

京都大学	博士 ( 医 学 )	氏 名	山本 佑樹
論文題目	Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids (オルガノイド形成下におけるヒト iPS 細胞由来肺胞幹細胞の長期培養)		
(論文内容の要旨)			
<p>II型肺胞上皮細胞は肺胞領域における組織幹細胞とされ、自己複製能とI型肺胞上皮細胞への分化能をもつとともに、サーファクタントを分泌して肺の虚脱を防ぐ。難治性呼吸器疾患の病態形成において、II型肺胞上皮細胞の異常との関連が示唆されており、創薬標的としての関心も高い。しかし研究用に得られるヒトII型肺胞上皮細胞は非常に限られており、また培養維持もできず、病態解明や創薬への応用は困難であった。ヒトiPS細胞はII型肺胞上皮細胞の有力な細胞ソースになり得ると考えられ、分化誘導方法の研究が行われてきたが、分化効率が不十分なものが多く、長期培養の報告もなかった。</p> <p>まず、ヒトiPS細胞から発生期肺の初期マーカーであるNKX2-1<sup>+</sup>腹側前方前腸細胞を分化誘導した。この細胞をCHIR99021, FGF10, KGF, DAPTを含む培地で7日間培養(前処理)してからヒト胎児肺線維芽細胞と共培養したところ約50%の効率でII型肺胞上皮細胞の分化マーカーSFTPC<sup>+</sup>の陽性細胞を含む肺胞オルガノイドが形成された。肺胞オルガノイドにはラメラ体と呼ばれるII型肺胞上皮細胞に特徴的な細胞小器官をもつ細胞が観察され、SFTPC<sup>+</sup>細胞における網羅的遺伝子発現解析ではII型肺胞上皮細胞に特徴的な遺伝子群の発現上昇が確認された。“前処理”による前駆細胞の変化とII型肺胞上皮細胞の分化との関連を調べるため、シングルセルRNAシーケンシングを用いて分化誘導過程における遺伝子発現の変化を解析すると、“前処理”によって前駆細胞はよりII型肺胞上皮細胞に近い遺伝子発現パターンに移行することが示された。細胞分化状態の変化を特徴づける遺伝子群には肺胞発生に重要とされる転写因子が含まれていた。さらに、線維芽細胞との共培養なしで肺胞オルガノイドを作成する方法も検討し、CHIR99021とSB431542を添加した培地で前駆細胞を三次元培養することで、SFTPC<sup>+</sup>細胞を約20%の効率で分化誘導できた。</p> <p>次にiPS細胞由来SFTPC<sup>+</sup>細胞を単離し、胎児肺線維芽細胞との共培養下でオルガノイド形成を繰り返し継代すると、3ヶ月以上に渡って長期培養することが出来た。継代を続けた肺胞オルガノイドにはSFTPC<sup>+</sup>細胞が維持される一方、I型肺胞上皮様細胞への分化も確認された。iPS細胞由来SFTPC<sup>+</sup>細胞のトランスクリプトームを成人II型肺胞上皮細胞と比較すると、継代を続けてもII型肺胞上皮細胞に比較的近い遺伝子発現パターンが維持されていた。</p> <p>分化誘導後長期継代したiPS細胞由来SFTPC<sup>+</sup>細胞を電子顕微鏡で観察すると幼若なII型肺胞上皮細胞が含まれ、不均一な細胞集団であると考えられたので、1細胞レベルで遺伝子解析すると、I型肺胞上皮細胞マーカーの共発現の程度により3群に分類された。マウスの肺発生期のデータとの対比により、iPS細胞由来SFTPC<sup>+</sup>細胞にはマウスで終末嚢胞期に出現しI型・II型双方の肺胞上皮細胞への分化能を持つ両能性細胞に対応する細胞群が含まれている可能性が示唆された。</p> <p>最後に、肺胞オルガノイドを薬剤毒性試験に応用した。II型肺胞上皮細胞のラメラ体に形態異常を来すことが知られている2種類の薬剤を肺胞オルガノイドに</p>			

<p>曝露させたところ、生体内で報告されているのと同様の現象が再現され、網羅的遺伝子発現解析で違いを調べることができた。本研究によりiPS細胞由来肺胞幹細胞の効率的な分化誘導法と長期培養法が開発され、薬剤毒性試験への応用も示された。今後、肺実質障害を伴う呼吸器疾患モデリングを通じた創薬や再生医療に役立つ可能性があると考えられる。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>II型肺胞上皮(AT2)細胞は肺胞領域の組織幹細胞であり、その異常は種々の難治性呼吸器疾患の病態形成に関連し、その分化誘導方法の確立は、疾患の病態解析や創薬研究を飛躍させる。申請者は、ヒトiPS細胞からAT2細胞への分化効率を高め、長期培養増殖法を開発することで、安定したAT2細胞ソースの確立を目指した。まず、iPS細胞より段階的に分化誘導したNKX2-1陽性肺前駆細胞は、KGF, FGF, CHIR, DAPTを含む培地で1週間培養することによりAT2細胞への分化効率が上昇すること、またこれらの細胞を三次元共培養下に継代することで肺胞幹細胞性を維持したまま長期間培養できることを示した。次に、GSK3β阻害薬とTGFβ阻害薬とを組み合わせることで培養することにより線維芽細胞なしでAT2細胞へ分化させる方法を開発した。さらに、iPS細胞由来AT2細胞への分化や長期培養の過程の遺伝子発現を1細胞レベルで解析し、分化に重要と考えられる細胞集団が不均一であり、マウス肺発生段階の細胞不均一性を再現していた。最後に薬剤性肺傷害モデルとして、2種類の薬剤を肺胞オルガノイドに曝露させ、異なる機序の薬剤応答性を確認し、iPS細胞を用いた肺毒性試験への応用可能性を示した。</p> <p>以上の研究は、ヒト肺胞上皮細胞の分化・維持機構の解明に貢献し、将来の難治性呼吸器疾患の再生医療や創薬に寄与するところが大きいと期待される。</p> <p>したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成30年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------