

81. ヒト iPS 細胞を用いた呼吸器難治疾患モデリング

三嶋 理晃

*京都大学 大学院医学研究科 呼吸器内科学講座

Key words : iPS 細胞, 肺気腫, 肺線維症, 気道上皮細胞, 肺胞上皮細胞

緒言

慢性閉塞性肺疾患や特発性肺線維症などの呼吸器疾患は、進行すると肺移植以外に根治療法のない重篤な難病である。ヒト由来の II 型肺胞上皮細胞をはじめとする呼吸器上皮細胞は、肺は再生能力が極めて乏しく、臨床検体からの単離や培養も難しいことから研究が遅れてきた。ヒト iPS 細胞は無限増殖能と分化多能性を有しており、効率よく呼吸器上皮細胞に分化させる方法が確立すれば、様々な研究に役立つことが期待される。我々はヒト iPS 細胞を発生学的に定義される段階を経て、II 型肺胞上皮細胞だけでなく、気道繊毛上皮細胞をはじめとする種々の気道上皮細胞に分化させる方法を開発することができた。病態機序の解明に応用するため、ヘルマンスキー・パドラック症候群 (HPS) に注目した。HPS は II 型肺胞上皮細胞の異常により肺気腫や肺線維症を来たすことのある疾患で、私たちは肺線維症を来たした HPS2 (AP3B1) に変異のある患者から iPS 細胞を樹立した。その iPS 細胞を II 型肺胞上皮細胞に分化させたところ、細胞内顆粒の異常な分布を認め、細胞内小胞輸送に異常を来たしていることが分かり、病態の初期変化を再現できたと考えている。

方法および結果

1. 気道上皮細胞への分化誘導法

これまでの私たちの研究成果¹⁾に基づき、ヒト iPS 細胞から 14 日間かけて段階的に内胚葉、前方前腸を経て肺の原基に相当する NKX2.1 陽性の腹側前方前腸細胞を誘導した。その後、Carboxypeptidase M (CPM) を表面抗原として間接磁気標識し、Magnet-Activated Cell Sorting (MACS) により腹側前方前腸細胞を単離し、マトリゲル TM 基底膜マトリックスと細胞懸濁液を混ぜることにより、三次元培養 (図 1) を行った。Y-27632、CHIR99021、FGF10 を添加することで、14 日間かけてスフェロイド構造が形成され (Day 28)、さらに 14 日間かけて (Day 42)、市販の培地に Y-27632 を加えて培養したところ、気道上皮細胞を構成する 5 種類の細胞、すなわち、気道繊毛上皮細胞、クラブ細胞、基底上皮細胞、粘液産生細胞、気道神経内分泌細胞に分化することが証明できた (図 2)。また、気道繊毛上皮細胞については、Day 42 で細胞を分離後、平面に播きなおすことで、機能評価が可能となり、生体内と同様の繊毛振動数を持つこと、繊毛運動によって粘液を輸送する能力をもつことが証明できた²⁾。

*現所属：大阪府済生会野江病院

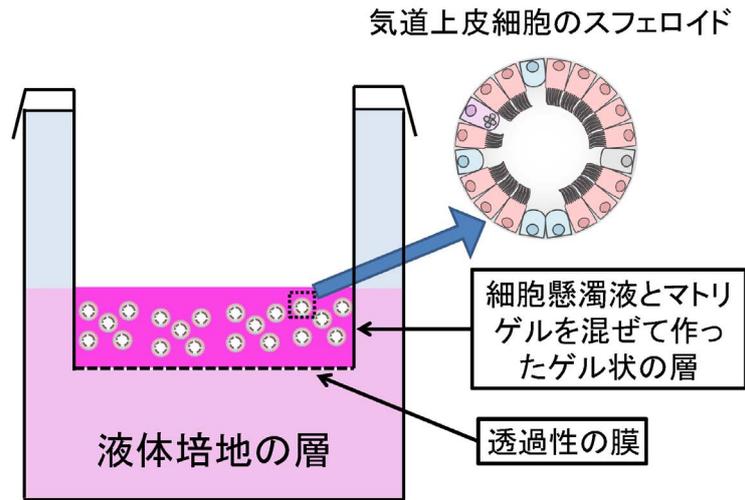


図1. 気道上皮細胞を分化させるための三次元培養の模式図

未分化なヒト iPS 細胞を 14 日間かけて段階的に内胚葉、前方前腸、腹側前方前腸細胞に分化させ、CPM+細胞を単離後、気道上皮細胞に分化させるための三次元培養を行った。

