

難治性肺疾患に対する新たな治療法の開発を目指した 直接リプログラミングによる肺再生法の確立

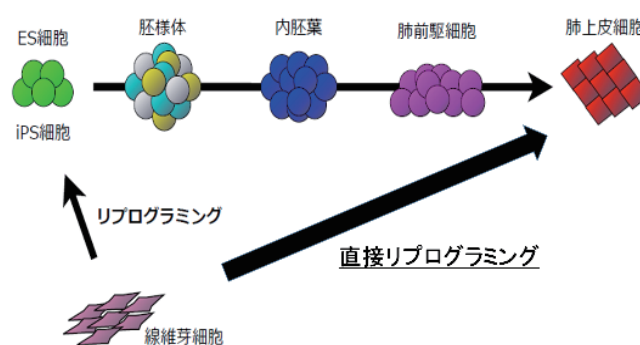
慶應義塾大学医学部 呼吸器内科
専任講師 石井 誠

はじめに

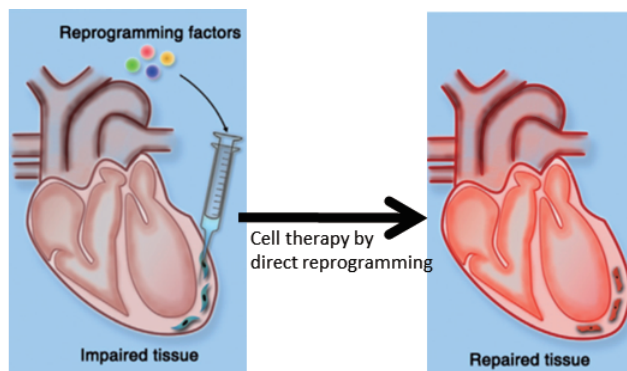
現在の再生医学は、Induced pluripotent stem cell(iPS細胞)やEmbryonic stem cell(ES細胞)のような幹細胞を利用する手法が主流であるが、幹細胞から肺の上皮系細胞(本研究では「肺細胞」と記載する)を得るためには、発生段階をなぞり分化過程の各ステップで種々の増殖因子を添加するなど複雑に培養条件を変化させる必要がある^[1]。肺再生を生体内で実用化するためには、分化誘導過程の簡略化が求められることになる。

幹細胞を用いない新たな再生医療の手法として、近年、直接リプログラミング法が注目を浴びている。これは、分化済みの体細胞(線維芽細胞など)に特異的遺伝子を過剰発現させ、幹細胞を経ずに直接目的の細胞を誘導する手法である(図1)。

本研究の協力者である慶應義塾大学循環器内科 家田真樹特任講師は、特異的3遺伝子を強制発現させることによって、マウス線維芽細胞からin vitroで心筋細胞を直接分化誘導することに成功した^[2]。その後、マウス生体内での直接リプログラミングや^[3]、ヒト心臓の線維芽細胞から心筋細胞への直接リプログラミングの成功を報告した^[4]。しかしながら、肺の上皮系細胞を分化誘導する報告は存在しない^[5]。肺細胞を分化させるために必要な転写因子群



【図1】 直接リプログラミングの概念図



直接リプログラミング法の特徴

- ・幹細胞を経ずに、体細胞(線維芽細胞など)を直接的に他種の細胞へ誘導する方法。
- ・シンプルかつ効率的に目的の細胞を誘導し、生体内での細胞治療や組織工学の材料として活用する。

現状

心筋細胞は、マウス生体内での誘導やヒト線維芽細胞を用いた誘導に成功しているが、肺の細胞を直接リプログラミング法によって誘導した報告は存在しない。

Reprogramming factors for pulmonary cells are unknown.

