

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10056

研究課題名(和文) ABCA3変異を有する2型肺胞上皮細胞前駆細胞を用いた肺胞修復薬剤の探索

研究課題名(英文) Investigating the drugs to repair injured alveolar epithelial cells using type 2 alveolar epithelial progenitor cells with ABCA3 mutations

研究代表者

大田 千晴(Ota, Chiharu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00733106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ABCA3蛋白は、2型肺胞上皮細胞に発現し、肺胞恒常性の維持に重要である。我々はヒト肺より肺胞上皮前駆細胞(AEPCs)を分離・培養する方法を開発した。本研究の目的は、ABCA3変異を持つ肺から分離したAEPCsを用いてABCA3変異によるAT2機能障害のメカニズムを明らかにすることである。ABCA3mt/mt-AEPCsとABCA3wt/wt-AEPCsの分化後の肺胞上皮様細胞を遺伝子発現比較したところ、変異型では野生型に比較して、細胞極性や上皮細胞恒常性維持に関与する遺伝子の発現が低下していた。一方、WNT signalingなどの肺発生に関与する遺伝子の発現が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ABCA3変異によって起こっていると考えられる肺胞上皮細胞(AT2)機能障害を、AT2の前駆細胞AEPCsを用いて再現したところである。本研究の成果を用い、ABCA3変異によって生じるAT2機能障害をターゲットとして、AT2の機能を改善するという新規視点による治療薬開発を目指すことができる。また、ABCA3は肺ではAT2に特異的な遺伝子であるため、ABCA3変異の解析はAT2傷害による難治性肺疾患のメカニズム解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Patients with homozygous or compound heterozygous mutations in ABCA3 gene cause severe lung diseases in infants and children. We isolated an alveolar epithelial progenitor cells (AEPCs) from human lungs. In the present study, we isolated AEPCs from 2 patients without ABCA3 mutations and from 2 patients with different ABCA3 mutations and analyzed the differentially expressed genes of the two groups. We evaluated the differentially expressed genes of AT2 derived from ABCA3-wt- and ABCA3-mt-AEPCs. Changes of cell polarity and epithelial barrier function, development associated genes in AT2 with ABCA3 mutation might be involved in the disease development.

研究分野：小児呼吸器

キーワード：肺胞上皮細胞 遺伝性間質性肺炎 ABCA3 肺胞上皮前駆細胞 肺胞傷害 肺胞修復 肺線維化

1. 研究開始当初の背景

肺胞上皮は1型肺胞上皮細胞(AT1)と2型肺胞上皮細胞(AT2)で構成されている。AT2はsurfactantを産生し、AT1傷害時には前駆細胞として肺胞の恒常性を維持する。AT2が傷害されると、肺胞上皮前駆/幹細胞が新たに分化して肺胞が修復されるが、間質性肺炎などの難治性肺疾患においてはこの修復過程が破綻していると考えられている(*Eur Respir Rev* 21: 152-160, 2012)。ATP-binding cassette (ABC) A3 蛋白は、AT2のラメラ体限界膜上に発現し、surfactant輸送・代謝、肺胞恒常性の維持に重要な役割を担っている。ABCA3は脂質トランスポーターとしてsurfactantを構成するリン脂質をラメラ体に輸送する。また、ABCA3はラメラ体そのものの形成にも関与する。ラメラ体内ではsurfactantを構成するsurfactant protein (SP)が前駆体から成熟体にプロセッシングされ、輸送されたリン脂質とともにsurfactant lipoproteinとして肺胞腔内に分泌される。このようにABCA3は肺胞形成および恒常性の維持にとって不可欠な蛋白であることから、種々のABCA3遺伝子変異が、新生児期の致死的肺傷害や小児期の間質性肺炎の原因となることが報告されている。Surfactant分泌不全による肺胞虚脱や、SP前駆体のプロセッシング障害によって集積した異常SPによるAT2の小胞体ストレスが病因とされているが、ヒトABCA3変異AT2における機能解析は進んでいない。これは、AT2の分離・培養が技術的に難しいことが一因である。また、兄弟例で同様の変異を有している場合でも、発症時期や症状が異なる場合があることから、疾患発症には遺伝子変異に加え、種々のエピジェネティック因子が関与する可能性も示唆される。

