

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02930

研究課題名（和文）COPDにおける新規2型肺胞上皮細胞サブグループを介した病態解明

研究課題名（英文）Pathogenesis via a novel type 2 alveolar epithelial cell subgroup in COPD

研究代表者

藤田 雄 (Fujita, Yu)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10737133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,230,000円

研究成果の概要（和文）：II型肺胞上皮細胞（AT2）は幹細胞としてのstemnessを含め不均一な形質の細胞であり、AT2形質不均一性の変化やstemness低下が病態進展に關する可能性がある。我々は、single-cell transcriptomic analysis手法により病態肺におけるAT2の形質不均一性を検討した。その結果、炎症性分子を高発現するAT2集団へ分化形質転換するtrajectoryであるinflammatory AT2(iAT2)を同定した。本研究では、iAT2のCOPD病態進展における役割と機能的解析を行い、難治性呼吸器疾患の病態解明とともに新規AT2を標的とした治療法の開発につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AT2がCOPD病態で重要であることは、従来から報告されているが、AT2の形質の不均一性や新規細胞集団の有無などの詳細は検討されてこなかった。本研究の成果から、iAT2がCOPDの発症や病態に關する詳細な分子メカニズムが明らかになる。現状、COPDの治療法に關しては、吸入ステロイドや気管支拡張剤などの対処療法しか治療選択肢がない。COPDの肺胞構造破壊につながるAT2の異常を標的とする新たな治療戦略は、難治性呼吸器疾患の新たな治療戦略開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Type II alveolar epithelial cells (AT2) are cells with heterogeneous morphology, including stemness as stem cells, and changes in AT2 morphological heterogeneity and reduced stemness may be involved in disease progression. We investigated AT2 plasmatic heterogeneity in diseased lungs by single-cell transcriptomic analysis. As a result, we identified an inflammatory AT2 (iAT2) trajectory that differentially transforms into an AT2 population that highly expresses inflammatory molecules. In this study, we will analyze the role of iAT2 in the pathogenesis of COPD and its functional analysis, which will lead to the elucidation of the pathogenesis of intractable respiratory diseases as well as the development of novel AT2-targeted therapies.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：COPD II型肺胞上皮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) II型肺胞上皮細胞研究の着眼点

II型肺胞上皮細胞(AT2)は肺胞表面活性物質のサーファクタント産生により、肺の虚脱を防いでいる。さらにAT2が増殖能を持ち、AT1に分化しうる組織幹細胞であることは、特に損傷治癒過程で重要で、AT2は、肺胞構造及び機能の恒常性維持で最も重要な細胞といえる。加齢に伴い発症する呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患(COPD)と特発性肺線維症(IPF)において、AT2でのオートファジーなど蛋白恒常性維持機構の破綻と、それに伴うアポトーシスやネクロトーシスといった細胞死、細胞老化の亢進、さらに治癒過程における機能異常などが病態進展に関与する可能性が示されている。興味深いのは、同様なAT2異常が報告されているCOPDでは肺気腫で肺構造を失い、一方IPFでは線維化で肺が固くなる点にある。AT2は幹細胞としてのstemnessを含め不均一な形質の細胞集団であり、AT2形質不均一性の変化やstemness低下が病態進展に関与する可能性があり、さらにAT2形質の違いがCOPDとIPFにおける病態進展及び差異の原因となる可能性がある。一方で、AT2形質の不均一性と、その機序の詳細を検討するには、AT2の細胞培養系の確立が必須であったが、*in vitro*では容易にAT1に分化してしまい、AT2の詳細な機能解析は現在に至るまで実現していない。また近年の細胞培養法の進歩から、iPS細胞から肺前駆細胞を作成し、さらにオルガノイド培養系によるAT2への分化誘導増殖の可能性が示されているものの、複雑なプロセスによる細胞分化誘導過程を必要とし、また分化誘導過程では成人加齢関連疾患で重要なエピゲノム情報は失われてしまう。そこで本来の細胞形質を保持した形でのAT2形質の全体像をまず理解するために、現在細胞単位での網羅的な機能解析法として広く用いられている、single-cell transcriptomic analysis手法により病態肺におけるAT2の形質不均一性を検討した。

