

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23390219

研究課題名(和文) 肺組織幹細胞への再分化転換機構を応用した炎症性肺疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文) A novel treatment strategy for inflammatory lung diseases, using de-differentiation mechanisms toward bronchiolar stem cells

研究代表者

菊地 利明 (KIKUCHI, Toshiaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10280926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：「細気管支幹細胞への再分化転換の誘導に蛋白分解酵素SLPI(secretory leukocyte protease inhibitor)が関わっている」という先行知見を元に、SLPIの下流シグナル分子を解析した。SLPIシグナルの下流で再分化転換機構に関わっている分子を同定し、「bronchiolar progenitor factor (BPF)」と命名した。さらに、この下流シグナルを炎症性肺疾患の新規治療法の開発へと応用することを試みた。ナフタレンによるマウス肺炎モデルにおいて、BPFの組換え蛋白質は、細気管支幹細胞への再分化転換を促すことによって、炎症を軽減することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Based on our finding that secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) was involved in differentiative switches between bronchiolar stem cells and differentiated lung cells, we investigated the downstream signals of SLPI. As a result, we identified a molecule that induced de-differentiation to bronchiolar stem cells in the signaling pathway of SLPI, and hereafter referred to it as bronchiolar progenitor factor (BPF). Administration of recombinant BPF protein ameliorated naphthalene-induced lung inflammation. These results suggest that the differentiative switches between bronchiolar stem cells and differentiated lung cells may be a useful target to develop a novel strategy for inflammatory lung diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

細気管支幹細胞は気道上皮の修復に重要と考えられている肺組織幹細胞である。2001年にvCE細胞、variant CCSP (Clara cell secretory protein)-expressing細胞、として発見され、その後の研究によって、気道分岐部のNEB (neuroepithelial body)や終末細気管支のBADJ (bronchioalveolar duct junction)のニッチに存在することが分かってきた。気道上皮細胞の細胞平均寿命は約100日と長いため、細気管支幹細胞は通常ほぼ静止状態にある。そして、細気管支幹細胞は緩やかに自己増殖を繰り返しながら、クララ細胞だけでなく、粘液細胞や線毛細胞へ分化している。

肺炎症による気道傷害が生体内に発生すると、細胞供給を増やすために、細気管支幹細胞の自己増殖や分化が促進され、さらには一旦分化したクララ細胞が細気管支幹細胞へと再分化転換を起こす。しかし、細気管支幹細胞への再分化転換機構の詳細はよくわかっていない。

申請者はこれまで、クララ細胞で発現している蛋白分解酵素SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor)を取り上げ、肝細胞増殖因子の産生を刺激する作用など、蛋白分解酵素では説明できない多彩な生理機能をSLPIについて報告してきた。さらにその研究の一環として、「SLPIは細気管支幹細胞からクララ細胞への分化を促しているが、逆にSLPIの阻害は細気管支幹細胞への再分化転換を促す」ことを見出した。

2. 研究の目的

当該研究では、「細気管支幹細胞への再分化転換の誘導にSLPIが関わっている」という先行知見を足がかりに、まず再分化転換機構の分子メカニズムを明らかにする。その上で、再分化転換による細気管支幹細胞の増加を、炎症性肺疾患の組織修復や炎症鎮静化へと役立て、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) SLPIの下流シグナル分子の解析<再分化転換機構の解明>

SLPI欠損マウス(細気管支幹細胞への再分化転換が促進されている)での発現差異を指標に、再分化転換に関わっているSLPI下流分子群を選び出す。

(2)炎症性肺疾患の新規治療法の開発

SLPI欠損マウスではナフタレン肺障害が軽微であったことから、肺炎症の軽減を目指して、SLPI下流分子群による再分化転換の促進を図る。

4. 研究成果

(1) SLPIの下流シグナル分子の解析<再分化転換機構の解明>

SLPI欠損マウスにおける細気管支幹細胞

数(図1)やナフタレンの肺炎症の程度を検討した。その結果、SLPI欠損マウスでは、有意に細気管支幹細胞数が増加しており、それに伴い、ナフタレンによる肺炎症は軽減されることがわかった。

