

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790998

研究課題名（和文）肺胞上皮幹細胞の組織再生能に差をもたらす制御因子は何か

研究課題名（英文）To discover the master regulators of stemness in the bronchioalveolar stem cells.

研究代表者

羽藤 泰（HATO TAI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10365281

研究成果の概要（和文）：

ヒトでは新生児肺には切除後の再生現象がみられる一方で、成人肺ではほとんど再生は起こらないことが知られている。本研究では、肺の再生能を規定する因子として、とくに肺胞上皮幹細胞に注目し、齧歯類を用いた遺伝子発現プロファイルの比較から、幹細胞の組織再生能を規定する新規制御因子の同定を試みた。マウス肺の肺切除後代償性肺再生モデルを用いて、再生中の肺から肺胞上皮幹細胞を抽出し、cDNA ライブラリー作製し PCR アレイで解析した。

研究成果の概要（英文）：

Although lung regeneration is observed in infants after major lung resection, same phenomenon is seldom observed in adults in human beings. We sought to identify the master regulator of lung regeneration. We put our focus on bronchioalveolar stem cells (BASCs). Using lung post pneumonectomy compensatory lung growth model, we compared mRNA expression profiles of the BASCs through PCR array technology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

## 1. 研究開始当初の背景

肺切除の対象となる症例は（とくに肺癌の）罹患者数増加を受けて急速に増加している。一方で、肺には機能的な切除限界があるために、外科的切除においては、治療上の制約となっている。また、肺組織は死亡する課程あるいは死亡後にダメージを受けること

が多く、臓器移植についても困難な臓器の一つである。そこで、申請者らは臓器提供によらない肺機能の再生、具体的には患者肺から採取した肺胞上皮幹細胞を *ex vivo* に増幅し、患者に戻す細胞ベースの再生医療の確立を最終目標に研究を行っている。今回の申請では、肺胞上皮幹細胞に注目して「幹細胞の組

織再生に影響を与える因子は何か」について  
(1) 遺伝子プロファイルを比較する手法  
(2) 特定の未分化性維持因子に着目して機能改変を *in vivo* で行う方法の二つを用いて検討を行った。

肺切除後に新生児肺は旺盛に代償性の肺再生がみられる一方で、成人肺では切除後に代償性肺再生現象はほとんどみられないことが臨床的に知られている。なぜ再生能に差が生じるのか、その原因として肺胞上皮幹細胞に着目して解析を試みた。肺胞上皮幹細胞 bronchiole-alveolar stem cells, BASC は Kim らによりはじめて単離された。肺胞上皮を薬剤で強く傷害すると、細気管支と肺胞道の接合部に存在するある細胞から肺胞の再生が起こることが知られていた。この細胞は II 型肺胞上皮細胞のマーカーであるサーファクタントプロテイン C (SPC) 陽性で、かつ、気管支上皮細胞のマーカー CCSP 陽性のダブルポジティブ細胞であることも知られていた。Kim らはこの細胞をフローサイトメトリーで単離し (CD45<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> 分画) 肺胞全体の約 0.3% を占める細胞, BASC を同定した。この細胞は feeder 細胞との共培養で自己増殖し、matrigel 内で肺胞上皮、気管支上皮細胞へ分化し、多分化能が証明され、幹細胞としての要件を満たすことが *in vitro* で示された。しかしながら、肺胞上皮幹細胞は *in vitro* では幹細胞の要件を満たす細胞として認識されているものの、生体内での幹細胞としての機能については現時点で検証がされていない (あるいは論証が困難)。

われわれは、肺胞上皮幹細胞が生体肺発生・再生には必須の細胞であるという仮定のもと、肺再生・再生現象を通じて肺胞上皮幹細胞の遺伝子発現プロファイルがどう変わるのかを比較検討することで、肺胞上皮幹細胞の組織再生能を規定する一連の制御因子群を同定することを目的とした。また網羅的解析と同時に、われわれは肺胞上皮特異的に発現する 3 つのタンパク質を FACS から同定しているが (Tie2, c-kit, Notch1) このうち、Tie2 の機能についても肺胞上皮特異的に遺伝子改変を行うマウス SPCp-Cre マウスを用いて機能解析を行った。

