

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17750

研究課題名（和文）成体肺に潜在する再生能の再活性化に基づく肺再生療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of lung regeneration therapy based on reactivation of the regenerative potential of the adult lung

研究代表者

清水 勇輝 (Shimizu, Yuki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20789482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：MLE12に伸展刺激（伸展率20%、伸展回数15回／分、12時間）を与えると、細胞増殖能を維持したまま2次元方向への細胞遊走が著しく抑制され、それらの細胞はⅠ型肺胞上皮細胞（AT1）からⅡ型肺胞上皮細胞（AT2）へと性質が転換し、その一部は幹細胞性を有していた。また、伸展刺激を与えることでMLE12の細胞核内における転写因子Xの発現が増加する傾向がみられた。以上より、成体において人為的にseptationを起こさせるトリガーとして、「物理的過伸展刺激」と「転写因子X」が関係している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに肺再生に関する多くの研究がなされているが、肺再生機序の解明、および有効な肺再生療法の確立は未だ成されていない。今回の研究成果より、肺胞新生のためには「物理的過伸展刺激」が重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後、「転写因子X」との関連も含めて更なる検討を行うことで、人為的に肺胞新生を引き起こすことが可能となるかもしれない。本研究成果が肺再生療法確立への一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：When MLE12 was subjected to extension stimulation (extension rate 20%, extension frequency 15 times/min, 12 hours), cell migration in the two-dimensional direction was markedly inhibited while maintaining cell proliferative ability, and those cells were converted from type I alveolar epithelial cells (AT1) to type II alveolar epithelial cells (AT2), some of which had stem cell characteristics. In addition, the expression of transcription factor X in the nucleus of MLE12 cells tended to increase upon stimulation with elongation. These results suggest that "physical hyperextension" and "transcription factor X" may be involved as triggers for artificially inducing septation in adult cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：肺胞上皮細胞 過伸展刺激 肺胞隔壁増生

1. 研究開始当初の背景

人体において、肺は「呼吸」という重要な生理的活動を担っている臓器であるが、腫瘍や外傷など種々の疾患や病態によって組織構造が破壊される。それに対する処置として肺切除が施行されることは少なくなく、「呼吸」という生理機能が損なわれ、患者のQOLが著しく低下する結果と成り得る。したがって、破壊あるいは肺切除によって失われた組織を「再生」により補うことが出来れば、患者にとって非常に有益な治療法となる。しかし、肺は複雑な構造・機能を有しており、iPS細胞などによる成体肺の再生療法に関する研究は進んでおらず、臨床応用が困難な現状にある。再生療法確立への戦略として、(1) iPS細胞など幹細胞を用いた再生療法、(2) 細胞外マトリックスなど、細胞の足場と成り得る biomaterial を用いた再生療法、(3) 組織が元来有している再生能を再活性化する再生療法、が考えられる。前述の通り、肺は非常に複雑な肺胞構造を有しており、iPS細胞などによって組織構造や機能を再現することは困難と考え、上記(3)の方法を選択し検討することとした。

所属する研究室の先行研究である、モデルとして左肺全摘出マウスを用いた *in vivo* の研究では、残存右肺に起こる変化について、形態計測を含む詳細な組織学的観察を行った^[Am J Respir Crit Care Med 181:1397-1406, 2010]。その結果、残存右肺に、「肺胞道の拡張⇒肺胞道壁から肺胞道内への隔壁増生 (septation) ⇒肺胞の新生」というカスケードによって、「代償性肺再生」つまり肺組織再生が起こることが示された。肺胞道壁から septation は、個体発生の後期の肺胞形成過程に起こる現象であり、成体肺組織にも個体発生過程を模した肺胞新生能が潜んでいることを示している。また、羊や豚における研究では、仔羊や仔豚に成熟した個体の肺を移植した場合、体の成長とともに移植肺も成長することが報告されている。このように、成熟した個体においても septation による肺再生メカニズムが潜んでおり、再生能力を活性化・制御できる可能性を十分に秘めていると考えられる。この再生能を制御する方法を確立するため、septation がどのようなメカニズムで起こっているかを解明することが必要と考えた。

2. 研究の目的

マウスにおける代償性肺再生のデータより、成熟した個体の肺の再生機構が活性化される誘因として、気腔（特に肺胞道）への吸入空気容積の増加によって残存肺が過膨張することが考えられ、過伸展刺激が septation を直接刺激する因子として重要であると推測される。

肺胞は肺の組織学的・機能的終末部となり、肺胞表面は主に I 型肺胞上皮細胞 (AT1) と II 型肺胞上皮細胞 (AT2) で覆われており、AT2 は肺胞上皮の損傷に反応し、AT1 へ分化する能力を有することから、AT2 は肺の組織幹細胞としての役割を担うと考えられている。これまで、我々は、肺の解剖学的特徴に注目し、代償性肺再生における生体内の肺胞環境を模倣するような、細胞に周期的過伸展刺激を与える *in vitro* の実験系を確立した。この実験系を用いて、本研究では、潜在的再生能の制御因子の特定を行う。さらに、成体肺の潜在的再生能の再活性化に基づく再生療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウス肺胞上皮細胞 MLE12 (ATCC) を、10% FBS、10nM ヒドロコルチゾン、10nM β -エストラジオールを添加した D-MEM:F12 培地にて培養した。単層培養にてサブコンフルエント状態にした MLE12 を 96 ウェルプレートに播種し、スフェロイドを作製した。作製したスフェロイドは、フィブロネクチンコーティングを施したシリコンチャンバーに播種し、培養した。スフェロイドから細胞が遊走することで得られる、境界明瞭な 2 次元単層領域を主として解析対象とした。

