

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15960

研究課題名(和文) 肺気腫発症メカニズムにおける肺上皮幹細胞の役割

研究課題名(英文) Exposure to Cigarette Smoke Enhances the Stemness of Alveolar Type 2 Cells.

研究代表者

佐々木 衛 (Sasaki, Mamoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：90573311

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)：長期間の喫煙曝露(鼻限定曝露、1回1時間、週5日、3ヶ月間)を実施したマウスにおいては肺組織のIHCによる評価においてSPC陽性細胞率が増加していた。慢性喫煙曝露を受けた型肺胞上皮は3次元培養系において高い自己複製能を示し、さらに2次元培養系においても長期喫煙群が高い生存率を示した。また、型上皮へと分化を示す2次元培養のmonolayerによる検討においてもlayerの形成が喫煙群のほうが有意に高いことが示された。上記より慢性喫煙による型肺胞上皮細胞自己複製能が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDは世界で最も罹患数の多い疾患の一つである。COPDはタバコ煙を主とした有害物質を長期に吸入曝露することによって生じた気道・肺の慢性炎症により引き起こされる。現在までに様々な病態に対するアプローチがなされているものの、現時点では根本的な治療はなく、病態の詳細な解析と新たな治療の確立が必要である。当研究にて長期の喫煙において型上皮細胞の自己複製能の上昇とその関与にcircadian rhythmが関連していることが示唆されたことにより、肺気腫病態の解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of chronic CS on AT2 stem cells. Adult mice expressing green fluorescent protein (GFP) in their AT2 cells were exposed to CS for 5 days/week over 3-months. Histological assessment showed that CS not only induced emphysematous changes but also increased the number of AT2 cells compared to that of air-exposed lungs. Assessment of sorted GFP+/AT2 cells via the stem cell 3D organoid/colony forming assay revealed that the number and size of the colonies formed by the CS-exposed AT2 stem cells were significantly higher than those of air-exposed control AT2 cells. AT2 stem cells respond to chronic CS exposure by activating their stem cell function, thereby proliferating and differentiating faster, and becoming more resistant to apoptosis. Disturbances in expression levels of several circadian rhythm-related genes might be involved in these changes.

研究分野：COPD

キーワード：肺気腫 喫煙 肺幹細胞 肺胞 型上皮細胞 colony forming assay

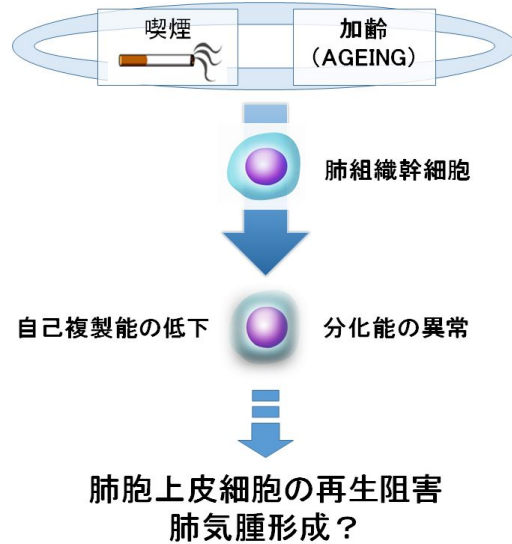
## 1. 研究開始当初の背景

### (1). 慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対する新たな治療法模索の必要性

COPD は世界で最も罹患数の多い疾患の一つであり、世界保健機構では、死亡原因の第 4 位にあげられ、2020 年には第 3 位になると予測されている(Murray CJ et al. Lancet 1997)。COPD はタバコ煙を主とした有害物質を長期に吸入曝露することによって生じた気道・肺の慢性炎症により引き起こされる。現在までに様々な病態に対するアプローチがなされているものの、現時点では根本的な治療はなく、病態の詳細な解析と新たな治療の確立が必要である。

### (2). COPD の病態形成・進行における肺組織幹細胞の関与

多くの難治性の呼吸器疾患では、気道、肺泡レベルでの細胞障害が存在する。マウスやヒトでは、肺の複製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、中枢気道では、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、細気管支肺泡境界領域の Bronchioalveolar stem cells(BASCs)が幹細胞の役割を担い、末梢気道では、肺泡領域の型肺泡上皮細胞が幹細胞の役割を担う(Jason R.Rock et al. Disease Models & Mechanisms, 2010)と考えられている。肺幹細胞は正常肺上皮細胞においては十分な複製能を保っているが、COPD などの慢性炎症状態や加齢性変化においては、その自己複製能が低下する(Nicolas M et al. Thorax, 2015)と考えられている。



## 2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は現在世界第 4 位の死因で重篤な疾患であるが、根本的な治療は存在しない。近年 COPD では、肺の組織幹細胞が上皮細胞の再生と関連しており、肺気腫形成におけるその重要性が示唆されているが、その具体的な機序は明らかではない。本研究では、以下の 3 つを目的とする。肺気腫モデルマウスから採取する肺上皮幹細胞を、三次元器官培養系に供し、肺気腫病態形成時の上皮幹細胞の自己複製能、分化能を正常マウスと比較する。また、正常マウス由来の肺上皮幹細胞の三次元器官培養系におけるタバコ煙抽出液添加の影響を確認することで、タバコ煙の肺上皮幹細胞への直接的影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1). 肺気腫モデルマウスの作製

