

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591148

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを応用した肺胞上皮幹細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of somatic stem cells in an alveolar epithelial cell population using a label-retaining strategy

研究代表者

山田 充啓 (Yamada, Mitsuhiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00396483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：SPC-rtTA & TRE-H2BGFPマウスにドキシサイクリン(DOX)を胎生6.5日から生後14日まで投与すると、肺胞上皮系細胞の核がGFPにより標識されていた。DOXを中止すると、経時的に大部分の肺胞上皮細胞は標識を失っていったが、6週間後でも標識が核内に残存している細胞群(LRCs 肺胞上皮幹細胞)を確認した。LRCsの表面マーカーの発現をフローサイトメトリーにて解析を行った所、beta4-integrinの発現明らかに上昇していた。LRCsは明らかにコロニー形成率が高く、またコロニーの大きさも大きかった。LRCsの局在を共焦点顕微鏡にて解析した所、肺胞領域に散在して存在していた。

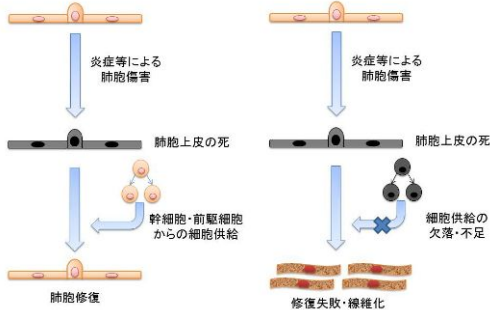
研究成果の概要(英文)：We crossed transgenic mice having the SPC promoter-driven reverse tetracycline transactivator with transgenic mice expressing histone H2B-GFP protein controlled by a tetracycline responsive regulatory element. Doxycycline was administered to the double transgenic mice from embryonic day 6.5 to postnatal day 14 for labeling. Lungs were harvested at postnatal day 56, and single lung cell suspensions were prepared. LRCs were identified by flow cytometry. Analyses for expression levels of previously reported lung epithelial stem cell markers (Sca-1, CD34, CD90, c-kit, CD24, alpha6-integrin, beta4-integrin) revealed that LRCs were enriched in beta4-integrin, but not in other markers. Both LRCs and H2B-GFP^{low} cells were also isolated by a fluorescence-activated cell sorter for colony formation assays. LRCs had a higher for epithelial colony formation compared to H2B-GFP^{low} cells. Fluorescence confocal microscopic analyses revealed that LRCs were located in alveolar area.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：組織固有幹細胞

1. 研究開始当初の背景

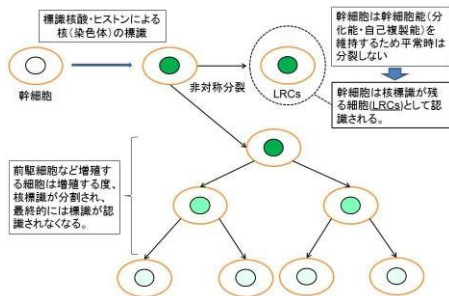
炎症等により、肺胞が傷害された後、正常に修復されるためには、脱落した肺胞上皮細胞が補充される必要がある。もし補充が不十分な場合、代償として線維芽細胞増生を誘発し、肺胞の線維化に至る (図1)。



(図1)肺胞の傷害・修復・線維化

申請者は肺傷害後の肺組織修復のメカニズムの解明をテーマとして研究を遂行している。これまでの研究成果により、肺胞の修復に骨髄由来幹細胞(Yamada M, Kubo H et al. J Immunol, 172:1266-72 (2004); Yamada M, Kubo H et al. et al. Thorax, 60:410-413 (2005)) および間葉系幹細胞(Hegab AE, Kubo H et al. Stem Cells Dev 19:523-535, (2010); Fujino N, Kubo H, Yamada M et al. Lab Invest 91: 363-378, (2011))が関与していることが明らかになると共に、肺組織固有幹細胞も肺胞上皮細胞の供給源として、肺胞修復に必要であることが示唆された(Kubo H, Yamada M et al. Proc Am Thorac Soc 5: 362-363, (2008))。しかしながら、肺胞上皮幹細胞を生体内で同定し、動態を追跡する試みは未だ行われていなかった。

