

令和元年5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16053

研究課題名(和文)末梢肺上皮幹細胞の基礎的研究

研究課題名(英文) Characterization of distal airway stem-like cells expressing N-terminally truncated p63 and thyroid transcription factor-1 in the human lung

研究代表者

田中 悠祐 (Tanaka, Yusuke)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70792125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト正常末梢肺組織から分離・培養した上皮細胞をHuman Lung (HuL)細胞と命名しその解析を行った。HuL細胞はdelta Np63+, KRT5+ (基底細胞マーカー), TTF-1+, KRT7+ (肺胞上皮マーカー)と両方の性質を持つ未熟な上皮細胞であり, 3次元培養及びマウスへの移植実験によりHuL細胞が細気管支だけでなく肺胞へ分化することを示した。さらにヒト肺組織では末梢気道領域にHuL細胞と同様の表現型を示す細胞の存在を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器領域には, 特発性肺線維症や慢性閉塞性肺疾患など根本的な治療法が存在しない慢性疾患が多く, iPS細胞で注目を集める“細胞治療”が将来的にこれら呼吸器領域の難病にも導入される可能性がある。肺は領域ごとにそれぞれ異なる上皮細胞が存在しているが, そのすべてに分化可能な上皮幹細胞の存在は明らかになっていなかった。本研究においてHuL細胞は末梢肺組織の複数部位の上皮細胞を再生しうる上皮幹細胞であることを明らかにすることができ, 将来的に再生治療に使用しうる細胞と期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that human lung epithelial (HuL) cells, derived from normal, peripheral lung tissue, in monolayer, mostly express both the N-terminally truncated isoform of p63 (delta Np63), a marker for airway basal cells, and thyroid transcription factor-1 (TTF-1), a marker for alveolar epithelial cells, even though these two molecules are usually expressed in a mutually exclusive way. Three-dimensionally cultured HuL cells differentiated to form bronchiole-like and alveolus-like organoids. We also uncovered a few bronchiolar epithelial cells expressing both delta Np63 and TTF-1 in the human lung, suggesting that these cells are the cells of origin for HuL cells. Taken together, delta Np63+ TTF-1+ peripheral airway epithelial cells are possibly the human counterpart of mouse DASCs and may offer potential for future regenerative medicine.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：Distal airway stem cell 末梢肺上皮幹細胞 TTF-1 delta Np63 3次元培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸器領域には、特発性肺線維症や慢性閉塞性肺疾患など根本的な治療法が存在しない慢性疾患が多い。iPS 細胞で注目を集める“細胞治療”が、将来的にこれら呼吸器領域の難病にも導入される可能性もあると思われる。ただし正常粘膜内に幹細胞が同定され、その長期培養法も確立している大腸と比較すると肺上皮幹細胞の研究は緒に就いたばかりである。生理的条件下における肺胞領域の恒常性は 2 型肺胞上皮が稀に非対称分裂し 2 型上皮を維持しつつ 1 型肺胞上皮にも分化することで保たれていると考えられる。しかし近年、2 型肺胞上皮とは別個に肺野末梢の上皮幹細胞とも言える細胞が肺内に存在しているとの報告がなされた (Zuo et al. Nature 2015; 616: 616-20.; Vaughan et al. Nature 2015; 616: 621-25.)。これらの論文には、インフルエンザウイルスに感染させたマウス肺を詳細に解析することによって、2 型肺胞上皮や Clara 細胞とは異なる肺野末梢の幹細胞・前駆細胞が活発かつ適切に増殖、移動、分化し、広範に脱落した気管支・肺胞領域の上皮を再生することが詳細に記載されている。しかし同様の細胞がヒトの肺にも存在するか否かは全く不明である。また、それぞれの論文で distal airway stem cells (DASCs) や lineage-negative progenitors と呼称される肺野末梢の幹細胞は、肺胞上皮に分化しうるにもかかわらず、ともに気管支・細気管支の基底細胞に発現する p63 と keratin 5 (Krt5) を発現しているとされている。

当研究室で培養系を確立したヒト正常肺組織由来の上皮細胞 (Human Lung cells; HuL cells と命名した) は、TTF-1 陽性の細胞でありながら、同時に delta Np63 (p40 と呼ばれる) と KRT5 を発現していることを見出した。現在の肺癌の病理診断学においては、TTF-1 は腺癌の、delta Np63 は扁平上皮癌の最も信頼性の高いマーカー分子とされていることを考慮すると、我々の HuL 細胞の発現 profile は極めて例外的である。しかしインフルエンザウイルス感染による上皮障害で、広範に上皮が剥離した細気管支・肺胞領域の上皮を再生するには、活発な増殖能をもちながら適宜細気管支や肺胞上皮に分化可能な幹細胞的性質を有する細胞の存在が必要であることは自明であり、この TTF-1(+)/delta Np63(+) HuL 細胞こそヒトにおける DASCs に相当するものと推察される。

