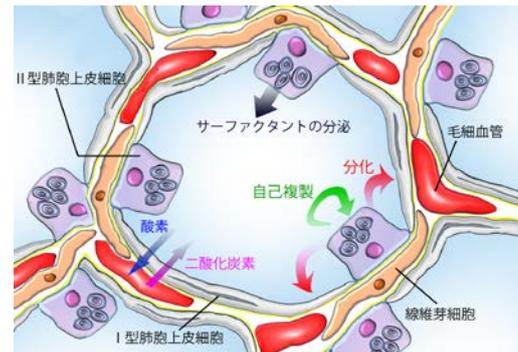


ヒト iPS 細胞から分化させた肺胞上皮細胞の長期培養に成功

—様々な呼吸器疾患の研究進展へ貢献—

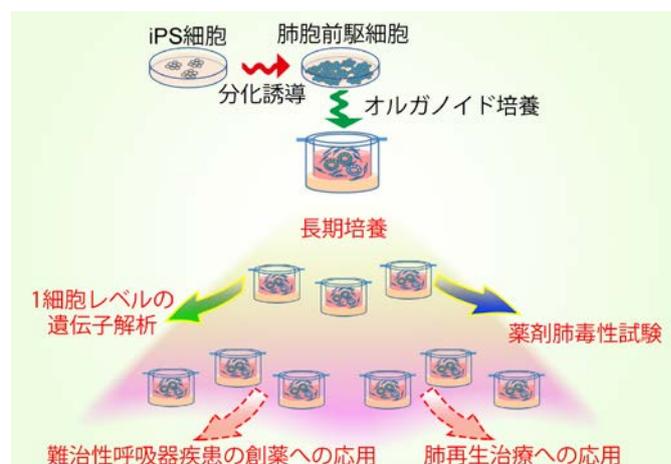
概要

肺胞は体に必要な酸素を取り込み不要な二酸化炭素を排出するガス交換を行うための構造で、I 型、II 型の肺胞上皮細胞に覆われています。I 型肺胞上皮細胞は平たい形をしてガスを通しやすい形をしており、II 型肺胞上皮細胞は肺胞がつぶれるのを防ぐために活性物質（サーファクタント）を分泌し、自己を複製しながら I 型肺胞上皮細胞にも分化できるという肺における幹細胞としての重要な役割を担っています。この II 型肺胞上皮細胞の異常は、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎、肺がん



などの様々な難治性呼吸器疾患とも関連すると考えられていますが、II 型肺胞上皮細胞は試験管内では遺伝子発現が安定せず、長期培養が出来なかったため、研究の大きな制約となってきました。

後藤慎平 医学研究科呼吸器内科特定准教授、山本佑樹 医師らは、ヒト iPS 細胞から効率よく II 型肺胞上皮細胞を作製し、3 ヶ月以上にわたって長期培養することに成功しました。また、鈴木 穰 東京大学教授、河野隆志 国立がん研究センター研究所分野長らの研究チームと共同研究を行い、ヒト iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞に分化する過程を 1 細胞ごとの遺伝子レベルで詳細に解析したところ、マウスの同じ細胞と似たようなパターンを取ることが分かりました。この成果はヒトにおける肺の発生様式が遺伝子レベルではまだ未解明の中、iPS 細胞を使うことでヒトの肺胞がマウスと同様のパターンで発生する可能性を示唆しました。さらに研究者たちはヒト iPS 細胞から分化させて長期培養した II 型肺胞上皮細胞に形態異常を引き起こすことが知られる薬剤を投与し、細胞、遺伝子レベルで異常を検出する方法を開発しました。これらの実験結果から、ヒト iPS 細胞は今まで困難だった薬剤による肺への副作用予測や将来の肺の再生医療、様々な難治性呼吸器疾患の創薬にも役立つことが期待されます。これらの研究成果は 2017 年 10 月 2 日付の *Nature Methods* オンライン版に掲載されました。



1. 背景

Ⅱ型肺胞上皮細胞の障害は様々な難治性呼吸器疾患の原因の一つとして考えられており、障害が起きるメカニズムの理解が難治性呼吸器疾患の病態解明や創薬に不可欠となりつつあります。しかし、現状はヒトのⅡ型肺胞上皮細胞を研究のために入手するには限界があります。肺は再生能力が低いいため研究のために余分に肺を切除することは倫理的にも出来ません。また、Ⅱ型肺胞上皮細胞を入手したとしても長期培養が難しく、従来の培養方法では数日間でⅠ型の細胞へ分化してしまい、それ以上増えなくなってしまいます。こうした問題の解決策として、iPS細胞からのⅡ型肺胞上皮細胞を作製法開発が進められてきました。しかし、iPS細胞にどの因子を入れればⅡ型肺胞上皮細胞へ分化させられるのか分かっていなかったため、効率的な作製は難しいままでした。後藤准教授らの研究チームは2014年にⅡ型肺胞上皮細胞の前段階の細胞を肺線維芽細胞と一緒に培養してオルガノイド¹を形成することで、Ⅱ型肺胞上皮細胞への分化を達成したものの、十分な作製効率ではありませんでした。また、ヒトiPS細胞から分化させたⅡ型肺胞上皮細胞がどれくらい実際のⅡ型肺胞上皮細胞に近いものなのか、安定的に増殖させることはできるか、という点の検討が残されていました。

