

ヒト羊膜上皮細胞を用いた  
II型肺胞上皮細胞への分化誘導  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系呼吸器内科学専攻

野本 正幸

修了年 2024 年

指導教員 権 寧博

## I. 緒言

ヒトの肺は、I型肺胞上皮細胞、II型肺胞上皮細胞という形態的に異なる二つの上皮細胞と組織間隙を埋める肺線維芽細胞などにより構成される。II型肺胞上皮細胞は、サーファクタントを産生することで、肺胞構造の維持、軽度傷害時における前駆細胞、自然免疫等に関わる。II型肺胞上皮細胞の傷害は、感染症、慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎など様々な病気に関与する。特に間質性肺炎の一種である特発性肺線維症は治療方法が確立されていない致死的な疾患である。健全なII型肺胞上皮細胞を移植する治療が提唱<sup>1)</sup>されているが移植に足りうる量の細胞の確保が困難であり実現には至っていない。人工多能性幹(iPS)細胞を用いてII型肺胞上皮細胞を段階的に誘導することが報告<sup>2)-6)</sup>されているが、iPS細胞を始めとした各種の多能性幹細胞の作出には通常多大な時間や労力、費用を要し、十分な細胞数を確保することが難しい。また現状では特定の細胞種に分化誘導を行う方法として、各組織の系統発生の段階を様々な成長因子や小分子化合物によって再現することで行われているが、この方法では体外において均質かつ機能的に成熟した細胞を大量に分化誘導することは困難である。そこで、簡便かつ大量に入手することが可能な多能

性細胞と、その細胞からより容易かつ均質な分化誘導を行う方法の開発が求められている。

ヒト羊膜上皮細胞 (hAECs) は、多能性幹細胞様の分化能を持つ細胞として近年注目を浴びている<sup>7)、8)</sup>。出産後に廃棄される胎盤から安価かつ大量に分離することが可能であり、他の多能性細胞のように複雑なリプログラミング手順を必要とせず、特殊な培養も必要としない。また、造腫瘍性を有さず免疫回避能を持っていることから、hAECs は臨床応用に適した多能性幹細胞として、今後の再生治療への応用が期待されている。本研究では、hAECs に転写因子を導入することで目的の細胞へと直接分化誘導を行うことができるダイレクトリプログラミングにより II 型肺胞上皮細胞の作出を試みた。また分化誘導を行った細胞の特性評価も行なった。

II 型肺胞上皮細胞に分化する上で、転写因子 *NKX2-1* が重要であると報告されている<sup>2)-6)</sup>。*NKX2-1* は肺および甲状腺のマスターレギュレーターであると考えられており、*NKX2-1* 遺伝子の単独導入により II 型肺胞上皮細胞への分化誘導が可能になるのではないかと考え、ダイレクトリプログラミング法<sup>9)</sup>を用いて分化誘導を試みた。また、肺胞上皮細胞への分化の簡便な検出のために、あらかじめ hAEC に II

型肺胞上皮に特異的なマーカーであるサーファクタントタンパク質 C 遺伝子 (*SFTPC*) のプロモーター依存的に GFP (Green Fluorescent Protein) を発現するレポーター遺伝子 (*SFTPC-GFP*) を用いた。これによって細胞から RNA を抽出することなく、GFP の蛍光を指標として II 型肺胞上皮細胞への分化を経時的に検出することを可能とした。

## II. 対象と方法

羊膜から分離した hAEC は STEM-CELLBANKER に懸濁しクライオチューブに 1mL ずつ分注し液体窒素中で保存とした。凍結保存された hAEC を融解後、4 日目に最初の継代を行った。以後 2 日ごとに培地を交換し、14 日目にレンチウイルスベクター (*SFTPC-GFP*) を導入した。その後、16 日目に 2 回目の継代を行ない 18 日目にレンチウイルスベクター (*MX2-1*) に感染させた。その後、分化誘導培地に切り替え 14 日間培養を行い細胞を回収し評価とした。回収した分化誘導細胞は、フローサイトメトリー解析により GFP の発現の評価および分離を行なった。

分離した細胞から RNA を抽出し、逆転写を行って RT-qPCR を用いて mRNA 発現解析を行った。また、タンパク質を抽出し発現の半定量を行なった。さらに、広範な遺伝子の発現の変化を網羅的に確

認するために RNA-sequencing (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を行った。得られた解析結果を NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) から入手した、健常者から採取したヒト II 型肺胞上皮細胞のデータとも比較した。

### III. 結果

hAECs に SFTPC-GFP をあらかじめ導入し、14 日ほど培養してからレンチウイルスベクターを用いて *NKX2-1* を導入したところ、導入後 5 日目で GFP の蛍光が検出され始め、2 週間で GFP 陽性細胞数が頭打ちとなった。*NKX2-1* を導入した細胞がどの程度の割合で GFP を発現し II 型肺胞上皮細胞に分化するかを確認するためにフローサイトメトリーで解析を行ったところ、全細胞の  $10.2 \pm 2.3\%$  (平均  $\pm$  s. e. m,  $n=4$ ) で GFP が陽性であった。GFP 陽性細胞の mRNA の発現を RT-qPCR で確認したところ、*NKX2-1* および *SFTPC* は共にコントロール群と比較し有意に上昇を認めた。加えて、ウエスタンブロッティングによりタンパク質を評価したところ、コントロール群と比較し、*NKX2-1* 導入群で発現していることが確認できた。また、内在性の *NKX2-1* の上昇も見られた。

