

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)

山本 佑樹、後藤 慎平、興梠 陽平、関 真秀、小西 聡史、池尾 聡、曾根 尚之、長崎 忠雄、松本 久子、室 繁郎、伊藤 功朗、平井 豊博、河野 隆志、鈴木 穰、三嶋 理晃

論文要約

【研究背景】

一般に組織幹細胞を安定的に培養するのは難しいとされてきた。しかし近年、臓器類似の三次元構造であるオルガノイド形成下に組織幹細胞を長期培養維持することができるようになり、その制御メカニズムの解明などに貢献している¹⁾。Ⅱ型肺胞上皮細胞は肺胞領域における組織幹細胞（肺胞幹細胞）とされ²⁾、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。慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎、肺癌といった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。しかし研究用に用いることのできるヒトⅡ型肺胞上皮細胞は、採取のために生体侵襲性の高い処置が必要などの理由から非常に限られており、また培養維持するのも困難なため、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³⁾⁻⁹⁾。

【結果】

まず、ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞を経て、発生期肺の初期マーカーである NKX2-1⁺腹側前方前腸細胞を分化誘導した。先行研究では、この段階で Carboxypeptidase M (CPM) という表面抗原を用いて単離した NKX2-1⁺細胞からⅡ型肺胞上皮細胞の分化誘導を試みていたが⁸⁾、本研究においては NKX2-1⁺細胞をよりⅡ型肺胞上皮細胞に分化しやすい状態に変化させる“前処理”をすることでⅡ型肺胞上皮細胞の分化誘導効率を改善できるとの仮説を立てた。種々の培養条件を検討した結果、NKX2-1⁺細胞に古典的 Wnt シグナル伝達経路を活性化させる CHIR99021、FGF10、KGF、そして Notch シグナル伝達経路を抑制する DAPT を添加した培地で 7 日間培養する“前処理”を行った上で、ヒト胎児肺線維芽細胞と共培養したところ 51.2±1.2%の効率でⅡ型肺胞上皮細胞の分化マーカーである SFTPC の陽性細胞を含む肺胞オルガノイドが形成された。透過型電子顕微鏡で観察すると肺胞オルガノイドにはラメラ体と呼ばれるサーファクタントを貯留するⅡ型肺胞上皮細胞に特徴的なライソソーム関連細胞小器官をもつ細胞が認められた。サーファクタントの主成分はフォスファチジルコリンであるが、生細胞イメージングでは蛍光色素標識したフォスファチジルコリンがラメラ体に集積するのが確認された。肺胞オルガノイドの蛍光免疫染色で SFTPA、SFTPB、SFTPD

といったサーファクタント蛋白質や ABCA3、DCLAMP といったラメラ体に局在する蛋白質の発現が認められた。定量的 RT-PCR では、これらのマーカーがヒト iPS 細胞 5 株および ES 細胞株それぞれから形成された肺泡オルガノイドにおいても高発現していることが確認された。また SFTPC⁺細胞を単離してマイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うと、II 型肺泡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 型肺泡上皮細胞の分化との関連を調べるため、シングルセル RNA シークエ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した。1 細胞レベルでのトランスクリプトームについて主成分解析を行うと、“前処理”によって NKX2-1⁺前駆細胞はより II 型肺泡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。この過程における細胞分化状態の変化を特徴づける遺伝子群を抽出し、クラスター解析を行ったところ、肺泡発生に重要とされる ETV5 や CEBPD といった転写因子を含むクラスターが同定され、これらの遺伝子群の II 型肺泡上皮細胞分化における重要性が示唆された。

次に線維芽細胞との共培養なしでも肺泡オルガノイド作成を可能にする方法を検討した。その結果、CHIR99021 および TGF- β シグナル伝達経路を抑制する SB431542 を添加した培地を用いて非接着プレート上で前駆細胞を集塊形成させ、その後マトリゲル包埋下で三次元培養することで、 $23.1 \pm 1.4\%$ の効率で含む SFTPC⁺細胞を含む肺泡オルガノイドが形成された。いずれかの化合物を除いた条件では、分化誘導効率は大幅に低下し、古典的 Wnt 経路活性化と TGF- β 経路抑制の相乗的作用の重要性が示唆された。シングルセル RNA シークエンシングで、線維芽細胞あり、なしそれぞれの手法で分化誘導した SFTPC⁺細胞のトランスクリプトームを成人 II 型肺泡上皮細胞と比較したところ、いずれの方法で分化誘導した SFTPC⁺細胞も成人 II 型肺泡上皮細胞と比較的近い発現プロファイルを持つことが示された。

次に iPS 細胞由来 SFTPC⁺細胞をオルガノイドから単離し、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、SFTPC⁺細胞は 3 ヶ月以上に渡って安定的に増殖し長期培養することが出来た。継代を続けた肺泡オルガノイドには $22.5 \pm 1.2\%$ から $66.0 \pm 4.8\%$ の割合で SFTPC⁺細胞が維持されラメラ体がより成熟した形態を持つのが観察された一方で、SFTPC⁺PDPN⁺AQP5⁺の I 型肺泡上皮様細胞への分化も確認された。5 継代を経た SFTPC⁺細胞では明らかな核型異常は観察されず、増殖は非腫瘍性であることが示唆された。長期培養を経た iPS 細胞由来 SFTPC⁺細胞のトランスクリプトームを CPM^{high} 前駆細胞、iPS 細胞由来気道上皮細胞¹⁰⁾や成人 II 型肺泡上皮細胞と主成分解析、クラスター解析および相関解析を用いて比較したところ、継代を続けても II 型肺泡上皮細胞に比較的近い遺伝子発現パターンを維持し続けていることが分かった。iPS 細胞由来 SFTPC⁺細胞の単離には SFTPC-GFP レポーター細胞を用いてきたが、他細胞株に適用可能な継代方法の開発も必要と考えられた。II 型肺泡上皮細胞のラメラ体がライソソーム関連細胞小器官であり LysoTracker で標識される性質に注目し¹¹⁾、LysoTracker 強陽性細胞を単離してオルガノイド形成下の継代を行うと、複数細胞株において長期培養が可能であった。以上の結果より、

