

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15323

研究課題名（和文）肺組織幹細胞ニッチにどこまで迫ることができるか

研究課題名（英文）Approaches to mimic lung tissue stem cell niches

研究代表者

別役 智子（Betsuyaku, Tomoko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：60333605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、中枢気道、末梢肺レベルそれぞれの解剖学的部位固有の組織幹細胞の自己増幅能、分化能の評価系を確立し、標準化に成功した。さらに、中枢気道、末梢肺レベルそれぞれの解剖学的部位固有の幹細胞に適した組織幹細胞ニッチを作成し、可能な限り簡略化し、汎用化のためのプロトコルを確立した。すでに論文化しており、本方法が、汎用化されれば、肺の発生、老化、癌化の機序に関する研究が促進され、肺組織幹細胞を利用した再生医療の発展にもつながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have established several methods to optimize the culture system of lung stem cells isolated central and peripheral lung epithelium. Especially, our novel finding is to find the method to culture stem cells with fibroblasts as a niche. Our new methods published will be widely used for further investigation of lung stem cells and contribute to lung regenerative medicine.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：再生医療 肺上皮幹細胞 線維芽細胞 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

多くの難治性の呼吸器疾患では、気道、肺胞レベルでの細胞傷害が存在する。マウスやヒトでは、肺の修復や成長に携わる組織幹細胞が肺の各領域に存在することが示唆されており、気管上皮における基底細胞、細気管支におけるクララ細胞、細気管支肺胞境界領域の Bronchioalveolar stem cells (BASCs)、肺胞領域の I I 型肺胞上皮細胞が幹細胞の役割を担うと考えられている。近年、細胞傷害後の組織修復過程や、肺の成長、癌化において組織幹細胞の重要性が示唆されている。

幹細胞ニッチ (stem cell niche) とは組織幹細胞が見出される微小環境である。組織幹細胞 は生涯を通して未分化状態を維持するが、*in vitro* での培養に伴って増殖能が低下することが知られている。このことから、幹細胞がその性質を維持するためには適切な環境が必要であると考えられている。“3D colony formation assay” は *in vitro* で幹細胞の自己増幅能、分化能などを評価する培養系であるが、培養系として成功させるには *in vivo* を模倣する適切な人工的ニッチが必要である。同時に、ニッチによる組織幹細胞の動態制御を理解することは、組織幹細胞を様々な治療戦略に応用するために必須である。しかし、肺組織幹細胞ニッチの研究は、心臓や皮膚の組織幹細胞ニッチ研究成果の蓄積からは大きく遅れている (Wagers AJ, *Cell Stem Cell*, 2012)。現状では、世界中でも少数の研究室、研究者が、それぞれ独自の幹細胞ニッチを用いた *in vitro* の肺組織幹細胞研究を報告しており、それらの結果の比較や再現することは容易ではない。これらの技術的ハードルの高さが、肺の組織幹細胞研究に新規に取り組もうとする研究者の妨げとなっている。

2. 研究の目的

- 1) 中枢気道、末梢肺レベルそれぞれの

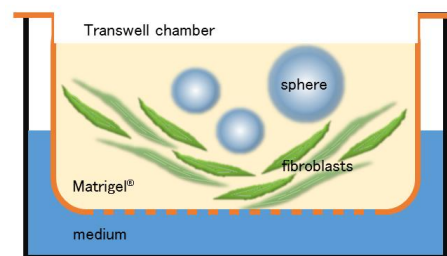
解剖学的部位固有の組織幹細胞の自己増幅能、分化能の評価系を確立し、標準化すること

- 2) 中枢気道、末梢肺レベルそれぞれの解剖学的部位固有の幹細胞に適した組織幹細胞ニッチを作成し、可能な限り簡略化し、汎用化のためのプロトコルを確立すること

3. 研究の方法

- 1) 中枢気道、末梢肺組織からの組織幹細胞の自己増幅能、分化能の評価系の確立

末梢肺上皮細胞分離については、中枢気道と同様に dispase を用いて細胞を単離し、AutoMacs システムを用いて CD45、および CD31 陽性細胞 (血球系細胞、血管内皮細胞) を除去したのち、MoFlo sorter (Beckman Coulter) を用いて、EpCAM 陽性の上皮細胞を選択する方法を試行する。中枢、または末梢肺上皮細胞浮遊液を Matrigel (BD) と混和し、transwell のインサート上の chamber に撒く (下図)。



