



肺胞オルガノイド

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 科学評論社 公開日: 2023-12-11 キーワード (Ja): 急性好酸球性肺炎(AEP), 慢性好酸球性肺炎(CEP) キーワード (En): 作成者: 榎本, 泰典, 森本, 充 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000054

肺胞オルガノイド

理化学研究所 生命機能科学研究センター 呼吸器形成研究チーム
榎本泰典、森本充

はじめに

呼吸器組織は近位（口側）の気管・気管支領域と遠位の肺胞領域に大別され、気管・気管支は空気の通り道、すなわち気道として、肺胞はガス交換の場としての機能を有する。呼吸器組織には、さまざまな機能に特化した上皮細胞が含まれており、その中には気管・気管支内腔を覆う基底細胞、クラブ細胞、線毛細胞、杯細胞、神経内分泌細胞、刷子細胞が存在し、肺胞にはⅠ型及びⅡ型の肺胞上皮細胞が存在する。これまで基底細胞、クラブ細胞、およびⅡ型肺胞上皮細胞は、三次元培養条件下で増殖、分化を経て自己組織化し、微小な呼吸器上皮構造、すなわちオルガノイドを形成できることが知られている。本稿では、肺胞領域の組織幹細胞として知られるⅡ型肺胞上皮細胞から作成される“肺胞オルガノイド”に焦点を絞り、その手法やそこから明らかになった生物学的意義、さらには医学的応用の可能性について概説する。

Ⅱ型肺胞上皮細胞（AT2：Alveolar Type 2 epithelial cell）

肺胞はガス交換の場として機能するため、十分な内腔面積の確保と、繊細な組織構造を維持することが求められる。その2つの役割を果たすため、肺胞上皮は2つの異なる上皮細胞で構成されている。Ⅰ型肺胞上皮細胞（AT1）は、肺胞の表面積の95%以上を覆う扁平化した巨大な細胞であり、毛細血管の微細なネットワークに隣接しガス交換に関与する。AT1はAger、Pdpn、および転写因子Hopxを発現している。Ⅱ型肺胞上皮細胞（AT2）は立方状の形態を呈し、肺の表面張力を維持するためにサーファクタントの産生・分泌を主たる機能とする。そのためAT2はSftpcやSftpbといったサーファクタントプロテインを高発現している。

成体における定常状態では肺胞上皮細胞のターンオーバーは遅いことが知られているが、肺胞上皮が損傷するとAT2が増殖し、さらにAT1に分化することで障害部位を修復できることがマウスを使った遺伝的系統追跡実験により明らかとなった^{1,2}。すなわちAT2は肺胞における組織幹細胞として重要な役割を有している。

マウス肺AT2に由来する肺胞オルガノイド

肺胞の組織幹細胞であるAT2の生物学的、医学的重要性は極めて高い。しかし、従来の平面（二次元的）培養法では形態を維持しつつAT2を増殖させることは難しく、*in vitro*におけるAT2研究の大きな障壁となっていた。ブレイクスルーになったのは2013年にHoganらが発表した論文だった。細胞外マトリクスを豊富に含むマトリゲルTMの内部で、間葉系の

支持細胞と三次元的に共培養することで、AT2 を効率よく増殖させられることが報告された¹。著者らは、AT2 細胞を標識できる *Sftpc-CreER* マウスと、Cre 活性依存的に蛍光レポーターを発現する *Rosa26-lox-stop-lox-tdTomato* マウスを掛け合わせることで、タモキシフェンにより Cre リコンビナーゼを誘導すると AT2 が蛍光標識できるマウスを作成した。同マウスからフローサイトメトリー (FACS) により AT2 を単離、また同時に *Pdgfra-Gfp* マウスから *Pdgfra* 陽性肺線維芽細胞を単離してこれらを共培養に用いている。すると培養して数日の内に AT2 が増殖し始め、球状のスフェアが確認されるようになり、2 週間ほどでスフェアの外側に AT2 が、内側に AT2 から分化した AT1 が見られるようになる。同様の手法で我々が作成した肺泡オルガノイドの写真を図 1 に示す。