## 2. 研究の目的

マウス肺胞上皮幹細胞の組織再生ポテンシャルは未知である。げっ歯類の肺は定常時には増殖が抑えられているが、発生時および片側肺切除モデルで旺盛に再生する。そこで、静止期と増殖期の差を導く要因は何か、発生・再生現象を通じて、(1) 肺胞上皮幹細胞での遺伝子発現プロファイルを比較すること、(2) 肺胞上皮特異的に既知の幹細胞制御因子を改変すること、の二つの手法により明らかにするとともに、新規制御因子を探

索する。

## 3. 研究の方法

(1) 胎児、新生児、成体からの肺細胞採取  
C57BL/6 マウス、plug check により妊娠 17 日相当の雌マウスをジエチルエーテルで麻酔死させた後、に子宮を切除、雄胎児から肺を切除した。新生児 (1 週齢) 成体 (8 週齢) は雄の個体をジエチルエーテルで麻酔死させた後、それぞれ肺を切除し、2  $\mu$ l/mg の collagenase/dispase (Roche) 添加 PBS 5ml 中で 37  $^{\circ}$ C 30 分インキュベートし、気管支からモスキート鉗子で愛護的に細胞を剥離した。剥離した細胞を 10% FBS 添加 PBS 10ml でサスペンドし cell strainer 40  $\mu$ m を 2 回通過した後、10% FBS 添加 PBS で 3 回洗浄。細胞集塊を遠心し、ペレットを RBS lysis buffer (0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 10mMKHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA) で 5 分常温インキュベートし、赤血球を溶血し、再度 10% FBS 添加 PBS にて洗浄した。

## (2) 肺切除後代償性肺再生モデル

C57BL/6 マウスにケタラル・キシラジン筋注で麻酔導入後、経口的に 18G サーフロー針で気管内挿管を行った。挿管後に後側方切開左開胸を行い、左肺門を動静脈気管支一括して 1-0 絹糸で結紮し、左肺全摘術を行う。胸郭、皮膚を埋没で縫合し、呼吸状態確認の上抜管し肺切除モデルとした。同モデルでは既報の論文により切除後 2 日の時点で肺胞再生がピークとなり、術後 3 週間ほどで代償性の肺再生が完了することが報告されている。このモデルでは切除前、二日後、一ヶ月後の時点での評価を行うこととした。

## (3) フローサイトメトリーによる肺胞上皮幹細胞純化

回収した肺細胞を 5% FBS 添加 PBS で 1.0  $\times$  10<sup>7</sup> 細胞/ml となるように希釈した。希釈細胞に対し CD45-biotin conjugate (Becton Dickinson), CD31-biotin conjugate (Becton Dickinson), CD34-FITC conjugate (Becton Dickinson), Sca-1-APC conjugate 抗体 (e-Bioscience) を 1  $\times$  10<sup>6</sup> 個あたり 1  $\mu$ l 投与し 4  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートする。再び 5% FBS 添加 PBS で洗浄した後、streptavidin-PE conjugate を 1  $\times$  10<sup>6</sup> 個あたり 1  $\mu$ l 投与した。4  $^{\circ}$ C 30 分インキュベートした後、死細胞を podoplanin iodide でマークした後、フローサイトメトリーで FITC 陽性 APC 陽性、PE 陰性の分画を回収した。回収した細胞を直ちに Buffer RLT (QIAGEN) に可及的に濃い濃度でサスペンドした。サスペンドした細胞を QIA shredder (QIAGEN) で破碎した後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてカラムで RNA を回収した。回収した RNA には多量の rRNA が含まれるの

で RiboMinus™ Human/Mouse Transcriptome Isolation Kit (Invitrogen) を用いてこれらを除いた後、直ちに -80 °C で保存した。

#### (4) 遺伝子発現プロファイル比較

肺発生モデル、肺切除後代償性肺再生モデルのいずれのモデルでも、単一個体からではいずれもせいぜい  $5 \times 10^5$  個程度の細胞しか回収することが困難で、網羅的遺伝子解析を行うには mRNA 量が十分得られなかった。そこで、回収した mRNA から cDNA ライブラリーを作製した上で、RT2 profiler PCR array (SA bioscience) を用いて特に齧歯類幹細胞シグナルの発現解析を行った。