(2) 培養細胞伸展モデル

MLE12 を伸展するために、細胞伸展システム (STB-1400 ; STREX) を用いた。伸展プログラムは伸展率 20%、伸展回数 15 回/分に設定した。

(3) 形態解析

形態解析のために、位相差顕微鏡を用いてデジタルカメラにて伸展前後の対象の細胞を撮影した。細胞集塊の直径を Image J を用いて解析した。

(4) 免疫蛍光染色

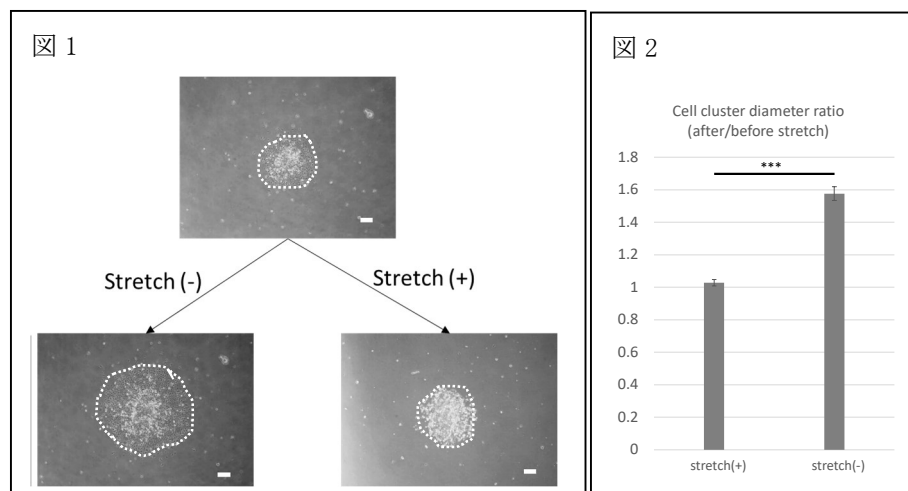
シリコンチャンバー内の MLE12 に対して 10 分間メタノール固定後、10% BSA にて 15 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体としてそれぞれ Syrian hamster monoclonal antibody against podoplanin (AT1 マーカー) (1/100 dilution; ab11936; Abcam)、rabbit monoclonal antibody against proSPC (AT2 マーカー) (1/500 dilution; ab211326; Abcam)、rat monoclonal antibody against Sca-1 (幹細胞マーカー) (1/100 dilution; ab51317; Abcam)、rabbit polyclonal antibody against Ki67 (1/100 dilution; ab15580; Abcam) を用いて 4℃、overnight にて反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体としてそれぞれ podoplanin に対して Alexa Fluor 488 goat anti-Syrian hamster IgG (1/100 dilution; ab180063; Abcam)、proSPC と Ki67 に対して Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG (1/100 dilution; Invitrogen)、Sca-

1 に対して Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG (1/100 dilution; Invitrogen) を用いて光を遮蔽し室温にて 1 時間反応させた。核染色には NucRed™ Live 647 ReadyProbes™ Reagent (R37106; Molecular Probes) を使用した。PBS 洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM5 (Carl Zeiss) を用いて観察した。

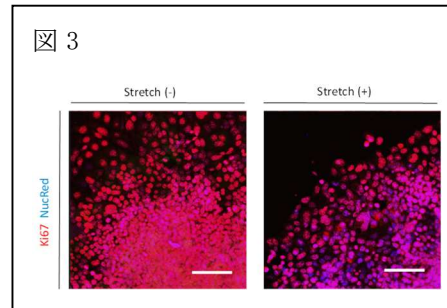
4. 研究成果

(1) 伸展刺激を与えることによる MLE12 の細胞遊走、細胞増殖に与える影響

位相差顕微鏡にて細胞遊走の解析を行った。MLE12 を用いて作製したスフェロイドをフィブロネクチンコーティングしたシリコンチャンバーに播種し、24 時間インキュベート後に写真撮影を行った。その後、12 時間の伸展刺激を与え、12 時間イン



