

ヒト肺モデル:肺特有の構造・機能を in vitroで再現する

Human lung models: reconstructing structures and functions in vitro

山本 佑樹
Yamamoto Yuki

HiLung株式会社 代表取締役
HiLung Inc. (CEO)

KEYWORD ▶

呼吸器

iPS細胞

ヒト肺モデル

はじめに

01

近年、パンデミックを来し世界の仕組みを変えてしまった、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)をはじめとする病原体は勿論、たばこ煙や排ガス・PM2.5などの環境公害物質、花粉・黄砂などのアレルゲンとなりうる物質は、呼吸器疾患の原因あるいは悪化要因となり得る。複雑で高度な機能を有する肺を高精度に模倣したヒト肺モデルは乏しかったが、近年の発生学及び幹細胞生物学の急速な進展により、臓器形成や組織再生におけるメカニズム解明やその制御に関する理解が進んだ。その結果、組織幹細胞や前駆細胞などを適切な条件下で培養することにより、呼吸器細胞の特異的な性質を維持しつつ培養したり、複雑な細胞構成や三次元組織構造を再現したりすることが可能になってきた。またこれらのヒト肺モデルは生体工学などの異分野技術との融合によって、さらに精緻化することも可能になっており、Microphysiological System (MPS)や生体模倣システムと総称され、高いヒト外挿性の実現が期待されている。本稿では肺の概略を踏まえた上で呼吸器疾患モデルの問題点を紹介し、こうしたヒト肺モデルの進展について最近の知見を含めて紹介したい。

肺の構造と機能

02

肺は生命維持に必須の機能であるガス交換の場として極めて複雑精緻な構造と機能を有する臓器であり、空気の通り道である気道とガス交換の場である肺泡に大別することができる。構造としては気管から始まり枝分かれを繰り返して末梢気管支へ至り、その先端に嚢胞状の構造物である肺泡が存在する。ヒトの肺では肺泡が約3億個存在し、延べ表面積は70m²に達するとされており、この広大な表面積は効率的なガス交換を可能にしている。このような複雑な構造・機能を維持する上で最も重要な役割

を果たしているのは、肺を構成する特徴的な機能を有した細胞群である。シングルセル解析などのオミックス技術が進歩した現在、ヒト肺には最低でも58種類もの細胞種が存在するという報告¹⁾もあり、これらの細胞群が複雑な相互関係を構築することで恒常性を維持していると考えられる。

このように肺は“精密機械”のようであり、一般に再生能力の低い臓器にも関わらず、常に外気に晒され体外の多種多様な刺激に曝露されていることが大きな特徴である。このため肺においては多種多様な難治性疾患が発生し一部は致死的である。

呼吸器疾患モデルの現状と問題点

03

前述のような背景をもとに、呼吸器疾患における医薬品ニーズは極めて大きいにも関わらず、医薬品の開発成功率は他の疾患領域に比べて低いとされている。中でも、医薬品開発において初めてヒトでの薬効が確認される、第二相試験での成功率の低さが目立つ。すなわち前臨床で行われた培養細胞や動物モデルを用いて取得されたデータが、“ヒト”の臨床試験結果を正確に予測できていないことを示唆する。特に、動物モデルとヒト呼吸器疾患病態との乖離は、近年の研究進展によって数多く指摘されている。例えば、嚢胞性線維症という遺伝性疾患はCaucasianを中心に多くの保因者がみられ、呼吸器病変が致死的となる難病が存在する。この難病は細胞膜を介した塩素イオン輸送に関わるCFTR遺伝子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) の変異によって引き起こされるが、CFTR遺伝子を欠失させたマウスにおいては特に大きな変化は見られない²⁾。また遺伝性疾患以外でも同様であり直近の例を挙げると、新型コロナウイルスは通常マウス肺においては効率的な感染が成立しない³⁾。このような乖離の要因として重要と考えられるのは、ヒト肺と動物肺との差異である。まず前提として、魚類などは一部を除いて肺が存在しておらず、心臓や肝臓などの主要臓器を比べても、そもそも進化レベルで決定的な違いがある。

