

## 要 旨

肺に不可逆的な障害を来たす難治性呼吸器疾患の克服は、人口の高齢化を背景として重要な課題となっており、新しい治療手段につながる再生医療や創薬が期待されている。臓器の再構築は究極の目標であるが、肺は気道と肺胞の大きく2領域に分かれており、上皮細胞だけでなく、血液細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞種が一定の規則性をもって複雑に配置された構造を取っていて肺全体を作り出すことは未だ容易ではない。しかし、近年は呼吸器における幹細胞研究が急速に進み、ヒト多能性幹細胞も肺への分化制御が可能になりつつある。

ヒト多能性幹細胞を用いた呼吸器細胞への分化研究において、発生学的な段階を培養皿内で再現していくことが合理的な方法と十分理解されるようになったのは2005年以降で、iPS細胞樹立の報告以降に本格的に取り組まれるようになった。しかし、肺への分化研究は呼吸器発生のプロセス自体がまだ十分に解明されていなかったことも背景にあったため遅れ、2011年に内胚葉の段階からTGFβとBMPのシグナル経路を同時に阻害することにより、発生学的に定義される「前方前腸化」が促進されることが報告された。その後、発表者らによってBMP、WNT、レチノイン酸を濃度調整して同時刺激すると「腹側化」が促進され、さらに細胞表面抗原Carboxypeptidase M (CPM)を用いれば、気道や肺胞に分化する前段階の肺の芽に該当するNKX2.1<sup>+</sup>細胞を単離できることが示された<sup>1)</sup>。これにより、細胞株間で異なる分化効率であっても、NKX2.1<sup>+</sup>細胞の段階で純度の高い均一化された状態を作り出すことができ、その後の効率よい分化誘導が可能となった。また、ゲル状基質内で三次元構造を形成しながら培養するオルガノイド培養により、生体内に近い機能をもった気道<sup>2)</sup>や肺胞上皮細胞<sup>3)</sup>を分化誘導させる方法が開発された(図1)。さらに肺胞の組織幹細胞であるII型肺胞上皮細胞は従来より培養維持が困難とされていたが、iPS細胞由来のII型肺胞上皮細胞については肺線維芽細胞と共培養するオルガノイド培養を繰り返すことによって、1年にわたる長期培養も可能となった(図2)<sup>3)</sup>。これらの成果は、II型肺胞上皮細胞の異常から肺線維症を来たすと考えられているHermansky-Pudlak症候群(HPS2)の患者特異的iPS細胞を用いた細胞病態の再現にも応用され、ゲノム編集により遺伝子修復したiPS細胞を用意してそれぞれを肺胞オルガノイドに分化させ、肺サーファクタントの分泌能を調べたところ、疾患特異的iPS細胞では肺サーファクタントの分泌能が障害されていることが証明された(図3)<sup>4)</sup>。一方、気道上皮細胞についてはオルガノイド培養による分化誘導で、肺線維芽細胞との共培養なしに、粘液線毛輸送能を持った気道上皮細胞に効率よく分化誘導することが可能となった(図4)<sup>2)</sup>。発表者らはこの方法を

用いて遺伝性の気道疾患モデリングにも取り組んでいる。線毛機能不全症候群は線毛運動に関与する遺伝子異常により、気道上皮細胞の重要な機能である粘液纖毛クリアランス能が損なわれて肺炎を繰り返すことで慢性的に肺機能が低下していく疾患である。40以上の原因遺伝子が報告されており、変異箇所も多様なため、電子顕微鏡などを組み合わせても診断できないケースが多い。患者由来のiPS細胞を用いれば、従来では因果関係の証明が困難だった遺伝子変異でも、変異を修復した細胞との比較が可能となり、病態を繰り返し再現もできるため、将来的な治療手段の開発にも有用に違いないと考えている。

以上の進捗を踏まえ、ヒトiPS細胞を用いた肺オルガノイド研究は今後、呼吸器の創薬や臓器再生を進めるための新しい技術の一つとして十分期待できる状況に至ったと考えている。

#### 参 考 文 献 (\*Corresponding author)

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 Rep.* 2014; 3: 394-403.
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 Rep.* 2016; 6: 18-25.
3. Yamamoto Y, Gotoh S\*, Korogi Y, Seki M, Konishi S, Ikeo S, Sone N, Nagasaki T, Matsumoto H, Muro S, Ito I, Hirai T, Kohno T, Suzuki Y, Mishima M. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods.* 2017; 14: 1097-1106.
4. Korogi Y, Gotoh S\*, Ikeo S, Yamamoto Y, Sone N, Tamai K, Konishi S, Nagasaki T, Matsumoto H, Ito I, Chen-Yoshikawa TF, Date H, Hagiwara M, Asaka I, Hotta A, Mishima M, Hirai T. In vitro disease modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome type 2 using human induced pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Stem Cell Rep.* 2019; 12: 431-440.