#### (5) 肺胞上皮特異的 COMP-Ang1 過剰発現マウス、SPC-COMP-Ang マウス

肺胞上皮幹細胞に Tie2 発現が高いことが FACS の結果から得られており、この分子が肺胞上皮幹細胞の未分化性維持に関わっていることを *in vivo* で検証するため、肺胞上皮特異的に同レセプターの下流シグナルを増強するマウスモデルを作製した。SPC-Cre マウス (C57BL/6 バックグラウンド) 雄と CAG-flox-stop-flox-COMP-Ang1 マウス雌 (慶應義塾大学発生分化生物学新井文用氏より供与) の交配により生じた仔を解析に用いた。negative control として同腹の SPC-Cre 単独陽性マウスを用いた。同トランスジェニックマウスの肺を生理学的・解剖学的に解析すると同時に、発生段階での肺胞上皮幹細胞の振る舞いについて検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 肺胞上皮幹細胞での未分化性維持因子の網羅的遺伝子探索

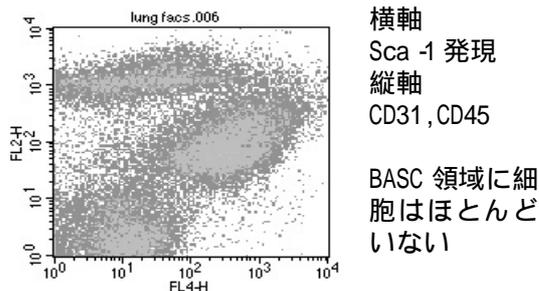


図1 新生児モデルでは BASCs は不在

肺発生モデルから肺胞上皮幹細胞を回収しようと FACS を行ったが、驚いたことに既報の CD31-CD45-Sca-1 では肺胞上皮幹細胞分画がほとんど存在せず、発生段階においては同分画に相当する細胞外がなく発生段階には寄与していない、もしくは発生段階では肺胞上皮幹細胞は存在するとしても発現プロファイルが異なる、という二つの可能性

が考えられた。

次に肺切除後代償性肺再生モデルでの検討を行った。同モデルでは右側肺からしか細胞が回収できなくなるが、やはり回収率がどうしても少なく、最大で  $5.0 \times 10^5$  個程度しか細胞が回収されなかった。これらの細胞から mRNA を回収したが、マイクロアレイ解析に用いるのに必要な指摘 RNA 量 (2 µg) には到底至らず、マイクロアレイでの解析はやむなく断念した。そこで RT2 profiler PCR アレイを用いて、既報の幹細胞特異的遺伝子の発現を検討した。これらの一連の幹細胞特異的遺伝子のうち、ある遺伝子 (未発表のため Gene X とする) は、定常状態に比して肺切除後 2 日の時点で約 2 倍に発現が高まる現象が観察され、一ヶ月の時点で定常状態に復帰した。この遺伝子は定常状態では、ほかの上皮細胞に比して肺胞上皮幹細胞で発現が 2 倍高くこの発現は FACS でも確認することができた。(図2)

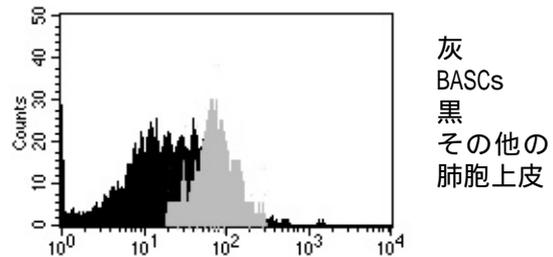


図2 FACS 上で肺胞上皮幹細胞領域で高い発現を確認できる

また免疫染色を行うと、同シグナルは残念ながら肺胞上皮幹細胞特異的ではなかったが、定常状態の肺では II 型肺胞上皮細胞と肺胞上皮幹細胞で細胞質に発現が確認された。