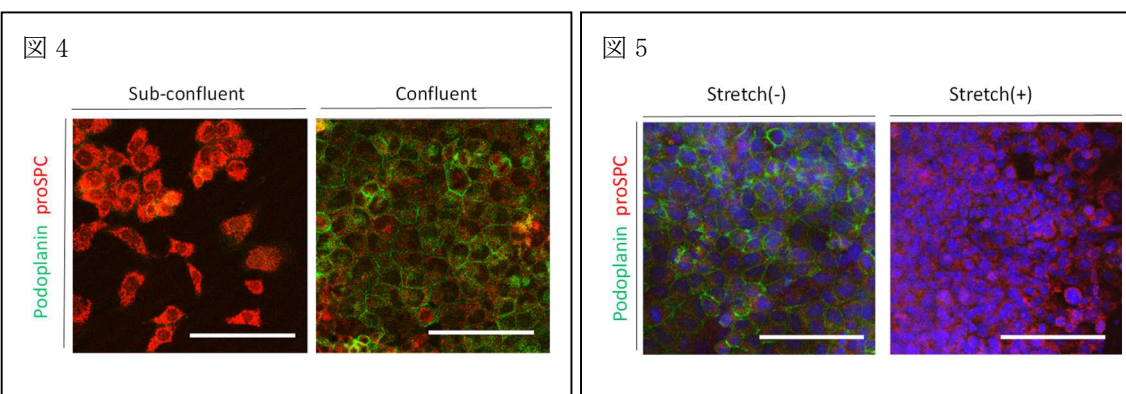
キュベート後に写真撮影を行い、細胞遊走について細胞集塊の直径を評価した。伸展を与えなかったものでは、細胞は培養面に対して平面方向への細胞遊走が確認されたが、一方で、伸展刺激を与えると平面方向への細胞遊走が著しく抑制された (図 1、2)。さらに、細胞増殖能について調べるため、Ki67 に対する免疫蛍光染色を行ったところ、伸展刺激の有無にかかわらず、細胞集塊辺縁の細胞における増殖能は保たれていることが分かった (図 3)。以上より、伸展刺激によって MLE12 は培養面に対して平面方向ではなく垂直 (Z 軸) 方向へと遊走しようとしている可能性が示唆された。この現象は肺発生における septation を模していると考えられる。



(2) 伸展刺激を与えた MLE12 における podoplanin、proSPC の発現

MLE12 は、サブコンフルエント状態では proSPC (AT2 マーカー) を高発現し、コンフルエント状態では Podoplanin (AT1 マーカー) を高発現した (図 4)。

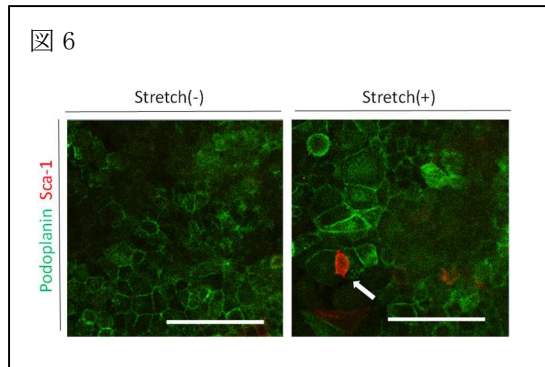
本研究では、より安定した状態の細胞を解析するため、MLE12 を用いてスフェロイドを作製した。作製したスフェロイドをシリコンチャンバーに播種し、24 時間後に伸展を開始した。12 時間の伸展刺激後、12 時間インキュベートした後に免疫蛍光染色を行った。伸展刺激後にスフェロイドから細胞が遊走し、その結果得られた境界明瞭な 2 次元単層領域を検討した。免疫蛍光染色により、伸展刺激を与えると MLE12 における Podoplanin の発現が減少し、proSPC の発現が増加すること、つまり AT1 優位から AT2 優位へと MLE12 の性質が転換することが分かった (図 5)。



(3) MLE12 に伸展刺激を与えることによる Sca-1 陽性細胞の出現

今回の伸展条件 (伸展率 20%、伸展回数 15 回/分) において MLE12 の性質が AT1 優位から AT2 優位へと転換することが確認できたため、肺胞上皮細胞において、本来の肺発生における分化とは逆方向、つまり脱分化のような現象が起こっている可能性が示唆された。したがって、この現

象によって MLE12 が幹細胞性を獲得したことを確認するため、さらに免疫蛍光染色により幹細胞マーカーである Sca-1 の発現を調べた。その結果、伸展刺激を与えない場合には Sca-1 陽性細胞は確認できなかった一方で、伸展刺激を与えると一部に Sca-1 陽性細胞が確認された（図 6、矢印）。以上より、伸展刺激により MLE12 に脱分化のような現象が起こり、幹細胞性を獲得することで septation を模している可能性が考えられた。



本研究結果より、生体において septation が起こる際の有力なトリガーの一つは「肺胞上皮細胞に対する過伸展刺激」である可能性が強く示唆された。

<引用文献>

①Takahashi Y, Izumi Y, Kohno M, Kimura T, Kawamura M, Okada Y, Nomori H, Ikeda E: Thyroid transcription factor 1 influences the early phase of compensatory lung growth in adult mice. *Am J Respir Crit Care Med* 181:1397-1406, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 勇輝、田尾 裕之、崔 丹、河野 裕夫、池田 栄二
2. 発表標題 伸展刺激下のマウス肺胞上皮細胞における細胞動態の変化 ―肺再生療法確立のための基礎的検討―
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------