培養開始後、7、14、21 日目に蛍光、位相差顕微鏡 (Leica, DMI6000B microscope) 下で、インサートごとのコロニー数、コロニー径を測定する。Matrigel 3D コロニーの組織学的検討のため、培養終了時に、transwell のインサートからコロニーを含む Matrigel を下面フィルターごと切り取り、Histogel を用い固相化する。さらにパラフィン包埋後、薄切し病理組織検討に供した。

- 2) 中枢気道、末梢肺組織幹細胞ニッチ形成に必要な液性因子の同定と“添加カクテル

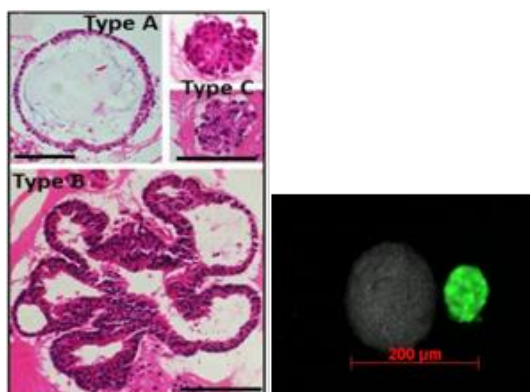
化”

- ① FGFs についての効果を末梢肺組織幹細胞培養系で確認した。
- ② 従来、胎児幹細胞増殖、多臓器幹細胞ニッチに関して報告されている増強因子の添加により効果を確かめることの2点について、Leukemia Inhibitory Factor (LIF)、transforming growth factor-beta superfamily、type I activin receptor-like kinase-5 inhibitor (Alk5-I) SB-431542、Rho-associated protein kinase inhibitor (ROCK-I) Y-27632 の効果を検討した。
- ③ 末梢肺組織幹細胞ニッチにおける支持細胞の選択と供給可能な“標準化”

成熟マウスの肺線維芽細胞を支持細胞とする方法に挑戦した。末梢肺上皮細胞：線維芽細胞比の最適化の検討を行った。

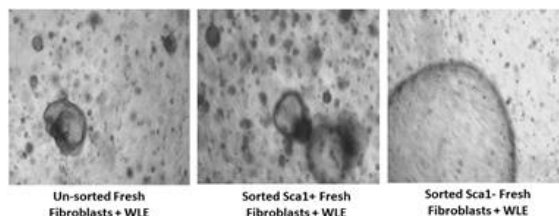
4. 研究成果

1) I 型肺上皮細胞由来の細胞が green fluorescence protein (GFP) の発現で識別可能な、Sftpc/GFP mice (CBA/Ca x C57BL6J) を Duke 大学の Brigid Hogan 博士から供与され、本研究に用いることが可能になった。その結果、小型の内腔を有さない type C 型のコロニーが肺胞上皮系であることがあきらかになった。(右図：左側の大型 Type A コロニーは GFP 陰性であるが、右側の小型 Type C コロニーは GFP 陽性すなわち Sftpc を発現し、II 型肺上皮細胞に分化していることを示す。)



2) 末梢肺上皮細胞：線維芽細胞比の最適化の検討

上皮細胞数を一定にし、線維芽細胞の割合を上げる我々の実験では、コロニー数、コロニーサイズともに、上皮と線維芽細胞の比を 1:1 (C) にする条件が最適であった。1:5、1:10 と線維芽細胞をさらに増やしてもそれ以上のコロニー数増加、サイズ増大は認めず、むしろ細胞数過多によるアポトーシスを誘導した。さらに、同一個体内での肺線維芽細胞の多様性に注目し、FACS を用いて線維芽細胞を細胞表面マーカー sca-1 陽性、陰性に分離し、上皮幹細胞支持機能の差異を検討した。下図に示すように、正常肺から採取した分離前の線維芽細胞は前頁に示す type A, B, C すべての種類のコロニーを支持するのに対し、sca-1 陰性線維芽細胞は type A, B のコロニーを支持するが、type C (肺胞上皮系) のコロニーを支持することができなかった。一方、Sca-1 陽性線維芽細胞は type C (肺胞上皮系) のコロニーを支持することが判明した。