図 1. ヒト多能性幹細胞から気道・肺胞上皮細胞への分化誘導法

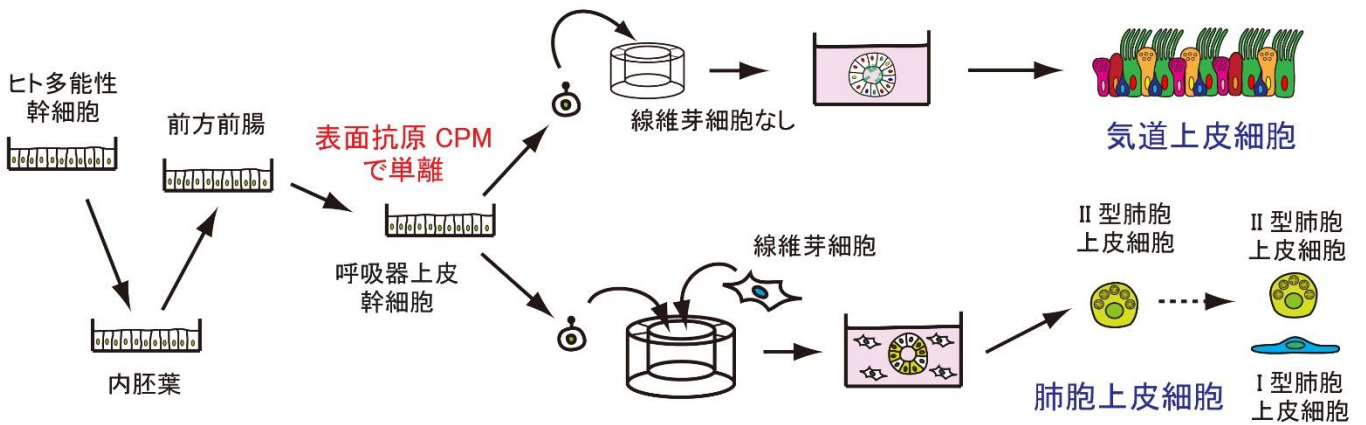


図 2. ヒト iPS 細胞由来の II 型肺胞上皮細胞

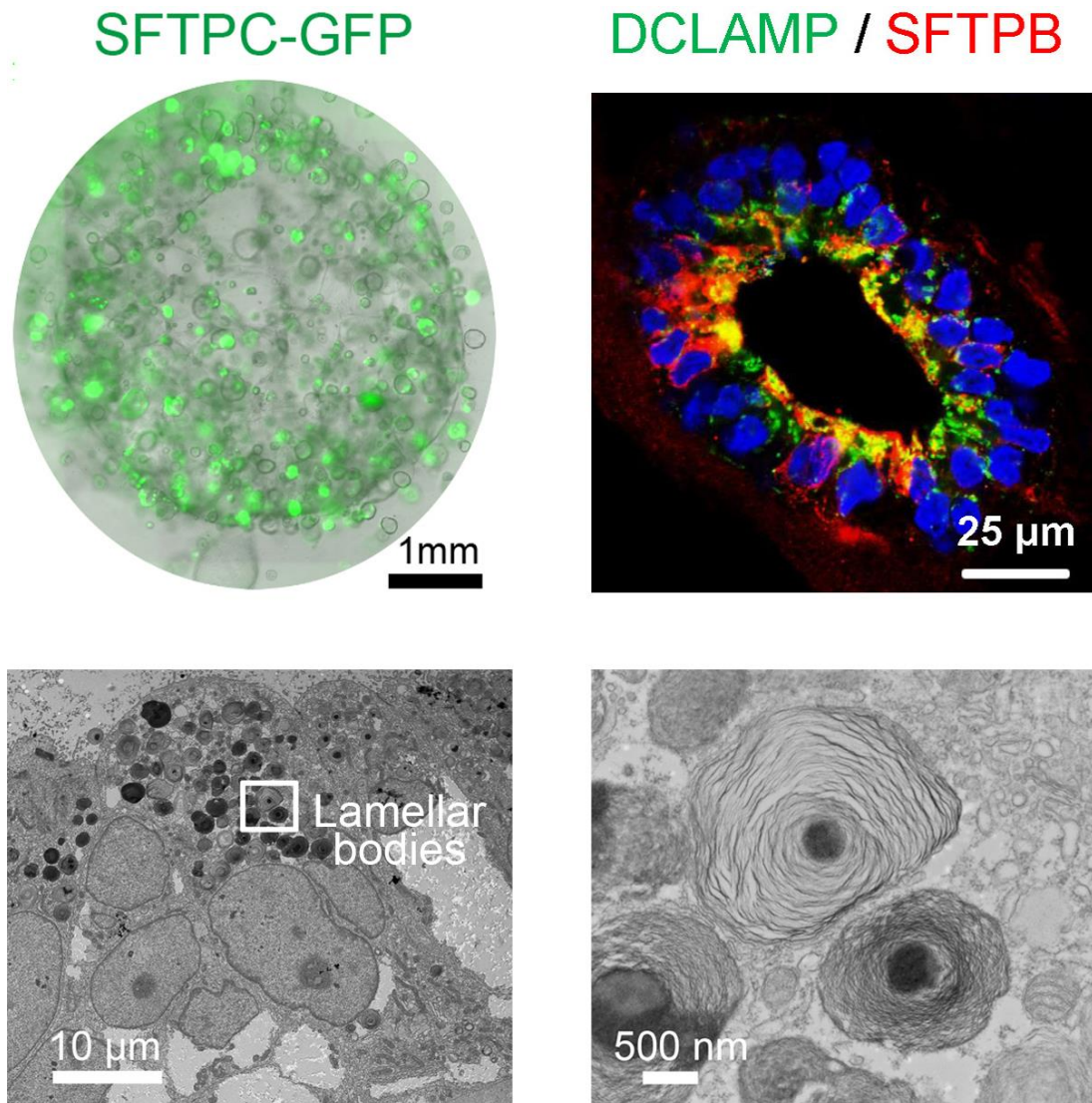