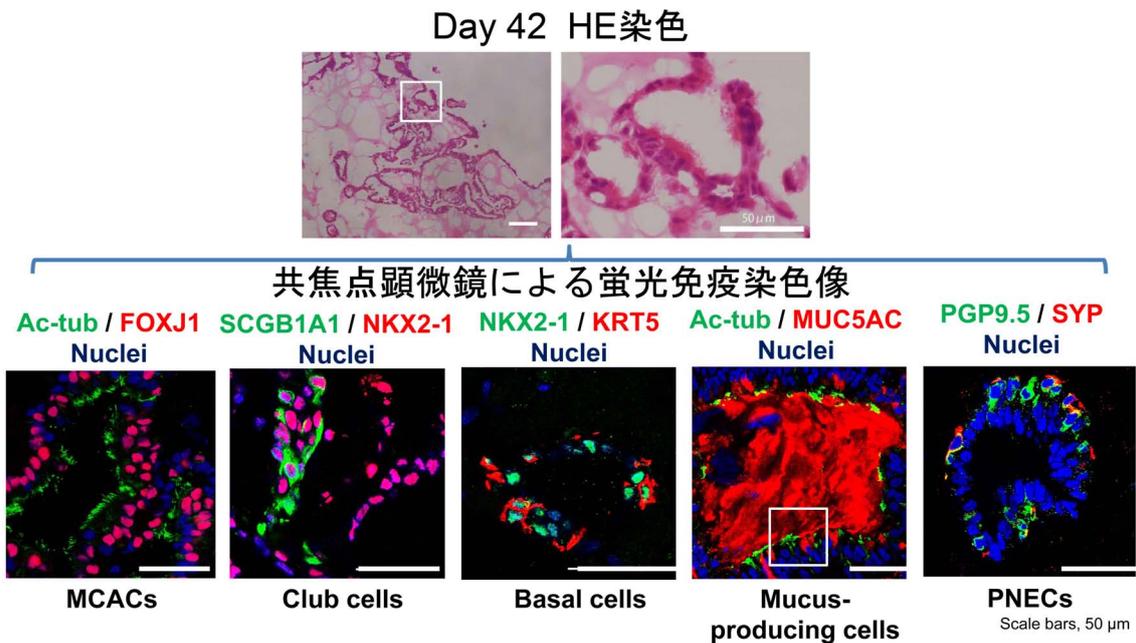


図2. ヒト iPS 細胞から分化させた気道上皮細胞

CPM+腹側前方前腸細胞を三次元培養で分化させると気道上皮細胞を構成する 5 種類の細胞、すなわち、気道繊毛上皮細胞、クラブ細胞、基底上皮細胞、粘液産生細胞、気道神経内分泌細胞への分化が確認できた。

2. ヘルマンスキー・パドラック症候群の患者由来 iPS 細胞の樹立

ヘルマンスキー・パドラック症候群の患者由来の皮膚線維芽細胞については米国 Coriell Institute for Medical Research から入手した (GM17890)。ヒト iPS 細胞の樹立については OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA を発現させるエピソーマルベクター³⁾を用いてエレクトロポレーションにより遺伝子導入を行って樹立した。樹立した iPS 細胞は、STO フィーダー細胞の中で正常な形態のコロニーを形成し、皮膚線維芽細胞で報告されたのと

同じ変異を有することが確認できた。核型は正常であり、アルカリホスファターゼ（ALP）活性を持ち、未分化マーカーである SSEA4、TRA-1-60、NANOG、OCT3/4、SOX2 を発現することが確認できた。SCID マウスの精巣に移植したところ、奇形腫を形成し、三胚葉に分化することも確認できた（図 3）。

