

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08785

研究課題名(和文) 気道・肺の障害・修復と再生におけるp53の役割～p53遺伝子改変ブタを用いた研究

研究課題名(英文) The role of p53 during airway and lung injury, repair and regeneration using TP53-mutant porcine

研究代表者

鳥羽 博明 (TOBA, Hiroaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：40403745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：野生型ブタとp53 KOブタを用い、LPSを経気道的に右前葉に選択的に投与して急性肺障害モデルを作成した。CTでは2時間後に浸潤影が出現し、48時間後ではconsolidationを呈した。6時間後、p53 KOブタにて有意な脈拍の低下を認めた。両群で肺障害を呈していることを組織学的に確認した。血清・BALサンプルでは、6時間後のp53 KOブタにおいて、TNF- α ・IL-6・IL-10が上昇していた。加えて、ブタ肺からのオルガノイドを試み、基底細胞マーカー陽性細胞を安定的に回収し、3D培養で14日目にオルガノイド様構造物を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、解剖学的・生理学的にヒトに近いブタ、特にp53 KOブタを用いて、p53が急性気道・肺胞上皮の障害・再生にどのような役割を果たすかどうかについて明らかにすることであった。LPS誘導急性肺障害モデルを用いた結果から、p53が肺障害による悪影響から守る役割を果たしている可能性が示唆された。このことから、大動物における肺障害においてのp53の役割に関する知見の一端を初めて明らかにすることができたと考える。

研究成果の概要(英文)：We used lipopolysaccharide(LPS)-induced acute lung injury porcine model for this study. Under general anesthesia, LPS was selectively administrated intratracheally into the right anterior lobe by using bronchoscope in both wild type and p53 KO groups. Computed tomography (CT) already showed the infiltrations at 6 hours (hrs) and consolidations at 48 hrs after administration in the lung fields of both groups. At 6 hrs after LPS administration, the pulse rate was significantly decreased in p53 KO group. In both groups, the findings of acute lung injury were histologically confirmed. Some cytokines and chemokines were measured by using samples of serum and bronchoalveolar lavage (BAL), and TNF- α , IL-6 and IL-10 were increased at 6 hrs after LPS administration in p53 KO group. Additionally, we tried to form the organoids from porcine lung. We could collect basal cell marker positive cells, and confirm the formation of the organoids-like structures under 3-dimensional culture for 14 days.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：急性肺障害 肺の修復・再生 p53遺伝子改変ブタ 肺オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺の再生は、多数の細胞が関与していること、細胞ソースの選択、足場の構築、分化促進の環境整備や3D構築が難しいことから、創ることが困難とされる。また最終的にガス交換という機能を持たせないといけないため、とりわけハードルが高い。近年、Embryonic stem cell (ES細胞)・iPS細胞を用いて個々の気道・肺胞上皮細胞への分化・誘導させることに成功した報告もあるが、未だ機能を持つ肺を創るまでには至っていない。このような複雑な臓器であることから、ベースとなる知見もまだ少ないのが現状としての問題である。これまで、われわれは様々な手法で肺の再生に取り組んできた。ラット胎仔肺組織を正常肺・線維化肺に移植し、生着・分化すること、肺への分化を方向付けられた細胞と足場である間葉系細胞の重要性を報告した。また、マウスiPS細胞から終末細気管支の局所幹細胞である気管支肺胞幹細胞(Bronchioalveolar stem cells: BASCs)の分化・誘導にも成功し、その気道内投与が終末細気管支障害の修復を促進することを証明した。このように主にマウス・ラットのような小動物を用いて肺の再生に関する様々な基礎的知見を得てきた。

一方で、iPS細胞などの細胞ソースをより効率的で良い方向に導くためには、様々な遺伝子に着目し、分子生物学的な角度からも知見を蓄積する必要性を感じていた。そこで本研究では癌抑制遺伝子であるp53蛋白に着目した。その頃、マウスでp53の欠失が気道上皮前駆細胞の自己再生・多分化能・増殖を促進し、気道上皮細胞の修復を調節していることが報告されたこと、加えて、本大学生物資源学科の音井研究室において、簡便な方法で遺伝子改変ブタを作製する手法を開発し、p53 KOブタを作成・飼育していることを知り、p53 KOブタを実験に使用することができることを知った。そこで今回、最終的にヒトに当てはめるためには、ヒトに近い大動物であるブタの気道・肺障害・修復過程や再生において、p53がどのような役割を果たしているのかを証明することが必要であると考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、解剖学的・生理学的にヒトに極めて近いブタを用いた肺障害・修復、肺の再生に関する研究であり、p53がブタ肺の気道・肺胞上皮細胞の障害・修復に果たす役割、ブタ肺からOrganoidを作成し、その形成過程でp53が果たす役割、Organoidをブタ肺に移植し、足場存在下での生着・分化、p53の有無による違いについて明らかにすることを目的とした。今回のプロジェクトでは、とりわけp53 KOブタを用いてこのような研究を行った報告はなく、われわれ独自の試みであり、p53の有無が、大動物の肺胞・気道上皮の障害・修復において果たす役割、Organoid形成過程や移植後の分化において果たす役割を明らかにすることで、最終的に今後の肺の再生医療の発展に寄与することを念頭に置いた。

3. 研究の方法

野生型/p53 KOブタを用いて、急性肺障害(ALI)モデル、気道上皮障害モデルを作成し、p53が大動物の気道・肺胞上皮の障害・修復過程で果たす役割を明らかにする。

