

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893106

研究課題名(和文)喫煙による肺傷害からの上皮細胞修復メカニズムと転写因子C/EBP の役割

研究課題名(英文)C/EBP-alpha protects lung epithelial cells during CS-induced lung injury

研究代表者

佐藤 篤靖 (SATO, ATSUYASU)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30706677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺傷害において 型肺胞上皮細胞は幹細胞として再生に重要とされている。研究者は 型肺胞上皮細胞が肺傷害後に分化、増殖することを純化した 型肺胞上皮細胞を用いて証明した。また 型肺胞上皮細胞に発現する転写因子C/EBP を肺上皮特異的にノックアウトしたマウスを作製し、喫煙において肺に保護的に働くことを証明した。

研究成果の概要(英文)：Alveolar type 2 cells are critical for lung homeostasis including regeneration after lung injury. In the present study, regeneration process was evaluated using isolated alveolar type 2 cells. The proliferation and differentiation of alveolar type 2 cells were shown by FACS based methods and lineage trace murine model. C/EBP-alpha, epithelial specific transcription factor, was specifically knocked down in lung epithelial cells. Using this model, the protective function of C/EBP-alpha against cigarette smoke stimulation was shown

研究分野：呼吸器内科

キーワード：C/EBP 喫煙 再生

1. 研究開始当初の背景

肺の発生時期に必須である一群の転写因子は、肺傷害に対する防御のみならず組織の再生に重要であることが解明されつつあり、近年では肺の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。C/EBP α は胎児期のII型肺胞上皮細胞の成熟に必須であるが、生後はクララ細胞、II型肺胞上皮細胞において発現し、肺傷害時のみ機能する。疾患におけるこのような胎児性転写因子の研究は近年進んでいるものの、C/EBP α については未熟である。COPD患者の喫煙による肺傷害では、どのように傷害と修復が繰り返されているかは全く不明である。転写因子C/EBP α の役割を検討することは複雑な疾患背景の理解、治療戦略に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

- a. II型肺胞上皮に存在する転写因子C/EBP α が急性肺傷害においてI型肺胞上皮細胞傷害を軽減することが予備検討より判明したが、傷害と修復のメカニズムは未知であり、Nicheな細胞群が幹細胞と言われているが一定の見解はない。II型上皮細胞が増殖し分化することを同定する。
- b. 「C/EBP α が喫煙による気道、肺胞上皮傷害に対して防御的に働く」という仮説を証明するために、C/EBP α 肺上皮特異的KOモデルマウスの喫煙暴露実験を行い気道上皮細胞、肺胞上皮細胞の変化を検討する。

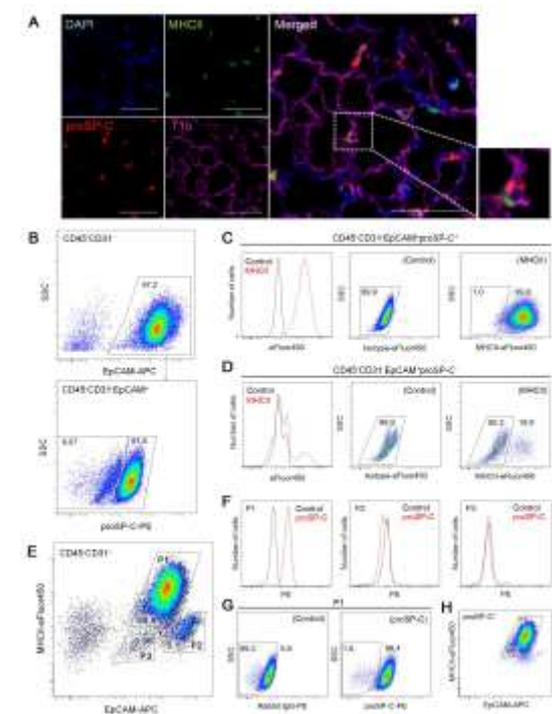
3. 研究の方法

- a. I型肺胞上皮細胞の傷害後における修復様式同定のため、マウスに対しBHTを腹腔内に投与する。肺上皮細胞の増殖と分化を可視化するために、肺上皮特異的にGFPを発現するモデルマウスを作製し、Lineage Trace Modelとする。肺泡領域の修復に重要な幹細胞がII型肺胞上皮細胞であることを証明するために蛍光免疫染色によりI型肺胞上皮細胞の再生過程を観察する。またII型肺胞上皮細胞を肺組織より高純度で単離しFACSでの発現やmRNAの発現を観察することで細胞の分化を特定する。
- b. C/EBP α を肺胞上皮特異的にKOしたモデルマウスを作製し、COPDのモデルとして慢性喫煙暴露を行い、気道領域、肺泡領域の組織学的変化を定量した。