### 2. 研究の目的

将来的に呼吸器領域に細胞治療を導入するための基礎データとすべく、HuL 細胞が肺野末梢の上皮幹細胞に相当する細胞であることを示す。

### 3. 研究の方法

当院呼吸器外科で外科的切除されたヒト正常肺の末梢組織より分離・培養した細胞を Human Lung cells; HuL 細胞, 気管支組織より分離・培養した細胞を Human Bronchial cells; HuB 細胞と命名した。HuL 細胞は delta Np63 及び肺胞上皮マーカー TTF-1 を同時に発現していることを見出した。生理的に delta Np63 と TTF-1 の発現は相互排他的と考えられている。にもかかわらず HuL 細胞が delta Np63 と TTF-1 の両者を発現していることは、HuL 細胞が末梢気道 (細気管支) にも肺胞上皮にも分化しうる細胞であることを示唆している。2 次元・3 次元培養系やマウス肺への移植実験を通じて HuL 細胞こそが線毛上皮、杯細胞、肺胞上皮等へ分化しうる末梢肺上皮幹細胞であるかどうか検証した。

### 4. 研究成果

(1) 2 次元培養系における HuL 細胞は delta Np63<sup>+</sup>、KRT5<sup>+</sup>、TTF-1<sup>+</sup>、KRT7<sup>+</sup> の表現型を示す未熟な上皮細胞である。

HuL 細胞は 2 次元培養を行うと著明な増殖能を示し、およそ 5 回まで継代可能であった。肺胞上皮マーカー TTF-1、KRT7 が陽性でありながら、基底細胞マーカー delta Np63、KRT5 も陽性であった。フローサイトメリーによる解析では、TROP2<sup>+</sup>、ITGA6<sup>+</sup>、PDPN<sup>+</sup>、CD24<sup>low</sup>、CD90<sup>+</sup> であり、未熟な上皮細胞の発現パターンを示した。一方 HuB 細胞は delta Np63、KRT5、KRT7 は明瞭に陽性であったが TTF-1 は陰性であった。

(2) 3 次元培養された HuL 細胞は細気管支粘膜上皮のみならず肺胞上皮にも分化可能である

HuL 細胞の delta Np63 陽性かつ TTF-1 陽性という表現型は HuL 細胞が細気管支粘膜上皮にも肺胞上皮にも分化可能な幹細胞であることを示唆していると仮定し、3 次元培養下で HuL 細胞の分化を促した。3D 環境下の HuL 細胞は播種数時間以内に凝集し、スフェロイドを形成した。培養を継続すると徐々に増大しつつ内部に空洞が形成され嚢胞となった。添加する少分子化合物を調整した Condition B では、HuL 細胞は嚢胞壁は多層性の壁構造を呈し、apical 面には多数の線毛が観察された。delta Np63 は 2 次元培養上ではほぼ全ての細胞が陽性だったのに対し、3 次元培養では apical 面の上皮で陰性となった。TTF-1 は basal 面で一部陰性化を認め、SP-A の発現は見られなかった。以上より Condition B は細気管支粘膜上皮への分化を促すと考えられる。一方 Condition A の場合、嚢胞壁は菲薄化し、ほぼ単層性となる嚢胞が確認された。嚢胞壁を構成する一部の細胞では、多くのスフェロイドで SP-A の発現が細胞質

に認められ、SP-A は apical 面全体を覆っていた。delta Np63 は部分的に陰性化した一方、TTF-1 は概ね陽性であった。以上より Condition A は肺胞上皮への分化を促進すると考えられる。以上の結論が mRNA レベルの発現解析でも矛盾しないことも確認した。一方 HuB 細胞を用いて同様の 3D 培養を行ったところ、Condition B はもちろんのこと Condition A でも線毛を有する気管支ないし細気管支様の構造を呈した。以上より、HuL 細胞は培養条件により繊毛細胞を伴う細気管支様構造となるだけでなく、SP-A を産生・分泌する肺胞上皮へ分化しうるということが明瞭となった。一方 HuB 細胞は気管支様構造を呈し、肺胞上皮に分化することはなかった。以上の結果は、HuL 細胞が細気管支粘膜上皮及び肺胞上皮への多分化能を有する、ヒトにおける末梢気道幹細胞に相当する細胞であることを強く示唆している。一方 HuB 細胞は気管支粘膜由来であるため TTF-1 の発現量も低く、肺胞上皮への分化は示さないと想定される。

