

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09217

研究課題名(和文) 肺上皮幹細胞の増殖因子Tweak/Fn14シグナルの検討と再生治療への応用

研究課題名(英文) Roles of TNF-like weak inducer of apoptosis/fibroblast growth factor-inducible 14 signaling in lung epithelial cells during lung regeneration

研究代表者

佐藤 篤靖 (Sato, Atsuyasu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30706677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Fn14とTweakは細胞の増殖過程で重要な因子として考えられており、本研究は再生時における肺幹細胞における役割や、疾患モデルを用いて治療応用の可能性を検討した。急性肺傷害モデルにおいて、これらのノックアウトマウスは修復が遅れるものの長期的には正常に帰することが確認された。次に反復する刺激下においての検討を行うために慢性的な上皮傷害をマウスに対し行い、気道上皮細胞の再生様式を検討したが有意差を得なかったが、早期の治癒起点において重要な役割があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：TNF-like weak inducer of apoptosis and fibroblast growth factor-inducible 14 are recognized as a fundamental factors for cell proliferation. In the present study, we hypothesized that those signaling is critical for lung epithelial regeneration. In acute lung injury model, lacking of those signaling promoted prolonged repair time course, but finally showing good regeneration after lung injury, suggesting a partial important role in the early phase of regeneration, but alternative compensation might be involved in the mechanism.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：Tweak Fn14 肺傷害 再生

### 1. 研究開始当初の背景

近年の研究では、マウス肺において一部のクララ細胞やII型肺胞上皮が幹細胞として肺の傷害後のRegenerationに貢献することがLineage Trace Modelの発展により示されてきた。ナフタレンのマウスへの投与によりCYP2F2の活性からクラブ細胞特異的の傷害が生じる。肺の中にはナフタレン耐性のクラブ細胞の細胞群が存在し、幹細胞機能を有することから気道上皮における再生状況が観察されてきた。クラブ細胞は増殖するほかに線毛上皮細胞に分化する。この増殖と分化のメカニズムはある程度規則性があるが、増殖因子、分化規定因子に関しては不明点である。我々は胎児性転写因子C/EBP $\alpha$ に注目して肺上皮細胞の研究を行ってきた。C/EBP $\alpha$ は胎生期のII型肺胞上皮の成熟に必須の転写因子であり、肺上皮特異的にノックアウトされたマウスではサーファクタントの異常にて生直後に肺傷害を来し死亡する。生後肺における役割は未知であったが、生後にクラブ細胞とII型肺胞上皮細胞に発現するC/EBP $\alpha$ を細胞特異的にノックアウトしたところ、成長、寿命に関して影響を認めなかった。しかしながら、肺傷害を惹起するとノックアウト群では予後不良であり、サーファクタントの分泌傷害を示した。これより先行研究において、C/EBP $\alpha$ は生後肺の成長に不要であるが、傷害時の恒常性維持に必須である(Emergent Functionを有する)事を報告した。C/EBP $\alpha$ は気道上皮のクラブ細胞にても発現するがその役割は不明であった。我々はクラブ細胞特異的にC/EBP $\alpha$ をノックアウトしたマウスに対しナフタレン肺傷害を惹起して再生過程において線毛上皮細胞への分化が低下していることが明らかになった。この結果の解析のため、傷害からの再生機転時期の末梢気道上皮細胞をLaser Micro Dissectionにて単離しマイクロアレイ解析を行い、C/EBP $\alpha$ の誘導するアンチセリンプロテアーゼが上皮細胞局所のセリンプロテアーゼ活性を抑制する結果、クララ細胞が線毛上皮細胞に分化する事を見出した。局所のセリンプロテアーゼ活性による増殖誘導メカニズムは不明である。セリンプロテアーゼ活性により惹起される局所的シグナルが細胞増殖と分化に関与するという仮説を立てた。さらに解析のなかで細胞におけるFn14の発現が増強していることに注目し、リガンドである膜型m-Tweakがプロテアーゼによりフリーフォームに活性化され、Tweak/Fn14シグナルが気道上皮細胞再生、特に増殖過程において重要であると仮定し、本研究を企画した。