さらに、その他のⅡ型肺胞上皮の性質を持っているかの評価を含め、広範な遺伝子の発現の変化を網羅的に確認するために RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。RNA-seq のカウントデータから *SFTPC* 以外のサーファクタント関連遺伝子やサーファクタントの分泌に関わる遺伝子群の上昇が見られた。その一方で、甲状腺特異的な遺伝子上昇は認めなかった。また免疫寛容を誘導する *HLA-G* の発現の上昇を認めた。以上の結果から hAEC のⅡ型肺胞上皮細胞への分化が示唆され、同時に hAEC がもつ免疫回避能を保持していることが確認できた。また、*NKX2-1* を導入した群は、GFP の発現に問わずほぼ同じ遺伝子プロファイルを保持しており、*NKX2-1* を誘導した細胞に対してプロサーファクタントプロテイン C で免疫染色を行ったところほぼ全ての細胞で発現を認めた。これにより、レンチウイルスによる実際の *NKX2-1* の誘導効率はフローサイトメトリーで測定した値よりも大幅に高いことが示唆された。本研究で作出した細胞がどの程度健常者から採取したⅡ型肺胞上皮細胞に近づいているかを確認するために NCBI GEO より入手したヒトⅡ型肺胞上皮細胞の RNA-seq データについても同様にマッピングを行い比較した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行ったところサーファクタントの代

謝の遺伝子セットで有意にエンリッチメントスコアの上昇を認めており、ヒトⅡ型肺胞上皮細胞と同様の結果が得られた。

Ⅱ型肺胞上皮細胞の機能を保持しうるか評価するために既報<sup>3)、6)</sup>を参考にして、ダイレクトリプログラミングを行った hAEC の 3 次元培養を行いスフェロイドを形成した。脂質貯蔵を行なうラメラ小体が発現していることがⅡ型肺胞上皮細胞の特徴であることから、肺サーファクタントを含有するラメラ小体形成を機能的Ⅱ型肺胞上皮細胞の指標とした。肺サーファクタントの約 90%は脂質で、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) が主成分であることから、LysoTrackerRed で標識した小胞への GFP 標識ホスファチジルコリンの取り込みを確認し、作出した細胞はラメラ小体を有する機能的Ⅱ型肺胞上皮細胞であることが示唆された。

#### IV. 考察

本研究では、多分化能を持つ hAECs にレンチウイルスベクターで *NKX2-1* を導入することでⅡ型肺胞上皮細胞と同様の遺伝子プロファイルをもつ細胞を作出可能であることを示した。

*NKX2-1* は甲状腺の分化にも関与しているが、今回作出した細胞では甲状腺のマーカー遺伝子として知られる *TPO* といった甲状腺特異的遺伝子の発現は認めなかった。*TPO* は *NKX2-1* の他に、*PAX8* などの転写因子によっても制御されている<sup>10)</sup>。ラットの甲状腺細胞での甲状腺分化の研究で *PAX8* 欠損させると甲状腺分化表現型が失われることが報告されている<sup>11)</sup>。そのため、*NKX2-1* だけでは甲状腺には分化しなかったと思われ、今後、*NKX2-1* に加え、*PAX8* を導入することで甲状腺細胞への分化に応用できる可能性が示唆された。

細胞の個性は主に転写因子群の相互作用によって規定されていることが知られている。それらの中でもマスターレギュレーターと呼ばれる遺伝子群は遺伝子発現制御の頂上に位置し、細胞の運命や分化を決定付ける転写因子である。マスターレギュレーターの中には自身の発現制御をも担うことで、安定的にその細胞の性質を維持させているものも存在する。これまでに *NKX2-1* にそのような性質があることは示されておらず本研究が初めての報告となる。現時点では、どの程度の外因性の *NKX2-1* 遺伝子の発現が分化に必要なのか、また誘導された内因性 *NKX2-1* の発現が十分量かつ長期間持続発現するのかなどの不明点は多々あるが、この性質は本方法の可能性を示

すものと考えられる。本研究ではレンチウイルスを用いて遺伝子を導入したが、レンチウイルスはゲノム上のランダムな位置に遺伝子を挿入するため、持続的な発現が期待できる一方、がん抑制遺伝子上に挿入された場合、がん化の可能性があるため、臨床移植用の細胞作出には適さないと考えられる。しかし、hAECは今回我々が観察したように、一過性の*NKX2-1*遺伝子強制発現により内在性*NKX2-1*の発現を惹起することで持続的な*NKX2-1*の発現を維持することが可能であると考えられる。そのため、ゲノム傷害性のないセンダイウイルスベクターや、合成mRNAの導入であれば、ゲノムDNAを傷つけることなく*NKX2-1*を安定的に発現させ、臨床応用可能なhAEC由来II型肺胞上皮細胞を作出できると考えられる。また、*NKX2-1*の発現を惹起する低分子化合物の探索により、さらに安全で簡便なII型肺胞上皮細胞の分化誘導法の開発も期待できる。