2. 研究手法・成果

今回の研究では、主に3つの手法を開発しました。

1. ヒトiPS細胞から効率良くⅡ型肺胞上皮細胞を分化誘導する方法

Ⅱ型肺胞上皮細胞になる前段階の細胞に着目し、特定の培養液であらかじめ処理しておくことで分化しやすくなることを発見しました。この方法で準備した前段階の細胞を肺線維芽細胞²と培養しオルガノイドを形成したところ、50%程度の高い効率でⅡ型肺胞上皮細胞に分化しました。肺線維芽細胞を使わずに済む方法も合わせて検討を行ったところ、CHIR99021³とSB431542⁴という2種類の化合物を組み合わせることにより、線維芽細胞を使わずにⅡ型肺胞上皮細胞に分化させることができました。

2. オルガノイド培養を用いたヒトiPS細胞由来Ⅱ型肺胞上皮細胞の長期培養

分化させたⅡ型肺胞上皮細胞を含むオルガノイドから酵素を用いて細胞を取出し、肺線維芽細胞と混ぜ合わせてオルガノイドを作り直すという作業を繰り返すことで、iPS細胞由来Ⅱ型肺胞上皮細胞を3か月以上の長期間にわたって安定的に増やし続けることに成功しました。長期培養したiPS細胞由来Ⅱ型肺胞上皮細胞が、実際のⅡ型肺胞上皮細胞に近い状態のまま増殖しているかどうかを確かめるため、マイクロアレイや1細胞ごとのRNAシーケンスで解析(図1)したところ、実際の肺に存在するⅡ型肺胞上皮細胞でみられる代表的な遺伝子の多くが正常に発現していることが分かりました。さらに、1細胞ごとの遺伝子発現パターンに応じてiPS細胞から分化したⅡ型肺胞上皮細胞の“グループ分け”を行い、大人のⅡ型肺胞上皮細胞に近いものと胎児レベルのⅡ型肺胞上皮細胞に近いもの、などの分類も出来るようになりました(図2)。

¹ ミニ臓器を培養皿の上で作成したもの。

² 肺の結合組織を作り出す細胞。分裂寿命や老化の研究、ワクチン生産に広く用いられてきた。

³ GSK3βという酵素を阻害することで細胞内のシグナル伝達経路を活性化させる低分子化合物。

⁴ TGF-βシグナル伝達経路を阻害する低分子化合物。

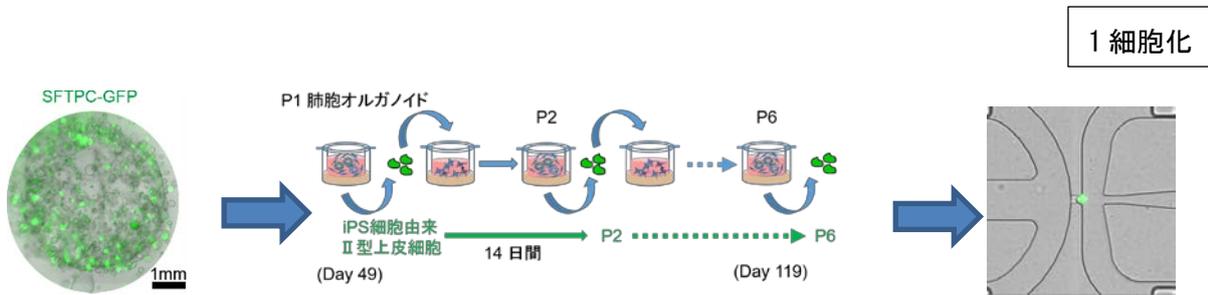


図 1 (左) : 作成したオルガノイド。Ⅱ型肺胞上皮細胞が緑色に発光している。(中) 今回開発した iPS 由来Ⅱ型肺胞上皮細胞を長期培養する方法。P6 では 6 回細胞を植え替えている。(右) : 1 細胞ごとに分離した iPS 由来Ⅱ型肺胞上皮細胞。

