

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16609

研究課題名(和文)胎仔肺組織の生着・分化におけるBipotential細胞の役割

研究課題名(英文)The role of alveolar bipotential progenitor cells in fetal lung tissue engraftment and differentiation

研究代表者

河北 直也(KAWAKITA, Naoya)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：60522266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肺組織におけるbipotential細胞の局在が同定可能となり、胎齢17日ラット肺の移植実験を行った。移植肺は含気を得て経時的に拡張し、免疫染色でもbipotential細胞や成熟細胞の形態や分化、局在を確認した。また、移植後のレシピエントにDexamethasoneを7日間投与する群を追加し、ステロイド群により移植肺が拡張することを確認した。移植肺の評価はCTを撮影することでも行い、これによっても移植肺の良好な拡張を確認した。Bipotential細胞の単離にまでは至らなかったため、今後継続して研究を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット胎仔肺の移植実験から、移植肺の生着や肺の再生においてbipotential細胞が重要な役割を果たしていることが観察された。今後、肺の再生医療に用いる細胞としてbipotential細胞が候補となる可能性がある。また、適切な時期にステロイド薬を投与することで、肺の再生がより良好となる可能性も示唆された。

今後はbipotential細胞のみを抽出して移植することで、肺の良好な再生を得られるかという実験を継続していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Our experiments made it possible to identify the localization of alveolar bipotential progenitor cells in rat lung tissue. We transplanted embryonic day 17 rat lungs to adult rat lungs. The transplanted lungs were engrafted and expanded over time. Immunostaining also confirmed the morphology, differentiation and localization of alveolar bipotential progenitor cells and mature cells.

In addition, we added a group which the recipients after transplantation were administered Dexamethasone for 7 days. It was confirmed that the transplanted lung was expanded more in the steroid group. We performed evaluation of the transplanted lungs by taking computed tomography(CT). CT also confirmed good expansion of the transplanted lungs.

We have not yet been able to extract Bipotential cells. Therefore, we plan to continue research.

研究分野：医歯薬学 呼吸器外科学

キーワード：肺胞上皮細胞 幹細胞

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、1) 多数の細胞が構築に関与していること、2) 可能性の高い細胞 source の選択が難しいこと、3) 足場の構築・分化を促進する増殖因子や環境を整えるのが難しいこと、4) 組織を 3D 構築するのが難しいことなどから、非常に困難な臓器と考えられてきた (Warburton D. Proc Am Thorac Soc 2008). しかしながら、Embryonic Stem Cell (ES 細胞) や induced Pluripotent Stem cell (iPS 細胞) の登場により新しい段階に入り、実際に ES 細胞や iPS 細胞から気道・肺胞上皮細胞の性格を有する細胞への分化・誘導が確認された。これらは画期的な進歩ではあったが、それらの細胞群を機能の有する臓器として構築するところまでは至っておらず (Longmire TA, et al. Cell Stem Cell 2012), まだベースとなる知見が少ない状況であった (Weiss DJ, Stem Cells 2014).

これまで我々のグループでは、ラット胎仔肺組織を用いて肺胞領域の再生にアプローチし、胎仔肺組織が正常ラット肺だけではなく、プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおいても生着・分化することを証明し (Kenzaki K, et al. JTCVS 2006, Toba H, et al. JTCVS 2012) (Figure 1), 肺への分化を方向付けられた細胞と足場となる間葉系細胞の重要であることを証明した。加えて、TTF-1/CCSP の免疫組織染色より、その発現パターンから移植片が胎仔肺組織内で正常の発生・分化過程を模倣している可能性があることも示した (Toba H, et al. JTCVS 2012) (Figure 2). 研究を続けている中で、移植した胎仔肺組織片がレシピエント内で生着し、形態的に肺胞構造を構築する過程において、より重要な役割を果たす細胞群を同定する必要性を感じていた。

そこで、今回我々は新たな細胞ソースとして肺胞領域の局所の幹細胞である Bipotential 細胞に着目した。正常なマウス肺の発達においては、胎齢 9.5-10 日で肺芽が形成されると、経時的に気管・気管支と枝分かれしていき、最終的には I 型肺胞上皮細胞 (AT1) と II 型肺胞上皮細胞 (AT2) を中心として肺胞嚢が構築されることにより完成し、ガス交換能を有するようになる。Treutlein らは、RNA-sequence の手法を用い、マウス肺における bipotential 細胞の存在を証明した (Nature 2014). 彼らは、胎齢 14.5/16.5/18.5 日それぞれの段階のマウス胎仔肺を用いて検討し、とりわけ胎齢 18.5 日の嚢状に広がった肺胞嚢の上皮が AT1/AT2 で覆われ、その先進部に bipotential 細胞が存在することを示した。Bipotential 細胞は AT1 (Pdpn+) と AT2 (Sftpc+) の両方の性格を有しており、遺伝子発現の経時的な解析により、成熟した AT1 になるまでには 3 段階のステップ、成熟した AT2 になるには 2 段階のステップが必要であるが、最終的にはどちらかに分化し、正常な肺胞構築に寄与することで、局所の幹細胞としての役割を果たすとしている。そこで、今回我々はラット肺、特に胎仔肺組織移植モデルを用いて bipotential 細胞発現の経時的变化を検証することで、移植した胎仔肺組織片がレシピエント内で生着し、形態的に肺胞構造を構築していることにどのように寄与しているかについて検証するという着想に至った。