本研究で用いた hAECs には前述のように移植治療に有用な特性を持っている。転写因子の導入という簡便な方法でII型肺胞上皮細胞様の細胞の誘導に成功した本研究の意義は大きい。本研究を元に今後 hAECs の更なる移植治療への応用法の開発が進むことが期待される。

## V. 結論

本研究ではレンチウイルスベクターを用いて hAECs に *NKX2-1* を導入することにより II 型肺胞上皮の性質をもつ細胞を作出することができた。また、*NKX2-1* は一過性の強制発現により自己活性化することが示唆され、ゲノム DNA を傷つけず導入する方法や、*NKX2-1* の発現を惹起する低分子化合物の探索により、さらに安全で簡便な II 型肺胞上皮細胞の分化誘導法の開発が可能であると考えられる。

## X. 引用文献

- 1 Anna Serrano-Mollar, Gemma Gay-Jordi, Raquel Guillamat-Prats, Daniel Closa, Fernanda Hernandez-Gonzalez, Pedro Marin, Felip Burgos, Jaume Martorell, Marcelo Sanchez, Pedro Arguis, Dolors Soy, Jose M Bayas, Jose Ramirez, Teresa D Tetley, Laureano Molins, Jordi Puig de la Bellacasa, Camino Rodriguez-Villar, Irene Rovira, Juan Jose Fibla, and Antoni Xaubet. Safety and Tolerability of Alveolar Type II Cell Transplantation in Idiopathic

- Pulmonary Fibrosis. *Chest*. 2016;150(3):533-43.
- 2 Sarah X L Huang, Mohammad Naimul Islam, John O' Neill, Zheng Hu, Yong-Guang Yang, Ya-Wen Chen, Meanie Mumau, Michael D Green, Gordana Vunjak-Novakovic, Jahar Bhattacharya and Hans-Willem Snoeck. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 2014; 32:84-91.
  - 3 Shimpei Gotoh, Isao Ito, Tadao Nagasaki, Yuki Yamamoto, Satoshi Konishi, Yohei Korogi, Hisako Matsumoto, Shigeo Muro, Toyohiro Hirai, Michinori Funato, Shin-Ichi Mae, Taro Toyoda, Aiko Sato-Otsubo, Seishi Ogawa, Kenji Osafune, and Michiaki Mishima. Generation of Alveolar Epithelial Spheroids via Isolated Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2014; 3:394-403.
  - 4 Briana R Dye, David R Hill, Michael AH Ferguson, Yu-Hwai Tsai, Melinda S Nagy, Rachel Dyal, James M Wells, Christopher N Mayhew, Roy Nattiv and Jason R Spence. Invitro generation of human pluripotent stem cell derived

lung organoids. *Elife*. 2015:1–25.

5 Finn Hawkins, Philipp Kramer, Anjali Jacob, Ian Driver, Dylan C. Thomas, Katherine B. McCauley, Nicholas Skvir, Ana M. Crane, Anita A. Kurmann, Anthony N. Hollenberg, Sinead Nguyen, Brandon G. Wong, Ahmad S. Khalil, Sarah X.L. Huang, Susan Guttentag, Jason R. Rock, John M. Shannon, Brian R. Davis, and Darrell N. Kotton. Prospective isolation of NKX2-1-expressing human lung progenitors derived from pluripotent stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017; 127:2277–2294.

6 Anjali Jacob, Michael Morley, Finn Hawkins, Katherine B. McCauley, J.C. Jean, Hillary Heins, Cheng-Lun Na, Timothy E. Weaver, Marall Vedaie, Killian Hurley, Anne Hinds, Scott J. Russo, Seunghyi Kook, William Zacharias, Matthias Ochs, Katrina Traber, Lee J. Quinton, Ana Crane, Brian R. Davis, Frances V. White, Jennifer Wambach, and Darrell N. Kotton. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell*.

2017; 21:472–488. e10.

- 7 Toshio Miki. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*. 2011; 2:25
- 8 Chika Takano, Brendan H Grubbs, Mika Ishige, Erika Ogawa, Ichiro Morioka, Satoshi Hyakawa and Toshio Miki. Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cell Translational Medicine*. 2020;10(6):829–835.
- 9 Haofei Wang, Yuchen Yang, Jiandong Liu, and Li Qian. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms, and progress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021; 22:410–424.
- 10 Damante G, Di Lauro R. Thyroid-specific gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994;1218:255–266.
- 11 Marina Pasca di Magliano, Roberto Di Lauro, and Mariastella Zannini. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences. 2000; 97(24):13144-13149.