さらに哺乳類という枠組みに限っても、動物モデルとして最も汎用されるマウス肺では、ヒト肺と比較して構成する細胞種が異なることや、呼吸細気管支のような解剖学的に疾患発生母地として重要な構造が存在しない⁴⁾、など大きな種差が存在する。

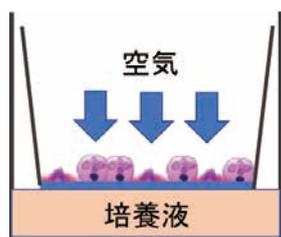
このように動物モデルの限界が指摘される中で、疾患研究や創薬においてヒト外挿性の高い“ヒト肺モデル”に対する関心が高まっている。従来は、ヒト肺細胞モデルとしてA549などの腫瘍細胞株が用いられてきたが、このような細胞では呼吸器上皮細胞としての特徴的なマーカー発現や機能が消失しているなど、外挿性を考えるうえで問題点が多かった。またヒト肺から単離した初代培養細胞も重要な細胞ソースではあるが、通常の平面的な培養方法では短期間のうちに呼吸器細胞特異的な性質を失ってしまうといった問題が指摘されてきた⁵⁾。

気面-液面境界培養 (air-liquid interface, ALI)

04

気面-液面境界培養は、培養ウェル内にセルカルチャーインサート(以下、インサート)と呼ばれる宙づり状の物質透過性培養器材を配置することにより、上層に細胞を播種して空気に曝露させるとともに、下層に加えた培地がインサート膜の穴を通して上層の細胞に供給される仕組みとなっている(図1)。空気に細胞が曝露される状態が生理的である呼吸器領域においては、特に気管・気管支上皮細胞の培養において最も標準的な方法として使用されている。ヒト気管・気管支から採取された細胞を本培養系に播種して数週間培養することにより、基底細胞や繊毛上皮細胞、杯細胞などの粘液産生細胞などが、いわゆる偽重層構造(pseudostratified layer)を呈する生体の気道上皮を近似した構造体を再現することが可能になる。また呼吸器疾患患者から採取した気道上皮細胞を用いることにより、疾患病態研究や創薬にも応用されている。本培養系が創薬においてヒト外挿性の高いモデルとして重要な役割を果たした代表的事例の1つに、嚢胞性線維症におけるCFTR modulator(嚢胞性線維症治療剤)と呼ばれるクラスの薬剤開発が挙げられる。本症において病因となっているCFTR機能異常を標的とする最初の上市薬はivacaftor(VX-770)であるが、患者由来気道上皮細胞を用いてALI培養を行った薬効評価試験結果は、本剤が臨床試験に進むうえで重要

図1 気面-液面境界培養



培養液はインサートのメンブレンを通じて細胞に供給され、細胞のapical面は空気に曝露される。

な非臨床薬効データになったことが知られている。CFTRは塩素イオンチャンネルの機能を有するため、イオンチャンネル機能が評価可能なUssing chamber法を用いて評価を行ったところ、VX-770は良好な機能改善作用を示した⁶⁾。その後ivacaftorの成功を皮切りにVertex社はCFTR modulatorを連続的に上市させているが、このin vitro機能評価系と臨床試験のアウトカム(1秒量の改善)が良く相関することが知られており、in vitroヒト呼吸器疾患モデルの成功事例と言える。こうした遺伝性疾患以外にも、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの罹患率が高い疾患においても、ALI培養を用いた疾患モデル作成の有用性は知られている。例えばGrasらは、重症および中等症喘息患者から得た気管支上皮細胞をALI培養で分化させたのち、それらのフェノタイプを比較したところ、重症患者由来ALI培養においてムチンやIL-8の産生増加といった臨床に合致する所見を得ることが出来た⁷⁾。またGohyらはCOPD患者とコントロールの肺検体サンプルを解析比較するとともに、そのサンプルに由来する細胞を用いてALI培養を行ったところ、繊毛上皮細胞が減少し粘液産生細胞が増加するといったCOPD患者における特徴的な細胞分化傾向を再現することが出来たとしている⁸⁾。

