

論 文 内 容 要 旨

題 目 Bronchioalveolar stem cells derived from mouse-induced pluripotent stem cells promote airway epithelium regeneration (マウス iPS 細胞由来の気管支肺胞幹細胞は末梢気道上皮再生を促進する)

著者 Naoya Kawakita, Hiroaki Toba, Keiko Miyoshi, Shinichi Sakamoto, Daisuke Matsumoto, Mika Takashima, Mariko Aoyama, Seiya Inoue, Masami Morimoto, Takeshi Nishino, Hiromitsu Takizawa, Akira Tangoku

令和 2 年 10 月 2 日発行 Stem Cell Research & Therapy 第 11 卷 1 号 430 ページに発表済

内容要旨

【背景】マウス気管支肺胞幹細胞(Bronchioalveolar stem cells : BASCs)は bronchioalveolar-duct junction(BADJ)に存在する細気管支から肺胞領域の幹細胞としての性質を保持しており, 自己複製能および, 線毛細胞, クラブ細胞, I 型・II 型肺胞上皮細胞への分化能を有する局所の幹細胞である. BASCs はクラブ細胞に特徴的なマーカーである club cell secretory protein(CCSP)と surfactant protein C(SPC)を同時に発現する細胞として定義されている. 同領域の上皮細胞が傷害されると, BASCs は自己複製により増殖し, さらに傷害された細胞に分化することで, 細胞修復に寄与している. この知見を踏まえて, 傷害マウスに BASCs を外的に投与すれば修復を促進するのではないかと考えた. しかし, 成体マウスの定常状態において BASCs は 1%未満と非常に少なく, 回収して細胞移植に用いることは難しい. 人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は様々な細胞に分化可能であると考えられているが, BASCs への誘導を示した報告はまだなく, iPS 由来 BASCs の治療的有効性は不明である.

【目的】マウス iPS 細胞から BASCs を誘導することと, 誘導した BASCs を末梢気道上皮傷害マウスに投与することで, その上皮傷害からの回復が促進されるかどうかを評価することを目的とした.

【方法】iPS 細胞から BASCs を誘導する方法は, iPS 細胞から II 型肺胞上皮細胞を誘導する方法を用い, フローサイトメトリー, 免疫蛍光染色, 電子顕微鏡により BASCs の誘導の確認を行った. マウス末梢気道上皮傷害モデルにはナフタレン腹腔内投与モデル(クラブ細胞選択的脱落モデル)を用い, 同マウスに傷

## 様式(8)

害発生後翌日に分化させた iPS 細胞に PKH26 色素を結合させた後に  $1 \times 10^6$  細胞で気管内投与した (iPS 群). その後, 5 日目と 15 日目に投与細胞の生着の確認と, BADC の上皮  $200 \mu\text{m}$  中におけるクラブ細胞数を計測し, 修復の定量的評価とした. 対象群として, ナフタレンの腹腔内投与のみを行う群 (NA 群) と, ナフタレン投与翌日に Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM) を気管内投与する群 (コントロール群) を作成した.

**【結果】** iPS 細胞から BASCs はフローサイトメトリーで約 7% の誘導効率で誘導されていることを確認した. 免疫染色でも CCSP, SPC 共陽性細胞を確認できた. さらに透過型電子顕微鏡では同一細胞内にクラブ細胞に特徴的な構造 (secretory granule) と II 型肺胞上皮細胞に特徴的な構造 (lamellar body, microvilli) を有する細胞が見られ, BASCs の微細構造と考えられた. iPS 群において 5 日目, 15 日目に投与 BASCs が BADC や肺胞腔に生着していることを確認した. BADC におけるクラブ細胞数は, 5 日目では群間に差はなかったが, 15 日目には NA 群  $8.9 \pm 3.3$ , コントロール群  $9.5 \pm 5.6$ , iPS 群  $13.3 \pm 2.8$  と有意に iPS 群でクラブ細胞の修復が促進されていた ( $p=0.013$ ).