### 2. 研究の目的

1) 肺傷害モデルにおけるTweak/Fn14の役割の検討

Tweak/Fn14シグナルが気道上皮傷害からの再生時における肺幹細胞の増殖シグナルとして働くことを示す。

2) Tweak/Fn14の活性機序の検討

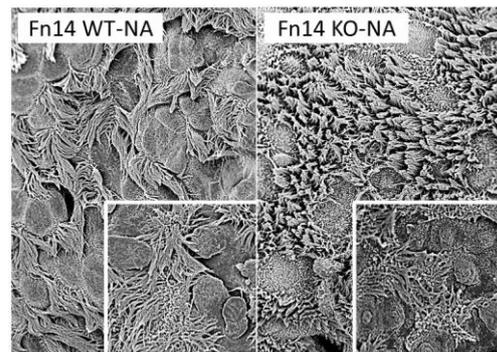


図1: ナフタレン肺傷害後14日目のマウス気道上皮(走査電子顕微鏡写真)。左(対照群)、右(Fn14KO)。KO群においてナフタレン肺傷害後の細胞数の回復は順調であるが、線毛長においては対照群に比し短く、扁平であることから傷害からの回復過程にあることを示唆している。

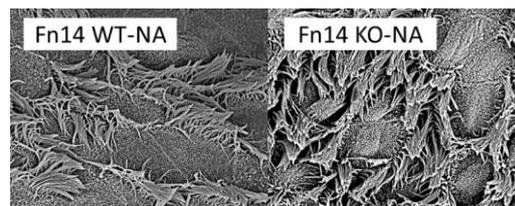


図2: ナフタレン肺傷害後56日目の気道上皮(走査電子顕微鏡写真)。第14日ち異なりノックアウト群においても線毛長は回復し、成熟した線毛気道上皮細胞が観察される。

膜結合型m-Tweakが再生時のセリンプロテアーゼ活性により活性化されると仮定しており、傷害時におけるセリンプロテアーゼ活性を検討する。

### 3. 研究の方法

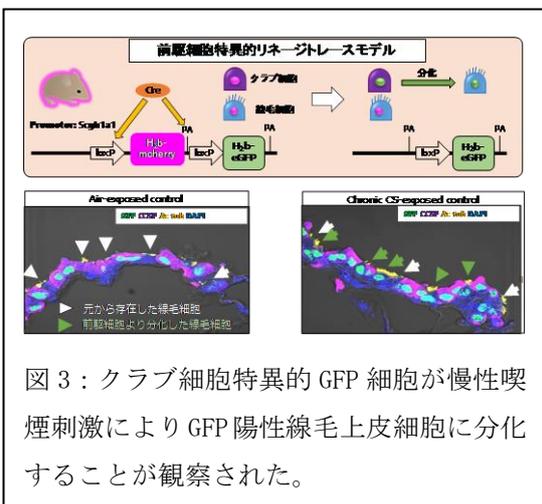
1) TweakKOマウス、Fn14KOマウスを用いた肺傷害モデルの検討から、再生様式を検討する。傷害モデルとしてナフタレン肺傷害、喫煙暴露モデルを用いた。

2) 肺傷害後の再生期および慢性傷害期における上皮上のプロテアーゼ活性を可視化、組織中の活性を定量し再生、傷害におけるバランスとFn14、Tweakの役割を検討する。

### 4. 研究成果

【結果①】ナフタレン肺傷害モデルを作成し最盛期におけるTweak/Fn14の役割を検討した。先行研究では再生期においてFn14は細気管支領域にて高発現をしており、我々はFn14KO、TweakKOマウスにおけるナフタレン肺傷害後の表現型を検討した。先行研究で示