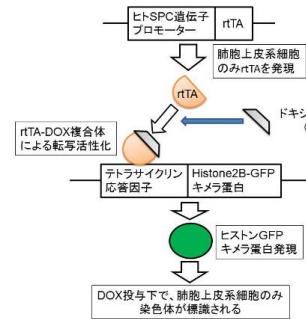
近年、標識核酸・ヒストンを利用した細胞核標識を応用し、組織固有幹細胞を同定する試みが皮膚組織等で報告されている(Tumbar T et al. Science 303: 359-362 (2004); Zhang YV et al. Cell Stem Cell 5: 267-278 (2009))。本方法により、生体内で幹細胞を Label-retaining cells(LRCs, 標識保持細胞)として認識・同定することが可能となった (図2)。



(図2)LRCs の定義

研究代表者は肺胞上皮系幹細胞を LRCs として認識・同定するため、Surfactant Protein C 遺伝子プロモーター制御下に rtTA を発現する SPC-rtTA (line2)マウス (Whitsett JA et al. Am J Respir Cell Mol Biol 40: 1-3 (2009))とテトラサイクリン応答因子(TRE)制御下に

Histone2B-GFP キメラ蛋白を発現する TRE-H2BGFP マウス (Tumbar T et al. Science 303: 359-362 (2004))を交配し SPC-rtTA & TRE-H2BGFP マウスを作成した(図3)。



(図3)SPC-rtTA & TRE-H2BGFP マウス

2. 研究の目的

研究代表者らは、上記の SPC-rtTA & TRE-H2B GFP マウスを用い、肺胞上皮系細胞の LRCs (肺胞上皮幹細胞)の同定、分離・解析を試みることを本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

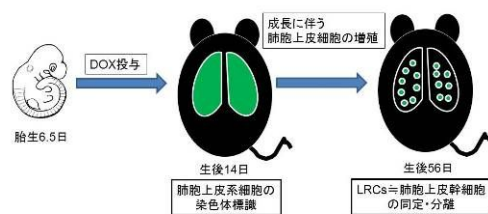
(1) SPC-rtTA & TRE-H2BGFP にドキシサイクリン(DOX)を胎生 6.5 日から生後 14 日まで投与する。投与中止より 2、4、6 週間後に肺を回収、肺胞上皮幹細胞(LRCs)を解析した(図4)。

フローサイトメトリーによる既知の幹細胞表面マーカー(Sca-1, c-kit, CD104 等)の測定 (Yamada M, Kubo H et al. J Immunol, 172:1266-72 (2004))。

セルソーターを用い、肺胞上皮幹細胞を分離、培養系での幹細胞能(増殖能・コロニー形成率)の確認 (Hegab AE, Kubo H et al. Stem Cells Dev 19:523-535, (2010))。

共焦点顕微鏡による肺胞上皮幹細胞の解剖学的位置の確認：幹細胞 niche(幹細胞を維持するための微小環境)の情報を得る(Fujino N, Kubo H, Yamada M et al. Lab Invest 91: 363-378, (2011))。

肺胞上皮幹細胞の網羅的遺伝子発現解析：標識が消失した肺胞上皮細胞と LRCs(肺胞上皮幹細胞)を分離、RNA を回収し遺伝子発現解析を比較検討した。



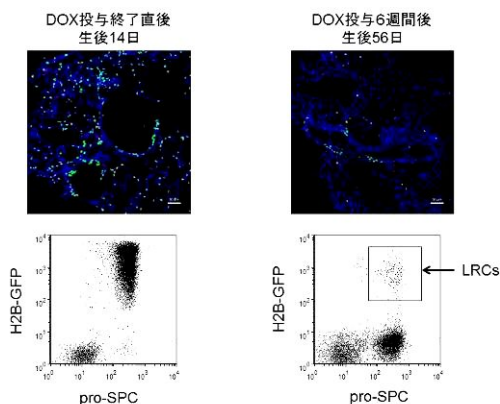
(図4) 肺胞上皮幹細胞(LRCs)の同定

(2) microRNA-21 の肺胞上皮系細胞における肺傷害時の役割解析

上記、方法(1)の結果より、LRCs はコントロール細胞群に比し、microRNA-21 の発現が有意に高かった。microRNA-21 の肺胞上皮幹細胞を含む肺胞上皮系細胞での役割を解析するため、先ず microRNA-21 の発現動態をコントロールマウス及びプレオマイシン肺傷害モデルにおいて解析を行った。