iPS 細胞由来 SFTPC⁺細胞は、オルガノイド形成下に自己複製能および I 型肺胞上皮様細胞への分化能を保ちながら肺胞幹細胞として安定的に長期培養可能であると考えられた。

分化誘導後長期継代した iPS 細胞由来 SFTPC⁺細胞を電子顕微鏡で観察すると形態的に幼若なものから成熟したラメラ体を持つものも含まれ、不均一な細胞集団であると考えられた。また蛍光免疫染色で、I 型肺胞上皮細胞マーカーと II 型肺胞上皮細胞マーカーが共発現する細胞が認められた。シングルセル RNA シークエンシングで、初代、2 継代後および 5 継代後の SFTPC⁺細胞を遺伝子解析したところ、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。3 群を特徴づける遺伝子群を抽出し、クラスター解析を施行すると、異なる遺伝子オントロジーに関連付けされる 3 つの遺伝子セットに分けられ、特に I 型肺胞上皮細胞マーカーを多く含む遺伝子セットが存在することも分かった。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⁺細胞にはマウスで終末囊胞期に出現し 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¹²⁾に対応する細胞群が含まれている可能性が示唆された。以上の結果から、iPS 細胞由来肺胞幹細胞は発生過程の細胞に類似した細胞を含むヘテロな細胞集団であり、ヒトの肺胞上皮細胞の発生過程を解析するための良いモデルであることが示唆された。

最後に、肺胞オルガノイドが薬剤毒性試験に応用が可能かどうかを検討した。種々の薬剤の副作用として肺障害が知られているが、特に生体で 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 GNE7915¹³⁾とアミオダロン¹⁴⁾の 2 種類の薬剤について調べた。肺胞オルガノイドを 2 種類の薬剤に曝露した後、電子顕微鏡で観察したところ、生体内で報告されているのと同様にラメラ体の異常な腫大と増加が観察された。LysoTracker を用いた生細胞イメージングでも LysoTracker 陽性細胞小器官が細胞内に充満しているのが分かり、これらの現象はフローサイトメトリを用いて定量化することが出来た。薬剤曝露後の肺胞オルガノイドから SFTPC⁺細胞を単離して網羅的遺伝子発現を解析すると、それぞれの薬剤投与に影響を受ける遺伝子群を抽出できた。これらの遺伝子群につき遺伝子オントロジー解析を行うと、特にアミオダロン投与により創傷治癒やサイトカイン分泌などの炎症に関連する遺伝子群の変動があることが分かり、生体における薬剤性肺障害の発症と関連している可能性があると考えられた。

【考察】

本研究で開発された方法により、iPS 細胞由来肺胞幹細胞の効率的な分化誘導及び長期培養が可能になった。線維芽細胞を用いずに肺胞オルガノイドを形成する方法も開発できたが、線維芽細胞を用いた肺胞オルガノイドで分化誘導される肺胞幹細胞と遺伝子発現プロファイルに差があることや、線維芽細胞を用いないで長期培養する手法の開発などの課題も残されている。しかし、薬剤毒性試験への応用も可能であることも示され、今後は肺実質性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。

【参考文献】

1. Clevers, H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* **165**, 1586-1597 (2016).
2. Barkauskas, C. E. *et al.* Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* **123**, 3025-3036 (2013).
3. Green, M. D. *et al.* Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 267-272 (2011).
4. Longmire, T. A. *et al.* Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell. Stem Cell.* **10**, 398-411 (2012).
5. Schmeckebier, S. *et al.* Keratinocyte growth factor and dexamethasone plus elevated cAMP levels synergistically support pluripotent stem cell differentiation into alveolar epithelial type II cells. *Tissue Eng. Part A.* **19**, 938-951 (2013).
6. Ghaedi, M. *et al.* Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* **123**, 4950-4962 (2013).
7. Huang, S. X. *et al.* Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 84-91 (2014).
8. Gotoh, S. *et al.* Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **3**, 394-403 (2014).
9. McCauley, K.B. *et al.* Efficient derivation of functional human airway epithelium from pluripotent stem cells via temporal regulation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell.* **20**, 844-857 (2017).
10. Konishi, S. *et al.* Directed induction of functional multi-ciliated cells in proximal airway epithelial spheroids from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **6**, 18-25 (2016).
11. Van der Velden, J. L., Bertoncello, I. & McQualter, J. L. LysoTracker is a marker of differentiated alveolar type II cells. *Respir. Res.* **14**, 123-9921-14-123 (2013).
12. Treutlein, B. *et al.* Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* **509**, 371-375 (2014).
13. Bedrossian, C. W., Warren, C. J., Ohar, J. & Bhan, R. Amiodarone pulmonary toxicity: cytopathology, ultrastructure, and immunocytochemistry. *Ann. Diagn. Pathol.* **1**, 47-56 (1997).
14. Fuji, R. N. *et al.* Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung. *Sci. Transl. Med.* **7**, 273ra15 (2015).