

令和元年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10074

研究課題名（和文）肺血管幹細胞の同定と肺血管発生における分子機構の解明

研究課題名（英文）Roles of stem cell antigen-1 in the pulmonary endothelium

研究代表者

前田 潤（Maeda, Jun）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・専任講師

研究者番号：00255506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：マウス成獣肺組織を用いて、幹細胞表面マーカーSca-1陽性かつ血管内皮細胞表面マーカーCD31陽性細胞の発現様式の解析を行った。Sca-1陽性・CD31陽性細胞は、肺胞壁および肺胞間の血管壁に発現していた。肺組織分散細胞群に対して蛍光ソーティングを行い、Sca-1陽性・CD31陽性細胞を分離、内皮細胞用培地で培養したところ、樹枝状の管腔構造へ分化し、培養細胞数に比例して増加した。一方、Sca-1陰性・CD31陽性細胞の同条件下で培養ではさらに多くの管腔構造へ分化した。Sca-1は肺血管幹細胞に発現している可能性があるが、マウス成獣肺では血管内皮細胞の血管新生を抑制する機能があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、肺組織における正常な肺血管内皮への分化する幹細胞、すなわちガス交換を担う気道系（肺胞）と血管系（肺毛細血管網）のネットワークの発生および再生機構の少なくとも一部が解明され、肺血管幹細胞分画が特定された。肺血管低形成、肺動静脈奇形、肺動脈性高血圧症などの肺血管疾患は、単独でも有効な治療法が少なく、また先天性心疾患に合併すると、その予後を不良にする。本研究の成果は、これら難治性肺血管疾患に対して、肺血管幹細胞と肺血管発生の分子機構を応用した新たな再生医療や内科的治療の分子標的検索のための基礎的知見として、臨床にもつながる意義がある。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the temporospatial expression pattern of adult murine pulmonary cells both positive for stem cell antigen, Sca-1 and endothelial cell marker, CD31. The cells positive for both Sca-1 and CD31 were expressed in alveolar wall and vascular wall in alveolar interstitial space. Fluorescent antigen cell sorting using anti-Sca-1 and anti-CD31 antibodies could separate a subset of both antigen-positive cells. These cells were differentiated to characteristic luminal structure, suggesting potential for differentiation to pulmonary vascular cells. However, the Sca-1-negative and CD31-positive cells were more robustly able to give rise to vascular cells. These results suggested that Sca-1 could be expressed in pulmonary vascular stem cells but might repress the angiogenesis in adult murine lungs.

研究分野：小児循環器学、心臓大血管発生学

キーワード：肺血管幹細胞 肺血管形成 幹細胞マーカー

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患に伴う肺血管構築異常・低形成や、肺動脈性肺高血圧症などの肺血管疾患は、既存の治療に抵抗性であることが多く、ブレイクスルーとして、肺血管再生医療の導入が不可欠と考えられる。肺血管発生を制御し、再生医療を行うためには、肺血管幹細胞および肺血管の分化、成熟についての知見が必須であるが、これらの分野の研究はほとんど進んでいない。

肺の発生は、内胚葉由来の前腸から肺芽が分岐することによって開始する。肺芽から偽腺状期、細管期、終末嚢期と発生が進むにつれ、気管支、細気管支、終末細気管支へと枝分かれした気道系が構築され、ガス交換を担う肺胞に連なり、成熟した肺が形成される。この気道系の発生と同時に中胚葉由来の間葉系細胞および中皮細胞により、肺血管系および間質が形成される。偽腺状期に肺芽周囲にある中胚葉由来の原腸間葉系細胞によって肺内に原始血管叢が発生し、伸長・分枝・接続して血管内皮細胞による成熟血管網が形成される。肺発生における幹細胞研究は、他の臓器に比べて遅れており、2005年に bronchioalveolar stem cells が気道上皮に分化する幹細胞として初めて報告された (Kim CB, et al 2005)。この幹細胞は表面マーカーとして Sca-1 と CD34 を発現しており、その後、骨・軟骨、平滑筋、線維芽細胞などに分化する肺間葉系多能性幹細胞の性質を有することが報告された (Summer R et al, 2007, McQualter JL, 2009)。これらは肺再生医学に繋がる画期的な成果であるが、肺幹細胞の系譜に特異的な表面マーカーが特定されておらず、また、幹細胞の分化誘導の条件も確立していないため、肺血管再生医療への応用は進んでいない。