4. 研究成果

(1) SPC-rtTA & TRE-H2BGFP マウスにドキシサイクリン(DOX)を胎生 6.5 日から生後 14 日まで投与すると、肺胞上皮系細胞の核が GFP により標識されていた。DOX を中止し、2、4、6 週間後の肺を観察すると、経時的に大部分の肺胞上皮細胞は GFP 標識を失っていったが、6 週間後でも標識が核内に残存している細胞群 (LRCs 肺胞上皮幹細胞)を確認した(図 5)。

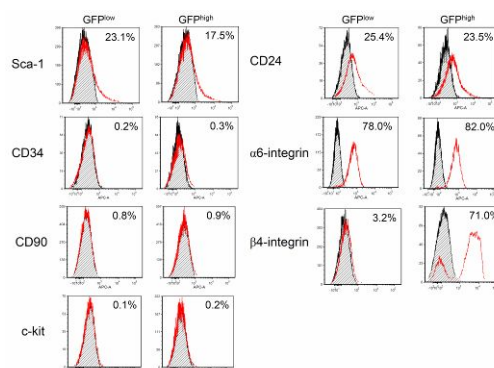


(図 5) SPC-rtTA & TRE-H2BGFP マウスにおける、肺胞上皮系細胞の標識と LRCs

共焦点顕微鏡像(上)とフローサイトメトリー像(下)。DOX を胎生 6.5 日から生後 14 日まで投与している。DOX 投与直後には肺胞上皮細胞の核がヒストン GFP キメラ蛋白により標識されている(左)。DOX 投与中止 6 週間後、大部分の肺胞上皮細胞は GFP 標識を消失しているものの、標識が核内に残存している細胞群 (LRCs 肺胞上皮幹細胞)が存在していた(右)。

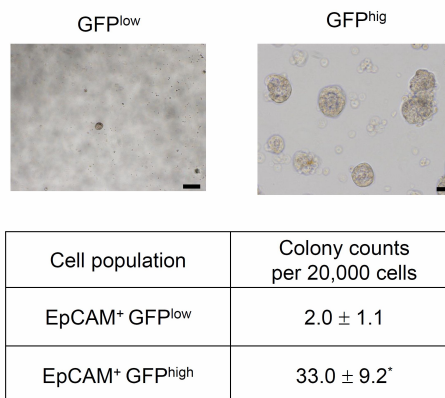
DOX 投与を中止後 6 週間後でも標識を保持している細胞群(LRCs)をフローサイトメトリーにて同定し、上皮幹細胞マーカー候補分子の発現について解析を行った。上皮幹細胞マーカー候補分子(Sca-1, CD34, CD90, c-kit, CD24, α6-integrin, β4-integrin)について、LRCs と GFP 標識を失った肺胞上皮細胞 (H2B-GFP^{low} 細胞)を比較解析した所、LRCs ではβ4-integrinの発現がH2B-GFP^{low} 細胞に比し明らかに上昇していた。他マーカーについては両者の細胞群に発現の差異を認めなかった(図 6)。

LRCs 増殖能・コロニー形成率について解析するため、セルソーターを用い、LRCs を分離し、マトリゲル・コラーゲン上で培養を



(図 6) 肺胞上皮 LRCs における各種上皮幹細胞マーカー候補分子の発現。コントロール細胞群 (H2B-GFP^{low} 細胞) に比し、β4-integrin の発現がに比し明らかに上昇している。

行い、H2B-GFP^{low} 細胞と比較検討した。LRC は H2B-GFP^{low} 細胞に比し、明らかにコロニー形成率が高く、またコロニーの大きさも大きかった (図 7)。



(図 7) LRCs のコロニー形成率。コントロール細胞群(EpCAM⁺ H2B-GFP^{low} 細胞)に比し LRCs のコロニー形成率は有意に高かった。

LRCs の解剖学的位置を確認するため、DOX 投与を中止後 6 週間後の SPC-rtTA & TRE-H2BGFP マウス肺組織切片を作成し、共焦点顕微鏡による観察を行った。これまでの報告(Kim CF et. al; Cell. 2005 121:823 など)では、肺胞と細気管支の接合部に気管支肺胞幹細胞(BASCs)が存在すると報告されていたが、LRCs は同部位に特化して局在しているわけではなく、肺胞領域に散在していた。