図 3. HPS2 疾患特異的 iPS 細胞を用いた細胞病態の再現  
 (透過型電子顕微鏡像と分泌刺激後の肺胞上皮細胞)

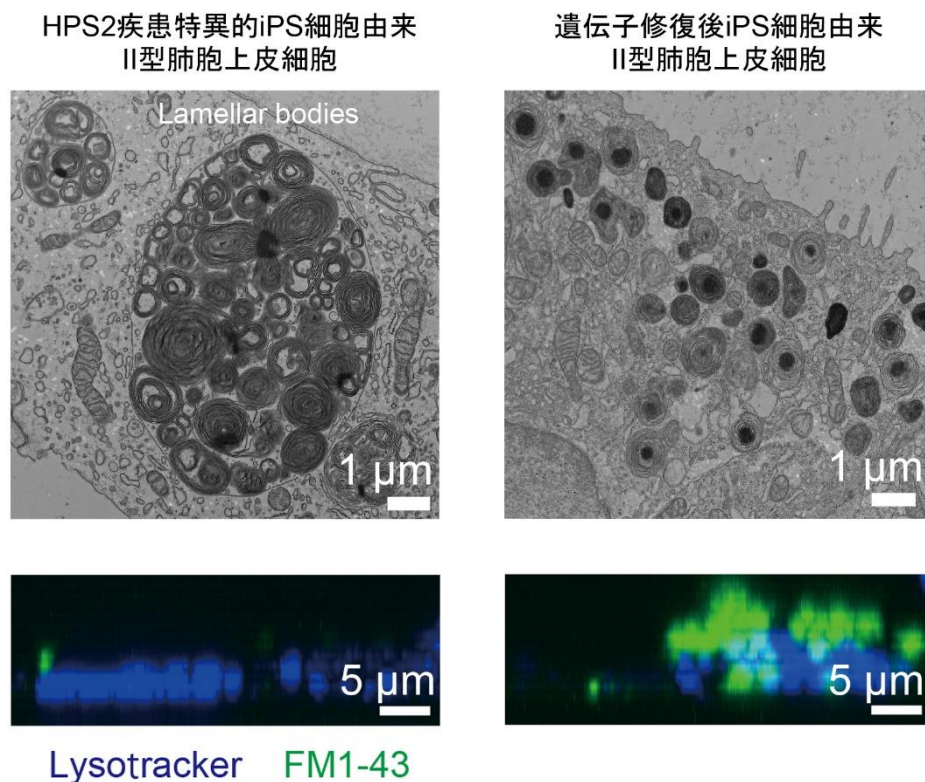


図 4. ヒト iPS 細胞由来の気道線毛上皮細胞

