



News Release

2024年3月25日

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

ヒト iPS 細胞由来肺胞スフェロイドの“on-gel 培養法”による化合物スクリーニング — I 型肺胞上皮細胞の分化を促進するシグナル経路を同定 —

ポイント

- 化合物スクリーニングに適した肺胞スフェロイド^{注1)}の「on-gel 培養法」を構築した。
- 274 種類の低分子化合物を対象に I 型肺胞上皮細胞への分化を促進する作用のスクリーニングを行った。
- YAP/TAZ シグナル^{注2)}の活性化と AKT シグナル^{注3)}の抑制により、I 型肺胞上皮細胞への分化が促進されることがわかった。

1. 要旨

大西裕子 研究員 (CiRA 臨床応用研究部門、京都大学大学院医学研究科)、後藤慎平 教授 (CiRA 同部門) らのグループは、ヒト iPS 細胞から作製した肺胞上皮細胞を用いた化合物スクリーニング法を構築し、YAP/TAZ シグナルの活性化と AKT シグナルの抑制が I 型肺胞上皮細胞 (AT1) への分化を促進することを明らかにしました。

肺でのガス交換を担う I 型肺胞上皮細胞 (AT1) は、ウイルス感染や環境刺激によって損傷することがあります。損傷した AT1 を補うため、II 型肺胞上皮細胞 (AT2) が AT1 へ分化することが知られていますが、培養細胞を用いて AT2 から AT1 への分化を選択的に再現することはできていませんでした。

本研究では、AT1 への分化状況を簡便かつ高感度に定量できるヒト iPS 細胞を樹立し、さらに、ヒト iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞からなるスフェロイドを作製する新たな培養法「on-gel 培養法」を開発しました。on-gel 培養法は、従来法と比べ培養操作が簡便で、少量の細胞で作製可能なため、多数の化合物の作用を同時に評価するスクリーニングに適しています。

研究グループは、今回樹立したヒト iPS 細胞と on-gel 培養法を組み合わせ、274 種類の化合物を対象に AT1 への分化を促進する作用をもつ化合物のスクリーニングを実施しました。その結果、YAP/TAZ シグナルを活性化する LATS-IN-1 と AKT シグナルを抑制する BAY1125976 を添加することで、ヒト iPS 細胞およびヒト生体由来の AT2 から AT1 への分化が促進されることを明らかにしました。

今回明らかになった知見は今後の肺の再生医療に示唆を与えるものです。また、本研究で構築した化合物スクリーニング法は、肺胞に関わる疾患モデルにも応用可能と考えられ、肺疾患の創薬に役立つことが期待されます。

この研究成果は、2024年3月29日（金）に Stem Cell Reports で掲載される予定です。

2. 研究の背景

ヒトの肺には小さい袋状の肺胞という組織が約3億個存在し、肺胞では酸素を血液中に取り込み、二酸化炭素を排出するガス交換が行われています。肺胞の表面は2種の上皮細胞で覆われており、肺胞の表面積の95%を占め、酸素と二酸化炭素が行き来する扁平なI型肺胞上皮細胞（AT1）と、肺胞の袋構造を保つためのサーファクタント^{注4}を分泌する立方形のII型肺胞上皮細胞（AT2）により構成されます。発生においては、どちらも肺胞上皮前駆細胞から分化しますが、ウイルス感染や環境刺激によってAT1が損傷した場合は、AT2が組織幹細胞として増殖し、一部がAT1へと分化することが知られています。

これまでの研究から、この肺胞損傷の修復機構であるAT2からAT1への分化過程の異常が、間質性肺炎や新型コロナウイルス感染症などの肺疾患に関わる可能性が示唆されています。一方、ヒト生体由来の肺胞上皮細胞は貴重であり、さまざまな解析に用いるために十分でないことから、ヒトiPS細胞を用いたAT2からAT1への分化誘導の再現や疾患モデルの構築が期待されています。

研究グループは肺疾患の理解と治療法の開発のため、ヒトiPS細胞を用いて肺胞上皮細胞を誘導する方法をこれまでに開発してきました。そのなかで、ヒトiPS細胞由来AT2と線維芽細胞をマトリゲル^{注5}内で共培養することにより、一部がAT1へ分化する傾向があることが確認されています。本研究では、ヒトiPS細胞を用いて、AT1への分化を促進する化合物をスクリーニングする実験系を構築し、AT1への分化に関わるシグナルを網羅的に探索しました。