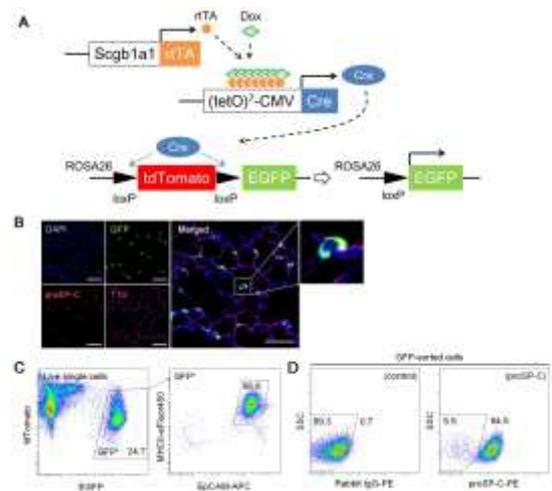
4. 研究成果

- ①マウスは急性肺傷害によりI型肺胞上皮細胞は傷害されるが第7日には正常に修復された。蛍光免疫染色では、通常のI型肺胞上皮細胞はRFP陽性であるが、II型肺胞上皮細胞より分化したI型肺胞上皮細胞はGFP陽性であった。これより肺の修復においてII型肺胞上皮細胞が修復する様式が特定された。これを細胞レベルで証明するためにII型肺胞上皮細胞を肺組織より高純度での単離を試みた。我々は多くの表面抗原よりMHCII

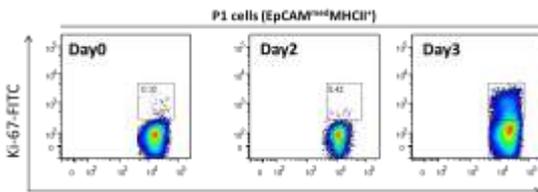
抗原を選択し(A)、これとEpCAMを組み合わせることにより、三つの分画を得ることに成功した(E)。それぞれはP1、P2、P3と名付け、P1はII型肺胞上皮細胞主体とした集団であった(G)。



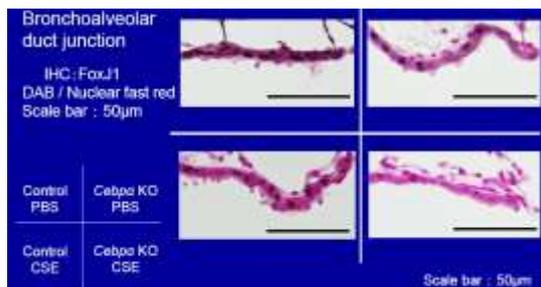
②また、ラット Scgbl1-rtTA プロモーターに Tet-on-Cre を交配し、GFP-Tomato マウスとも交配したトリプルトランスジェニックマウスを作製した。これによりII型肺胞上皮特異的に内因性GFP発現させ(A)本分離方法が適正であることを示した。GFP陽性細胞はII型肺胞上皮細胞と一部の気道上皮細胞で発現が確認されたが(B)、96.8%のGFP陽性細胞がP1分画に位置し(C, D)、それらはproSP-C陽性細胞であり、本方法によるII型肺胞上皮細胞の特異的単離は、内因性マーカーを用いた証明により明白であった。この方法は現在までの既報で最も純度の高い単離法である。



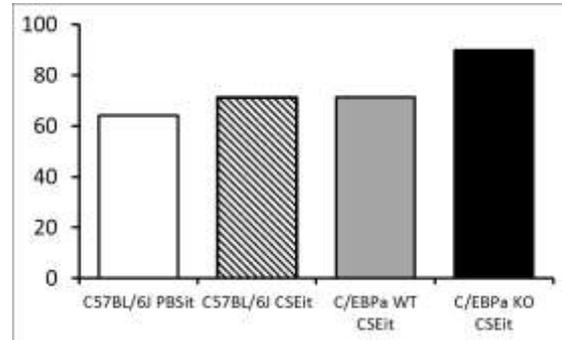
③肺傷害後にⅡ型肺胞上皮細胞を単離した実験では、分化は特定され、単離した細胞においても pdpn の発現が上昇し分化を示唆する所見を得た。増殖の観察のため、proSP-C と Ki-67、T1 α の蛍光三重染色を行い、Ki-67/proSP-C 陽性細胞を確認した。次にその定量と time course を観察するために肺傷害後にⅡ型肺胞上皮細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて増殖マーカーKi-67 の発現を P1 分画にて観察した。第3日にて増殖を確認した(図)。これよりⅡ型肺胞上皮細胞は増殖と分化をすることで肺傷害からの再生を行うことが証明された。しかしながら、同様の実験を喫煙モデルにて行っているが、細胞傷害が不十分であるのか修復機転を認めなかった。COPD では修復能の欠落と仮定しており、より長期に刺激を変更して再実験に望んでいる。