細胞の管腔側が空気に曝露されるという、生理学的に整合性の高いALI培養の特徴が最大限に生きる実験は、たばこ煙や病原体など外気を通じて肺に取り込まれる物質の影響評価や疾患病態研究である。ALI培養におけるたばこ煙曝露実験は、たばこ煙の毒性評価や喫煙と極めて関連が深い疾患であるCOPDの疾患モデル作成など多数の報告があり、その有用性が広く知られている⁹⁾。GindeleらはALI培養した気管支上皮細胞にたばこ煙を間欠的に曝露させると、上皮バリア機能障害や繊毛運動低下が起きたことに加え、トランスクリプトーム解析を行うと気道上皮細胞の分化傾向に異常が惹起されることを示した¹⁰⁾。また呼吸器ウイルス感染症研究においても本培養系は有用なツールのため多数の報告事例があり、新型コロナウイルス感染症のパンデミックを契機に改めて注目が集まっている。本稿でも触れる通り、in vitroのヒト肺モデルについては、近年の幹細胞生物学の急速な発展に伴ってオルガノイド培養が脚光を浴びようになっていたが、パンデミックに伴う新型コロナウイルス研究の際にその弱点もクローズアップされた。すなわち一般的な呼吸器オルガノイドの作製手法では、多くの場合細胞管腔側が三次元培養体の閉鎖された内腔側に位置するため、管腔側から感染する新型コロナウイルスにおいては生理的なモデルを作製することが難しいのである^{11, 12)}。その結果、ウイルス感染実験を容易かつヒト病態との整合性をもって行えるALI培養が創薬・病態研究モデルとして頻用されることとなった¹³⁾。中でもALI培養が大きな役割を果たしたのは、最初の緊急使用許可に至ったレムデシビルの非臨床薬効試験である。本剤は従来コロナウイルス感染症に汎用されていたVeroE6細胞感染モデルでは、新型コロナウイルスに対する薬効は弱かったが、ALI培養を用いた気道上皮細胞の感染モデルにおいてより高い薬効を確認することが出来¹⁴⁾、臨床開発に進む後押しになったと推察される。

今までに述べてきた通り、ALI培養は呼吸器の生理学的特徴に

合致する部分の多い手法であり比較的古くから行われているが、COVID-19パンデミック対応を含めて現在もヒト肺モデルとして最も汎用されている。また本系は上皮細胞を中心に行われているが、近年では線維芽細胞との共培養を行う手法¹⁵⁾など、ヒト肺モデルの複雑化に向けた試みによって更なる発展が期待される。

オルガノイド

05

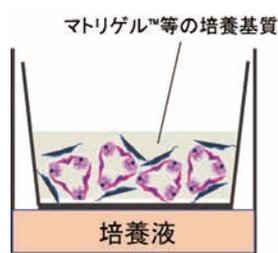
オルガノイドとは、一般に臓器特有の三次元構造や複雑な構成細胞をin vitroで再現した培養体であり(図2)、癌細胞などの疾患組織再現も含めた比較的広い範囲で用いられる用語となっている。オルガノイドの起源をどこに置かかは諸説あるが、本系を構築する上で細胞ソースとして欠かせない幹細胞に関する研究進展が、現在の“オルガノイド”の急速な普及に寄与したと考えると、日本人を筆頭著者とする二つの研究が極めて重要であったことは明らかである。一つは、2008年にEirakuらが報告したES細胞を用いた大脳組織の構築に関わる論文で、幹細胞がもつ“自己組織化”という能力を実証した¹⁶⁾。もう一つは、2009年にSatoらが報告したLgr5陽性小腸幹細胞を用いた腸管オルガノイド形成に関わる論文で、ニッチ環境の再現による幹細胞制御で生体に類似した三次元培養体を作製できることを明らかにした¹⁷⁾。さらに、2007年にTakahashiらが樹立したヒトiPS細胞¹⁸⁾が広く利用できるようになると、オルガノイド技術と組み合わせるとヒトの臓器形成を再現可能なツールとして様々な領域で応用されるようになった。またTakebeらが血管構造を持つオルガノイド形成に成功したように¹⁹⁾、より生体模倣性を高めるために多系統の細胞種を共培養する試みも進んでいる。