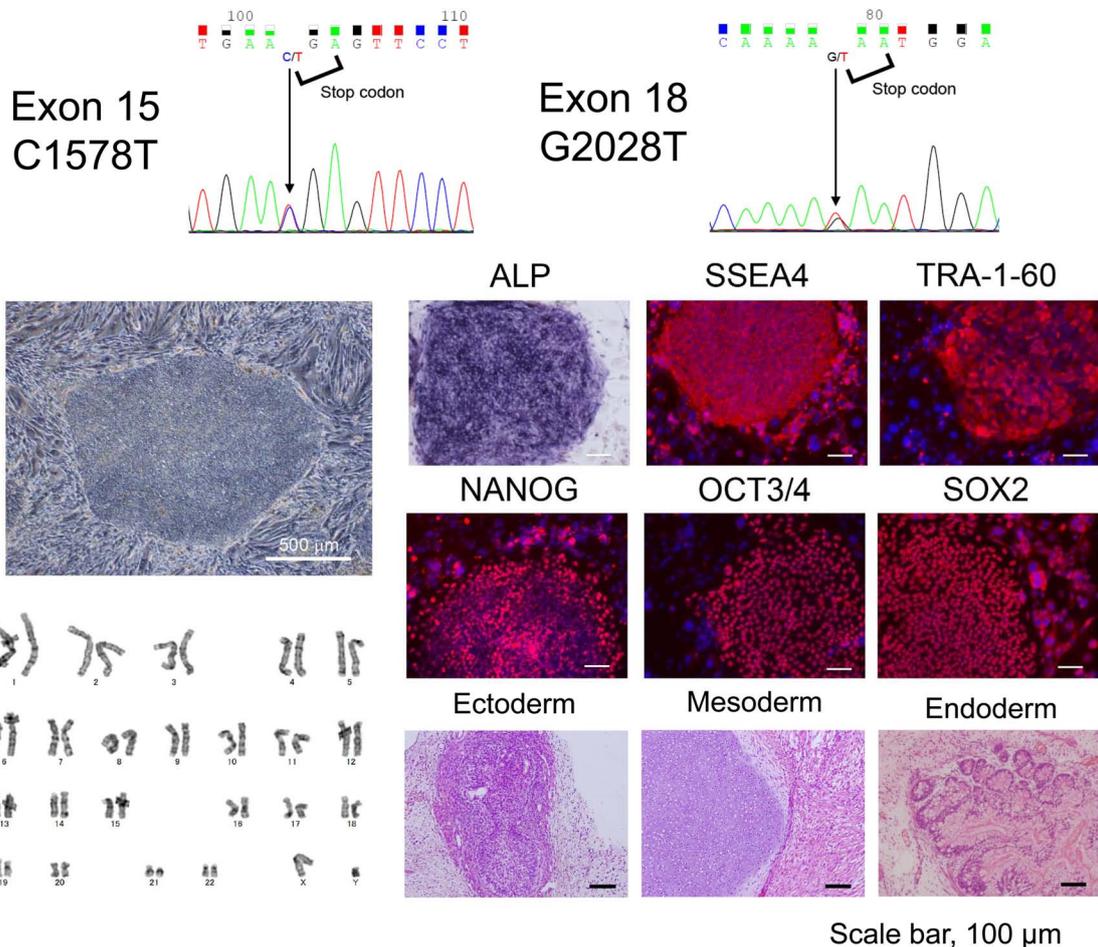


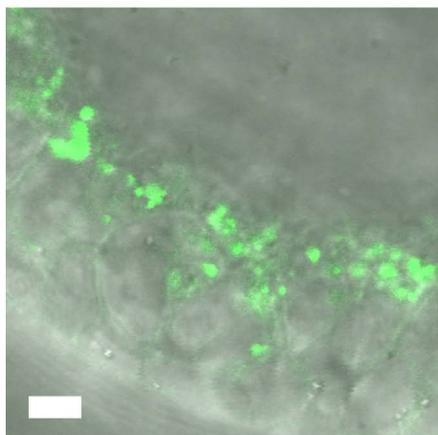
図 3. HPS2 (AP3B1) 遺伝子変異のあるヘルマンスキー・パドラック症候群患者由来の皮膚線維芽細胞 GM17890 (Coriell Institute for Medical Research) から樹立された iPS 細胞株

患者由来 iPS 細胞では遺伝子変異により HPS2 遺伝子の各アレルで stop codon が生じている。樹立された iPS 細胞は正常な形のコロニーを形成し、正常な核型を呈していた。また、ALP 活性、各種未分化マーカーが陽性であり、三胚葉への分化能も確認できた。