④C/EBP α の喫煙における役割について気道上皮レベルで検討した。気道においては約二カ月のタバコ抽出液を気管内注入することにより C/EBP α 上皮特異的 KO マウスでは FoxJ1 陽性の線毛上皮細胞の数の減少を認めた。Club 細胞に大きな変化はなかった。喫煙により線毛上皮細胞の数の低下が報告されるのは約 9 から 12 カ月の喫煙暴露のモデルで報告されており、半年の暴露でも線毛上皮細胞に影響は無いとされている。正常では蓄積された刺激によるものか、細胞回転周期で起こるのか、加齢により C/EBP α の活性変化によるものかは不明である。C/EBP α KO マウスは本来タバコ刺激に影響を受けない線毛上皮細胞を早期に失った現象は説明が困難である。現在は KO マウスを Lineage Trace Model と交配し、Quadruple Transgenic Mouse を作製し、喫煙刺激下での気道上皮細胞の傷害と再生過程を示し、再生過程の分化障害などが示されると期待している。



⑤次に、肺胞レベルでは同実験を行い、肺気腫の進展における C/EBP α の役割について検討した。において対照群に比較してより明らかな気腔の拡大を認め、喫煙に対する傷害に C/EBP α が保護的に働いている事が示唆された(下図)。



現在は C/EBP α により制御されるセリンプロテアーゼインヒビターの同定に努めている。また、計画に含まれるヒト肺における C/EBP α の発現を現在検討中である。実験計画のほぼすべてを申請期間内に終えることができた。本研究より得られた知見より TNF super family をの活性化を見出し、発展した思考で新規課題を申請し、受理いただき現在研究を行っている。

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)

[学会発表] (計 1 件)

1. A New Strategy of FACS-Based Alveolar Type II Cell Isolation Using MHC Antigen in Mice, [Publication Number: A3846]

K. Hasegawa, MD, A. Sato, MD, PhD, K. Tanimura, MD, Y. Fuseya, MD, K. Uemasu, MD, S. Sato, MD, Ph.D, M. Mishima, MD.PhD., S. Muro, MD

American Thoracic Society 2015, Denver

2. “Quantitative Assessment of Skeletal Muscle Mass in COPD Patients Using Chest CT Images, [Publication Number: A2260]”

K. Tanimura, MD, S. Sato, MD, Ph.D, A. Sato, MD, PhD, Y. Fuseya, MD, K. Hasegawa, MD, K. Uemasu, MD, T. Hirai, MD, PhD, M. Mishima, MD, PhD, S. Muro, MD

American Thoracic Society 2015, Denver

3. Intermittent Hypoxia-Induced Hydrogen Peroxide Impairs Lung Epithelial Cell Repair In Vitro, [Publication Number: A5979]

S. Hamada, MD, A. Sato, MD, PhD, K. Tanizawa, MD, K. Hasegawa, MD, K. Tanimura, MD, T. Matumoto, MD, R. Tachikawa, MD, M. Azuma, MD., K. Murase, MD, M. Inouchi, MD, PhD, T. Oga, MD, PhD, M. Mishima, MD, PhD, K. Chin, MD, PhD

American Thoracic Society 2015, Denver

“間欠的低酸素による気道上皮修復メカニズムへの影響”

濱田 哲¹⁾, 佐藤篤靖¹⁾, 谷澤公伸²⁾, 長谷川浩一¹⁾, 谷村和哉¹⁾, 松本 健¹⁾, 立川 良¹⁾, 東 正徳¹⁾, 村瀬公彦¹⁾, 井内盛遠²⁾, 半田知宏¹⁾, 小賀 徹²⁾, 三嶋理晃¹⁾, 陳 和夫²⁾

第55回日本呼吸器学会学術講演会ミニシンポジウム

[雑誌論文]

1. Hasegawa K, Sato S, Tanimura K, Fuseya Y, Uemasu K, Sato A, Hirai T, Mishima M, Muro S. Emphysema and airway disease affect within-breath changes in respiratory resistance in COPD patients.

Respirology. 2015 Mar 30. doi: 10.1111/resp.12535.

2. Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, Tanabe N, Sato A, Ogawa E, Muro S, Hirai T, Mishima M. p38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice.

BMC Pulm Med. 2014 May 7;14(1):79. doi: 10.1186/1471-2466-14-79.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤篤靖 (Atsuyasu Sato、さとう あつやす)

研究者番号:

30706677