呼吸器のオルガノイドも他臓器と同じく、発生学や幹細胞生物学の知見の上に発展してきた。2009年にRockらは、気道上皮細胞において基底細胞が組織幹細胞の役割を持つことをマウスの実験などを通して証明し、表面抗原を用いて分離した基底細胞を三次元培養することにより、繊毛上皮細胞や粘液分泌細胞など実際の気管・気管支構成細胞への分化や構造を模倣することができることを示した²⁰⁾。この論文を発表したHoganらの研究グループは、2013年に従来in vitroでの培養維持が困難とされて

いたマウス由来II型肺上皮細胞をマウス由来肺線維芽細胞との共培養オルガノイドとして形成することにより、初めて長期に培養するとともにI型上皮細胞への分化能などを確認した²¹⁾。同研究は、これまで重要視されながらも困難であったヒト肺領域および関連する疾患研究の端緒となった、重要なマイルストーンと位置付けられる。その翌年、京都大学のGotohらの研究グループが、ヒトiPS細胞から分化誘導した肺前駆細胞と線維芽細胞との共培養オルガノイドを形成することにより、困難であったII型肺上皮細胞の分化誘導に成功した²²⁾。呼吸器領域では腸管などと異なり、初代培養細胞採取に高い侵襲性を伴うこともあり、特にヒトiPS細胞を用いたオルガノイド形成研究や創薬研究応用が盛んに行われるようになった。例えば、ChenらはヒトiPS細胞から肺の三次元枝分かれ構造を再現したオルガノイドを作製し、ウイルス感染実験や疾患特異的iPS細胞を用いた肺線維症モデル作製が可能であることを報告した²³⁾。またKorogiらは疾患iPS細胞から作成した肺上皮オルガノイドを用いて、遺伝性肺線維症の病態形成に肺サーファクタントの分泌異常が関与している可能性を示した²⁴⁾。本研究ではライブセルイメージングを用いてサーファクタント分泌に関わる細胞小器官の動態を可視化したり、遺伝性肺線維症の原因遺伝子をCRISPR/CAS9を用いて修復しフェノタイプが正常化することを示したりするなど、iPS細胞由来オルガノイド技術やイメージング技術、遺伝子改変技術の組み合わせが病態研究に大変有用であることを示した。またオルガノイド培養を用いて、iPS細胞由来肺上皮細胞を長期間にわたり増殖させることなども可能になった^{25, 26)}。気道上皮細胞においても、オルガノイド培養を行うことによってより成熟した機能的な繊毛上皮細胞を分化することができるようになるなど²⁷⁾、iPS細胞から成熟した呼吸器細胞を分化・維持する方法として、オルガノイドの有用性に関する多くの報告がなされている。一方、患者検体等から分離した初代培養細胞を用いたオルガノイド作製については、前述の通り細胞採取自体に伴う侵襲性の問題や安定した細胞増殖が難しかったこともあり、汎用的な手法は限られていた。しかしマウスなどの実験動物を用いた幹細胞ニッチの研究などから、呼吸器細胞系譜の制御に関わる因子などが同定された結果、分離した組織幹細胞を用いて効率的にオルガノイドを作製することが可能になってきた。Katsuraらはヒト肺から分離したII型肺上皮細胞を、線維芽細胞との共培養系を用いずに複数の成長因子や化合物を添加した培養液だけで肺胞様の三次元構造を形成させ、増殖・分化させることに成功した²⁸⁾。またこのモデルを用いて新型コロナウイルス感染モデルを作製することにも成功した。さらに初代培養気道上皮細胞からオルガノイドを作製し、より長期間にわたって拡大培養したり、嚢胞性線維症や呼吸器ウイルス感染モデルへ応用したりすることも可能となった²⁹⁾。

このように呼吸器オルガノイドは、iPS細胞あるいは初代培養組織幹細胞などを用いた臓器形成、組織再生メカニズム等の研究から呼吸器疾患の病態研究まで、幅広い応用展開が行われている。こうした取り組みの中から、今までの培養系では困難であった新規メカニズムや創薬ターゲットの同定など、実際の患者治療につながる知見が得られることが期待されている。

