

# 博士論文要約

二宮 直登

## マウス ES 細胞及び皮膚細胞からの肺前駆細胞の作製 (Generation of lung progenitor cells from mouse embryonic stem cells and fibroblasts)

### 研究の背景と目的

#### マウス ES 細胞を用いた肺細胞の分化誘導

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell, ES 細胞) は、多能性を持つと同時に半永久的に増殖できることから様々な組織の疾患に対する細胞移植治療のソース細胞として期待されている。成体の肺にも成体幹細胞が存在するが、再生能力には限界があり深刻なダメージを受けた肺の再生は不可能とされている。従って、細胞移植治療は慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) や肺線維症などの深刻な肺疾患に対する治療法として期待できる。しかし肺が約 40 種類の細胞から構成されている極めて複雑な臓器である上に、肺を構成する様々な細胞の分化制御法もほとんど開発されていないことから、肺疾患に対する再生医療は他の臓器に比べて非常に遅れている。そこで第一章では、様々な肺細胞を効率よく分化させ、肺疾患に対する細胞移植治療への応用につなげることを目的とし、肺発生に関与する様々な成長因子の肺細胞分化に対

する影響をマウス ES 細胞を用いた分化誘導系で評価した。

## 肺原基転写因子ネットワーク再構築による皮膚細胞から肺前駆細胞への直接転換

ES 細胞や iPS 細胞は、人体を構成する全ての細胞に分化しうる万能細胞である反面、逆にこの万能性が仇となり、現在の技術では完全に制御できないほどの爆発的な分化能と造腫瘍性を持つ。そのため精度の高い分化制御法の開発に加えて、分化させた細胞の精製法や安全性の検証に時間を要している。すなわち実験室レベルで多能性幹細胞の可能性を語る事はできても、真に実用化するには各分化段階の分化特異性の検証、分化効率の向上、目的外細胞の除去方法、分化細胞の安定培養法、大量培養方法など解決すべき問題があまりに多く、再生医療や創薬産業に直ちに使用できるような完成度の高い分化誘導法を確立するレベルには到達していない。このような現状から第二章では、iPS 細胞の抱える腫瘍化の問題や分化コントロールの技術的問題を解決し、肺の再生医療を早期に実現させることを目的に、分化した体細胞から肺を構成するすべての細胞の元となる肺前駆細胞を 1 ステップで作成する分化転換法の開発を行った。

## 結果と考察

### マウス ES 細胞を用いた肺細胞の分化誘導

私は第一章で、肺発生に必須の様々な成長因子が ES 細胞から肺細胞への *in vitro* 分化誘導系において肺細胞分化に対しどのような影響を与えるか評価を行った。その結果、BMP4 がマウス ES 細胞を *in vitro* で肺細胞へ分化させる場合に極めて重要な因子であることを見出した。

まず ES 細胞から *Nkx2.1* 陽性肺前駆細胞への分化誘導においては、BMP4 は肺前駆細胞の分化に抑制的に働いた。これは BMP4 処理が ES 細胞を強力に中胚葉方向へ分

化させる活性をもつためだと考えられる。BMP4 はアフリカツメガエル胚の腹側化を引き起こし、腹側中胚葉組織である血球などを誘導することが知られている (Kessler and Melton, 1994)。今回私の行った研究においても BMP4 は中胚葉マーカーである *Flk1* と *Pdgfra* の発現を強力に誘導する一方で、内胚葉マーカーである *Foxa2* の発現を抑制した。対照的に BMP の阻害物質である noggin は、中胚葉と内胚葉マーカーに影響を与えることなく *Nkx2.1* の発現を上昇させた。他の TGF $\beta$  スーパーファミリーのメンバーである activin は中胚葉と内胚葉遺伝子マーカーの発現上昇と共に *Nkx2.1* の発現を上昇させた。もう一つの TGF $\beta$  スーパーファミリーである nodal はより特異的な影響を示した。nodal は内胚葉マーカー遺伝子の発現上昇と共に *Nkx2.1* の発現を上昇させ、中胚葉マーカー遺伝子の発現上昇は伴わなかった。activin、nodal 及び TGF $\beta$  は、内胚葉遺伝子マーカーの発現上昇と共に *Nkx2.1* の発現を上昇させたことから、ES 細胞を内胚葉方向へ分化誘導することで肺前駆細胞の分化を促進させる活性を持つ因子であると考えられる。マウス胚を用いた組織培養実験の結果から、FGF1 と FGF2 は濃度依存的に将来肺、肝臓、膵臓へと分化する前腸内胚葉の運命を決定することが知られている。前腸内胚葉を低濃度の FGF1 または FGF2 で培養すると肝臓、膵臓方向へ分化し、高濃度の FGF1 または FGF2 で培養すると肺へ分化する。今回私の行った実験においても高濃度の FGF1 または FGF2 で処理することで *Nkx2.1* の発現を上昇させた。FGF1 及び FGF2 は activin、nodal 及び TGF $\beta$  と異なり内胚葉マーカー遺伝子の発現誘導を伴わないこのことから、内胚葉に分化した細胞から肺前駆細胞への分化段階を特異的に促進する可能性が考えられる。

一方、成熟肺細胞に対しては、BMP4 は、濃度依存的に肺細胞の分化を制御していた。低濃度の BMP4 で処理すると粘液細胞やクララ細胞の分化が促進され、高濃度では基底細胞の分化が促進された。その一方で、BMP4 は繊毛細胞と肺胞上皮 II 型細胞の分化を抑制した。この結果から BMP4 は、*in vitro* において ES 細胞から肺細胞への分化

誘導を選択的にコントロールするのに重要な因子であることが分かった。BMP4 以外の成長因子に関しては、activin、Shh、RA は、繊毛細胞の分化を促進させた。activin と nodal は、粘液細胞の分化を促進させた。FGF10 と RA は、肺胞上皮 II 型細胞の分化を促進させた。nodal と RA は、肺胞上皮 I 型細胞の分化を促進させた。

### 肺原基転写因子ネットワーク再構築による皮膚細胞から肺前駆細胞への直接転換

第二章では、iPS 細胞の抱える腫瘍化の問題や分化コントロールの技術的問題を解決し、肺の再生医療を早期に実現させることを目的に、分化した体細胞から肺を構成するすべての細胞の元となる肺前駆細胞を 1 ステップで作成する分化転換法の開発を行った。その結果 5 つの遺伝子をマウス皮膚細胞に導入することで、肺前駆細胞へと直接転換できることを明らかにした。これは ES 細胞や iPS 細胞の技術的問題を一気に解決できうる、細胞分化転換技術である。

しかし、マウス皮膚細胞から肺前駆細胞への転換に使用した 5 遺伝子を用いても、ヒト皮膚細胞を肺前駆細胞へと転換することはできなかった。そのため本研究をヒト細胞へ応用するためには、より強力な肺前駆細胞転換遺伝子を見つけることと、ヒト細胞内に存在する肺前駆細胞への転換を阻害する遺伝子を同定する必要がある。