私たちは肺血管系の発生に関与する幹細胞の探索を目的として、マウス胎仔および新生仔の肺から CD31 陽性肺血管内皮細胞を単離し、RNA マイクロアレイ法によって肺発生の時期によって発現が変化する遺伝子群を解析した。その結果、幹細胞表面マーカーとして知られている Sca-1 が発生過程の肺に発現すること、またその発現が胎生 14 日と比較して生後 2 日の肺組織で約 20 倍に上昇していることを発見した。Sca-1 は活性型 T 細胞で増加する膜タンパク質で、その分子機能についてはいまだ不明な点が多い。最近、マウス成獣の心臓から表面マーカーとして、Sca-1 および血管内皮細胞マーカーである CD31 を用いて単離された細胞 (Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞) が、成熟した血管内皮細胞に分化し、心筋梗塞領域での血管新生を促進することが報告されている (Liang SX et al, 2011)。以上の結果から、肺血管系においても Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞が幹細胞として機能し、肺血管内皮前駆細胞ないし間葉系細胞を形成する可能性が考えられる。私たちは、肺組織から単離した Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞の性質や分化様式を明らかにすることにより、肺再生医学につながるような肺血管系を形成する幹細胞を特定し、肺血管発生における分子機構を解明することを目的として本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

細胞表面マーカー Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞が、肺血管幹細胞として機能し、肺血管内皮前駆細胞ないし、肺間葉系細胞を形成することを明らかにすることを目的とした。マウス胎仔から成獣における Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞の発現様式と組織特異的マーカーを観察し、Sca-1 と CD31 を指標に肺血管幹細胞の候補を特定する。

3. 研究の方法

(1) 肺発生における Sca-1 の発現様式の検討

マウス胎仔および成獣の肺組織を用いて抗 Sca-1 抗体、抗 CD31 抗体による免疫組織化学法を行い、Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞の時間的・空間的発現様式を共焦点顕微鏡で観察した。血管内皮細胞や血管平滑筋、血管周皮細胞、肺胞上皮細胞との関連性について、さらに他の血管内皮細胞特異的マーカー (vWF) に対する抗体を用いた共染色を行い確認した。以上について胎生 14 日 (偽腺状期)、生後 2 日 (肺胞期)、成獣 (週齢 8) のパラフィン包埋肺組織切片で比較した。

(2) 表面マーカーを用いた肺血管幹細胞の分画

胎生 14.5 日、生後 2 日および成獣マウス肺を摘出し、用手的にハサミで細断した後、ディスペラーゼおよびコラゲナーゼ処理を行い、肺分散細胞を得た。これらを抗 Sca-1、CD31、CD45 (造血細胞マーカー) 抗体と蛍光 2 次抗体でラベルし、CD45 陰性細胞群を蛍光活性化セルソーティング (FACS) により、Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞、Sca-1 陽性・CD31 陰性細胞、Sca-1 陽性 CD31 陰性細胞の各分画をモフロソーター®を用いて単離した。

(3) 肺血管幹細胞の自己複製能、分化能、血管新生能の検討

上記(2)で得られた Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞、Sca-1 陽性・CD31 陰性細胞、Sca-1 陽性 CD31 陰性細胞を、内皮細胞用培地 (内皮細胞増殖 2 キット®) に懸濁し、24 ウェル培養皿上に 3 次元培養が可能なマトリゲル®を置き、細胞増殖およびコロニー形成能、血管分化観察した。