Hogan らの報告以外にも、これまでに複数の研究グループより様々なマウス肺泡オルガノイドの作成方法が提唱されている。興味深いことに、それぞれのグループで AT2 の選択方法、共培養する支持細胞 (フィーダー細胞) の種類、培地組成に関しては論文ごとに異なる。例えば AT2 を単離するためには上述の遺伝子改変マウスを使用し蛍光色素で FACS を用いる方法と、純度は落ちるが野生型マウスから細胞表面抗原を利用して単離する方法がある。支持細胞には *Pdgfra* 陽性の脂肪線維芽細胞 (lipofibroblast)¹ のほか、マウス線維芽細胞 MLg 細胞株³、CD45-CD31-EpCAM-線維芽細胞⁴、肺内皮細胞⁵、肺マクロファージ⁶ といった多様な細胞が報告されている。また培地に関しても、線維芽細胞増殖因子 (FGF) や上皮成長因子 (EGF) といった成長因子やシグナル阻害剤の有無やその使用濃度など、グループごとに異なっており、これらの差異が AT2 及び肺泡オルガノイドの増殖能や分化度の違いを生んでいると推測される。また最近、IL-1 や TNF α といった炎症性サイトカインが AT2 の増殖にポジティブに作用していることが報告され⁷、炎症時の上皮損傷及び欠損状態を素早く補うための生体防御機構とも捉えられる。

肺泡オルガノイドは損傷再生のモデルとして捉えられており、オルガノイド内で発見された新規の細胞動態が、成体の損傷再生に寄与していた例もある。2020 年 Kobayashi らは、肺泡オルガノイドにおけるシングルセルトランスクリプトーム解析を行い、肺泡オルガノイドの中に AT2 と AT1 の移行期に相当する細胞が存在することを同定し、それらを pre-alveolar type-1 transitional cell state (PATs) と名付けた⁸。興味深いことに PATs は細胞老化マーカーや TGF β シグナルの向上が認められ、また同様の遺伝子プロファイルを有する細胞が肺線維症の患者肺にもみられた。PATs は単なる移行期にある細胞という位置付けだけでなく、線維化の病態生理にも関与することが示唆された。同様の報告は別グループからもなされており、概ね同種の細胞群を見ているものと考えられている^{9,10}。

支持細胞に依存しないマウスおよびヒト肺泡オルガノイド

これまでの肺泡オルガノイド培養法では支持細胞の存在が必須であり、その手技としての煩雑さと AT2 及びその系譜細胞のみを解析することが難しい点が問題であった。そこで最近になり、支持細胞を必要としない、いわゆるフィーダーフリー条件における肺泡オルガノ

イドの作成方法が検討された。

Shiraishi らは発生途中の *Colla2-Gfp* マウス由来の GFP 陽性間葉系細胞と Epcam 陽性上皮細胞を単離し、時系列で解析する SAGE シークエンス解析を行った。それぞれの細胞種の細胞間シグナル分子の動態データからインタラクトーム解析を行い、上皮細胞を支持するニッチ因子の同定を試み、表 1 に示す培地組成でフィーダーフリーの肺胞オルガノイド作成に成功した¹¹。また最近、Katsura らは従来の AT2 と線維芽細胞の共培養法で作成したオルガノイドサンプルにおいてシングルセルトランスクリプトーム解析を行い、それぞれの細胞に発現しているリガンド、レセプター、アンタゴニストを抽出し、それを基に Shiraishi らとは別の培地組成でフィーダーフリー条件を確立した¹²。両グループの組成を比べると、共通して EGF と FGF7/10、TGF β 阻害剤 SB431542、Wnt アゴニスト CHIR99021、Heparin、Rock inhibitor の 6 つが含まれている。これらの因子はフィーダーフリー条件の AT2 維持、増殖に重要な働きがあると想定される。