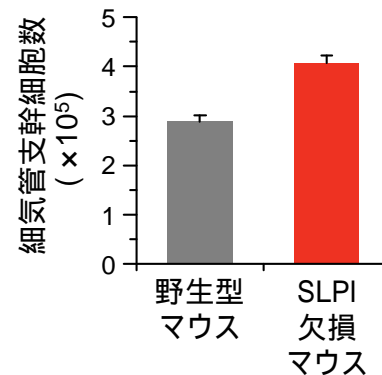


図1. SLPI欠損マウスおよび野生型マウスの細気管支幹細胞数。フローサイトメトリーを用いて、細気管支幹細胞(Lin陰性、Sca-1陽性、自己蛍光弱陽性)の数を測定した。

次に、SLPIの下流シグナルとして再分化転換に関わる因子を同定する目的で、SLPI欠損マウスの細気管支幹細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。

当初の計画では、SLPIとの結合が疑われている18個の蛋白質をsiRNAでin vivoノックダウンすることによって、SLPIの下流シグナル分子を明らかにする予定であった。しかし、その実験を行う前に、SLPIの下流シグナル分子をより網羅的にスクリーニングすることが、当該研究全体の推進に有益と考え、SLPI欠損マウスの細気管支幹細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った(図2)。

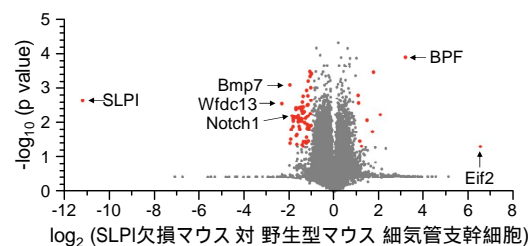


図2. SLPI欠損マウスおよび野生型マウスの細気管支幹細胞を用いたマイクロアレイ解析。SLPI欠損マウスおよび野生型マウスそれぞれ3匹ずつより、フローサイトメトリーを用いて、細気管支幹細胞(Lin陰性、Sca-1陽性、自己蛍光弱陽性)を分離し、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray(アジレント社)を用いて、mRNAの発現解析を行った。SLPI欠損マウス対野生型マウスで、発現が2倍以上に上昇あるいは半以下に低下し、かつその差異が有意であった遺伝子はそれぞれ10個と61個であった(赤丸で示す)。

この実験により、SLPI の下流シグナルに関連していると疑われる 71 個の遺伝子群 SLPI 欠損マウスで発現上昇している遺伝子が 10 個、発現低下している遺伝子が SLPI 遺伝子も含め 61 個) を同定することに成功した。

これらの 71 個の遺伝子群の中から、SLPI シグナルの下流で再分化転換機構に深く関わっていると考えられる分子を同定し、「bronchiolar progenitor factor (BPF)」と命名した。SLPI 欠損マウスにおける BPF の発現上昇は、蛋白質レベルにおいてもウエスタンブロットで確認した(図3)。

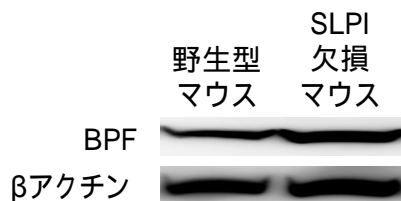


図3. マウス肺細胞における BPF 蛋白質の発現(ウエスタンブロット法)。図2の mRNA レベルでの実験結果に相応して、SLPI 欠損マウスの肺細胞では、野生型マウスの肺細胞に比し、BPF 蛋白質の発現が著明に増加していた。アクチンは、電気泳動に用いた蛋白質量が、両群間同程度であることを示している。

この BPF の遺伝子欠損マウスにおいては、SLPI の発現を shRNA で阻害しても細気管支幹細胞への再分化転換は促進されなかった(図4)。この結果から、BPF は SLPI の下流シグナルとして働いていることが示された。

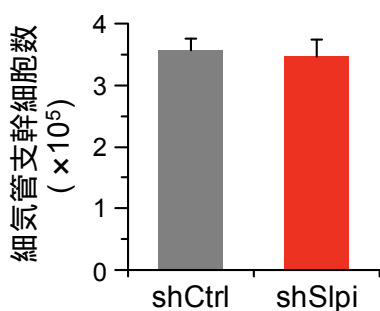


図4. BPF 欠損マウスにおける細気管支幹細胞数。BPF 欠損マウスに、SLPI の発現を抑制する short hairpin RNA を発現するプラスミド shSlpi、あるいはコントロール short hairpin RNA を発現するプラスミド shCtrl を、経静脈的に in vivo トランスフェクション法を用いて遺伝子導入した。shSlpi によって、肺細胞の SLPI 発現レベルは抑制されたものの、BPF 欠損マウスの細気管支幹細胞 (Lin 陰性、Sca-1 陽性、自己蛍光弱陽性) の数は、shCtrl に比し有意な増加は認められなかった。

(2) 炎症性肺疾患の新規治療法の開発

前項までの研究成果から、BPF が SLPI の下流シグナルとして細気管支幹細胞への再分化転換を促していることが示唆された。実際、BPF の組換え蛋白質 rBPF を野生型マウスに投与すると、細気管支幹細胞数の増加が認められた(図5)。

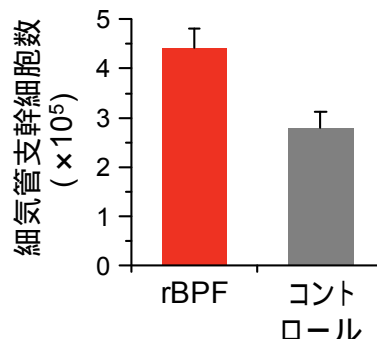


図5. BPF の投与による細気管支幹細胞数の増加。20 μg の BPF 組換え蛋白質 rBPF を、経静脈的に野生型マウスに投与し、その7日後に、細気管支幹細胞 (Lin 陰性、Sca-1 陽性、自己蛍光弱陽性) の数をフローサイトメトリー法で測定した。BPF の投与によって、細気管支幹細胞数は有意に増加した。

そこで、この BPF の機能を炎症性肺疾患の新規治療法へ応用することを試みた。その結果、ナフタレンによるマウス肺炎モデルにおいて、BPF の組換え蛋白質は、細気管支幹細胞への再分化転換を促すことによって、炎症を軽減することが明らかとなった(図6)。

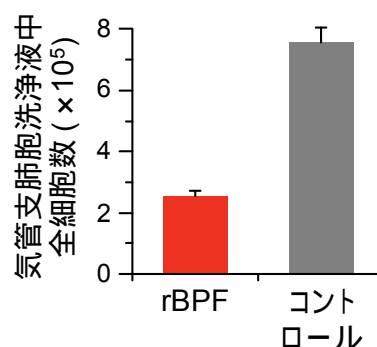


図6. ナフタレンによるマウス肺炎モデル。20 μg の BPF 組換え蛋白質 rBPF を、経静脈的に野生型マウスに投与し、その翌日、体重 1g 当り 200 μg のナフタレンを腹腔内投与した。その6日後に、肺炎症の程度を評価するために、気管支肺胞洗浄液中の全細胞数を測定した。rBPF の投与によって肺炎症は著明に軽減され、気管支肺胞洗浄液中の全細胞数は有意に減少した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 33 件)

1. Hirano T, Kikuchi T (全 15 名、2 番目). OX40 ligand newly expressed on bronchiolar progenitors mediates influenza infection and further exacerbates pneumonia. *EMBO Mol Med*. 2016, 8, 422-36. 査読有
DOI: 10.15252/emmm.201506154.
2. Santoso A, Kikuchi T (全 12 名、2 番目). Syndecan 4 mediates Nrf2-dependent expansion of bronchiolar progenitors that protect against lung inflammation. *Mol Ther*. 2016, 24, 41-52. 査読有
DOI: 10.1038/mt.2015.153.
3. Abe K, Kikuchi T (全 15 名、14 番目). Possible role of Krüppel-like factor 5 in the remodeling of small airways and pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2016, 17, 7. 査読有
DOI: 10.1186/s12931-016-0322-y.
4. Numakura T, Kikuchi T (全 12 名、6 番目). Simultaneous development of sarcoidosis and cutaneous vasculitis in a patient with refractory Crohn's disease during infliximab therapy. *BMC Pulm Med*. 2016, 16, 30. 査読有
DOI: 10.1186/s12890-016-0193-5.
5. Hashimoto Y, Kikuchi T (全 19 名、16 番目). 27-hydroxycholesterol accelerates cellular senescence in human lung resident cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016, in press. 査読有
DOI: 10.1152/ajplung.00351.2015.
6. Hirano T, Kikuchi T (全 8 名、7 番目). Two cases of endobronchial aspergilloma complicated with primary and metastatic lung cancer-case report and review literature. *Respir Investig*. 2016, in press. 査読有
7. Nakano Y, Kikuchi T (全 6 名、4 番目). New sterilization method using plasma discharge against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* on the surface of contact lens. *J Med Biol Eng*. 2016, in press. 査読有
8. Ito C, Kikuchi T (全 10 名、8 番目). CD8+ T cells mediate female-dominant IL-4 production and airway inflammation in allergic asthma. *PLoS One*. 2015, 10, e0140808. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0140808.
9. Tamada T, Kikuchi T (全 10 名、8 番目). Biomarker-based detection of asthma-COPD overlap syndrome in COPD populations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015, 10, 2169-76. 査読有
DOI: 10.2147/COPD.S88274.
10. Shibata S, Kikuchi T (全 9 名、7 番目). A 21-day of adjunctive corticosteroid use may not be necessary for HIV-1-infected pneumocystis pneumonia with moderate and severe disease. *PLoS One*. 2015, 22, 10, e0138926. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0138926.
11. Nihei M, Kikuchi T (全 13 名、10 番目). Chronic inflammation, lymphangiogenesis, and effect of an anti-VEGFR therapy in a mouse model and in human patients with aspiration pneumonia. *J Pathol*. 2015, 235, 632-45. 査読有
DOI: 10.1002/path.4473.
12. Ono M, Kikuchi T (全 14 名、13 番目). Mesenchymal stem cells correct inappropriate epithelial-mesenchyme relation in pulmonary fibrosis using stanniocalcin-1. *Mol Ther*. 2015, 23, 549-60. 査読有
DOI: 10.1038/mt.2014.217.
13. Shibahara I, Kikuchi T (全 19 名、10 番目). OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: a clue for successful immunotherapy. *Mol Cancer*. 2015, 14, 41. 査読有
DOI: 10.1186/s12943-015-0307-3.
14. Kikuchi T (全 13 名、1 番目). *Mycobacterium avium* genotype is associated with the therapeutic response to lung infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014, 20, 256-62. 査読有
DOI: 10.1111/1469-0691.12285.
15. Kanehira M, Kikuchi T (全 10 名、2 番目). Human marrow stromal cells downsize the stem cell fraction of lung cancers by fibroblast growth factor 10. *Mol Cell Biol*. 2014, 34, 2848-56. 査読有
DOI: 10.1128/MCB.00871-13.
16. Okuyama K, Kikuchi T (全 9 名中 5 番目). The involvement of glucocorticoids in psychological stress-induced exacerbations of experimental allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014, 163, 297-306. 査読有
DOI: 10.1159/000360577.
17. Jan Treda C, Kikuchi T (全 8 名、6 番目). Secretory leukocyte protease inhibitor modulates urethane-induced lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2014, 35, 896-904. 査読有
DOI: 10.1093/carcin/bgt382.
18. Muramatsu S, Kikuchi T (全 10 名、5 番目).