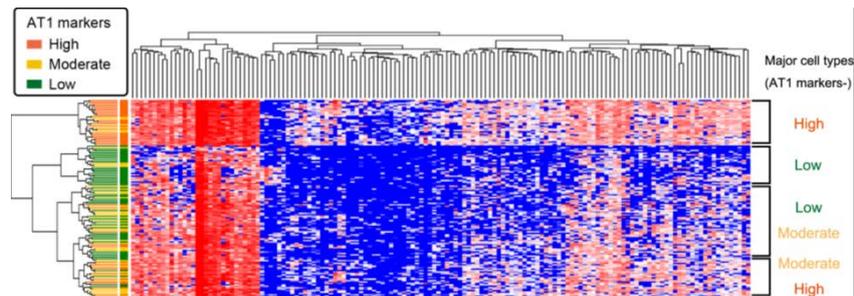


図 2 : 遺伝子発現パターンによって iPS 由来Ⅱ型肺胞上皮細胞をグループ化した図。縦軸が 1 個ずつの細胞、横軸が遺伝子。赤～青の表示は、遺伝子発現量の多さを示す(赤くなるほど多い)。

3. 長期培養したヒト iPS 細胞由来Ⅱ型肺胞上皮細胞から肺胞オルガノイドを作り、薬剤肺毒性試験を可能に
 薬剤の中には肺炎を起こすものもあります。そこで、今回開発した技術を薬剤肺毒性試験に応用出来ないかと考えました。薬剤性肺炎を引き起こすことが知られているアミオダロン⁵という薬剤やサルへの投与でⅡ型肺胞上皮細胞に異常が報告されていた GNE7915⁶という化合物を肺胞オルガノイドに投与し、変化を解析しました。その結果、これらの薬剤によってⅡ型肺胞上皮細胞にあるラメラ体という肺サーファクタントを貯留する構造が大きく膨らむことが確認できました。これは実際に報告されている症状と一致しています。(図 3)。

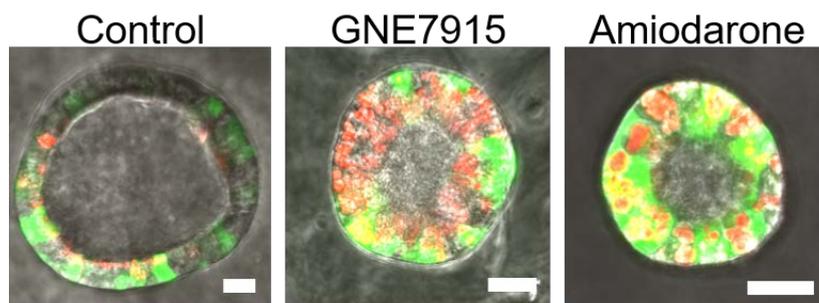


図 3 : 薬剤投与を行ったあと、iPS 由来Ⅱ型肺胞上皮細胞を細胞が生きている状態で撮影したオルガノイド。薬剤投与後のもの(中・右)では投与していないもの(左)に比べて赤色に蛍光する色素で標識されたラメラ体という構造物が異常に大きくなり増えている。

3. 波及効果、今後の予定

今回の研究成果により、ヒト iPS 細胞からⅡ型肺胞上皮細胞を効率よく作成して長期培養が可能になり、その過程を 1 細胞レベルで解析できたことは重要な進歩と考えられます。そして、従来困難だったヒト由来Ⅱ型

⁵ 不整脈治療に使用される薬剤。

⁶ 一部の家族性パーキンソン病に見られる異常蛋白質を標的として開発された低分子化合物。

肺胞上皮細胞を用いた薬剤の肺毒性試験が可能になり、ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導技術の応用の一例を示すこともできました。再生医療に向けては、現時点ではまだまだ多くの課題が残されており、より純度や品質の高い細胞を作成できる方法を更に開発していく必要があります。しかし、今回の成果により難治性肺疾患の病態解明や、より多くの細胞を必要とする新薬の開発といった応用研究にもヒト iPS 細胞由来 II 型肺胞上皮細胞の有用性が期待され、私たちはこれらの技術を将来の医療に役立て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。

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・橋渡し研究加速ネットワークプログラム、
日本学術振興会 科学研究費補助金、かなえ医薬振興財団、武田科学振興財団、第一三共株式会社

<論文タイトルと著者>

タイトル : Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids

著者 : Yuki Yamamoto, Shimpei Gotoh, Yohei Korogi, Masahide Seki, Satoshi Konishi, Satoshi Ikeo,
Naoyuki Sone, Tadao Nagasaki, Hisako Matsumoto, Shigeo Muro, Isao Ito, Toyohiro Hirai,
Takashi Kohno, Yutaka Suzuki, Michiaki Mishima

掲載誌 : *Nature Methods*