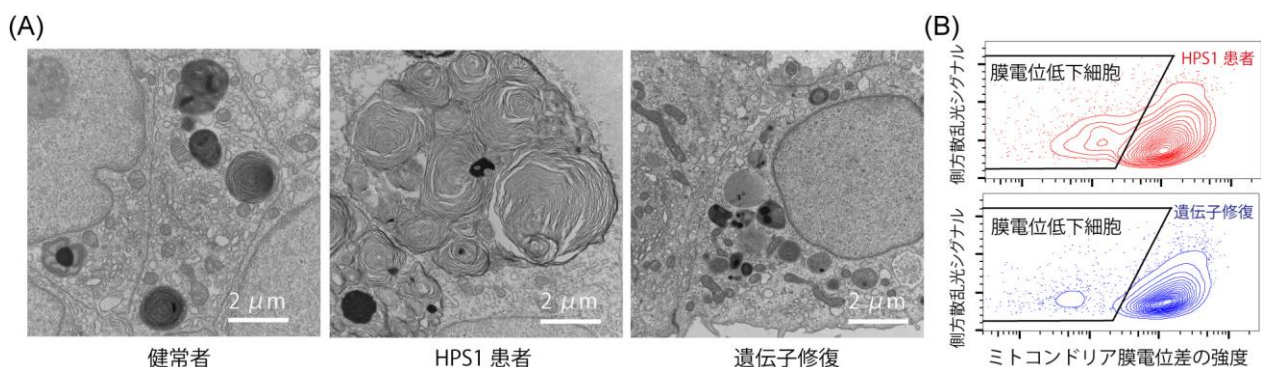


図 2：肺胞オルガノイドの解析 (A) ラメラ体の観察 (B) ミトコンドリア膜電位の評価

今回の研究で作製したHPS1患者さん由来のiPS細胞は、これまでの研究報告や実際の患者さんの病態をよく再現できているため、HPS1患者さんの病気の発症メカニズムの解明や治療薬の開発に役立つことが期待されます。

## 3. 波及効果、今後の予定

患者さん由来のiPS細胞を用いた解析において、肺芽オルガノイドではTGFβの活性化がHPS1の肺病態の形成に関与している可能性を示しました。一方でこのオルガノイドに含まれる細胞は胎児の細胞に似ており、成熟した肺の上皮細胞であることまでは示すことが出来ませんでした。病態の責任細胞の一つとして考えられてきた2型肺胞上皮細胞で見出されたミトコンドリア機能の低下も治療標的となる可能性があります。これらの特徴が実際のヒトの病態と関連するかどうかは今後検証していく必要があります。また、間質性肺炎では、

肺胞上皮細胞の障害とそれに続く周囲の線維芽細胞の異常な活性化が病態形成に関与していると考えられています。今回の肺胞オルガノドを用いた解析では、肺胞上皮細胞を解析出来ましたが、線維芽細胞についてはまだ十分に解析できていません。今後は、線維芽細胞の解析も行うことで、HPS 患者さんが間質性肺炎を発症する原因を解明していきたいと考えています。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

杏林製薬株式会社、日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム、日本学術振興会・文部科学省 科学研究費補助金

##### <用語説明>

**注1 肺胞上皮細胞**：肺でのガス交換を担う肺胞の表面に存在する細胞。1型肺胞上皮細胞は、扁平な構造を取ることで効率の良いガス交換を担っています。2型肺胞上皮細胞は肺サーファクタントを分泌し、分裂増殖して肺胞上皮細胞に分化することで呼吸時の肺胞構造の維持に関与しています。

**注2 肺上皮前駆細胞**：幹細胞から、気道または肺胞上皮細胞に分化する途中の段階にある細胞。

**注3 肺サーファクタント**：2型肺胞上皮細胞から肺胞の空気が入る側に分泌される界面活性物質で、呼吸時に肺胞がつぶれてしまうことを防ぐ働きがあります。

**注4 ゲノム編集**：ゲノム DNA を切断する酵素と切断する位置を決める RNA を細胞に取りこませることで、狙った位置のゲノム DNA 配列を改変する技術。

**注5 ES 細胞**：理論上は全ての細胞に分化することができる胚性幹細胞のこと。作製するためには受精卵が必要であるため、様々な希少疾患の患者さんから ES 細胞を作製するには倫理面でも限界があります。

**注6 オルガノイド**：培養皿の中で増殖能と分化能を持った細胞からつくられた臓器に似た立体構造体で複数種の細胞から構成されています。「ミニ臓器」とも呼ばれます。

**注7 肺線維芽細胞**：肺の結合組織を構成する細胞の一つ。間質性肺炎においては、線維芽細胞が異常に活性化して過剰量のコラーゲンを分泌することで肺胞の壁が固くなり肺が収縮すると考えられています。

**注8 ラメラ体**：2型肺胞上皮細胞内に存在し、肺サーファクタントを貯蔵するための細胞小器官。肺サーファクタントの主成分であるリン脂質が規則正しく並ぶことで、特徴的な層状構造をとります。

##### <研究者のコメント>

病気の治療薬を創る上で、培養皿の中で病気を模倣し、病気の発症メカニズムを解明したり、治療薬の候補物質の作用を評価したりすることは非常に重要です。iPS 細胞はこれまでに入手の難しかった病気の細胞を作製出来るため、ヘルマンスキー・パドラック症候群だけでなく、多くの病気の治療薬の開発に役立つ可能性があります。

##### <参考文献>

- 1 Gotoh, S. *et al.* Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **3**, 394-403, doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.005 (2014).
- 2 Konishi, S. *et al.* Directed Induction of Functional Multi-ciliated Cells in Proximal Airway Epithelial

- Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **6**, 18-25, doi:10.1016/j.stemcr.2015.11.010 (2016).
- 3 Yamamoto, Y. *et al.* Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods* **14**, 1097-1106, doi:10.1038/nmeth.4448 (2017).
- 4 Korogi, Y. *et al.* 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, doi:10.1016/j.stemcr.2019.01.014 (2019).
- 5 Chen, Y. W. *et al.* A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* **19**, 542-549, doi:10.1038/ncb3510 (2017).
- 6 Nakatani, Y. *et al.* Interstitial pneumonia in Hermansky-Pudlak syndrome: significance of florid foamy swelling/degeneration (giant lamellar body degeneration) of type-2 pneumocytes. *Virchows Arch* **437**, 304-313, doi:10.1007/s004280000241 (2000).

<論文タイトルと著者>

タイトル：Modeling of lung phenotype of Hermansky-Pudlak syndrome type I using patient-specific iPS cells (疾患特異的iPS細胞を用いたヘルマンスキークー・パドラック症候群1型の肺病変の疾患モデリング)

著者：Takahiro Suezawa, Shuhei Kanagaki, Yohei Korogi, Kazuhisa Nakao, Toyohiro Hirai, Koji Murakami, Masatoshi Hagiwara, Shimpei Gotoh

掲載誌：Respiratory Research DOI：10.1186/s12931-021-01877-8