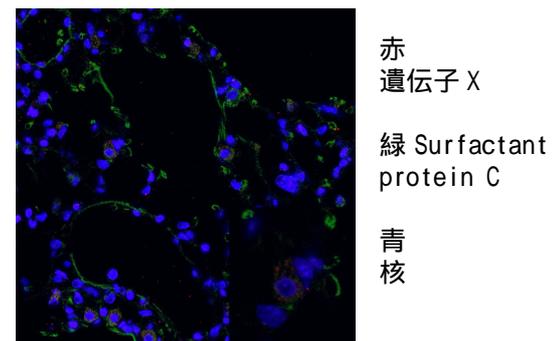


図3 免疫染色で肺での発現を確認した

今後、肺胞上皮再生における同シグナルの機能解析を行いたいと考えている。

#### (2) 肺胞上皮特異的 Tie2 シグナル過剰発

## 現マウスの解析

われわれは、肺胞上皮特異的に Angiopoietin-1 のより強力な変異タンパク質である COMP-Ang1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現型を解析した。この SPCp-COMP-Ang1 マウスは半数以上が出生直後に呼吸不全で死亡した。生存したマウスを用いて、導入したタンパクが発現しているかを確認した。肺を切除して western blot で COMP-Ang1 タンパクが発現していること、および Tie2 受容体にリン酸化が起こっていることを確認した。SPCp-COMP-Ang1 マウスは出生後に死亡しなければ、外見上はコントロールマウス (SPCp-Cre マウスを用いた) と比して差がなく、発育も同等であった。肺に表現型があるものと推察し、生理学的機能評価のため酸素消費を比較したところ、安静時には差がなかったが、トレッドミルをもちいて運動負荷をかけると運動耐容能に差があり、コントロールに比して早期に運動をやめてしまい、酸素消費にも差を生じた。

そこで肺の組織学的構築を観察した。SPCp-COMP-Ang1 マウスでは肺の構築がコントロールに比して明らかに未熟であった。肺胞構築の成熟度を示す指標 radial alveolar count も低下していた。さらに肺内の筋性血管を中心に血管径の拡大がみられた。終末細気管支レベルでの血管径を比較すると約 1.5 倍の差が生じていた。切片の取り方による差でないことを示すために micro CT を施行したところ、CT 画像上で SPCp-COMP-Ang1 マウスでは血管構築がより太く、分枝が末梢まで追跡可能であることが示された。

なぜ血管構造の変化によって肺構造が未熟となるのかを検討した。われわれのモデルでは肺胞上皮幹細胞の絶対数が抑制されるのではないかと予測して、フローサイトメトリーを行ったところ、肺胞上皮幹細胞はむしろ 3 倍以上に濃縮されていた。一方で肺の総細胞数は 1/3 に抑制されていた。結局、総じて見ると BASCs 絶対数は両群間で差がなかった。免疫組織学的に検討してみると、確かに気管支終末部分には肺胞上皮幹細胞はせいぜい 1 つしか見られず 3 倍近く増殖している像は見られなかった。以上から、血管網が発達しないことで肺胞上皮幹細胞から肺のより下位の上皮細胞への分化が進行せずに頓挫してしまっているものと推察した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Hato T, Kimura Y, Morisada T, Koh GY, Miyata K, Tabata M, Kadomatsu T, Endo M, Urano T, Arai F, Araki K, Suda T,

Kobayashi K, Oike Y.

Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation.

Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 3;381(2):218-223. Epub 2009 Feb 13.

査読あり

[学会発表](計 39 件)

羽藤 泰、原田匡彦、堀尾裕俊

中葉原発肺がんは予後不良か 当院での肺癌中葉切除症例の再考

第 50 回日本肺癌学会総会

平成 21 年 11 月 12 日 東京

羽藤 泰、木村吉成、小林紘一、野守裕明

Angiopoietin-1 は肺血管網形成を制御して肺発生に寄与する

第 62 回胸部外科学会総会

平成 21 年 10 月 12 日 横浜

羽藤 泰、原田匡彦、堀尾裕俊

多発嚢胞と濾胞性リンパ球増殖を伴った胸腺過形成の 1 例

第 154 回日本肺癌学会関東支部会

平成 21 年 3 月 14 日 東京

Hato T

Ectopic expression of Angiopoietin-1 in lung epithelium disrupted lung alveolarization

American Thoracic Society

May 19<sup>th</sup> 2008 Tronto

羽藤 泰、川久保雅祥、山内良兼、福富寿典、井澤菜緒子、木村吉成、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、川村雅文、林雄一郎

肺乳頭状腺腫(papillary adenoma)の 1 例

第 26 回日本呼吸器外科学会総会

平成 20 年 5 月 14 日 小倉

[図書](計 2 件)

羽藤 泰、小林紘一

【呼吸器症候群(第 2 版) その他の呼吸器疾患を含めて】腫瘍性疾患 その他腫瘍性病変 嚢腫

日本臨床(0047-1852)別冊呼吸器症候群 III Page273-277(2009.03)

羽藤 泰、川村雅文

【目でみる診療基本手技】診療手技 チューブ挿入法・カテーテル管理法 チェストチューブの入れ方と管理(脱気法を含む)

Medicina(0025-7699)45 巻 13 号 Page150-154(2008.12)

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

羽藤 泰 (HATO TAI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：10365281

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし