

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08167

研究課題名（和文）加齢による呼吸器疾患とリゾホスファチジン酸の関連 -肺の中の混沌と秩序-

研究課題名（英文）Analysis of a relationship between age-related respiratory diseases and lysophosphatidic acids

研究代表者

兼平 雅彦（Kanehira, Masahiko）

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：90374941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：リゾホスファチジン酸受容体の1つであるLPAR3の遺伝子欠損マウス（LPAR3^{-/-}）は、野生型（WT）に比べて、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の特徴の一つである肺コンプライアンスの上昇を認められた。また、LPAR3^{-/-}より回収した気管支肺胞前駆細胞のオルガノイド形成能は、WTマウスに比べて有意に低かった。一方で、オルガノイド形成の後に評価したI型、II型肺胞上皮細胞への分化能は、LPAR3^{-/-}、WTいずれもほぼ同等であった。このことから、LPAR3^{-/-}の気管支肺胞前駆細胞は、WTマウスに比べてステムネス、特に自己複製能を喪失していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂質メディエーターの一種であるリゾホスファチジン酸によるシグナル、特にLPAR3を介したシグナルが、肺の組織幹細胞（気管支肺胞前駆細胞）を細胞老化から保護し、ステムネスを維持していることが示唆された。この結果は、リゾホスファチジン酸による肺の恒常性維持という新しい概念を提唱するものであり、その学術的意義は大きいと思われる。また、現在明確な治療法がない慢性閉塞性肺疾患（COPD）の新たな治療法の突破口となりうる点で、社会的意義も同様に大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：In LPAR3-deficient mice, lung compliance, a feature commonly associated with COPD, was significantly increased compared to wild-type mice. In addition, the number of spheroid colony derived from bronchioalveolar progenitor cells (BASCs) in LPAR3^{-/-} mice was a third less than that in WT mice. Also, the spheroid colonies derived from BASCs in LPAR3^{-/-} mice possessed almost same ability to those in WT mice in terms of differentiating into type I and II alveolar cells. These results suggest that BASCs in LPAR3^{-/-} mice, which showed COPD-like phenotype, had a propensity to lose their stemness, especially self-renewing capacity, compared those collected from WT mice.

研究分野：呼吸器病態学

キーワード：リゾホスファチジン酸 慢性閉塞性肺疾患 加齢 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ; BMMSCs) に関する研究を遂行してきた。BMMSCs は、骨髄に存在し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有する幹細胞として、再生医療の分野で注目されている幹細胞の一種である。興味深いことに、脂質メディエーターの一種であるリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid ; LPA) のシグナル異常、特に、LPA 受容体のサブタイプ3 (LPAR3) のシグナルの遮断により、BMMSCs が細胞老化に陥り、自己複製能や分化能、いわゆる幹細胞性 (ステムネス) を喪失することを見出した。

2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、肺胞壁の破壊に伴い、慢性咳嗽や労作時呼吸困難を呈する呼吸器疾患である。加齢とともに発症率、ならびに重症度が上昇することが知られている。主な原因は喫煙であり、タバコ煙に含まれる各種化学物質、ならびに酸化ストレスが原因であることが知られている。研究代表者は、COPD の病態の背景には、加齢や喫煙による肺の組織幹細胞の枯渇と、それに伴う肺の修復不全があり、その一端に LPAR3 シグナルの異常があると予想した。

本研究では、LPAR3 欠損マウス (LPAR3^{-/-}) を用いて、COPD の病態 LPAR3 シグナルならびに肺の組織幹細胞のステムネスとの関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

a. 実験的肺気腫の誘導

LPAR3^{-/-}と野生型マウス (WT) へ、ブタ膵臓由来エラストラーゼ (PPE) を体重 1kg あたり 1 mg 気道内投与した。PPE 投与から 3 週間後、深麻酔下によりマウスを安楽死し、気管より空気を肺内へ注入し、肺を 25 cmH₂O まで拡張させた。その後、5 cmH₂O ずつ空気を肺内より回収し、0 cmH₂O まで容量を測定し、圧・容量曲線を描出し、肺コンプライアンスを評価した。

b. 病理組織学的評価

肺コンプライアンスを測定後の肺へ、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を注入し、肺を拡張させた。気管を結紮後に肺を摘出し、4%PFA へ 24 時間浸漬固定後、右肺からパラフィン切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色を行った。ランダムに 30 視野を選択し、400 μm の直線と重ね、直線と肺胞壁の交点の数を測定し、以下の式で平均肺胞壁間距離 (Lm) を計算した。

