

令和元年6月19日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09553

研究課題名(和文)肺微小環境再生に関する脂質の解析

研究課題名(英文)Lipid metabolism related to regenerative niche in lung model

研究代表者

清水 泰生 (SHIMIZU, YASUO)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80396621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺の微小環境再生にかかわる脂質の同定と局在を明らかにすることを目的とした。iPS細胞由来血管内皮細胞(iEC)を用いてマトリゲル内で内皮のネットワーク形成を作成しその後肺性幹細胞(HPMSC)をネットワークに接種しco-cultureを行った。高濃度のHPMSCは24hrの早期にiECネットワーク内へ広がりがりco-culture後のネットワークの脂質代謝はiECネットワーク単独で同定された脂質代謝とは明らかに異なった。in vitroでiECとHPMSCというhybridな微小環境を作成しco-cultureによる代謝変化をMALDI-IMSで観察できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

in vitroでiPS細胞から作成された血管内皮のネットワークを背景に肺組織由来幹細胞の接種による代謝変化をMALDI-IMSで明らかにすることができた。このことは疾患由来血管内皮細胞のネットワークを背景としたin vitroの組織幹細胞治療モデルや動物実験で肺内に投与した組織幹細胞治療効果を代謝の面から解析することができる可能性を示唆しており薬剤開発や病態解明に有用な手法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the lipids and the locations related-to regenerative niche in lung model. Human lung tissue derived stem cells (HPMSC) were inoculated to endothelial network composed by induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived endothelial cells (iEC). Co-culture was done in the matrigel which were onto indium tin oxide slide glass (ITO glass slide). Analysis was performed using MALDI-IMS. High number of HPMSC inoculation showed the rapid spreading of HPMSC into iEC network accompanied with the lipid metabolic changes of the network within 24hr. These results indicated that in vitro hybrid niche model composed by iEC and HPMSC, which is composed by iPSC derived cells (iEC) and tissue stem cells, was useful models to analysis metabolic changes using MALDI-IMS, and this model could be applied for the analysis of metabolic changes to drug or pathophysiology of lung diseases by using EC from disease specific iPSC.

研究分野：呼吸器 アレルギー疾患の再生医療

キーワード：再生 肺 iPS細胞 組織幹細胞 MALDI-imaging 脂質 血管内皮細胞 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患や肺線維症患者における血中の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell, EPC) は、その数において健常人と比較し少なく、コロニー形成能も低く、これらのことが肺修復能の損なわれている一因であることが示唆されている (Mali F et al. Plos One 2013, Smadja DM et al. Angiogenesis 2013)。このことは、EPC を用いた血管構築を標的とした細胞治療がこれらの疾患に有効である可能性を示唆している。EPC のような末梢血幹細胞を用いた治療における問題点は、患者由来の末梢血幹細胞の大量培養が難しく、自分以外から採取された幹細胞を使うことは免疫学的な拒絶も招く。induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) から誘導した endothelial progenitor cell (EPC) あるいは endothelial cell (EC) は繰り返し大量培養が可能で、自身の細胞を用いることも出来る上、遺伝子変異があればそれを修復したものを自身に使用することも可能である。さらに HLA タイプの一致した iPS 細胞を疾患治療に用いるための iPS 細胞バンク事業も整備されつつあるため、自身の iPS 細胞ではなくても HLA タイプの一致した iPS 細胞を用いることで移植拒絶反応を低くすることが可能となる。

脂質分子は細胞膜の形成にかかわるだけでなく、分化増殖、細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている。iPS 細胞由来分化細胞の分化効率や純化において培地内の因子、添加因子は有用であり、これらにかかわる脂質を明らかにすることは、遺伝子改変や表面抗原などを認識するフローサイトメトリー等の複雑な技術を用いない、且つ腫瘍化のリスクの低い移植医療の実現の一助となりえる。

2. 研究の目的

末梢血由来肺性幹細胞を用いて、iPS 細胞由来血管内皮細胞による血管網構築下における肺性幹細胞の生着と分化というハイブリッドな微小環境を構築し、肺微小環境再生にかかわる脂質を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

iPS 細胞から作成された血管内皮細胞 cell line (induced-endothelial cells, iEC) を用いてマトリゲル内で内皮のネットワーク形成を作成しその後 GFP でラベルされたヒト肺組織から単離された肺性幹細胞 (GFP-HPMSC) を添加し co-culture を行った。Co-culture を matrix-assisted laser desorption time of-flight imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) で用いる indium tin oxide slide glass (ITO グラス) 上で行った。

4. 研究成果

iEC 単独で形成されるネットワークに対する MALDI-IMS 解析によって、ネットワーク上に複数のリン脂質の分布を同定した。これらのリン脂質はネットワークの部位によって異なる濃度で分布していることを明らかにした (投稿準備中)。次に co-culture の解析では高濃度の細胞数の GFP-HPMSC は 24hr の早期に iEC ネットワーク内へ広がり iEC ネットワーク単独で同定された脂質の m/z とは明らかに異なる m/z が得られた。GFP-HPMSC が 1 細胞~少数では GFP-HPMSC が iEC ネットワークと接する部位での m/z の変化を判別することはできなかった。また本研究過程で iPS 細胞が自然分化するときに変化する phosphatidylcholine である PC(36:4) と PC(34:1) を MALDI-IMS で同定した (Shimizu Y et al 2017)。また iPSC から簡便に血管内皮様細胞を作成する方法とその過程で変化する脂質を明らかにした (Nakamura Y et al)。

in vitro で iPS 細胞から作成された血管内皮のネットワークを背景に肺組織由来幹細胞の接種による代謝変化を MALDI-IMS で明らかにすることができた。このことは疾患由来血管内皮のネットワークを背景とした組織幹細胞治療モデルの解析や動物実験で肺内に投与した組織幹