#### (2) Single-cell transcriptomic analysisによるAT2形質不均一性の検討

近年のsingle-cell transcriptomic analysis手法の確立により、個々の細胞における遺伝子発現の違いによるcell clusteringにより、細胞形質の詳細な評価が可能となり、様々な病態に関与する新規細胞集団が同定されている。呼吸器病態解明にsingle-cell transcriptomic analysisを使用した報告は、IPF病態において散見されるものの、間質性肺炎の病態の多様性の影響もあり、病態特異的なAT2の新規細胞集団の同定には至っていない。そこで我々は、COPD病態に着目したsingle-cell transcriptomic analysisを進めてきた。健常者3例、non-COPD喫煙者3例、COPD6例の肺検体を用いて、single-cell transcriptomic analysisを行い、得られた解析データからt-SNE plotを作成し、上皮細胞におけるサブクラスターの検討を行った。その結果、AT2は7つのクラスター(AT2のサブクラスとして1-7を同定)に分類されることが判明し、各クラスターの分布の詳細を検討することにより、ある特定のAT2(cluster AT2-5)の細胞集団が健常者ではほとんど認められないが、non-COPD喫煙者や、特にCOPD患者肺において出現する細胞集団であることが判明した。

### 2. 研究の目的

Single-cell transcriptomic analysisは、新規細胞集団の同定には魅力的なツールだが、その機能や病態制御における役割の解明には、異なるアプローチも必要である。我々は、解析から得られた、COPD患者にのみ認められる新規AT2(AT2-5)の細胞集団に着目をして、single-cell transcriptomic analysisに加えて、細胞培養系やオルガノイド培養を用いて、その機能解析を行うことを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

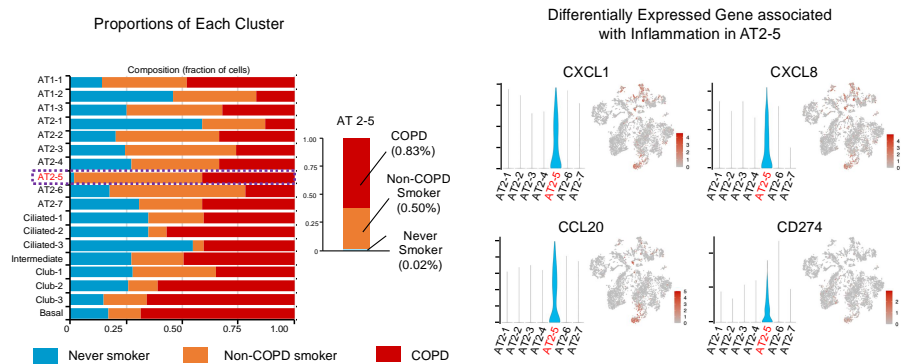
AT2-5 の機能解析に焦点を当て、COPD の病態解明とともに、新規 AT2 を標的とした治療法の開発までも視野に入れた検討を行う。この細胞集団は、組織幹細胞の一群として肺疾患の病態に関与している可能性が高く、喫煙肺や COPD における慢性炎症病態形成や肺気腫進展に関与するのかを検討する。また AT2-5 が肺内微小環境において、免疫細胞や間質細胞を中心とした他細胞と、どのような連携によって COPD 病態の形成/悪化につながっているかなどの検討を進めていく。具体的には、倫理審査に基づいて実施され、同意済みの患者肺検体から FACS を用いて AT2 を分離培養し解析に用いる。継続培養には、AT2 を用いたオルガノイド培養にてその形質の評価検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) inflammatory AT2(iAT2)の同定

AT2-5 の細胞集団に関する詳細な検討を single-cell transcriptomic analysis の遺伝子発現プロファイルを用いて追加検討を行った。遺伝子発現網羅解析から、この細胞集団では有意に炎症性シグナルやサイトカイン、ケモカインなど炎症に関与する因子が高発現していることが判明した(特に CXCL1、CXCL8、CCL20 および PD-L1)(図参照)。さらに、AT2 の細胞集団にお

ける pseudotime 解析を行い、細胞の trajectory を評価してみたところ、これまでの AT2 の AT1 への分化の lineage とは全く異なる、喫煙および COPD 病態