我々は、ヒト肺より肺胞上皮前駆細胞 (alveolarepithelial progenitor cells; AEPCs) を分離・培養する方法を開発した (*Lab Invest* 2011, 91:363-78)。AEPCsは2型肺胞上皮細胞特異的蛋白であるproSP-Cと、間葉系マーカーであるCD90を同時に発現し、自己複製能とともに、ラメラ体を有するAT2への分化能を持つ。我々はこれまでに、AEPCsから分化誘導したAT2の網羅的遺伝子発現解析や、慢性閉塞性肺疾患患者肺由来AEPCsにおける遺伝子発現解析 (*Respir Investig* 2012, 50:110-16)を行ってきた。今回、我々はABCA3遺伝子exon21およびexon25に複合ヘテロ接合体変異を有する8歳男児(*Eur J Pediatr* 2013, 172:953-57)の生体肺移植時の摘出肺からAEPCsを分離・培養した。このAEPCsの遺伝子変異解析を行ったところ、このAEPCsではもとの肺が有していたABCA3変異と同様の変異を有していることが明らかになった(ABCA3mt/mt-AEPCs)。一方、肺機能正常でABCA3変異を有していない10代気胸患者から摘出した肺検体から分離・培養したAEPCsでは変異を認めなかった(ABCA3wt/wt-AEPCs)。いずれのAEPCsでもflow cytometryによる解析で、AEPCsに特異的なCD90およびproSP-Cを同時に発現していたが、発現パターンは異なっていた(図4)。またABCA3wt/wt-AEPCsから分化誘導によって作成したAT2(ABCA3wt/wt-AEPCs-AT2)は円錐状のAT2様形態を示し、層状構造をもつラメラ体を形成していたが、ABCA3mt/mt-AEPCsから分化誘導によって作成したABCA3mt/mt-AEPCs-AT2は、紡錘状の間葉系細胞様の形態を示し層状構造のない異常なラメラ体を形成していた。

2. 研究の目的

本研究では、ABCA3mt/m-AEPCs を用いてABCA3 変異によるAT2機能障害のメカニズムを明らかにし、機能障害の改善のための薬剤を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

1. Surfactant 合成/分泌能の解析

ABCA3wt/wt-AEPCsおよびABCA3mt/mt-AEPCsを用い、AEPCsからAT2への分化誘導を行った。分化誘導開始5日後に細胞を回収して蛋白を抽出し、western blotting法およびELISA法を用いて、proSP-Cとmature SP-Cの割合について解析を試みた。Western blotting法では、proSP-Cおよびmature SP-Cを検出することが出来なかった。

2. SP-C発現細胞のソーティング

細胞内蛋白であるSP-C発現細胞をFACSでソーティングし、遺伝子発現を検出するシステムを構築した。このシステムを用いることで、ABCA3wt/wt-AEPCsおよびABCA3mt/mt-AEPCs由来AT2の遺伝子発現比較を行うことが可能となった。

3. 新たなABCA3変異AEPCsの樹立

研究期間中にABCA3変異を有する遺伝性間質性肺炎症例の肺移植が行われた。このため、ドナー肺から過去の報告と同様の方法で新たなABCA3mt/mt-AEPCsを樹立した。

4. ABCA3mt/mt-AEPCsとABCA3wt/wt-AEPCsの分化前後での遺伝子発現比較

上記によって集積した ABCA3mt/mt-AEPCs2 例、ABCA3wt/wt-AEPCs2 例をそれぞれ分化誘導し、分化前後での遺伝子発現を microarray を用いて比較した。

4. 研究成果

1. 培養上清中のproSP-Cを検出するELISAでは、ABCA3mt/mt-AEPCs由来AT2でABCA3wt/wt-AEPCs由来AT2より優位に高いproSP-Cを検出した。これはABCA3mt/mt-AEPCs由来AT2におけるラメラ体内proSP-Cプロセッシングの低下を示唆している可能性がある。

2. SP-C発現細胞のソーティングはこれまで報告されてこなかった方法であり、この方法を用いることで、これまで不可能であった2型肺胞上皮細胞特異的蛋白(proSP-C)を用いた純度の高い2型肺胞上皮細胞および2型肺胞上皮様細胞(AEPCからの分化誘導)の単離および遺伝子解析が可能になった。

