

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 周 啓亮
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第624号
学位授与の日付 平成27年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Differentiation of Mouse induced Pluripotent Stem Cells into Alveolar Epithelial Cells *In Vitro* for Use *In Vivo*
(生体での使用を目的としたマウス iPS 細胞における肺胞上皮細胞へのインビトロ分化誘導)
論文審査委員 主査 教授 中田 光
副査 教授 西條 康夫
副査 教授 窪田 正幸

博士論文の要旨

背景：急性肺損傷、特発性肺線維化及び慢性閉塞性肺疾患などの肺疾患の進行期において、現在の治療は疾患状態を安定化させるか、疾患の進行を遅らせることしかできない。肺移植はこれらの進行期肺疾患における最善の選択であるが、ドーナ臓器の不足が深刻の問題である。

組織工学、再生医療は、新たな機能の細胞または組織で損傷された細胞または組織を再生させる新たな学際的分野である。末期肺疾患の再生医療における最初のステップは、肺胞 I 型上皮細胞 (AEC I) と肺胞 II 型上皮細胞 (AECII) の作成である。

胚性幹細胞 (ESC) は *in vitro* で肺胞上皮細胞に分化させることができるが、免疫拒絶および倫理的問題があり臨床応用が困難である。体細胞に4個の遺伝子を組み込むことにより、ES細胞と同様な多分化能を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) が作製され、ES細胞の問題を克服することができた。最近、iPS細胞から AEC II 様細胞への *in vitro* での分化が報告されている。

目的：本研究では、iPS細胞から *in vitro* において、より効率的に肺胞上皮細胞への分化誘導を試みる。さらに肺胞上皮細胞へ分化誘導した iPS細胞の3次元の肺組織再構築能力や急性肺損傷を修復する能力を検討する。

方法：申請者らはまず既報のES細胞の分化プロトコルを改良して、*in vitro* において iPS細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導を試みた。分化培地に Activin A (20ng/ml) と Wnt3A (10ng/ml) を加え、内胚葉へ分化させる。内胚葉マーカーの発現レベルは Real-time PCR と免疫蛍光染色で解析した。培養開始7日目より、SABM培地に FGF (50ng/ml) を加えて、肺胞上皮細胞へ分化誘導する。肺胞上皮細胞マーカーの発現レベルは Real-time PCR、免疫蛍光染色及びフローサイトメトリーで、肺胞上皮細胞の細胞小器官レベルの特異的な構造は透過型電子顕微鏡で確認した。次に、細胞を除去した肺無細胞構造物 (肺スキヤフォールド) を作って、分化誘導細胞を肺スキヤフォールドの気管内から移植し、培養を行い、免疫組織化学染色と免疫組織蛍光染色で3次元肺組織再構築能力を検討した。更に、分化誘導した細胞をブレオマイシン (BLM)

誘導肺損傷モデルマウスに気管内移植し、肺組織の修復機能を検討した。移植細胞追跡のため、PKH26 染色が行われ、移植後 12 日に肺胞上皮マーカー (SPC、T1 α) の発現を免疫組織蛍光染色で確認した。炎症抑制効果は肺湿/乾比、肺胞洗浄液における細胞成分解析 (Diff-Quik 染色) 及び炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) の ELISA 解析で検討した。コラーゲン沈着はシリウスレッド/ファストグリーン染色及びヒドロキシプロリン定量で解析した。

結果：1. 既報の ES 細胞の分化プロトコールを改良し、in vitro で iPS 細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導を mRNA レベル、タンパクレベル、細胞小器官レベルで確認された。FCM で定量解析したところ 9.3 \pm 3.3% の SPC 陽性 AECII が得られた。

2. 肺スキヤフォールドに移植した分化誘導 iPS 細胞は肺胞上皮マーカー SPC 及び T1 α を強く発現し、より正常な肺組織に近い肺胞構造を作り出し、3 次元の肺再構築能を示した。再構築された肺胞組織に in vitro 分化より高い割合の SPC 陽性 AECII (13.46 \pm 5.59% VS 9.3 \pm 3.3%) が確認された。