$$\text{平均肺胞壁間距離 (Lm)} = 400 \mu\text{m} / \text{交点数}$$

c. 肺オルガノイドの作成

LPAR3^{-/-}と WT をイソフルラン吸入による深麻酔下で胸腔を開き、右心室より PBS を 10 ml 注入し、肺内の血液を灌流した。0.2 MEGTA 加 PBS で BALF を 4 回回収した後、4 U/ml エラストラーゼ加 PBS を気管から注入し、気管を結紮し、肺を摘出した。37 °C で 5 分消化後、肺葉をメスとハサミで細切し、250 μg/ml の DNase I で処理し、10% FCS 加 DMEM で懸濁し、1,000 rpm で 10 分遠心し、細胞を沈殿させた。その後、0.17 M 塩化アンモニウム液で赤血球を溶解した後、1,000 rpm で 10 分遠心し、肺組織由来の単一細胞を得た。

の方法で調整した単一細胞から、CD31⁻、CD45⁻、CD34⁺、Sca-1⁺の細胞群をセルソーターを用いて分取し、気管支肺胞前駆細胞 (Bronchoalveolar stem cells; BASCs) とした。

の方法で調整した単一細胞を 10% FCS 加 DMEM で懸濁し、プラスチックディッシュで 37 °C、5% CO₂ で 24 時間培養した。浮遊細胞を除去し、PBS でディッシュを 2 回洗浄した後、接着細胞を回収し、肺間質細胞とした。

の方法で回収した気管支肺胞前駆細胞 1.0 × 10³ 個と肺間質細胞 1.0 × 10⁵ 個を混合し、growth factor-reduced Matrigel と 3D 培養用培地 (10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10 μM SB431541 加 DMEM) を 1 : 1 で混合した培地 (200 μl) に懸濁した。24-well transwell の下層へ 3D 培養用培地 1 ml を添加した後、上層へ細胞懸濁液を添加し、37 °C、5% CO₂ で 1 週間培養した。下層の培地は 1 日おきに交換した。

形成されたオルガノイドは、数を計測した後、サイトスピンによりスライドガラス上へ塗抹した。風乾し、4% paraformaldehyde で固定した後、抗 AQP5 抗体、抗 SP-C 抗体を用いて免疫染色を行い、それぞれ I 型肺胞上皮細胞、II 型肺胞上皮細胞への分化能を評価した。

4. 研究成果

a. 肺コンプライアンス

LPAR3^{-/-}は WT に比べて、有意な肺コンプライアンスの上昇が認められた (図 1)。同様に、病理組織学的に平均肺胞壁間距離 (Lm) を測定したところ、LPAR3^{-/-}は WT に比べ

て、平均肺胞壁間距離の増大を認め、肺胞腔が顕著に拡張していることを確認した(図 2)。

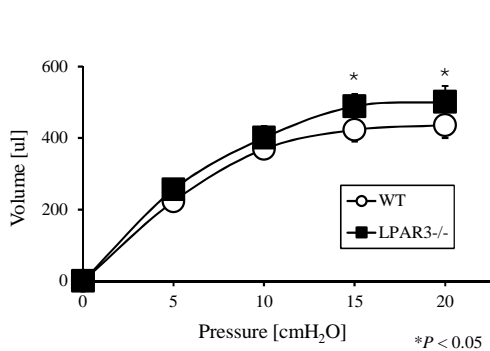


図1 肺コンプライアンス(PPE投与3週間後)

LPAR3欠損マウス(LPARG^{-/-})は野生型マウス(WT)に比べて、有意な肺コンプライアンスの上昇を認めた。

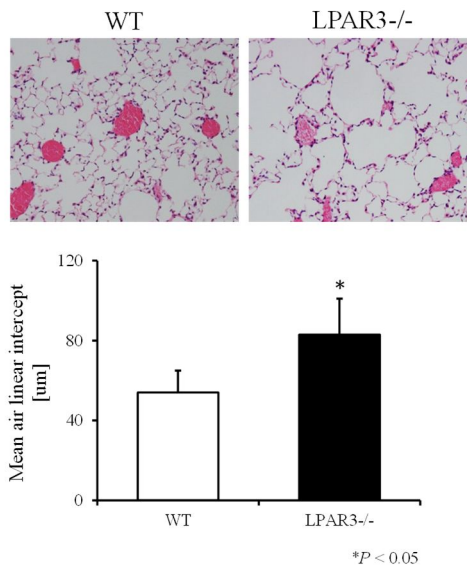


図2 平均肺胞壁間距離(PPE投与3週間後)