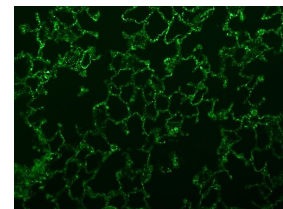


図 1 成獣マウス肺組織における Sca-1 発現

4. 研究成果

(1) 肺発生における Sca-1 の発現様式の検討

Sca-1 は肺血管内皮及び肺胞壁にわたり発現し、胎生 14.5 日に比して生後 2 日および成獣肺において発現が上昇していた(図 1)。また、Sca-1 分布は、CD31 の発現分布と部分的に一致し、肺胞壁および肺胞間の血管内皮に共発現していた。別の血管内皮細胞マーカーである vWF を用いた検討では、CD31 と同様に、Sca-1 と vWF の発現は一部オーバーラップしていた(図 2)。

(2) 表面マーカーを用いた肺血管幹細胞の分画

Sca-1 および CD31 を蛍光標識して FACS 解析を行い、胎生 14 日、生後 2 日および成獣マウスから肺分散細胞を得た。Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞分画は胎生期より出生後にかけて増加した(図 3)。

(3) 肺血管幹細胞の自己複製能、分化能、血管新生能の検討

FACS 解析を繰り返し行い、各分画細胞の単離を試みたが、胎生 14.5 日、生後 2 日の Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞回収率が低く、以後の実験は成獣肺組織を用いて行った。成獣肺組織の FACS 解析では 23.4% が Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞であった(図 4)。

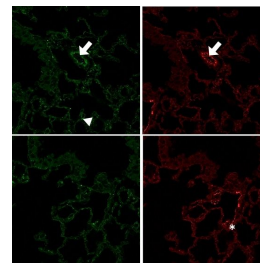


図 2 成獣マウス肺組織における Sca-1 および vWF 発現
矢印: Sca-1 と vWF を共発現する血管細胞 矢頭: Sca-1 発現細胞 * : vWF 発現細胞

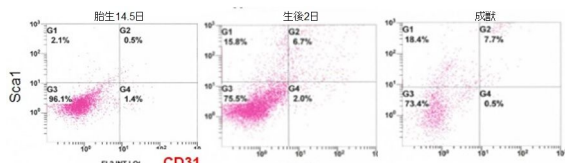


図 3 成獣マウス肺組織における Sca-1 および CD31 発現細胞分画
Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞(右上の分画)は生後に発現が増加

Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞を単離した後、マトリゲル上で増殖し、培養 4 日目頃から tube formation、すなわち樹枝状の管腔構造を形成した。また、培養細胞数に比例して管腔構造の増加を認めた。一方、Sca-1 陰性・CD31 陽性細胞はさらに多くの管腔構造へ分化した(図 5)。また、Sca-1 陽性・CD31 陰性細胞は、培養皿に固着し、線維芽細胞様の増殖を示した(図 6)。

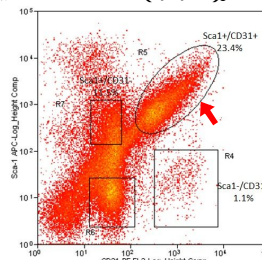


図 4 成獣マウス肺組織における Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞(矢印)

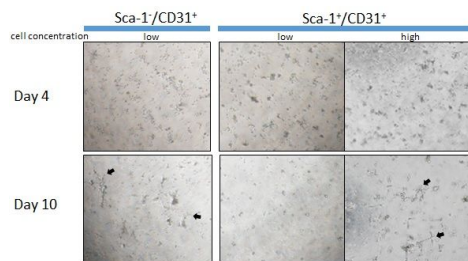


図 5 成獣マウス肺組織における Sca-1 陰性・CD31 陽性細胞と Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞の形態
管腔形成(矢印)は、Sca-1 陰性細胞で陽性細胞より多く認められる。培養細胞数を増加させると(high) Sca-1 陽性細胞でも管腔形成が認められる。

