

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15934

研究課題名(和文) Effect of high fat diet and aging on lung stem cells

研究課題名(英文) Effect of high fat diet and aging on lung stem cells

研究代表者

尾崎 真理 (OZAKI, Mari)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：90772286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食(HFD)と肥満は、心血管疾患などの病気の危険因子である。しかし、HFDは最近、肺を含む他の臓器に悪影響を与えることが示されている。HFDが肺に影響を与えるメカニズムはこれまで研究されていなかったため、HFDが肺の老化や幹細胞と呼ばれる特定の細胞に及ぼす影響を調べたいと思う。HFDは、ミトコンドリアの数と機能の低下、肺の炎症と上皮幹細胞の増殖の増加など、肺にさまざまな潜在的に有害な影響を引き起こすことがわかった。HFDの観察された効果のいくつかは、「加齢による」変化に似ている。低カロリー食に切り替えると、HFDによって誘発された変化のいくつかが逆転した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の食生活は欧米型の高脂肪食(HFD)に近づいている。この傾向のもとでは、肺をはじめとした臓器への影響を理解せねばならない。高脂肪食は肺の機能を損ない、肺の老化を加速させるが、カロリーを制限することにより、この現象を減速させることができる。これは食事を改善させることにより健康を促進できることを意味する。

研究成果の概要(英文)：High fat diet (HFD) and the ensuing obesity are known to be risk factors for many diseases such as cardiovascular disease. However, HFD has recently been shown to also negatively influence other organs and tissues, including the lung. As the mechanism(s) by which a HFD might influence the lung have never been studied we wanted to determine the effects of a high fat diet on aging and specific cells in the lung called stem cells, cells that are involved in the maintenance and regeneration of the lung.

We found that HFD induces various potentially harmful effects to the lungs, including decreasing the number and function of mitochondria and increasing lung inflammation and epithelial stem cell proliferation. Some of the observed effects of HFD are similar to the “aging-induced” changes. Switching to a low calorie diet efficiently reversed several of the HFD-induced changes.

研究分野：pulmonary medicine

キーワード：lung stem cells high fat diet aging alveolar cells mitochondria calorie restriction

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長く知られているが、高脂肪食(HFD)とそれに伴う肥満は、心血管疾患および死亡のリスク因子である。また HFD は、肺細胞におけるいくつかの内因性および外因性変化に関連する老化現象を加速することも知られている (Honma, Biogerontology. 2012)。然しながら、HFD が肺をはじめ様々な臓器や組織に負の影響を及ぼすことが理解され始めたのはごく最近のことである。高齢者に肺感染症が多く見られるが、肺機能組織の維持力、および組織損傷後の再生能力は加齢に伴い徐々に低下する。これは、組織の幹細胞が機能的にも数的にも減退減少した結果であると考えられる。すなわち、幹細胞の老化は、組織老化を呼び起こす重要な因子である。肺に対し、HFD によって引き起こされる下記症状が最近報告された。1) 母体の HFD は、胎児の肺の発達障害 (Mayor, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2015)、および成人期の喘息と関連する (MacDonald, Physiol Rep.2017)。2) mTOR and SIRT のような栄養分感知経路は、カロリーの過不足に反応して細胞のメタボリズムを調節することから、いくつかの食事関連疾患の発症に関与している。然しながら HFD が肺に影響を与えるメカニズムは、まだ解明されていない。欧米型食生活 (HFD) が、種々の身体器官や細胞に及ぼす影響、および変化の発症年齢との関係を理解することは不可欠である。本研究において、肺上皮幹細胞に対する HFD の効果、および HFD が肺幹細胞機能の老化現象への加担等を特定したいと考える。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は 1) マウスの気管及び肺胞上皮の肺組織幹細胞と非幹細胞に対する加齢の影響を明らかにする。2) 若齢マウスおよび老齢マウスの肺幹細胞に対する HFD の影響を調べる。3) HFD が肺幹細胞に影響を及ぼすメカニズムを明らかにする。

欧米では、BMI 値が 30 を超えると肥満と定義している。しかし日本肥満学会では、アジア人が HFD による健康被害を受けやすいことを考慮して、BMI 値を 25 に設定している。日本では肥満が少ないという通説とは裏腹に、この BMI 25 の基準値では日本人の 20%が「肥満」であり (Kanazawa, World Rev Nutr Diet.2005)、1962 年から 2002 年にかけて「肥満」は 3 倍に増加している。さらに、若年層の肥満度は、特に地方で増加傾向にある (Matsushita Int J Obes (Lond) 2008)。従って我々の研究は、何百万人もの人々の健康に影響を与える可能性のある、稀にしか検討されない一般的な生物学的変化の側面に注目している。