において出現する AT2-5 への特異的な細胞分化の軌跡を辿ることに成功した。このような、喫煙刺激および COPD 病態において出現する炎症性分子を高発現した AT2 を我々は inflammatory AT2 (iAT2)と命名し、この iAT2 の喫煙関連肺疾患の慢性炎症病態における役割の解析検討を進めた。

#### (2) AT2 オルガノイド培養を用いた解析

オルガノイド培養の用いるヒト AT2 細胞の回収のために、肺組織の一部を機械的にミンチし、DNase I、Collagenase type I、Dispase I を含む酵素を用いて解離させた。サンプルを 37 で 1 時間、水平回転させながらインキュベートした。細胞を洗浄し、100 μm と 40 μm のセルストレーナーにかけ、赤血球溶解バッファーで赤血球を溶解した。その後、細胞を HTII-280 抗体とインキュベートし、抗マウス IgM コーティング磁気ビーズと結合させ、磁気ビーズベースの AT2 細胞分離を可能にした。さらに Miltenyi MACS ビーズソーティングキットを用いて、製造者の指示に従って AT2 細胞を分離した。その後、細胞を DMEM/F12 で洗浄し、細胞数をカウント後、マトリゲルに播種した。オルガノイドの発育は良好であり、1 ヶ月毎の継代も及び凍結保存も可能であった。

肺検体の患者背景因子に着目して、オルガノイドの増殖、サイズ、colony-forming efficiency(CFE)を評価したところ、COPD 由来の AT2 オルガノイドではこれらの評価項目の異常が認められた。現在、AT2 オルガノイドを用いて iAT2 の特異的な表面マーカーで AT2 を分

離した集団における解析を行い、COPD 病態への iAT2 の関与メカニズムを検討している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watanabe Naoaki, Fujita Yu, Nakayama Jun, Mori Yutaro, Kadota Tsukasa, Hayashi Yusuke, Shimomura Iwao, Ohtsuka Takashi, Okamoto Koji, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi, Yamamoto Yusuke	4. 巻 67
2. 論文標題 Anomalous Epithelial Variations and Ectopic Inflammatory Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 708 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-05550C	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 Fujita Yu, Fujimoto Shota, Miyamoto Atsushi, Kaneko Reika, Kadota Tsukasa, Watanabe Naoaki, Kizawa Ryusuke, Kawamoto Hironori, Watanabe Junko, Utsumi Hirofumi, Wakui Hiroshi, Minagawa Shunsuke, Araya Jun, Ohtsuka Takashi, Ochiya Takahiro, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Fibroblast-Derived Extracellular Vesicles Induce Lung Cancer Progression in the IPF Microenvironment	5. 発行年 2023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.2022-02530C	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 Kadota T, Fujita Y, Araya J, Ochiya T, Kuwano K.	4. 巻 31(163)
2. 論文標題 Extracellular vesicle-mediated cellular crosstalk in lung repair, remodelling and regeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur Respir Rev	6. 最初と最後の頁 210106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/16000617.0106-2021.	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 Kadota T, Fujita Y, Araya J, Watanabe N, Fujimoto S, Kawamoto H, Minagawa S, Hara H, Ohtsuka T, Yamamoto Y, Kuwano K, Ochiya T.	4. 巻 10(10)
2. 論文標題 Human bronchial epithelial cell-derived extracellular vesicle therapy for pulmonary fibrosis via inhibition of TGF-β-WNT crosstalk.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Extracell Vesicles	6. 最初と最後の頁 e12124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jev2.12124.	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 Kizawa Ryusuke, Araya Jun, Fujita Yu	4. 巻 43
2. 論文標題 Divergent roles of the Hippo pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: tissue homeostasis and fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	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) 10.1186/s41232-023-00295-1	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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤田雄
2. 発表標題 Small RNAおよびエクソソームを用いた難治性呼吸器疾患における病態解明と治療法開発
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 直昭, 藤田 雄, 石黒 卓, 高橋 伸政, 清水 禎彦, 高柳 昇, 河端 美則, 荒屋 潤, 山本 雄介, 桑野 和善
2. 発表標題 びまん性肺疾患 線維化の病態 シングルセルRNA-seqおよび空間トランスクリプトーム解析の併用によるIPF病態解明
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2022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	荒屋 潤  (Araya Jun)  (90468679)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (32651)	

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