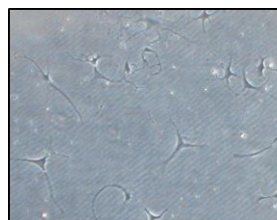


図 6 成獣マウス肺組織における Sca-1 陽性・CD31 陰性細胞の形態
培養ウエル表面に接着して増殖

以上より、Sca-1 は肺血管幹細胞に発現している可能性があるが、マウス成獣肺においては、血管内皮細胞の血管新生を抑制する機能があると考えられた。

(4) 研究成果の位置づけ、今後の展望

Sca-1 陽性・CD31 陽性細胞が肺血管幹細胞候補であるという仮説の下に本研究を開始したところ、生後 Sca-1 は血管新生には抑制的に機能するという解析結果が得られた。これは、予想に反して、Sca-1 が肺血管の分化に抑制的に機能する可能性を示唆するものである。私たちの RNA マイクロアレイを用いた先行実験で、マウス肺発生の過程で発現が変化する遺伝子群が同定され、その中でも Sca-1 は幹細胞表面マーカーであること、生後早期にダイナミックに発現が増加することから肺血管幹細胞の有力な候補と考えたが、研究結果からは肺血管発生には他の分子ネットワークの関与も考えられた。今後は、マイクロアレイ法で得られた他の遺伝子群についても検討を行う必要がある。現在肺血管幹細胞はいまだ明らかにされておらず、本研究の発展は、現代医療では予後不良である先天性肺血管低形成疾患や肺高血圧症における再生医療や、分子標的薬の開発への端緒となり得る。

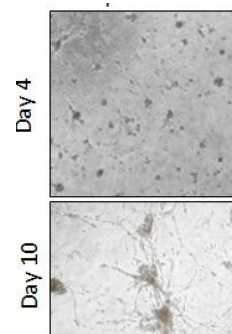


図 7 成獣マウス肺組織における Sca-1 陽性・CD31 陰性細胞の分化
線維芽細胞様の網目状ネットワークを形成

< 引用文献 >

Kim CB, Jackson EL, Woolfenden AE et al Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell 2005; 121: 823-835
 Summer R, Kotton DN, Liang S et al Embryonic lung side population cells are hematopoietic and vascular precursors. Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 33: 32-40
 McQualter JL, Brouard N, Williams B et al Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the Sca-1 positive cell fraction. Stem Cells 2009; 27: 623-633
 Liang SX, Khachigian LM, Ahmadi Z et al In vitro and in vivo proliferation, differentiation and migration of cardiac endothelial progenitor cells (SCA1+/CD31+ side-population cells). J Thromb

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shibata A, Uchida K, Kodo K, Miyauchi T, Mikoshiba K, Takahashi T, Yamagishi H. Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension via calcium signaling and apoptosis. Heart Vessels 査読有 2019 34:724-734. doi: 10.1007/s00380-018-1304-4. Epub 2018 Nov 2

〔学会発表〕(計 1 件)

Maeda J, Uchida K, Iwashita N, Yoshida Y, Yasuhara J, Shibata A, Kodo K, Yamagishi H. Identification of pulmonary vascular progenitor cell populations from developing lungs. The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease 2017

〔図書〕(計 1 件)

Maeda J, Uchida K, Iwashita N, Yoshida Y, Yasuhara J, Shibata A, Kodo K, Yamagishi H, Nakanishi T, Baldwin SH, Fineman JR, Yamagishi H (eds). Springer-Nature Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary hypertension. Proceeding of Roles of stem cell antigen-1 in the pulmonary endothelium. 2019 in press

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内田 敬子

ローマ字氏名：UCHIDA, Keiko

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：保健管理センター（日吉）

職名：講師

研究者番号（8桁）：50286522

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山岸 敬幸

ローマ字氏名：YAMAGISHI, Hiroyuki