3. In vivo において、分化誘導した iPS 細胞 (PKH26 陽性) を BLM 誘導肺損傷モデルマウスに気管内移植したところ、SPC+/PKH26+、T1 α +PKH26+細胞が確認された。

4. BLM 誘導肺損傷モデルマウスにおいて、分化誘導した iPS 細胞の気管内移植により、SPC 陽性 AECII が有意に回復された (6.6 \pm 3.1% vs 12.1 \pm 3.3%, P<0.05)。

5. 分化誘導した iPS 細胞の移植により、BLM 誘導肺損傷モデルマウス肺の湿/乾比の減少、炎症細胞の浸潤の改善、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) 分泌の低下が確認された。

6. BLM 誘導肺損傷モデルマウスにおいて、分化誘導した iPS 細胞の気管内移植により、肺組織へのコラーゲン沈着が低下し、肺線維化の改善を示した。

考察：幹細胞療法は、重度の急性および慢性の肺損傷を再生させることが期待されている。間葉系幹細胞による肺損傷修復能が報告されているが、in vivo での肺胞上皮細胞への分化の証明はされていない。最近、ES 細胞から肺胞上皮細胞への分化誘導が報告されたが、免疫拒絶および倫理的な問題より臨床応用は著しく困難である。

今回、申請者らは既報の ES 細胞の分化プロトコールを改良し、in vitro で iPS 細胞から肺胞上皮細胞へ分化誘導することに成功した。これら分化した細胞が 3 次元の肺組織再構築能力を有することを確認された。幹細胞での肺損傷修復においては、損傷した肺胞構造に移植細胞が生着して肺胞上皮細胞へと分化した以外に、多様なパラクラインメカニズムの介在が考えられる。本研究では、9%前後の SPC 陽性 AECII しか分化されていないが、急性肺損傷マウスにおける肺損傷を修復する能力を示し、一部は炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) の発現を抑制することが介在していることが証明された。

本研究では、はじめて分化誘導した mouse iPS 細胞における 3 次元の肺組織再構築能力、BLM 誘発急性肺損傷を修復する能力を示した。しかし、低い分化効率や未分化細胞の存在が問題となり、臨床への応用はまだ不適切である。最近分化過程に TGF β 、BMP、FGF シグナリングの調節や分化した細胞にソーティング策略の使用などにより、より質の高い幹細胞治療前景を見せている。

審査結果の要旨

申請者は、iPS 細胞から in vitro において、より効率的に肺胞上皮細胞への分化誘導を試み、さらに肺胞上皮細胞へ分化誘導した iPS 細胞の 3 次元の肺組織再構築能力や急性肺損傷を修復する能力を検討した。様々な因子を加え培養することにより、肺胞上皮細胞へ分化誘導し、細胞を除去した肺無細胞構造物 (肺スキヤフォールド) へこの細胞を気管内から移植培養を行い、3 次元肺組織再構築能力を検討した。更に、

分化誘導した細胞をブレオマイシン (BLM) 誘導肺損傷モデルマウスに気管内移植し、肺組織の修復機能を検討した。In vivoにおいて、分化誘導した iPS 細胞 (PKH26 陽性) を BLM 誘導肺損傷モデルマウスに気管内移植したところ、SPC+/PKH26+、T1a+/PKH26+細胞が確認された。

BLM 誘導肺損傷モデルマウスにおいて、分化誘導した iPS 細胞の気管内移植により、SPC 陽性 AECII が有意に回復された ($6.6 \pm 3.1\%$ vs $12.1 \pm 3.3\%$, $P < 0.05$)。また、分化誘導した iPS 細胞の移植により、BLM 誘導肺損傷モデルマウス肺の湿/乾比の減少、炎症細胞の浸潤の改善、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) 分泌の低下が確認された。BLM 誘導肺損傷モデルマウスにおいて、分化誘導した iPS 細胞の気管内移植により、肺組織へのコラーゲン沈着が低下し、肺線維化の改善を示した。以上のことから、申請者は、分化誘導した mouse iPS 細胞における 3 次元の肺組織再構築能力、BLM 誘発急性肺損傷を修復する能力を示した。学位論文として相応しい内容であり、その価値を認めるものである。