【図2】 直接リプログラミング法の特徴と現状
(Xu J et al. Cell Stem Cell, 2015 より改変して引用)

が同定されていないことが、大きな原因である。申請者らは後述の予備研究によって肺細胞の分化誘導に重要な複数の転写因子を見出した。その結果を踏まえ、短時間で効率的に、線維芽細胞から肺細胞を分化誘導する方法を開発することを目指している。

近年、線維芽細胞等の体細胞に複数の遺伝子を過剰発現させ、様々な臓器特異的細胞へ分化誘導する直接リプログラミング法が再生医療の手法として注目されている^[5]。しかし、これまで線維芽細胞から肺細胞へ直接分化誘導の成功例は報告されていない。そこで本研究では、直接リプログラミング法によって、線維芽細胞から肺細胞を分化誘導する方法を開発する。臨床応用を意識した、シンプルで効率的な肺細胞誘導法を検討する。

結 果

1. 細胞の分化に重要な転写因子の選定

まず肺の発生に重要とされる14の候補転写因子を選定した。生後2-3日目の仔マウスの尾、あるいはマウス胚より線維芽細胞を培養し（各々、Tail tip fibroblast:TTF、mouse embryonic fibroblasts:MEF）選定した14因子をレトロウイルスで導入し、14因子を過剰発現させたところ、GFP遺伝子のみを導入した線維芽細胞（コントロール）と比べ、導入7日後に、2型肺胞上皮細胞の特異的マーカーであるSP-C（Surfactant protein C, Sftpc）およびクラブ細胞の特異的マーカーであるCCSP（Clara cell secretory protein, Scgb1a1）の遺伝子発現は、SP-C mRNAが2,000倍、CCSP mRNAが300倍の上昇を認めた。さらに14因子のうちから、各因子の組み合わせによる検討により、特に4因子が重要であることを見出した。

2. SP-C GFPトランスジェニックマウスを用いた検討

SPC-GFPトランスジェニックマウス（SP-C発現細胞でGFP蛍光が陽性となるマウス）を用いて、同マウス由来の胚線維芽細胞MEFを用いて検討を行ったところ、プレートでの2次元培養では、4因子導入後、SP-C mRNAの上昇は認めるも、GFP蛍光は認めなかった。そこで、既存の肺上皮細胞の既存の報告^[6]を参考に、4因子導入2日後にマトリゲルを用いた3次元培養に移行し、同時に各種の液性因子の添加を行ったところ、4因子導入14日頃には、GFP蛍光陽性の細胞が散見されるようになり、培養28日では約5%前後のGFP陽性細胞を認める様になった。

さらに、このGFP陽性細胞をFlow cytometryにて単離し、蛍光細胞染色を行ったところ、GFP陽性細胞は、確かにSP-C陽性細胞であることを確認した。

考 察

これまで、線維芽細胞から肺上皮細胞に直接誘導する、いわゆる直接リプログラミングの

報告は一切ない。今回我々は、特異的4因子を同定し、さらに肺上皮細胞培養に有利とされる3次元培養を行うことで、4因子導入により確かにSP-C陽性細胞が誘導されることを世界で初めて見いだした。

現在は各種の培養条件を調整することで、より誘導効率のよい条件を検討している。今後は得られたSP-C陽性細胞の機能解析として、電子顕微鏡による2型肺胞上皮細胞特異的な構造が見られないかの確認を行うことと、誘導されたSP-C陽性細胞のRNA-sequenceによる網羅的遺伝子解析を行い、既存の2型肺胞上皮にどの程度近い細胞であるかの検討も行っていきたい。将来的には、肺線維症マウスでの改善効果の検討や、ヒト線維芽細胞からの誘導など、臨床応用の可能性に関してさらに検討していきたい。

要 約

マウス線維芽細胞から特異的因子の導入することで、SP-C陽性の肺上皮細胞を直接リプログラミングにて得ることにはじめて成功した。今後は将来の臨床応用に向けて検討を進めていきたい。

文 献

1. Gotoh S, Ito I, Nagasaki T *et al.* Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem cell reports* 3:394-403, 2014.
2. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142:375-386, 2010.
3. Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H *et al.* Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circulation research* 111:1147-1156, 2012.
4. Wada R, Muraoka N, Inagawa K *et al.* Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:12667-12672, 2013.
5. Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell stem cell* 16:119-134, 2015.
6. Barkauskas CE, Cbronce MJ, Rackley CR *et al.* Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of clinical investigation* 123:3025-3036, 2013.