喫煙誘導肺気腫モデル：当研究室では喫煙曝露装置：SG-300(柴田科学株式会社製)を使用し、雄性 C57BL/6 マウスに、Marlboro 10mg から抽出した煙を週 5 日、1 日 1 時間、1~6 ヶ月間以上曝露させ、肺気腫マウスを作成する方法を確立している。喫煙濃度は徐々に増加させることにより、喫煙に対して耐用性となり、長期喫煙が可能となる。このモデルでは、投与後 3 ヶ月までに肺気腫が完成し、5 ヶ月目まで持続する。右上図は喫煙 5 ヶ月目で肺気腫の形成を当研究室の microCT と組織学的に確認したものである(Mamoru S et al, American Journal of Physiology, 2014)。

### (2). 肺気腫マウスにおける肺上皮幹細胞の機能評価

中枢気道においては、上皮幹細胞として同定されている基底細胞(basal cells)を用いて細胞を単離した後に収集する。末梢肺の上皮細胞の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。こうして得られた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。培養開始後、7、14、21 日目に蛍光、位相差顕微鏡(Leica DMi6000B microscope)下でインサート毎のコロニー数、コロニー径や形状を検討する。これまでの予備実験では、前述のように末梢肺上皮細胞からは 2 週間培養後に形態学的に異なる 3 種類のコロニーが形成される。コロニー数・直径で量的評価から、幹細胞の自己複製能を評価し、マーカーを使用することで、肺組織幹細胞の分化能を評価する。使用するマーカーは K5(基底細胞)、CC10(Clara(Club)細胞)、MUC5AC(goblet 細胞)、lysozyme(分泌細胞)、CGRP(神経内分泌細胞)、acetylated  $\alpha$ -Tubulin(線毛細胞)、AQP5(型肺上皮細胞)、Sftpc(型肺上皮細胞)である。

さらに、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 Sgtpc/GFP mice(CBA/Ca x CC57BL6J)を Duke 大学の Brigid Hogan 博士から供与され、当該施設にて繁殖中である。また、培養終了後に transwell のインサートからコロニーを含む

Matrigel®を下面フィルター毎切り取り、Histogel を用いて固相化し、さらにパラフィン処理後に薄切し病理組織検討に供する。

### (3) . CSE を用いた肺組織幹細胞に対するタバコ暴露の影響の検討

健常肺マウスから採取された末梢および中枢の肺組織幹細胞に CSE を投与する。肺組織幹細胞の採取 day1,8,15 と各タイムポイントで各濃度の CSE を投与する。CSE 投与後に、肺気腫マウスの評価と同様の方法で肺組織幹細胞の機能評価を行う。

### 4 . 研究成果

慢性的な喫煙曝露は、上皮細胞の慢性的な炎症、酸化ストレス、およびアポトーシスを引き起こし、その結果、肺泡が破壊される。しかし、肺がたばこ煙によって誘発された損傷を修復できず、それによって気腫に屈するメカニズムは不明のままである。型肺泡上皮細胞は、肺泡幹細胞を構成し、肺組織の修復と維持に関与することが知られている。この研究では、型肺泡上皮細胞に対する慢性喫煙の影響を調べた。型肺泡上皮細胞で GFP を発現している成体マウスに 3 か月間にわたって週 5 日喫煙曝露を行った。組織学的評価では、慢性喫煙が気腫性の変化を誘発しただけでなく、空気曝露群と比較して型肺泡上皮細胞の数の比率を増加させたことが示された。幹細胞 3D オルガノイド/コロニーアッセイによる GFP + / 型肺泡上皮細胞の評価により、喫煙曝露した型肺泡上皮によって形成されたコロニーの数とサイズは、空気曝露群よりも有意に高いことが示された。2D in vitro 培養で生存している型肺泡上皮細胞を調べると、アポトーシスに抵抗する能力がより高いことが明らかになった。喫煙曝露した型肺泡上皮細胞のマイクロアレイ分析は、概日リズムと炎症が関与していることが示唆された。

上記より慢性の喫煙曝露により型肺泡上皮細胞の自己複製能が活性化され、それにより増殖がはやくなり、アポトーシスに対してより耐性になると考えられた。概日リズムがこれらの幹細胞能への変化に関係していることが当研究によって示唆された。

これらの結果は当初の喫煙による幹細胞の自己複製能の低下という、仮説とは逆の結果であった。肺泡壁の破壊および再生の障害に関しては型肺泡上皮は喫煙に対しては保護的に働いていると考えられ、慢性喫煙曝露における修復能力の低下は間葉系細胞との関連をさらに研究する必要があると考えられた。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsutsumi Akihiro, Ozaki Mari, Chubachi Shotaro, Irie Hidehiro, Sato Minako, Kameyama Naofumi, Sasaki Mamoru, Ishii Makoto, Hegab Ahmed E, Betsuyaku Tomoko, Fukunaga Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Exposure to Cigarette Smoke Enhances the Stemness of Alveolar Type 2 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2019-01880C	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----