3. 研究結果

1) I型肺胞上皮細胞（AT1）への分化を可視化するヒトiPS細胞の樹立

研究グループはこれまでに、II型肺胞上皮細胞（AT2）への分化状況を蛍光タンパク質GFPの発現により可視化するヒトiPS細胞を開発しています。このヒトiPS細胞に対して、AT1で特異的に発現する遺伝子*AGER*のプロモーター領域の下流に、蛍光タンパク質mCherryと発光タグHiBiTが連結したレポーター遺伝子を導入しました。蛍光タンパク質により、AT1への分化を簡便に検出でき、また、発光タグHiBiTにより、AT1分化の高感度な検出が可能なヒトiPS細胞を樹立しました。

2) 少ない細胞数で簡便に肺胞スフェロイドを形成できる on-gel 培養法の構築

次に、マトリゲルの中に細胞を埋め込み3次元培養する従来法ではなく、96ウェル培養プレート底面にマトリゲルをあらかじめ敷いておき、ヒトiPS細胞から作製した肺胞上皮前駆細胞あるいはAT2をマトリゲル層の上で培養する「on-gel 培養法」を考案しました（図1A）。その結果、肺胞上皮前駆細胞およびAT2どちらを培養した場合でも、12日後に球形の肺胞様構造（肺胞スフェロイド）が形成されました（図1B）。on-gel 培養法は、従来法より少量の細胞で肺胞スフェロイドを形成することができることに加えて、スクリーニングに用いる化合物の添加やHiBiT発光測定などの操作が簡便です。これにより、従来よりもより多くの化合物を対象としたスクリーニングが可能となりました。

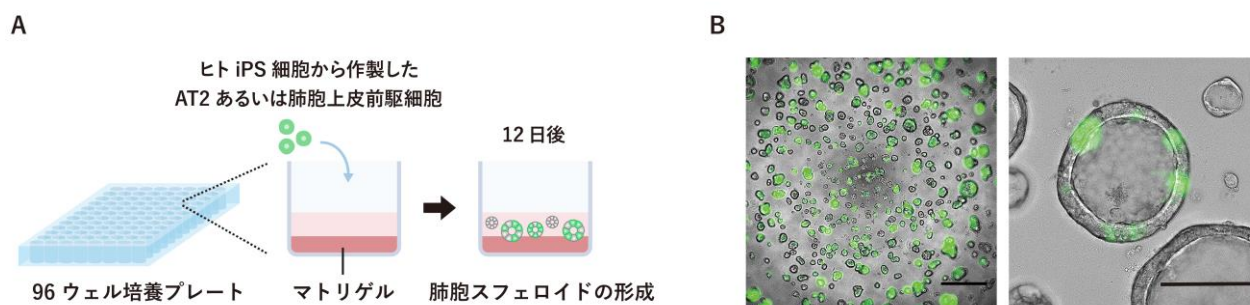


図 1：化合物スクリーニングに適した「on-gel 培養法」

- A： on-gel 培養法の概要。あらかじめ底面にマトリゲルを敷いておいた 96 ウェル培養プレートの上で、ヒト iPS 細胞由来の肺胞上皮前駆細胞あるいは AT2 を培養する。
- B： ヒト iPS 細胞由来の AT2（緑；GFP）を on-gel 培養して形成した肺胞スフェロイド。スケールバーは、左が 500 μm、右が 100 μm。

3) AT1 への分化を促進する化合物のスクリーニング

ヒト iPS 細胞由来の肺胞前駆細胞を on-gel 培養し、274 種類の低分子化合物を個別に添加し、AT1 への分化促進効果を HiBiT 発光により評価しました。その結果、有意な HiBiT 発光強度を示し、細胞毒性の可能性が低い候補化合物が 15 種類検出されました（図 2 A）。この 15 化合物について、ヒト iPS 細胞由来の AT2 の on-gel 培養に添加したところ、特に YAP/TAZ シグナルを活性化する LATS-IN-1 の添加により、AT1 のマーカー遺伝子の発現が大きく上昇しました（図 2B）。

なお、ROCK-IN-2 も AT1 マーカー遺伝子の発現を促進しましたが、本来の標的（on-target）とは異なる off-target 作用により YAP/TAZ シグナルを活性化していると考えられました。そのため、AT1 マーカー遺伝子の発現を誘導した化合物のうち、LATS-IN-1 と作用機序の重複する ROCK-IN-2、細胞毒性があると判定された NVP-AEW541 の 2 つの化合物を除いた 5 つの化合物（図 2B 下線）についてさらなる検討を行いました。