- Flagellin/TLR5 signaling potentiates airway serous secretion from swine tracheal submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013, 305, L819-30. 査読有
DOI: 10.1152/ajplung.00053.2013.
19. Okuyama K, Kikuchi T (全 8 名、7 番目). Contribution of CD4+ T cells and dendritic cells to female-dominant antigen-induced T helper type 2 cytokine production by bronchial lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013, 161 Suppl 2, 58-65. 査読有
DOI: 10.1159/000350426.
20. Fuse K, Kikuchi T (全 7 名、3 番目). Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother.* 2013, 19, 82-8. 査読有
DOI: 10.1007/s10156-012-0457-9.
21. Kanehira M, Kikuchi T (全 10 名、2 番目). Targeting lysophosphatidic acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells. *PLoS One.* 2012, 7, e32185. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0032185.
22. Takahashi H, Kikuchi T (全 8 名、7 番目). Pneumonia after earthquake, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012, 18, 1909-11. 査読有
DOI: 10.3201/eid1811.111660.
23. Ohkouchi S, Kikuchi T (全 9 名、6 番目). Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1. *Mol Ther.* 2012, 20, 417-23. 査読有
DOI: 10.1038/mt.2011.259.
24. Wong WF, Kikuchi T (全 20 名、5 番目). Runx1 deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J Immunol.* 2012, 188, 5408-20. 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1102991.
25. Okuyama K, Kikuchi T (全 7 名、6 番目). Higher sensitivity of male CD4+ T cells to suppressive effects of CD8+ T cells on IL-5 production compared to female CD4+ T cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012, 158 Suppl 1, 35-41. 査読有
DOI: 10.1159/000337759.
26. Watanabe A, Kikuchi T (全 14 名、4 番目). Usefulness of linezolid in the treatment of hospital-acquired pneumonia caused by MRSA: a prospective observational study. *J Infect Chemother.* 2012, 18, 160-8. 査読有
DOI: 10.1007/s10156-011-0309-z.
27. Daito H, Kikuchi T (全 16 名、2 番目). Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9-MyD88 in lung CD11b+ CD11c+ cells. *Eur Respir J.* 2011, 38, 688-701. 査読有
DOI: 10.1183/09031936.00177110.
28. Murakami K, Kikuchi T (全 9 名、5 番目). Toll-like receptor 4 potentiates Ca2+-dependent secretion of electrolytes from swine tracheal glands. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011, 45, 1101-10. 査読有
DOI: 10.1165/rcmb.2011-0020OC.
29. Oishi H, Kikuchi T (全 9 名、3 番目). The intensity of bronchiolar epithelial cell injury caused by an alloimmune response is ameliorated by transbronchial human interleukin-10 gene transfer in a rat model of lung transplantation. *Surg Today.* 2011, 41, 1458-60. 査読有
DOI: 10.1007/s00595-010-4472-0.
30. Gomi K, Kikuchi T (全 10 名、7 番目). Antibacterial activity of carbapenems against clinical isolates of respiratory bacterial pathogens in the northeastern region of Japan in 2007. *J Infect Chemother.* 2011, 17, 200-6. 査読有
DOI: 10.1007/s10156-010-0112-2.
31. Okuyama K, Kikuchi T (全 7 名、6 番目). T cell subsets related with a sex difference in IL-5 production. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011, 155 Suppl 1, 21-6. 査読有
DOI: 10.1159/000327261.
32. Fujimura S, Kikuchi T (全 5 名、4 番目). Risk factors for health care-associated pneumonia: transmission of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from general hospitals to nursing homes. *Am J Infect Control.* 2011, 39, 173-5. 査読有
DOI: 10.1016/j.ajic.2010.06.020.
33. Fujimura S, Kikuchi T (全 7 名、6 番目). Antibacterial effects of brand-name teicoplanin and generic products against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Chemother.* 2011, 17, 30-3. 査読有
DOI: 10.1007/s10156-010-0094-0.
- [学会発表](計 5 件)
Hirano T, Kikuchi T, Tode N, Ichinose M, Bronchial progenitor cells function as antigen presenting cells, American Thoracic Society International Conference, 2015 年 5 月 20 日, Denver (米国).