図2 オルガノイド培養



幹細胞などを三次元基質内で培養することで、組織様構造が形成される。

Organ-on-a-chip

06

幹細胞が持つ自己組織化能を活用したオルガノイドと異なり、マイクロ流路系などの工学的な技術に応用した生体環境を模倣する試みの一つとして、Organ-on-a-chipと呼ばれるデバイス技術がある。本系の最大の特徴は、収縮伸展やフローなどの生体臓器におけるメカニカルな刺激(以下、メカニカルストレス)を、in vitroで再現可能にしたところにある。常に呼吸に合わせた収縮伸展を繰り返し、気流や血流などのフローも含めた多様なメカニカルストレスがかかる臓器である肺は、本系において格好の研究ターゲットとなってきた。実際、organ-on-a-chipの概念が初めて世に示されたHuhらの論文は、lung-on-a-chipとしてメカニカルストレスに対する生体の反応を再現するものであった³⁰⁾。その後、本論文の責任著者であるIngberの研究グループからは、肺を含む様々な臓器に関するchipが作製され、病態モデル作製などに応用されている。さらにこれらの知見をもとに設立されたEmulate社が、本系の実用化に成功し、現在創薬研究などに広く用いられている。また最初の論文から10年が経ちより肺の生体模倣性を高めるために、chipを構成するメンブレンなどをより生体に近いものにした第二世代とも言うべきlung-on-a-chipも登場してきた。Zamprognoらは、従来organ-on-a-chipに多用されていたPDMS膜ではなく、エラスチンとコラーゲンの合成膜で構成されたlung-on-a-chipを開発し、メカニカルストレッチなどを再現することに成功した³¹⁾。これらの系は呼吸器疾患の病態研究や創薬応用だけでなく、気流の再現を活用したPM2.5の吸入物質毒性研究にも応用されている³²⁾。

Organ-on-a-chipの問題点は、chipに搭載する細胞ソースや搭載された細胞の性質・機能維持が不十分であったと考えられるが、前項でも述べた幹細胞生物学的知見の蓄積とiPS細胞などを含めた細胞ソースの多様化により、より安定かつ複雑な生体環境を模倣することができるようになると思う。またこれらのchipは、例えばliver-on-a-chipやkidney-on-a-chipと連結することで、多臓器間の相互作用などを再現することが可能になると考えられており、いわゆるbody-on-a-chipの概念実現が期待される。

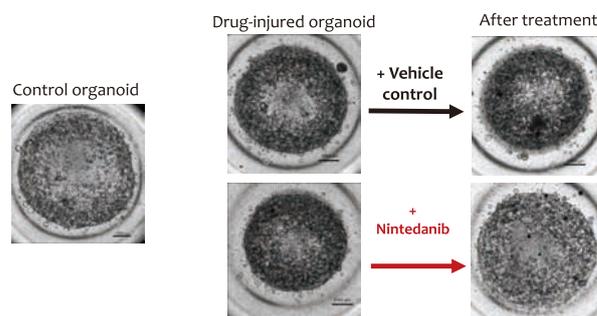
iPS細胞由来ヒト肺モデル

07

オルガノイドに関する項でも述べたように、ヒトiPS細胞は元来採取にハードルがあった初代呼吸器細胞に代わる、ヒト肺モデルの細胞ソースとして有望視されている。特に気道や肺胞上皮細胞の分化誘導方法確立に伴い、これらの細胞を種々の呼吸器疾患モデルに応用する研究が盛んになっている。またiPS細胞は血液などの検体から樹立が可能のため、臨床検体の入手が比較的困難な遺伝性希少疾患の研究において大きな威力を発揮している。例えばMcCauleyらは、嚢胞性線維症患者から樹立したiPS