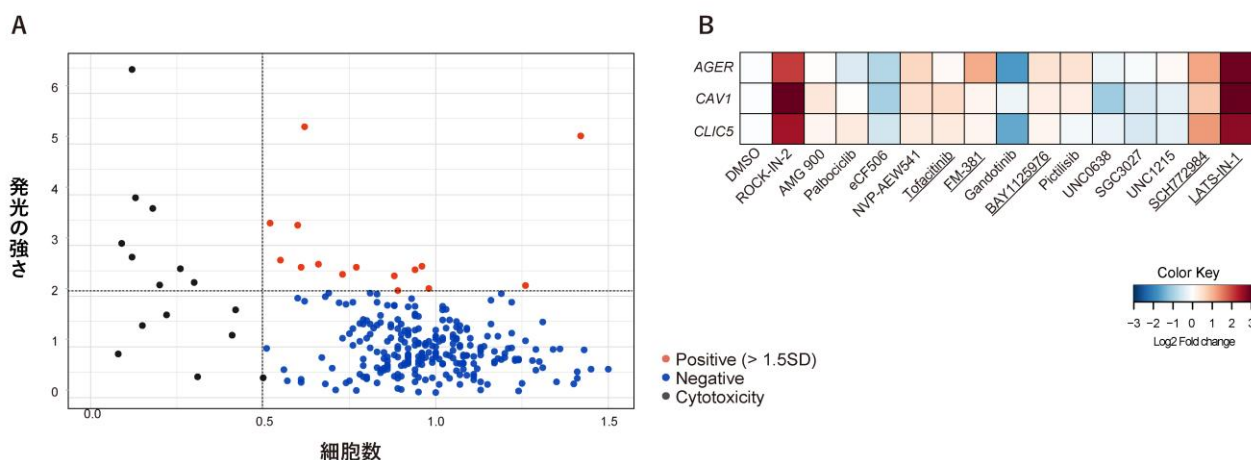


図 2：AT1 への分化を促進する化合物のスクリーニング

- A：化合物のスクリーニング結果。HiBiT 発光の認められた化合物のうち 15 化合物（橙；Positive）を候補化合物として検出した。細胞数が基準値以下となった化合物は細胞毒性をもつものとして候補から排除した（灰色；Cytotoxicity）。
- B：on-gel 培養したヒト iPS 細胞由来 AT2 細胞に添加した場合の AT1 マーカー遺伝子（*AGER*、*CAV1*、*CLIC5*）の発現。

4) YAP/TAZ シグナルの活性化と AKT シグナルの抑制による AT1 への分化促進

次に、LATS-IN-1 以外に AT1 マーカー遺伝子の発現を誘導した 4 化合物について、LATS-IN-1 と同時に添加することで AT1 への分化をさらに促進するかを検討しました。その結果、細胞の生存や増殖など複数のシグナル経路に関わる AKT シグナルを抑制する BAY1125976 を LATS-IN-1 と同時に添加した場合に、ヒト生体の AT1 を特徴づける遺伝子群の多くが発現することがわかりました（図 3A）。さらに、この 2 化合物の組み合わせは、ヒト生体から採取された AT2 に添加した場合も AT1 分化促進効果を示すことが確認されました。

最後に、LATS-IN-1 による YAP/TAZ シグナルの活性化と BAY1125976 による AKT シグナルの抑制が、マトリゲル中で線維芽細胞と共培養する従来法において、どのような効果を示すかを確認しました。その結果、2 化合物の添加により、肺胞スフェロイドの細胞層が扁平になる傾向が確認されました（図 3B）。これにより、2 つのシグナルの制御が、遺伝子発現のみならず、組織の形態形成にも関与することがわかりました。