した通り傷害5日後におけるクラブ細胞の再生はKOマウスでは野生型に劣っており、再生過程への関与が示唆された。その後詳細な時系列を解析から、14日後の回復状態ではCCSP、FoxJ1による免疫染色にて末梢気道の細胞数には有意差を認めなかった。しかしながら、傷害14日目での走査電子顕微鏡で観察されるようにFn14ノックアウトマウスでは線毛長が短く扁平な形態であった(図1)。細胞数は正常であるが、細胞の成熟としては途上にあると考えられた。一方、56日後にはFn14ノックアウトマウスはコントロールマウスと同様に回復した(図2)。これより、Fn14は早期回復に関与している可能性があり、代償再生メカニズムなどの存在から最終的には有意差を認めなかったものの、回復遅延などに関与する可能性はある。Precision Cut Lung Sliceを用いたex vivo研究により再現性を検討したが同様であった。これより再生の遅延を認めるものの長期には代替的な機能により再生が完了することが示唆された。一定の関与をする事が明らかとなり、刺激を繰り返すモデル、つまりは、慢性刺激モデルにより再生遅延に障害が生じると仮定し、週5日間、24週間の喫煙暴露実験を行った。その背景実験として、我々はLineage Trace遺伝子改変マウスを用いてクラブ上皮細胞が線毛上皮細胞に分化した際に核内のGFPにて認識できるマウスを作成し慢性喫煙暴露を行った。このモデルにおいて半年間の喫煙暴露後にGFP陽性線毛上皮細胞が多く観察され、上皮のturnoverの存在を証明することに初

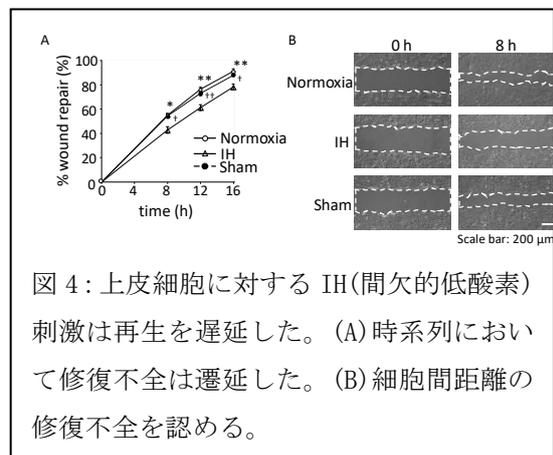


めて成功した(図3)。以上より、Fn14やTweakシグナルが傷害を繰り返す慢性喫煙刺激下に重要であると仮定し、ノックアウトマウスとコントロールマウスに対し喫煙暴露を半年間行い観察した。**【結果②】**慢性喫煙後肺傷害におけるFn14の発現とプロテアーゼ活性を検討した。ナフタレン肺傷害後の末梢気道組織をレーザーマイクロダイセクションにて抽出しマイクロアレイ解析を先行研究にて行い、末梢気道における遺伝子発現の検討では、

*Tnfsfr12a*の発現は増殖・分化のピークである傷害3日後には2.6倍となっていた。同様に喫煙暴露3か月後の末梢気道組織をレーザーマイクロダイセクションにて抽出し、マイクロアレイにて発現の検討を行ったが、上昇を認めなかった。同様にノックアウトマウスの気道上皮表現型もコントロールマウスと差異なく、上皮再生の恒常性は保たれていた。Tweakノックアウトマウスに関しても同様であった。慢性喫煙下における気道上皮傷害のターンオーバーには関与が乏しい結果となった。喫煙暴露御組織におけるプロテアーゼ活性はカゼイン基質の反応により蛍光標識し可視化した。これらの活性はセリンプロテアーゼ阻害剤BPTIにて抑制され、気道上皮におけるプロテアーゼ活性はセリンプロテアーゼと考えられる。しかしながら、Tweakシグナルは増強されて可能性を示唆したが、出口である再生の遅延が観察されなかったことより次の実験を行った。