肺胞オルガノイドをヒト疾患モデルに応用することを考えれば、ヒト AT2 から肺胞オルガノイドを作成する技術開発は必須である。マウスと異なり、ヒトでは AT2 に特異的に発現する膜表面タンパクである HT II -280 の存在が知られている¹³。そのため、ヒト AT2 の単離は抗 HT II -280 抗体を使用し FACS あるいは磁気細胞分離 (MACS) により、容易に単離することができる。このように単離したヒト肺由来の AT2 を用い、Shiraishi ら^{11,14} も Katsura ら¹² も、マウスの場合とほぼ同様の培地組成でフィーダーフリー培養を試み、ヒト肺胞オルガノイドの作成に成功している。

ヒト多能性幹細胞に由来する肺胞オルガノイド

胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) など、ヒト多能性幹細胞に由来する肺組織の誘導は、肺の発生や再生、肺疾患の理解や治療に至るまで大きな可能性を秘めている。また実際の成人の肺から初代細胞として AT2 を単離することには、倫理的、手技的なハードルが存在する。これらの背景から、以前よりヒト多能性幹細胞から AT2 への分化誘導研究が精力的に行われてきた。

AT2 の分化誘導には、培養皿の上で発生プロセスを再現していく必要がある。各発生ステージで特定の細胞種を誘導する成長因子と培養することで、幹細胞から胚体内胚葉 (Definitive Endoderm)、前腸内胚葉 (Anterior Foregut Endoderm)、さらには呼吸器上皮前駆細胞を含む腹側前腸内胚葉 (Ventralized Anterior Foregut Endoderm)、そして AT2 の順に分化プロセスを再現する。これまで少なくとも 3 つの研究グループがヒト多能性幹細胞から上記工程を再現した AT2 分化誘導条件を確立し、それぞれヒト肺胞オルガノイドの作成に成功している^{15,16,17}。またヒト“肺”オルガノイドとして、純粋な AT2 だけでなく広く気道上皮細胞や間葉系細胞も含めて誘導していく手法も開発されている^{18,19}。一般に多能性幹細胞から AT2 の分化誘導及び肺胞オルガノイドの作成には 1 ～数か月以上の長期培養が必要であり、その途中の培地組成や各誘導の期間、FACS による細胞選択の有無など、肺から

採取した AT2 の初代培養法と比較してプロトコルの多様性が非常に大きい。詳細に関しては各論文を参照されたい。

肺胞オルガノイドの医学的応用

マウスにおいてもヒトにおいても、肺胞オルガノイド作成の技術向上に伴い、これを医学的ツールとして利用できないか、様々な検討がなされるようになってきた。ここではその一端を紹介する。

① 薬剤毒性評価

抗不整脈薬であるアミオダロンは薬剤性間質性肺炎を起こすリスクが高い薬剤であり、その肺における AT2 ではラメラ小体が拡大することが知られている。Gotoh らのグループは、ヒト iPS 細胞由来の肺胞オルガノイドに対してアミオダロンを投与し、実際に AT2 のラメラ小体の変化を確認できたことから、*in vivo* の状況を再現できていることを示した¹⁵。薬剤性肺障害は時に致死的な合併症となりうるため、その毒性評価は臨床的なニーズも高い。肺胞オルガノイドを用いて事前に肺障害のリスク評価することができれば、個別化医療にもつながる可能性がある。

② 肺線維症モデル

肺の線維化の主役は上皮ではなく線維芽細胞と考えられている。そのため、肺胞オルガノイドではなく、上述の間葉系細胞も同時に培養できる“肺”オルガノイドを線維化モデルとして応用する試みがなされている。Hermansky-Pudlak 症候群は Hps1-6 や AP3B1 などの遺伝子変異が原因となり眼皮膚白皮症、出血性素因などを主症状とする遺伝性疾患であるが、一部の患者では若年性肺線維症を発症することが知られている。Chen らは、ES 細胞由来の肺オルガノイドと CRISPR-Cas9 技術を用いて Hps1 遺伝子をノックアウトした ES 細胞由来の肺オルガノイドを比較し、後者では間葉系細胞が有意に増加し、肺線維症様の変化がみられることを報告した¹⁸。Kim らは、ヒト iPS 細胞由来の肺オルガノイドに TGF β を作用させることでコラーゲンやファイブロネクチンの増加、すなわち線維化様変化がみられることから、これを *in vitro* 線維化モデルとして応用した²⁰。著者らはすでに抗線維化作用が示唆されているタンパク milk fat globule-epidermal growth factor 8 をこのモデルに作用させることで、TGF β 誘導性の線維性変化の減弱がみられることを確認している。難治性疾患である肺線維症の新薬開発における有用な *in vitro* ツールとなりうる。