### (3) マウスに移植された HuL 細胞は気管支粘膜様の形態を示す

次いで HuL 細胞が 3 次元培養系のみならず in vivo でも細気管支粘膜上皮や肺胞上皮に分化しうるか否かを検証した。細気管支粘膜上皮や肺胞上皮をプレオマイシンで脱落させた NSG mouse に 2 次元で増殖させた HuL5 細胞( $5.0 \times 10^6$ )を経気道的に投与した。HuL5 細胞投与後 60 日目に肺を採取し組織学的に解析したところ、HuL5 細胞(ヒト特異的ミトコンドリア抗体で確認)はプレオマイシンで脱落したと考えられる肺胞上皮を置換するように生着していた。ただしマウス肺内の HuL 細胞は、繊毛細胞や杯細胞への分化が目立ち(すなわち気管支粘膜様であり)正常の分化した肺胞上皮の形態とは大きく異なっていた。ただし一部の細胞は SP-A を発現しており、2 型肺胞上皮への分化を示す細胞が混在していると考えられた。

### (4) HuL 細胞と同様に delta Np63 および TTF-1 を発現する末梢気道上皮がヒト肺組織に存在している

ヒト正常肺組織においても肺癌組織においても delta Np63 と TTF-1 の発現は相互排他的とされていることを考慮すると、それらを同時に発現している HuL 細胞は一見奇妙である。そこでヒトの気管支および末梢肺組織に HuL 細胞と同様の表現型を示す細胞が存在するか否かを検証した。気管支領域では既知のごとく基底細胞は delta Np63 陽性、TTF-1 陰性であった。一方、呼吸細気管支を含む末梢気道領域では delta Np63 及び TTF-1 を共発現する上皮細胞が存在していた。また KRT5 陽性かつ KRT7 陽性の細胞も末梢気道に確認できた。以上の結果は、HuL 細胞が末梢気道に存在する delta Np63 (KRT5)陽性かつ TTF-1 (KRT7)陽性の末梢気道上皮細胞に由来することを強く示唆している。

## 結論

今回の我々の研究では、末梢肺組織由来で delta Np63+かつ TTF-1+の HuL 細胞が細気管支上皮にも肺胞上皮にも分化しうることを明確に示した。同様の表現型を示す細胞がヒト肺組織内の末梢気道に存在することも示した。HuL 細胞は末梢肺組織の上皮細胞を再生しうる上皮幹細胞であり、将来的に再生治療に使用しうる細胞と期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Tanaka Y, Yamaguchi M, Hirai S, Sumi T, Tada M, Saito A, Chiba H, Kojima T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Characterization of distal airway stem-like cells expressing N-terminally truncated p63 and thyroid transcription factor-1 in the human lung. *Experimental Cell Research*. 2018; 372: 141-149. (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

田中悠祐、山口美樹、平井幸恵、角俊行、多田周、斎藤充史、千葉弘文、小島隆、渡辺敦、高橋弘毅、佐久間裕司

ヒト末梢気道幹細胞の研究

第 98 回北海道医学大会病理分科会 (2018 年 10 月 13 日 札幌) 口演

Tanaka Y, Yamaguchi M, Hirai S, Sumi T, Tada M, Saito A, Chiba H, Kojima T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Characterization of Distal Airway Stem Cells Expressing  $\Delta$ Np63 and TTF-1 in the Human Lung. *International Rare Lung Diseases Conference* (2018 年 9 月 8 日 Cincinnati, Ohio, USA) poster discussion.

田中悠祐、山口美樹、平井幸恵、角俊行、多田周、斎藤充史、千葉弘文、小島隆、渡辺敦、高橋弘毅、佐久間裕司

ヒト末梢気道幹細胞の研究

第 58 回日本呼吸器学会学術講演会 (2018 年 4 月 29 日 大阪) ミニシンポジウム

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

平井 幸恵 (HIRAI, sachie)

山口 美樹 (YAMAGUCHI, miki)

角 俊行 (SUMI, toshiyuki)

多田 周 (TADA, makoto)

斎藤 充史 (SAITO, atsushi)

千葉 弘文 (CHIBA, hirofumi)

小島 隆 (KOJIMA, takashi)

渡辺 敦 (WATANABE, atsushi)

高橋 弘毅 (TAKAHASHI, hiroki)

佐久間 裕司 (SAKUMA, yuji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。