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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1: Kuroda A, Hegab AE, Jingtao G, Yamashita S, Hizawa N, Sakamoto T, Yamada H, Suzuki S, Ishii M, Namkoong H, Asakura T, Ozaki M, Yasuda H, Hamamoto J, Kagawa S, Soejima K, Betsuyaku T. Effects of the common polymorphism in the human aldehyde

dehydrogenase 2 (ALDH2) gene on the lung. Respir Res. 2017 ;18:69. (査読有)

2: Gao C, Fujinawa R, Yoshida T, Ueno M, Ota F, Kizuka Y, Hirayama T, Korekane H, Kitazume S, Maeno T, Ohtsubo K, Yoshida K, Yamaguchi Y, Lepenies B, Aretz J, Rademacher C, Kabata H, Hegab AE, Seeberger PH, Betsuyaku T, Kida K, Taniguchi N. A keratan sulfate disaccharide prevents inflammation and the progression of emphysema in murine models. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017;312:L268-L276. (査読有)

3: Hegab AE, Kameyama N, Kuroda A, Kagawa S, Yin Y, Ornitz D, Betsuyaku T. Using Micro-computed Tomography for the Assessment of Tumor Development and Follow-up of Response to Treatment in a Mouse Model of Lung Cancer. J Vis Exp. 2016;(111). (査読有)

4: Takahashi S, Ishii M, Namkoong H, Hegab AE, Asami T, Yagi K, Sasaki M, Haraguchi M, Sato M, Kameyama N, Asakura T, Suzuki S, Tasaka S, Iwata S, Hasegawa N, Betsuyaku T. Pneumococcal Infection Aggravates Elastase-Induced Emphysema via Matrix Metalloproteinase 12 Overexpression. J Infect Dis. 2016; 213: 1018-30. (査読有)

5: Hegab AE, Arai D, Gao J, Kuroda A, Yasuda H, Ishii M, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T. Mimicking the niche of lung epithelial stem cells and characterization of several effectors of their in vitro behavior. Stem Cell Res. 2015;15:109-21. (査読有)

6: Arai D, Hegab AE, Soejima K, Kuroda A,

Ishioka K, Yasuda H, Naoki K, Kagawa S, Hamamoto J, Yin Y, Ornitz DM, Betsuyaku T. Characterization of the cell of origin and propagation potential of the fibroblast growth factor 9-induced mouse model of lung adenocarcinoma. J Pathol. 2015; 235: 593-605. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1: Ahmed E. Hegab, Mari Ozaki, Tomoko Betsuyaku.

Effect of calorie restriction on lung stem cells and its interaction with aging.

アメリカ胸部疾患学会 ポスター発表

2017年5月21-24日 ワシントンDC アメリカ合衆国

2: Akihiro Tsutsumi, Ahmad E. Hegab, Mari Ozaki, Hidehiro Irie, Naofumi Kameyama, Shotaro Chubachi, Tomoko Betsuyaku

Lung epithelial stem cells in the development of emphysema in mice.

アメリカ胸部疾患学会 ポスター発表

2017年5月21-24日 ワシントンDC アメリカ合衆国

3: 堤昭宏、Ahmad E. Hegab、入江秀大、亀山直史、中鉢正太郎、別役智子.

肺気腫発症のメカニズムにおける肺上皮幹細胞の検討第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 ポスター発表 2017年4月21-23日 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

6. 研究組織

1) 研究代表者

別役 智子 (BETSUYAKU Tomoko)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 60333605

(2) 研究分担者

Hegab Ahmed (HEGAB Ahmed)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：00507915