細胞を気道オルガノイドに分化させ、嚢胞性線維症の病態再現や治療薬評価が可能であったと報告している³³⁾。また遺伝性肺線維症を来す、Hermansky-Pudlak症候群患者から樹立したiPS細胞を用いた疾患モデリングも報告されている^{24, 34)}。さらに、先述のorgan-on-a-chipの技術と組み合わせて気道繊毛上皮細胞の分化や原発性線毛機能不全症の疾患モデル形成を行った報告もある³⁵⁾。こうした遺伝性疾患に加えて、肺胞オルガノイドに薬剤障害を加えることにより肺線維症モデルを作成したり³⁶⁾(図3)、iPS細胞由来気道上皮細胞を用いて新型コロナウイルス感染モデルを作製し薬効を評価したり³⁷⁾することが可能になっている。

図3 iPS細胞由来肺胞オルガノイドを用いた線維症モデル



肺胞オルガノイドに薬剤障害を加えることで、肺線維症を再現した組織がダイナミックに収縮するフェノタイプを再現できた。ニンテダニブ(肺線維症に対する上市薬)によって、同フェノタイプは改善された。(HiLung社データ)

またiPS細胞を用いたヒト肺モデルの展開として、スループットの高い創薬アッセイへの応用や将来的な再生医療への応用が期待される。双方を実現するためには、細胞量産系の開発が必要であるが、IkeoらはiPS細胞由来肺前駆細胞をファイバー状に培養する方法により、安定的に拡大培養できることを報告した³⁸⁾。さらに、iPS細胞由来肺前駆細胞をマウスに移植することにより、初めて肺胞領域への生着に成功した。呼吸器領域でのiPS細胞の応用は他臓器に比べ遅れてきたが、将来の創薬あるいは再生医療への応用へ向けた研究が着実に進んでいる。

まとめ

08

肺は機能的にも構造的にもin vitroモデルを形成することは困難と考えられていた。しかしiPS細胞や組織幹細胞などを中心とした幹細胞生物学の進展と、組織・生体工学を加えた様々な解析技術を組み合わせることにより、生体模倣性の高いヒト肺モデルを作製することが可能になってきた。新型コロナウイルスのパンデミックに伴い世界中で行われているメカニズム研究や創薬の現場において、これらヒト肺モデルが当たり前のように使用されており、病態理解や薬剤開発を行う上で欠かせないツールとなった。今回のパンデミックを契機に、ヒト肺モデルの生体模倣性向

上や実用化がさらに加速していくと考えられる。例えば将来的には”clinical trial in a dish”のような、臨床試験機能を置き換えることや個別化医療を実現するツールとして、あるいは再生医療など細胞治療への応用などが期待される。