細胞治療効果を代謝の面から解析することができる可能性がある。本研究手法を用いた解析は代謝の観点から薬剤開発や病態解明に有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shimizu Y, Satou M, Hayashi K, Nakamura Y, Fujimaki M, Horibata Y, Ando H, Watanabe T, Shiobara T, Chibana K, Takemasa A, Sugimoto H, Anzai N, Ishii Y, Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry reveals changes of phospholipids distribution in induced pluripotent stem cell colony differentiation. Anal Bioanal Chem, 査読あり, 409, 2017, 1007-1016, doi: 10.1007/s00216-016-0015-x

Nakamura Y, Shimizu Y, Horibata Y, Tei R, Koike R, Masawa M, Watanabe T, Shiobara T, Arai R, Chibana K, Takemasa A, Sugimoto H, Ishii Y, Changes of plasmalogen phospholipid levels during differentiation of induced pluripotent stem cells 409B2 to endothelial phenotype cells, Sci Rep, 査読あり, 7, 2017, 9377, doi: 10.1038/s41598-017-09980-x

〔学会発表〕(計 10 件)

清水泰生, 中村祐介, 塩原太一, 藤牧未央, 堀金由紀子, 曾田紗世, 横山達也, 渡邊泰治, 池田直哉, 新井良, 三好祐顕, 知花和行, 武政聡浩, 石井芳樹, iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞のネットワーク形成における MALDI imaging を用いた脂質解析, 第 58 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2018, 4, 東京国際フォーラム (東京)

中村祐介, 清水泰生, 堀端康博, 内田信彦, 丁倫奈, 小池亮祐, 正和明哲, 渡邊泰治, 塩原太一, 新井良, 知花和行, 武政聡浩, 杉本博之, 石井芳樹, iPS 細胞の血管内皮細胞分化過程における脂質変化の解析と疾患モデル作成への試み, 第 45 回 獨協医学会学術集会, 2017, 12, 関湊記念ホール(栃木県)

清水泰生, 中村祐介, 堀金由紀子, 藤牧未央, 内田信彦, 丁倫奈, 小池亮祐, 正和明哲, 塩原太一, 新井良, 三好祐顕, 武政聡浩, 石井芳樹, ヒト肺組織由来肺性幹細胞はヒトiPS細胞分化誘導血管内皮へミトコンドリアをトランスファーする, 第66回 日本アレルギー学会学術大会, ミニシンポジウム, 2017, 6, 東京国際フォーラム (東京)

清水泰生, 佐藤元康, 林啓太郎, 堀端康博, 中村祐介, 渡邊泰治, 塩原太一, 新井良, 丁倫奈, 滝沢秀典, 三好祐顕, 知花和行, 武政聡浩, 安西尚彦, 杉本博之, 石井芳樹, iPS 細胞の自然分化過程で phosphatidylcholine 分布は変化する. 第 57 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2017, 4, 東京国際フォーラム (東京)

中村祐介, 清水泰生, 堀端康博, 藤牧未央, 内田信彦, 丁倫奈, 小池亮祐, 渡邊泰治, 塩原太一, 新井良, 知花和行, 武政聡浩, 石井芳樹, iPS 細胞の血管内皮分化過程における脂質変化の解析, 第 57 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2017, 4, 東京国際フォーラム (東京)

中村祐介, 清水泰生, 堀端康博, 藤牧未央, 安西尚彦, 杉本博之, 石井芳樹, iPS 細胞由来, 血管内皮細胞分化過程における脂質変化の検討. 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017, 3, 仙台国際センター(宮城県)

清水泰生, 佐藤元康, 林啓太郎, 堀端康博, 中村祐介, 藤牧未央, 安西尚彦, 杉本博之, 石井芳樹, iPS 細胞コロニーの自然分化過程における phosphatidylcholine 分布変化, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017, 3, 仙台国際センター(宮城県)

中村祐介, 清水泰生, 藤牧未央, 内田信彦, 丁倫奈, 小池亮祐, 渡邊泰治, 塩原太一, 知花和行, 武政聡浩, 石井芳樹, iPS細胞の分化過程における脂質変化の解析, 第18回 伊豆レスピロロジーフォーラム(IREF), 2016, 8.27, ロイヤルオークホテル (滋賀県)

清水泰生, 佐藤元康, 林啓太郎, 中村祐介, 渡邊泰治, 藤牧未央, 堀金由紀子, 塩原太一, 知花和行, 丁倫奈, 滝沢秀典, 安西尚彦, 杉本博之, 石井芳樹, iPS細胞コロニー分化の相違と脂質分布の検討, 第65回 日本アレルギー学会学術講演会, 東京, 2016, 6, 東京国際フォーラム (東京)

清水泰生, 林啓太郎, 中村祐介, 渡邊泰治, 藤牧未央, 堀金由紀子, 塩原太一, 知花和行, 新井良, 丁倫奈, 滝沢秀典, 三好祐顕, 武政聡浩, 石井芳樹, iPS細胞コロニーにおける分化部位と未分化部位の脂質分布の違い, 第56回 日本呼吸器学会学術講演会, 2016, 4, 国立京都国際会館 (京都)

〔図書〕(計 1 件)

Nakamura Y, Shimizu Y, Springer Nature, *Advances in Experimental Medicine and Biology, Stem cells and Regenerative Medicine Chapter I, Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine: Quality control based on evaluation of lipid composition*, 2019 *in press*.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://allergy.dokkyomed.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中村 祐介

ローマ字氏名：Yusuke Nakamura

獨協医科大学 呼吸器アレルギー内科

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。