LPAR3欠損マウス(LPARG^{-/-})は野生型マウス(WT)に比べて、有意な平均肺胞壁間距離の増大を認めた。

b. オルガノイド形成能の比較

LPAR3^{-/-}の気管支肺胞前駆細胞(BASCs)は、WTに比べ、オルガノイド形成能の低下を認めた(図 3)。一方で、形成されたオルガノイドを抗 AQP5、抗 SP-C 免疫染色を行ったところ、LPAR3^{-/-}由来のオルガノイドは、WT 由来のオルガノイドとほぼ同等の I 型肺胞上皮細胞、II 型肺胞上皮細胞への分化能を有していた(図 4)。

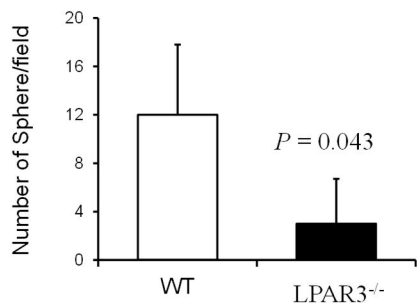
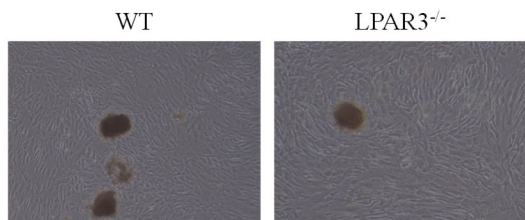


図3 3D培養によるオルガノイド形成能

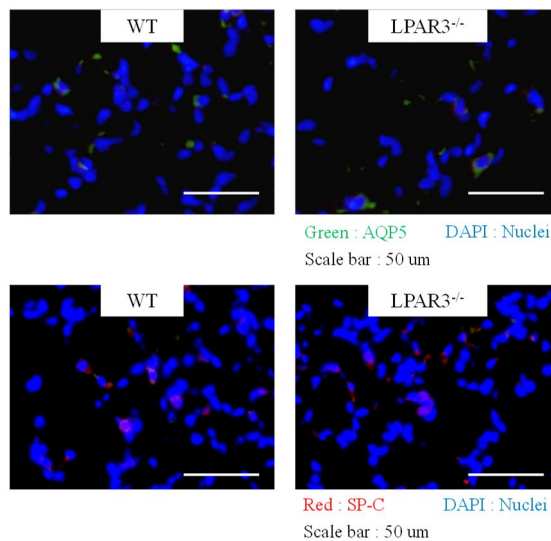


図4 I型ならびにII型肺胞上皮細胞への分化能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Yamato, Oishi Hisashi, Kanehira Masahiko, Matsuda Yasushi, HIRAMA Takashi, Noda Masafumi, Okada Yoshinori	4. 巻 27
2. 論文標題 Effect of CTLA4-Ig on Obliterative Bronchiolitis in a Mouse Intrapulmonary Tracheal Transplantation Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 355 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5761/atcs.oa.20-00398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe Kotaro, Kanehira Masahiko, Ohkouchi Shinya, Kumata Sakiko, Suzuki Yamato, Oishi Hisashi, Noda Masafumi, Sakurada Akira, Miyauchi Eisaku, Fujiwara Tohru, Harigae Hideo, Okada Yoshinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting stanniocalcin 1 expressing tumor cells elicits efficient antitumor effects in a mouse model of human lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3085 ~ 3100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yabuki H, Watanabe T, Oishi H, Katahira M, Kanehira M, Okada Y.	4. 巻 1103
2. 論文標題 Muse Cells and Ischemia-Reperfusion Lung Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 293-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56847-6_16	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi N, Watanabe T, Kanehira M, Watanabe Y, Hoshikawa Y, Notsuda H, Noda M, Sakurada A, Ohkouchi S, Kondo T, Okada Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Bone marrow mesenchymal stromal cells protect allograft lung transplants from acute rejection via the PD-L1/IL-17A axis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 726-734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-018-1643-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兼平 雅彦、阿部 皓太郎、大河内 眞也、岡田 克典
2. 発表標題 ミネラル調節ホルモンStanniocalcin-1を標的とした新たな肺がん治療法の可能性
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 標智仁、兼平雅彦、神沼修、長友啓明
2. 発表標題 実験用マウスのDeep Learningを用いた陰部画像からの発情検知システムの開発
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 兼平雅彦、野田雅史、岡田克典
2. 発表標題 加齢に伴う呼吸器疾患におけるリゾホスファチジン酸シグナルの関与
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼平雅彦、石橋直也、渡邊龍秋、野田雅史、岡田克典
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞による移植肺拒絶反応抑制効果の検討
3. 学会等名 第65回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大河内 真也 (Ohkouchi Shinya) (40375035)	東北大学・事業支援機構・講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------