参考文献

1. K. J. Travaglini, A. N. Nabhan, M. A. Krasnow, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020, 587, 619-625.
2. A. McCarron, D. Parsons, and M. Donnelly. Animal and Cell Culture Models for Cystic Fibrosis Which Model Is Right for Your Application? *Am. J. Pathol.* 2021, 191, 2, 228-242.
3. C. Muñoz-Fontela, W. E. Dowling, D. H. Barouch, et al. Animal models for COVID-19. *Nature*. 2020, 586, 509-515.
4. H. S. Bal, and N. G. Ghoshal. Morphology of the terminal bronchiolar region of common laboratory mammals. *Lab Anim.* 1988, 22, 1, 76-82.
5. L. G. Dobbs, M. C. Williams, and R. Gonzalez. Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type I cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type II cells. *Biochim Biophys Acta.* 1988, 970, 2, 146-56.
6. F. V. Goor, S. Hadida, P. Negulescu, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106, 44, 18825-30.
7. D. Gras, A. Bourdin, P. Chanez, et al. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol.* 2012, 129, 1259-1266.
8. S. Gohy, F. M. Carlier, C. Pilette, et al. Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep.* 2019, 9, 17963.
9. X. Li. In vitro toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review. *Toxicol In Vitro.* 2016, 36, 105-113.
10. J. A. Gindele, T. Kiechle, J. Schymeinsky, et al. Intermittent exposure to whole cigarette smoke alters the differentiation of primary small airway epithelial cells in the air-liquid interface culture. *Sci Rep.* 2020, 10, 6257.
11. J. Huang, A. J. Hume, D. N. Kotton, et al. SARSCoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response. *Cell Stem Cell.* 2020, 27, 6, 962-973.
12. E. Sano, T. Suzuki, K. Takayama, et al. Cell response analysis in SARSCoV-2 infected bronchial organoids. *Commun Biol.* 2022, 5, 516.
13. Y. J. Hou, K. Okuda, R. S. Baric, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell.* 2020, 182, 2, 429-446.
14. A. J. Pruijssers, A. S. George, T. P. Sheahan, et al. Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARSCoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Rep.* 2020, 32, 3, 107940.
15. S. Ishikawa and S. Ito. Repeated whole cigarette smoke exposure alters cell differentiation and augments secretion of inflammatory mediators in air-liquid interface three-dimensional co-culture model of human bronchial tissue. *Toxicol In Vitro.* 2017, 38, 170-178.
16. M. Eiraku, K. Watanabe, Y. Sasai, et al. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell.* 2008, 3, 5, 519-532.
17. T. Sato, R. G. Vries, H. Clevers, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009, 459, 262-265.
18. K. Takahashi, K. Tanabe, Mari, S. Yamanaka, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007, 131, 5, 861-872.
19. T. Takebe, K. Sekine, H. Taniguchi, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 2013, 499, 481-484.
20. J. R. Rock, M. W. Onaitis, B. L. M. Hogan, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106, 31, 12771-5.
21. C. E. Barkauskas, M. J. Cronce, B. L. M. Hogan, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest.* 2013, 123, 7, 3025-36.
22. S. Gotoh, I. Ito, M. Mishima, et al. Generation of Alveolar Epithelial Spheroids via Isolated Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2014, 3, 3, 394-403.
23. Y. Chen, S. X. Huang, H. Snoeck, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol.* 2017, 19, 542-549.
24. Y. Korogi, S. Gotoh, T. Hirai, et al. In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids. *Stem Cell Reports.* 2019, 13, 1, 431-440.
25. Y. Yamamoto, S. Gotoh, M. Mishima, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPSC cells in organoids. *Nat Methods.* 2017, 14, 1097-1106.
26. A. Jacob, M. Morley, D. N. Kotton, et al. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell.* 2017, 21, 4, 472-488.
27. S. Konishi, S. Gotoh, M. Mishima, et al. Directed Induction of Functional Multiciliated Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2016, 6, 1, 18-25.
28. H. Katsura, V. Sontake, P. R. Tata, 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, 6, 890-904.
29. N. Sachs, A. Papaspyropoulos, H. Clevers, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* 2019, 38, e100300.
30. D. Huh, B. D. Matthews, D. E. Ingber, et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010, 328, 1662-8.
31. P. Zamprogno, S. Wüthrich, O. T. Guenat, et al. Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Commun Biol.* 2021, 4, 168.
32. C. Xu, M. Zhang, J. Qin, et al. Assessment of Air Pollutant PM2.5 Pulmonary Exposure Using a 3D Lung-on-Chip Model. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020, 6, 3081-3090.
33. K. B. McCauley, F. Hawkins, D. N. Kotton, et al. Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell.* 2017, 20, 6, 844-857.
34. T. Suezawa, S. Kanagaki, S. Gotoh, et al. Modeling of lung phenotype of Hermansky-Pudlak syndrome type I using patient-specific iPSCs. *Respir Res.* 2021, 22, 284.
35. N. Sone, S. Konishi, S. Gotoh, et al. Multicellular modeling of ciliopathy by combining iPSC cells and microfluidic airway-on-a-chip technology. *Sci Transl Med.* 2021, 13, 601.
36. T. Suezawa, S. Kanagaki, S. Gotoh, et al. Disease modeling of pulmonary fibrosis using human pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Stem Cell Reports.* 2021, 16, 12, 2973-2987.
37. X. Yin, L. Riva, S. K. Chanda, et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2021, 34, 2, 108628.
38. S. Ikeo, Y. Yamamoto, S. Gotoh, et al. Core-shell hydrogel microfiber-expanded pluripotent stem cell-derived lung progenitors applicable to lung reconstruction in vivo. *Biomaterials.* 2021, 276, 121031.