- (1) LPS誘導ブタ急性肺障害(ALI)モデルの自然経過を観察する。野生型ブタ(n=3)に全身麻酔下に気管支鏡下にLPS(055:B5, 5mg/kg)20mlを右肺前葉に選択的に気道内投与する。経時的に(投与前・2・6時間・48時間後)CT撮像と気管支鏡下に組織を採取し、最終的には犠牲死させ、右肺前葉を摘出する。CT所見と組織学的評価(H-E)から、障害の最も強い時期と修復が進む時期のタイムポイントを決定する。
- (2) p53の有無でのLPS誘導ALIモデルによる肺障害と修復過程の違いを比較する。野生型群(n=5)/p53 KO群(n=5)にLPSを右肺前葉に気道内投与する。同時に両群の左肺前葉に20mlのPBSを投与し、コントロールとする。各タイムポイントでCT撮像し、同時に血清・気管支肺胞洗浄液(BAL)10mlを採取し、最終的に両肺前葉を摘出する。評価項目は、BAL:細胞数の測定、上清のMPO活性とMicrobeads arrayでサイトカインの測定、程度と経時変化: W/D比、CT所見、障害のスコア化、p53と構成細胞の局在・定量的評価: p53/PDPN(I型肺胞上皮)/Sftpc(II型肺胞上皮)、細胞増殖: Ki-67、アポトーシス: TUNEL、II型肺胞上皮の増殖: Sftpc/Ki-67二重染色。
- (3) ブタ肺の基底細胞由来の肺Organoidを作成。マウス基底細胞由来のOrganoidではclub細胞・線毛上皮細胞の構築される。野生型ブタ/p53 KOブタそれぞれの気管~気管支を摘出し、コラゲナーゼ処理し、気道上皮のみを得る。基底細胞のマーカーのp63+/ITGA6+細胞をFACSにて回収後、 3.0×10^4 /mlに調整し、differentiation medium内で3D培養する(マトリゲルは底25%/上層5%)。経時的に観察し、14日間培養してOrganoidを作成し、p53の有無による形態構築や分化の違いを検討する。評価項目は、経時変化: 電子顕微鏡で超微形態、bronchosphereの形態形成の違いと各タイムポイントで、ITGA6・p63・NGFR(基底細胞)/DNA12(線毛上皮細胞)の発現の違いを免疫染色・RT-PCRにて確認、Organoidでの細胞分布: Foxj1・tubulin・DNA12(線毛上皮細胞)、MUC5AC・CCSP(club細胞)、p63・CK5(基底細胞)の免疫染色。

4. 研究成果

野生型ブタ (n=5) と p53 KO ブタ (n=3) に対して, Lipopolysaccharide (LPS) 誘導急性肺障害モデルの作成した. 全身麻酔下に挿管し, 気管支鏡下に LPS 1 mg/kg を右前葉に選択的に投与し, コントロールとして左前葉に選択的に PBS のみ同量を注入した. 投与直前・2 時間後・6 時間後・48 時間後をタイムポイントとして, バイタルサイン, CT 撮像, 気管支肺胞洗浄液 (BAL), 血清を採取し, 最終的に 48 時間後に犠牲死させて肺組織を採取した. 野生型ブタ・p53 KO ブタともに, CT では 2 時間後, すでに LPS を投与した右前葉には浸潤影が出現し, 48 時間後には consolidation を呈していた. 加えて, 6 時間後のバイタルサインでは有意に p53 KO ブタにて脈拍の低下を呈した. 左前葉のコントロール群と比較肺乾湿比, BAL 中細胞数もコントロール群と比べて有意に増加していた. また, 組織学的にも, 両群とも急性肺障害を呈していることを確認することができた. 加えて, 血清・BAL サンプルを用いて, サイトカインパネルを用いてサイトカイン・ケモカインの測定を行い, 6 時間後のサンプルで p53 KO ブタにおいて, TNF- α ・IL-6・IL-10 が有意に上昇していることを確認した. 以上より, p53 が肺障害による悪影響から守る役割を果たしている可能性が示唆され, 大動物における肺障害における p53 の役割に関する知見の一端を初めて明らかにすることができたと考える.

さらに, ブタ肺からのオルガノイドを作成した. 野生型ブタの気管～気管支を採取して, 再現性をもって基底細胞マーカー (p63+/ITGA6+) 陽性細胞を安定的に回収した後, 3D 培養で 14 日目にオルガノイド様構造物を確認できた. 一方で, 各種気道上皮・肺胞上皮のマーカーの免疫染色では, 気道・肺胞上皮細胞への分化が確認できる段階までには至らなかった. しかしながら, ブタ肺からオルガノイドを作成できる可能性, それを肺再生の研究に用いることができる可能性を示すことができたと思われる.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	川上 行奎 (KAWAKAMI Yukikiyo) (00596249)	徳島大学・病院・特任講師 (16101)	
研究分担者	河北 直也 (KAWAKITA Naoya) (60522266)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	森本 雅美 (MORIMOTO Masami) (90563817)	徳島大学・病院・特任助教 (16101)	
研究分担者	谷原 史倫 (TANIHARA Fiminori) (90754680)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	平田 真樹 (HIRATA Maki) (10815583)	徳島大学・バイオイノベーション研究所・講師 (16101)	

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