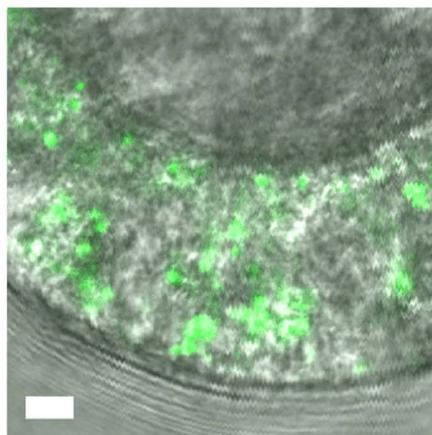
3. ヘルマンスキー・パドラック症候群の患者由来 iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞への分化誘導

未分化状態のヒト iPS 細胞から効率よく II 型肺胞上皮細胞に分化させるプロトコルについてはこれまでの研究¹⁾に基づき、改良を進めることが出来た。そこで新しいプロトコルを用いて、段階的に II 型肺胞上皮細胞を誘導した。II 型肺胞上皮細胞には、特徴的な細胞内小器官としてサーファクタントを貯留するためのラメラボディがあり、細胞のライソソームを生きのまま標識できる LysoTracker™ を用いて染色できることが知られている⁴⁾。ヘルマンスキー・パドラック症候群の患者由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞からそれぞれ分化させた II 型肺胞上皮細胞を LysoTracker™ で染色したところ、ラメラボディと考えられる顆粒状の細胞内小器官の分布が健常者では管腔側（アピカル側）に局在しているのに対して、ヘルマンスキー・パドラック症候群患者では管腔側（アピカル側）だけでなく、基底膜側にまで広く分布していることが確認できた（図 4）。

健常者由来iPS細胞(604A1)から
分化させたII型肺胞上皮細胞



HPS2(AP3B1)に変異有する
ヘルマンズキー・パドラック
症候群患者由来iPS細胞から
分化させたII型肺胞上皮細胞



Scale bar, 5 μ m

図4. ヒト iPS 細胞から分化させた II 型肺胞上皮細胞のスフェロイドに対して LysoTracker™ で細胞内小器官を標識した

顆粒状の細胞内小器官は健常者由来の II 型肺胞上皮細胞では管腔側（アピカル側）に局在したが、ヘルマンズキー・パドラック症候群患者由来の II 型肺胞上皮細胞では管腔側（アピカル側）だけでなく、基底膜側にまで広く分布していた。

考 察

ヒト iPS 細胞を用いた呼吸器難治疾患モデルは、疾患の原因細胞となっていることの多い呼吸器上皮細胞への分化誘導法が確立したことで新しい時代を迎えることができたと考えられる。本報告では呼吸器難治疾患モデルの一例として、ヘルマンズキー・パドラック症候群患者の例を挙げたが、気道上皮細胞への分化誘導法の応用も合わせると、本研究成果は今後、原発性繊毛機能不全症や嚢胞性線維症の疾患モデリングなど、様々な呼吸器疾患研究に役立つことが期待される。今後は iPS 細胞を用いた人工気管の開発や肺胞の組織再生治療といった再生医療についても将来性を期待したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は京都大学医学部附属病院呼吸器内科の室繁郎、伊藤功朗、後藤慎平である。健常者由来のヒト iPS 細胞（201B7、604A1）株の分与、iPS 細胞の樹立方法、分化誘導法の開発に当たっては京都大学 iPS 細胞研究所の長船健二博士、浅香勲博士、山中伸弥博士、沖田圭介博士、繊毛運動の機能評価については大阪大学生命機能研究科／医学系研究科の月田早智子博士にご協力をいただいた。共焦点顕微鏡は京都大学医学研究支援センターにご協力いただいた。最後に、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Gotoh S, Ito I, Nagasaki T, Yamamoto Y, Konishi S, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Funato M, Mae S, Toyoda T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Osafune K, Mishima M. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014; 3: 394-403. doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.005. PubMed PMID: 25241738.
- 2) Konishi S, Gotoh S, Tateishi K, Yamamoto Y, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Ito I, Tsukita S, Mishima M. Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2016; 6: 18-25. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.010. PubMed PMID: 26724905.

- 3) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011; 8: 409-412. doi: 10.1038/nmeth.1591. PubMed PMID: 21460823.
- 4) Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, Völkl H, Dietl P. Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 1579-1584. PubMed PMID: 9465058.