**【考察】** マウス iPS 細胞から BASCs が誘導可能であることを示し, BASCs の気管内投与が末梢気道上皮傷害に対し治療的有効性を有する可能性が示唆された. 生着は BADC および肺胞腔にみられており, 修復促進には投与細胞が生着する直接作用および, 投与細胞由来の液性因子や, 内因性因子との相互作用が関与する間接作用も寄与していると考えられた. BASCs は細気管支から肺胞領域の幹細胞であり, 同領域を主座に発生する慢性閉塞性肺疾患や急性肺障害などの疾患に対する細胞治療の可能性も期待される. ヒトには BASCs の存在は示されていない. しかし, ヒトにおいてもクラブ細胞は気道の防御機構を有し, その障害は肺移植後の閉塞性細気管支炎発症に強く関与していることが示唆されている. 本研究結果がヒトにおける細胞治療に貢献する可能性も考えられた.

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1472</b> 号	氏名	河北直也
審査委員	主査 島田光生 副査 西岡安彦 副査 常山幸一		

題目      Bronchioalveolar stem cells derived from mouse-induced pluripotent stem cells promote airway epithelium regeneration  
 (マウス iPS 細胞由来の気管支肺胞幹細胞は末梢気道上皮再生を促進する)

著者      Naoya Kawakita, Hiroaki Toba, Keiko Miyoshi, Shinichi Sakamoto, Daisuke Matsumoto, Mika Takashima, Mariko Aoyama, Seiya Inoue, Masami Morimoto, Takeshi Nishino, Hiromitsu Takizawa, Akira Tangoku  
 令和 2 年 10 月 2 日発行    Stem Cell Research & Therapy 第 11 巻  
 1 号文献番号 430 に発表済み

(主任教授 丹黒 章)

要旨      マウス気管支肺胞幹細胞(bronchioalveolar stem cells: BASCs) は、bronchioalveolar-duct junction (BADJ)に存在する線毛細胞、クラブ細胞、I型・II型肺胞上皮細胞への分化能を有する幹細胞である。BASCs は特徴的なマーカーである club cell secretory protein (CCSP)と surfactant protein C (SPC)を同時に発現し、上皮細胞が傷害されると自己複製し傷害細胞に分化することで修復に寄与する。

申請者らは、マウス iPS 細胞から誘導した BASCs が傷害された末梢気道上皮の再生を促進すると考えた。まず iPS 細胞から II型肺胞上皮細胞を誘導する方法を用いて BASCs への誘導を確

認した。その後、末梢気道上皮傷害モデルとしてナフタレン腹腔内投与モデルを用い、ナフタレンの投与のみを行う NA 群、ナフタレン投与翌日に DMEM を気管内投与するコントロール群および分化させた iPS 細胞を気管内投与する iPS 群を作成した。それらの群において経時的に細胞の生着確認ならびに BADJ 上皮 200 $\mu$ m 中におけるクラブ細胞数を計測し修復を評価した。

得られた結果は以下の通りである。

- 1 iPS 細胞から誘導された BASCs はフローサイトメトリーで約 7% 確認された。免疫染色でも CCSP、SPC 共陽性細胞が確認された。
- 2 透過型電子顕微鏡では同一細胞内にクラブ細胞に特徴的な構造(secretory granule)と II 型肺胞上皮細胞に特徴的な構造(lamellar body と microvilli)を有する細胞が見られ、BASCs の微細構造と考えられた。
- 3 iPS 群において 5 日、15 日目に投与された BASCs が BADJ や肺胞腔に生着していることが確認できた。
- 4 BADJ における 15 日目のクラブ細胞数は、NA 群  $8.9 \pm 3.3$ 、コントロール群  $9.5 \pm 5.6$ 、iPS 群  $13.3 \pm 2.8$  であり、iPS 群でクラブ細胞の修復が有意に促進されていた。

以上の結果から、マウス iPS 細胞から BASCs が誘導可能であり、BASCs の気管内投与が末梢気道上皮傷害に対し治療効果を有することが示唆された。本研究は、細気管支から肺胞領域に発生する慢性閉塞性肺疾患や急性肺傷害などに対する新規細胞治療開発に繋がるものであり、その臨床的意義は大きく学位授与に値すると判定した。