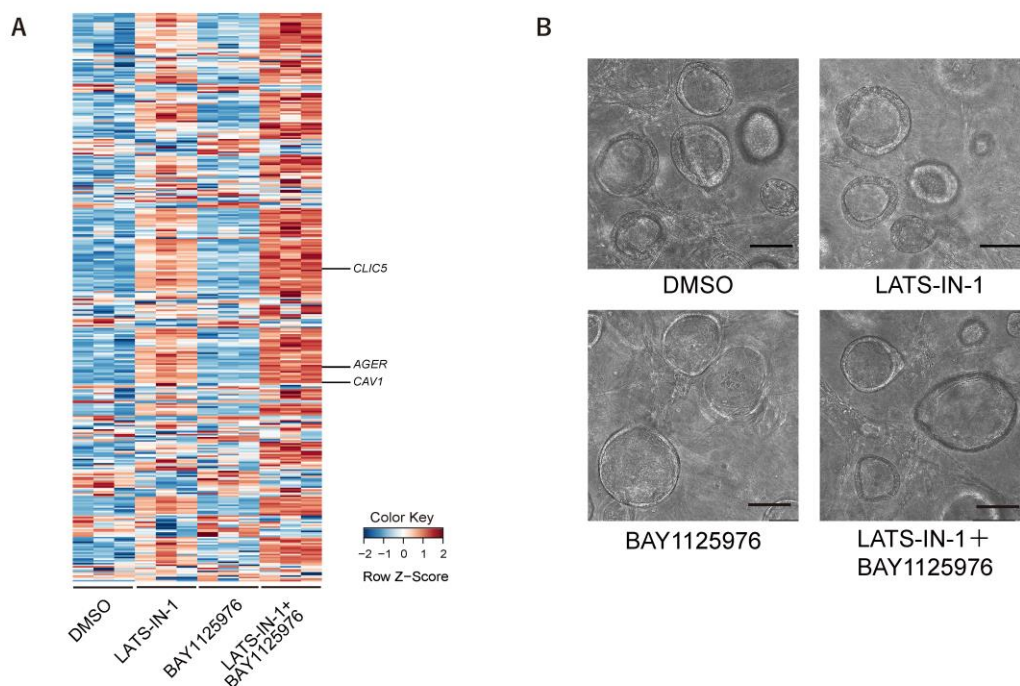


図 3：2 つのシグナルの制御による AT1 分化促進作用の解析

- A：トランスクリプトーム解析によりヒト AT1 で発現することが報告されている遺伝子群の網羅的発現解析。on-gel 培養したヒト iPS 細胞由来 AT2 細胞にそれぞれの化合物を添加した結果。
- B：マトリゲルの中で、線維芽細胞と共培養し肺胞スフェロイドを形成する従来法にそれぞれの化合物を添加した結果。スケールバーはいずれも 100 μ m。

4. まとめと展望

今回、研究グループは AT1 への分化を簡便かつ高感度に検出できるヒト iPS 細胞を樹立し、化合物スクリーニングに適した肺胞スフェロイドの on-gel 培養法を開発しました。これらを利用して、AT1 への分化を促進する作用をもつ低分子化合物を探索し、YAP/TAZ シグナルの活性化と AKT シグナルの阻害が重要であることを突き止めました。ヒト iPS 細胞由来を用いて AT2 から AT1 への分化を体外で再現することで、今後、ウイルス感染や環境刺激による肺胞の再生や、AT2 から AT1 への分化異常と肺疾患との関係をより詳細に研究することが可能になります。今後、本研究の成果が肺の再生のための新たな治療法の開発につながることを期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Screening of factors inducing alveolar type 1 epithelial cells using human pluripotent stem cells”
DOI: 10.1016/j.stemcr.2024.02.009

○ ジャーナル名

Stem Cell Reports

○ 著者

Yuko Ohnishi^{1,2}, Atsushi Masui^{1,2}, Takahiro Suezawa¹, Ryuta Mikawa^{1,2}, Toyohiro Hirai³, Masatoshi Hagiwara⁴, Shimpei Gotoh^{1,2,*}

* : 責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学大学院医学研究科 呼吸器疾患創薬講座
2. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 臨床応用研究部門 呼吸器再生医学研究室
3. 京都大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
4. 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学

6. 本研究への支援

本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- 杏林製薬株式会社 呼吸器疾患創薬講座研究費
- 日本医療研究開発機構 (AMED) (JP17bm0804007, JP23bm1423004, JP23bm1323001)
- 日本学術振興会 科学研究費助成事業 (JP22K19525)
- iPS 細胞研究基金

7. 用語説明

注1) スフェロイド

複数の細胞を培養皿のなかで立体的に凝集させた球形の細胞塊。

注2) YAP/TAZ シグナル

細胞増殖や細胞死などさまざまな応答を引き起こすシグナル伝達経路。細胞にかかる張力などに応じて遺伝子発現を制御することから、組織の形態およびサイズにも関わることが知られている。

注3) AKT シグナル

タンパク質合成や細胞増殖などに関わり、さまざまなシグナルによって活性化されるシグナル伝達経路。AKT シグナルの異常は、がんや糖尿病など多くの疾患に関係する。

注4) サーファクタント

肺胞の空気に接する側に分泌されている界面活性成分。肺胞は内側に縮んで空気を押し出す方向に力がかかっている。サーファクタントはその力を和らげ、空気を肺胞内に取り込みやすくしている。脂質やタンパク質などから構成されている。

注5) マトリゲル

3次元培養などに用いられる細胞培養用のゲル。培養したマウス肉腫細胞から抽出した細胞外マトリックスや種増殖因子などが含まれる。