**【結果③】**喫煙暴露実験の結果を受けて、再生の遅延に酸化ストレスが関与し、Fn14シグナルの関与そのものを凌駕しようと仮定した。

気道上皮細胞BEADS2Bに対してwound-healing実験を間欠的低酸素下にて行った。間欠的低酸素はミトコンドリアよりの酸化ストレスを誘導し、アクチン線維の極性に変化をもたらすことを証明した(図4、引用文献1)。この反応は転写因子非依存的に起こり、受容体に関連するシグナルよりも早いフェーズで認められた。このように酸化ストレ



ス下では複雑な修復様式が考えられるが、生体内ではさらに複雑な様式が推察され、慢性刺激下での事象を一つのシグナルで論じることが困難であった。以上よりFn14/Tweakシグナルは急性肺傷害後の気道上皮再生において早期治癒に寄与している可能性が示唆された。慢性期における傷害と修復様式についてさらなる検討が必要である。生体には様々な再生メカニズムや代償機構が存在し恒常性を保っており、多様なものの一つとして本研究結果が含まれると考えられ、今後も研究を継続したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 引用文献

1. Hamada S, Sato A, Hara-Chikuma M, Satooka H, Hasegawa K, Tanimura K, Tanizawa K, Inouchi M, Handa T, Oga T, Muro S, Mishima M, Chin K., Role of mitochondrial hydrogen peroxide induced by intermittent hypoxia in airway epithelial wound repair in vitro. *Exp Cell Res*. 2016Apr16.

### [雑誌論文] (計5件)

1. Nakatsuka Y, Vandenbon A, Mino T, Yoshinaga M, Uehata T, Cui X, Sato A, Tsujimura T, Suzuki Y, Sato A, Handa T, Chin K, Sawa T, Hirai T, Takeuchi O. Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia. *Mucosal Immunol*. 2018 Apr 25
2. Hasegawa K, Sato A, Tanimura K, Uemasu K, Hamakawa Y, Fuseya Y, Sato S, Muro S, Hirai T. Fraction of MHCII and EpCAM expression characterizes distal lung epithelial cells for alveolar type 2 cell isolation. *Respir Res*. 2017 Aug 7;18(1):150.
3. Tsao PN, Matsuoka C, Wei SC, Sato A, Sato S, Hasegawa K, Chen HK, Ling TY, Mori M, Cardoso WV, Morimoto M. Epithelial Notch signaling regulates lung alveolar morphogenesis and airway epithelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 19;113(29):8242-7.
4. Hamada S, Sato A, Hara-Chikuma M, Satooka H, Hasegawa K, Tanimura K, Tanizawa K, Inouchi M, Handa T, Oga T, Muro S, Mishima M, Chin K., Role of mitochondrial hydrogen peroxide induced by intermittent hypoxia in airway epithelial wound repair in vitro. *Exp Cell Res*. 2016Apr16. S0014-4827(16)30075-1
5. Tanimura K, Sato S, Fuseya Y, Hasegawa K, Uemasu K, Sato A, Oguma T, Hirai T, Mishima M, Muro S. Quantitative Assessment of Erector Spinae Muscles in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Novel Chest Computed Tomography-derived Index for Prognosis *AnnAm Thorac Soc*. 2016 Mar;13(3):334-41.

### [学会発表] (計2件)

1. 喫煙暴露マウスにおける急性肺傷害後上皮再生機能の検討  
上榎 潔, 佐藤 篤靖, 長谷川 浩一, 濱川 瑤子, 佐藤 晋, 室 繁郎  
第57回日本呼吸器学会学術講演会
2. 上榎 潔, 佐藤 篤靖, 谷村 和哉, 長谷川 浩

一, 濱川 瑤子, 佐藤 晋, 三嶋 理晃, 室 繁郎  
マウス慢性喫煙刺激における線毛上皮細胞傷害と C/EBP  $\alpha$  の役割  
第56回日本呼吸器学会学術講演会

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 篤靖 (Atsuyasu Sato)

京都大学医学研究科・呼吸器内科学・助教

研究者番号: 30706677