③ 肺胞感染モデル

昨今の新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症の流行を受けて、肺胞オルガノイドに対する感染実験を行った研究も増えてきている。Katsura らはヒト肺から作成した肺胞オルガノイドに SARS-CoV-2 を感染させ、トランスクリプトーム解析を行いインターフェロンを中

心とした炎症性反応や、サーファクタントプロテインの消失、上皮細胞のアポトーシスが起きていることを示している¹²。またさらに最近では、オルガノイドを単細胞にばらし air-liquid interface 培養系で感染効率を上げる試みもされている²¹。これらのモデルを用いることで、本症の治療薬同定やさらなる機序解明が望まれる。

以上、肺泡オルガノイドに関して概説した。幹細胞研究の進歩に合わせて、肺泡分野においてもオルガノイドの作成や解析に関して著しい進歩がみられている。この分野の研究が今後益々発展し、医学、薬学、生物学の各分野に還元されていくものと期待される。

参考文献

1. Barkauskas CE, Crouse MJ, Rackley CR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 2013;123: 3025.
2. Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 2014;507:190.
3. Chen H, Matsumoto K, Brockway BL, et al. Airway epithelial progenitors are region specific and show differential responses to bleomycin-induced lung injury. *Stem Cells* 2012;30:1948.
4. Hegab AE, Arai D, Gao J, et al. Mimicking the niche of lung epithelial stem cells and characterization of several effectors of their in vitro behavior. *Stem Cell Res* 2015;15:109.
5. Lee JH, Bhang DH, Beede A, et al. Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell* 2014;156:440.
6. Lechner AJ, Driver IH, Lee J, et al. Recruited Monocytes and Type 2 Immunity Promote Lung Regeneration following Pneumonectomy. *Cell Stem Cell* 2017; 21:120.
7. Katsura H, Kobayashi Y, Tata PR, et al. IL-1 and TNF α Contribute to the Inflammatory Niche to Enhance Alveolar Regeneration. *Stem Cell Reports* 2019;12:657.
8. Kobayashi Y, Tata A, Konkimalla A, et al. Persistence of a regeneration-associated, transitional alveolar epithelial cell state in pulmonary fibrosis. *Nat Cell Biol* 2020;22:934.
9. Choi J, Park JE, Tsagkogeorga G, et al. Inflammatory Signals Induce AT2 Cell-Derived Damage-Associated Transient Progenitors that Mediate Alveolar Regeneration. *Cell Stem Cell* 2020;27:366.
10. Strunz M, Simon LM, Ansari M, et al. Alveolar regeneration through a Krt8+ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nat Commun* 2020;11:3559.
11. Shiraishi K, Shichino S, Ueha S, et al. Mesenchymal-Epithelial Interactome Analysis Reveals Essential Factors Required for Fibroblast-Free Alveolosphere Formation. *iScience* 2019;11:318.
12. Katsura H, Sontake V, Tata A, et al. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres

Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell* 2020;27:890.

13. Gonzalez RF, Gonzales LAL, Ballard PL, et al. HTII-280, a biomarker specific to the apical plasma membrane of human lung alveolar type II cells. *J Histochem Cytochem* 2010;58:891.

14. Shiraishi K, Nakajima T, Shichino S, et al. In vitro expansion of endogenous human alveolar epithelial type II cells in fibroblast-free spheroid culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;515:579.

15. Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods* 2017;14:1097.