3. ABCA3mt/mt-AEPCsとABCA3wt/wt-AEPCsの分化前後での遺伝子発現比較を行った。分化後では、変異型、野生型ともに、分化前に比してThy-1やVimentinをはじめとした間葉系幹細胞マーカーが低下しており、間葉系細胞から上皮への分化誘導が進んだことが示唆された。また、分化後の肺胞上皮様細胞を比較したところ、変異型では野生型に比較して、細胞極性や上皮細胞恒常性維持に關与する遺伝子の発現が低下しており、一方、WNT signalingなどの肺発生に關与する遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 12件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ota Chiharu, Ng-Blichfeldt John-Poul, Korfei Martina, Alsafadi Hani N., Lehmann Mareike, Skronska-Wasek Wioletta, M. De Santis Martina, Guenther Andreas, Wagner Darcy E., K?nigshoff Melanie	4. 巻 8
2. 論文標題 Dynamic expression of HOPX in alveolar epithelial cells reflects injury and repair during the progression of pulmonary fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-31214-x	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 該当する
1. 著者名 Lehmann Mareike, Buhl Lara, Alsafadi Hani N., Klee Stephan, Hermann Sarah, Mutze Kathrin, Ota Chiharu, Lindner Michael, Behr J?rgen, Hilgendorff Anne, Wagner Darcy E., K?nigshoff Melanie	4. 巻 19
2. 論文標題 Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-018-0876-y	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 該当する
1. 著者名 Ota Chiharu, Kimura Masato, Kitami Masahiro, Kure Shigeo	4. 巻 bcr ~ 2018-224573
2. 論文標題 Asymptomatic left atrial appendage aneurysm (LAAA) with pericardial defect in a 1-year-old girl	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1136/bcr-2018-224573	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 該当する
1. 著者名 Kamata S, Fujino N, Yamada M, Grime K, Suzuki S, Ota C, Tando Y, Okada Y, Sakurada A, Noda M, Matsuda Y, Sugiura H, Ichinose M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Expression of cytochrome P450 mRNAs in Type II alveolar cells from subjects with chronic obstructive pulmonary disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacol Res Perspect.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Lehmann M, Korfei M, Mutze K, Klee S, Skronska-Wasek W, Alsafadi HN, Ota C, Costa R, Schiller HB, Lindner M, Wagner DE, Guenther A, Koenigshoff M	4. 巻 50
2. 論文標題 Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.02367-2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Takaya, Ota Chiharu, Fujino Naoya, Tando Yukiko, Suzuki Satoshi, Yamada Mitsuhiro, Kondo Takashi, Okada Yoshinori, Kubo Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Improving the viability of tissue resident stem cells using an organ preservation solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2093 ~ 2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12748	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 該当する

1. 著者名 Rokugo Yuka, Ota Chiharu, Kimura Masato, Sasahara Yoji	4. 巻 12
2. 論文標題 Preoperative administration of propranolol reduced the surgical risks of PHACES syndrome in a 14-month-old girl	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e228117 ~ e228117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2018-228117	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 該当する

1. 著者名 Ota Chiharu, Baarsma Hoeke A., Wagner Darcy E., Hilgendorff Anne, Koenigshoff Melanie	4. 巻 3
2. 論文標題 Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40348-016-0062-6	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 該当する

1. 著者名 Makiguchi Tomonori, Yamada Mitsuhiro, Yoshioka Yusuke, Sugiura Hisatoshi, Koarai Akira, Chiba Shigeki, Fujino Naoya, Tojo Yutaka, Ota Chiharu, Kubo Hiroshi, Kobayashi Seiichi, Yanai Masaru, Shimura Sanae, Ochiya Takahiro, Ichinose Masakazu	4. 巻 17
2. 論文標題 Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-016-0427-3	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 該当する

1. 著者名 Ando Katsutoshi, Fujino Naoya, Mitani Keiko, Ota Chiharu, Okada Yoshinori, Kondo Takashi, Mizobuchi Teruaki, Kurihara Masatoshi, Suzuki Kenji, Hoshika Yoshito, Ebana Hiroki, Kobayashi Etsuko, Takahashi Kazuhisa, Kubo Hiroshi, Seyama Kuniaki	4. 巻 310
2. 論文標題 Isolation of individual cellular components from lung tissues of patients with lymphangioliomyomatosis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L899 ~ L908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00365.2015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Chiharu, Ishizawa Kota, Yamada Mitsuhiro, Tando Yukiko, He Mei, Takahashi Toru, Yamaya Mutsuo, Yamamoto Yasuhiko, Yamamoto Hiroshi, Kure Shigeo, Kubo Hiroshi	4. 巻 54
2. 論文標題 Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 98 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2015.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Chiharu, Kimura Masato, Kure Shigeo	4. 巻 51
2. 論文標題 ABCA3 mutations led to pulmonary fibrosis and emphysema with pulmonary hypertension in an 8-year-old girl	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Pediatric Pulmonology	6. 最初と最後の頁 E21 ~ E23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppul.23379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大田千晴, 木村正人, 荒川貴弘 呉 繁夫
2. 発表標題 慢性肺疾患に合併した肺高血圧に対し 肺血管拡張薬投与が有効であった2例
3. 学会等名 日本小児呼吸器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiharu Ota, John-Poul Ng-Blichfeldt, Kathrin Mutze, Wioletta Skronska, Hoeke Baasma, Darcy Wagner, Melanie Koenigshoff
2. 発表標題 HOPX-WNT pathway regulates alveolar homeostasis
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 John-Poul Ng-Blichfeldt, Chiharu Ota, Jan Stolk, Pieter Hiemstra, Reinoud Gosens, Melanie Koenigshoff
2. 発表標題 Wnt activity marks lung progenitors capable of forming spheres in vitro
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大田千晴
2. 発表標題 間質性肺炎に対し, 脳死肺移植を施行した1歳女児例
3. 学会等名 第19回東北びまん性肺疾患研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019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	菊池 敦生 (Kikuchi Atsuo) (30447156)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	丹藤 由希子 (Tando Yukiko) (70596212)	東北大学・加齢医学研究所・JSPS特別研究員(RPD) (11301)	
研究分担者	木村 正人 (Kimura Masato) (80646894)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	