最近の報告に、成人肺では肺胞上皮幹細胞は SPC を発現していない細胞群に存在するという報告があった。そこで我々は SPC-rtTA & TRE-H2BGFP マウスにドキシサイクリン(DOX)を胎生 6.5 日から生後 1 日まで投与し、胎生期に SPC 陽性である細胞をラベリングした場合と生後 2 週間から 8 週間まで DOX を投与し、生後に SPC 陽性細胞をラベリングした場合の LRC 細胞を分離し、増殖能、コロニー形成率について検討した。

成体期 LRC は胎生期 LRC に比べ、増殖能、コロニー形成率が有意に低く、また成体期 H2B-GFP^{low} 細胞に比しても増殖能、コロニー形成率が有意であるも若干上昇しているのみであった。フローサイトメトリーにて上皮幹細胞マーカー候補分子(Sca-1, CD34, CD90, c-kit, CD24, alpha-6-integrin, beta-4-integrin)の発現についても解析を行ったが、成体期 LRC は胎生期 LRC と異なり、beta-4-integrin の発現は有意に上昇しておらず、一方、Sca-1 の発現が有意に上昇していた。細胞内の局在に関しては、胎生期 LRC および成体期 LRC とともに肺胞領域に存在していた。これらの結果は、成体期 LRC は胎生期 LRC とは異なる細胞集団であることを示唆し、肺胞上皮幹細胞の起源となる細胞は胎生期には SPC を発現しているものの、成体期では SPC の発現を失っている細胞集団である可能性が示唆された。

胎生期における肺の発生に関する研究報告でも、肺原基の末端に存在する SPC 陽性の肺原基細胞が中枢側に移動・各種細胞に分化するに従い、SPC の発現を消失することが指摘されており、成体期に存在する肺胞上皮幹細胞も、肺の発生に伴い、SPC の発現を失っているという今回の研究結果は既存の肺の発生の報告にも合致する結果と考えられた。

(2) LRCs の遺伝子発現解析をコントロール細胞と比較して行った所、microRNA-21 の発現が有意にコントロール細胞に比し高かった。microRNA-21 の機能・役割を解析するため、定常状態及びプレオマイシン肺傷害時の microRNA-21 の動態を解析した。未処置コントロールマウスにおいて、肺内皮細胞、肺間葉系細胞に比し有意に肺胞上皮系細胞での microRNA-21 の発現が高くなっていた。さらに肺胞上皮系細胞の microRNA-21 の発現はプレオマイシン投与後、定常状態に比し、有意に発現が上昇していた。

microRNA-21 は TGF-βシグナリングを増強することが報告されていた。そこで、microRNA-21 が上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition;) を促進する方向に関与していると考え、培養肺胞上皮細胞に microRNA-21 阻害薬を投与し、TGF-β誘導性の上皮間葉移行に対する影響を解析した。microRNA-21 阻害薬を投与された群は間葉系マーカーの発現上昇が減弱しており、形態的にも上皮様の形態を維持している細胞が多く、間葉系細胞様に変化している細胞が少なかった。以上のことから microRNA-21 は肺胞上皮の上皮間葉移行を促進することが判明した。

肺胞上皮幹細胞 (LRCs) においても microRNA-21 の発現が高いことから、幹細胞の機能維持または増殖等、幹細胞特有の機能に関与している可能性が高いが、非常に少ない肺胞上皮幹細胞に対して、microRNA-21 を効率的にノックダウンする方法が現時点で

は実現可能な実験系を構築することができず、今後の研究課題とする予定である。

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 1 件)

Mitsuhiro Yamada, Hiroshi Kubo, Chiharu Ota, Toru Takahashi, Yukiko Tando, Takaya Suzuki, Naoya Fujino, Tomonori Makiguchi, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Masakazu Ichinose. The increase of microRNA-21 during lung fibrosis and its contribution to epithelial-mesenchymal transition in pulmonary epithelial cells. Respiratory research, 査読有, Vol. 14, Issue 1, 2013, pp. 95. DOI: 10.1186/1465-9921-14-95

〔学会発表〕(計 2 件)

山田 充啓 Identification and characteristics of lung alveolar label-retaining cells. American Thoracic Society International Conference. 2013 年 5 月 12 日. Philadelphia(USA)

山田 充啓 The increase of miR-21 in serum exosomes during human interstitial lung diseases. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年 4 月 26 日 大阪国際会議場 (大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 充啓 (YAMADA, Mitsuhiro)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 00396483

(2)研究分担者

久保 裕司 (KUBO, Hiroshi)
東北大学・医学系研究科・研究員
研究者番号: 20332504