Kikuchi T, Pulmonary Stem Cell, 19th Congress of Asian Pacific Society of Respirology, 2014年11月14日, Bali (インドネシア).

Kikuchi T, Kobashi Y, Watanabe A, Ichinose M, Genotyping *Mycobacterium avium* has a clinical potential to predict therapeutic responses of the lung infection, European Respiratory Society Annual Congress 2013, 2013年9月10日, Barcelona (スペイン).

Tode N, Kikuchi T, Shibahara T, Daito H, Santoso A, Tamada T, Ohkouchi S, Ebina M, Nukiwa T, Innate immunity mediated by natural killer T cells is required for the development of hot tub lung in mice, American Thoracic Society International Conference, 2012年5月22日, San Francisco (米国).

Damayanti T, Santoso A, Kikuchi T, Nukiwa T, Deletion of Spli reduces lung inflammation after naphthalene induction, American Thoracic Society International Conference, 2011年5月16日, Denver (米国).

〔図書〕(計8件)

菊地利明、メディカルレビュー社、診療ガイドライン UP-TO-DATE 2016-2017、2016年、942頁(92-8頁)

三浦理、各務博、風間順一郎、成田一衛、菊地利明、医薬ジャーナル社、最新透析医療 先端技術との融合、2016年、859頁(773-80頁)。

菊地利明、医学書院、非結核性抗酸菌症診療マニュアル、2015年、142頁(2-14頁)。

菊地利明、中外医学社、Annual Review 2015 呼吸器、2015年、252頁(190-4頁)。

菊地利明、文光堂、イラストでわかる呼吸器内科学、2014年、159頁(8-9頁、20-1頁)。

菊地利明、アトムス、結核ハンドブック、2014年、232頁(213-26頁)。

菊地利明、南江堂、感染症診療 Pro&Con、2011年、165頁(91-4頁)。

菊地利明、診断と治療社、呼吸器研修ノート、2011年、840頁(423-7頁)。

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

名称：抗ヒト 0X40 リガンド抗体を用いたイ

ンフルエンザの新規治療法

発明者：菊地利明、平野泰三、一ノ瀬正和、石井直人、田中勇悦
権利者：国立大学法人東北大学、国立大学法人琉球大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/068920
出願年月日：2015年6月30日
国内外の別：国外

名称：新規抗ヒト 0X40 リガンド抗体、及びこれを含む抗インフルエンザ薬
発明者：菊地利明、平野泰三、一ノ瀬正和、石井直人、田中勇悦
権利者：国立大学法人東北大学、国立大学法人琉球大学
種類：特許
番号：特願 2014-135062
出願年月日：2014年6月30日
国内外の別：国内

名称：リゾリン脂質シグナル制御による幹細胞の維持増殖培養法
発明者：菊地利明、兼平雅彦、貫和敏博
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：PCT/JP2012/082979
出願年月日：2012年12月19日
国内外の別：国外

名称：リゾリン脂質シグナル制御による幹細胞の維持増殖培養法
発明者：菊地利明、兼平雅彦、貫和敏博
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：特願 2012-1441
出願年月日：2012年1月6日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/resp/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 利明 (KIKUCHI, Toshiaki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：10280926

(2) 連携研究者

服部 浩一 (HATTORI, Koichi)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：10360116

大河内 眞也 (OHKOUCI, Shinya)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40375035