16. Jacob A, Vedaie M, Roberts DA, et al. Derivation of self-renewing lung alveolar epithelial type II cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2019;14:3303.

17. Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc* 2019;14:518.

18. Chen YW, Huang SX, de Carvalho ALRT, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 2017;19:542.

19. Dye BR, Hill DR, Ferguson MAH, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 2015;4:e05098.

20. Kim JH, An GH, Kim JY, et al. Human pluripotent stem-cell-derived alveolar organoids for modeling pulmonary fibrosis and drug testing. *Cell Death Discov* 2021; 7:48.

21. Lamers MM, Vaart J, Knoops K, et al. An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar type II-like cells. *EMBO J* 2021;40:e105912.

図 1：肺胞オルガノイドの構造

明視野（左）で観察すると内腔を持つスフェアとなっていることがわかる。切片を作成し免疫染色（右）を行うと、外側に SPC 陽性の AT2 が、内側に PDPN 陽性の AT1 が存在していることが確認できる。

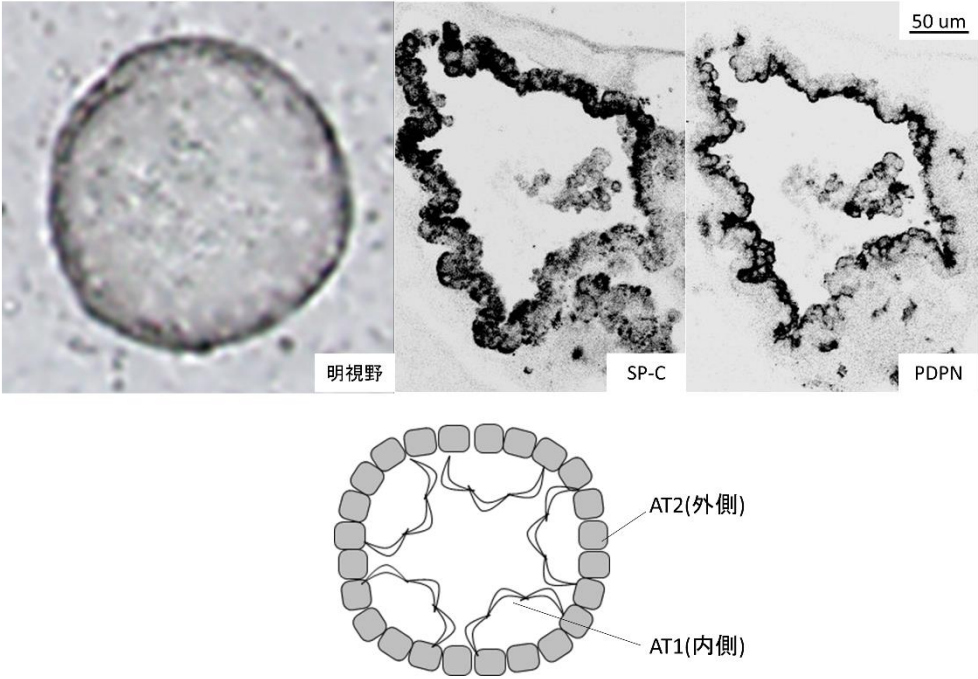


表 1：フィーダーフリー条件におけるマウス肺胞オルガノイド作成方法比較

Authors	AT2	培地組成
Shiraishi ら (2019) ¹¹	EpCAM ⁺ CD31 ⁻ CD45 ⁻ CD146 ⁻ TER119-細胞	MTEC/plus medium (Egf 含有); CHIR99021; SB431542; Noggin; Fgf7; Heparin sodium; Rock inhibitor (day0-2 のみ); Jagged1 (day2 以降)
Katsura ら (2020) ¹²	<i>Sftpc</i> - <i>tdTomato</i> 陽性 細胞	Advanced DMEM/F12; GlutaMAX; B-27 supplement; CHIR99021; SB431542; Fgf10; Heparin; Rock inhibitor; Egf; N-Acetyl-L-Cysteine; BIRB796