### 3. 研究の方法

本研究では、高脂肪食が肺幹細胞に及ぼす影響を調べた。若齢および老齢マウスを用いて、HFD の早期摂取開始および晩期開始による比較、インピトロ、インピボ両所での実験、などを行って、関連するメカニズムを追及した。また、肺上皮細胞におけるミトコンドリアの含有量および機能、ならびにカロリー消費制御に重要な遺伝子 (Sirt1 および mTOR) の役割を検討した。(1) 若齢および老齢マウスの肺幹細胞に対する HFD の影響をインピボで調べる。カロリーの 32% を脂肪から摂取できる高カロリーの HFD 飼料を投与 (標準飼料より摂取できる脂肪は 17%)。若齢および老齢マウスに 8 週間 HFD 飼料を投与。対照群として、同年齢のマウスに標準飼料を投与。全てのマウス体重を毎週計測、HFD 投与マウスの急速な体重増加を確認。飼料投与期間の終わりに各群のマウスを処理し、一部のマウスの肺を、RNA、タンパク質の分離、および組織学的分析に使用した。他のマウスは、気管より MTEC を、肺より遠位肺上皮細胞および線維芽細胞を分離するために使用された。HFD 投与の若齢及び老齢マウスの気管及び肺幹細胞、肺線維芽細胞に及ぼす影響を、下の図に記載した 3D コロニー形成アッセイによりインピボで調べた。また、グループ間のミトコンドリアの違いについても調べた。

- (2) 肺組織幹細胞に対する加齢の影響を特定する。気管と肺の両方を若齢(2ヶ月)と老齢(12ヶ月以上)のマウスで比較した。気管上皮の厚さ、核密度、細胞のサブタイプ(肺の気管および肺胞細胞における基底細胞、クララおよび繊毛細胞)を定量化して比較した。標準化された3Dコロニー形成アッセイ(Hegab, Stem Cell Res, 2015)で、マウス気管上皮細胞(MTEC)と遠位肺幹細胞の両方に対する加齢の影響を調べた。この場合、遠位肺幹細胞がコロニーに成長するためにニッチ細胞(線維芽細胞)との共培養が必要である。共培養細胞を交互に並べることで、上皮性幹細胞に対する加齢の影響をニッチ細胞に対する影響から分離し、標準的な成人肺細胞と比較することができた。成長中のコロニーの数、大きさ、型、および分化プロフィールを調べた。
- (3) インビトロで若齢及び老齢マウスの肺幹細胞へのHFDの効果を探る。MTECまたは遠位肺幹細胞を、標準培養液または脂肪酸(オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、脂質混合物)を添加した培地で培養した。コロニー形成効率(CFE)を調べるとともに、コロニーの大きさ、種類、分化プロフィールを検討した。
- (4) HFDが近位および遠位の肺上皮幹細胞とそのニッチ細胞に影響を及ぼす具体的なメカニズムを特定する。インビボのHFDマウスの肺上皮および間質のニッチ細胞と、インビトロで成長した上皮コロニーから分離したRNA、組織サンプル、MTECおよび全肺細胞について、RT-PCR、免疫染色およびフローサイトメトリーにより、主にSirt1およびmTOR経路とミトコンドリア遺伝子のいくつかの候補遺伝子の発現を調べた。Sirt1およびmTORの低分子阻害剤および活性化剤を用いて、*in vitro*の幹細胞コロニー形成アッセイにおける役割を操作、確認した。

#### 4. 研究成果

HFDが肺上皮細胞及び幹細胞に及ぼす影響と加齢との相互作用を調べた。若齢と老齢のマウスに標準食、またはHFDを与え、気管と肺の組織学的変化、炎症、ミトコンドリアの機能を調べた。幹細胞の機能は、*in vitro* organoid/colony forming efficiency (CFE)アッセイを用いて調べた。加齢は気管基底および肺胞タイプ-2(AT2)細胞の数を減少させた。HFDはAT2細胞の数を増加させた。老齢は、肺の炎症増加を引き起こし、HFDは若齢マウスにも同様の炎症増加を引き起こした。加齢はミトコンドリアの質量と機能を低下させ、活性酸素を増加させた。若齢マウスはHFDによって、加齢により誘発された変化に類似したミトコンドリア変化を引き起こした。若齢および老齢のHFD投与マウスから採取された気管および肺上皮細胞のオルガノイド培養は、標準食投与マウスと比較して高いCFEを示した。HFDを低カロリー脂肪食(LCD)に切り替えることで、HFD誘導効果のいくつかを効率的に逆転させることができた。従って、HFDは、肺の組織学的、炎症性、および機能的変化を誘導し、加齢による肺の炎症やミトコンドリアを悪化させることが分かった。LCDはHFDによって誘発された多くの負の影響を逆転させることができる。本研究は、HFDがミトコンドリアの数と機能を減少させ、肺の炎症および上皮幹細胞増殖を増加させるなど、HFDが肺に様々な潜在的に有害な影響を誘発するという概念を初めて証明している。HFDの観察された効果のいくつかは、「老化誘発」変化に類似している。LCDに切り替えることで、HFDによる悪影響のいくつかを効率的に逆転、回復させることができる。更なる研究と調査が必要である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hegab AE, Ozaki M, Meligy FY, Kagawa S, Ishii M, Betsuyaku T	4. 巻 33
2. 論文標題 High fat diet activates adult mouse lung stem cells and accelerates several aging-induced effects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 25-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2018.10.006	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mari Ozaki
2. 発表標題 Calorie Restriction Can Reverse Several of the Aging and HFD-induced Changes in Lung Epithelial Stem Cells
3. 学会等名 American Thoracic Society 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Ozaki
2. 発表標題 Calorie Restriction Can Reverse Several of the Aging and HFD-induced Changes in Lung Epithelial Stem Cells
3. 学会等名 Stem Cell Asia 2018
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------