2. 研究の目的

今まで研究してきた我々オリジナルの胎仔肺組織移植モデルを用いて、bipotential 細胞に着目することで、「移植した胎仔肺組織が生着・分化する」という事象の一端を説明する。そのうえで、新しい細胞ソースになる可能性について提案することを目的とする。

結果的に今回得られた知見が、今後臨床応用も期待されている iPS 細胞などを用いた肺の再生医療の発展に寄与することができると考えた。

3. 研究の方法

我々がすでにこれまで確立してきたラット胎仔肺組織移植モデルを用い、移植片がレシピエント肺内で生着し、肺胞構造を構築するメカニズムにおける bipotential 細胞の役割について、以下の流れで研究を進める。

(1) ラット胎仔肺組織を用いて bipotential 細胞の局在を経時的に評価する。

胎齢 15 日・17 日・19 日・生後 0 日・7 日のラット肺組織を用いる。

ラット肺組織における bipotential 細胞の局在パターンを評価する。

H-E 染色と Pdpn/Sftpc 二重染色を行い、経時的に局在や染色パターンを評価する。

Bipotential 細胞・成熟 AT1/AT2 の種々の遺伝子発現量を検証する。

それぞれのマーカーとして bipotential 細胞は Sftpc+/Pdpn+、成熟 AT1 は Pdpn+/Ager+/Aqp5+、成熟 AT2 は Sftpc+/Muc1+/Sftpb+/Abca3+/Lyz2+ である。これらの遺伝子群について mRNA の発現量を real time RT-PCR にて定量的に評価する。

(2) ラット胎仔肺組織移植モデルを用いて bipotential 細胞の局在を経時的に評価する。

ラット胎仔肺組織移植

これまで我々が確立してきた方法で行う (Kenzaki K, et al. JTCVS 2006). 具体的には、SPF 雄性 LEW ラット (8~12 週) をレシピエントとし、同系胎齢 17 日のラットをドナーとする。胎齢の明らかな妊娠ラットはラット用膈インピーダンスを用いて作成する。吸入麻酔下に妊娠ラットから胎仔を取り出し、顕微鏡下に両肺を摘出後、DMEM 培地内で 0.1mm 大に細切する。レシピエントは挿管し人工呼吸下 (Halothan 1.5%, N2O:O2=1:1) に左開胸にて行う。胎仔の移植肺片は 0.25ml の注射器内に DMEM ごと吸引し、20G サーフロー針外筒を用いレシピエント肺に 2 か所計 0.1ml ずつ注入する (うち 1 か所は肺尖部に注入)。左肺の左肺静脈流入部より尾側を結紮切除する。

胎仔肺移植後、1 日・3 日・1・2・4・8・12 週後の時点で犠牲死させ、心肺同時に摘出する。15cmH2O

の圧で気管から 10%ホルマリン液を注入し、後の組織学的評価のために使用する。肺尖部の移植片は固定液注入前に摘出し、RT-PCR 用に-80℃で保存する。

移植片における bipotential 細胞の局在パターンを経時的に評価し、他の重要な転写因子についても免疫組織学的に評価する。

まず、H-E 染色と Pdpn/Sftpc 二重染色を行い、bipotential 細胞の経時的に局在や染色パターンを評価する。加えて、肺の分化 (TTF-1, CCSP など) や EMT (Wnt7b, Wnt5a, FgfR2, Snail1, -catenin など) に関与する転写因子について免疫組織染色にて検討する。

移植片における種々の遺伝子発現量について経時的に評価する。

(1) のと同様に、bipotential 細胞・成熟 AT1/AT2 に関連した遺伝子群に加えて、肺の分化や EMT に関連する遺伝子群 (TTF-1, CCSP, Wnt7b, Wnt5a, Fgf10, Snail1, -catenin など) の mRNA 発現量についても real time RT-PCR にて定量的に評価する。

(3) 移植片内での bipotential 細胞の役割について、Microarray を用いて、網羅的に関連する遺伝子変化について同定する。

(2) の において有意な結果が得られたタイムポイントにおいて検討する。real time RT-PCR 用に採取した移植片から抽出した RNA を使用し、Microarray にて網羅的に遺伝子変化を解析する。同定された遺伝子を再度 real time RT-PCR にて確認する。それらの遺伝子群の中から、いくつか抽出し、免疫組織学的染色を追加する。

(4) ラット胎仔肺組織より bipotential 細胞を単離する。

胎仔肺組織からの肺胞上皮細胞の回収法に関しては、Treutlein らのマウス胎仔肺組織を用いたプロトコルを参考に (Nature 2014) 改変して使用し、FACS による細胞ソーティングを用いて bipotential 細胞を単離する。

まず、胎齢 17 日・19 日のラット胎仔肺組織を摘出し、エラスターゼと DNase を含む DMEM/F12 培地内で室温・45 分間振とうさせる。10%FBS と 1U/ml の PS 添加した DMEM/F12 培地を同量加え、100um のフィルターを通し、10 分間遠心分離する。40um のフィルターを通し、遠心分離する。PBS (0.5% BSA・2mM EDTA 添加) で再懸濁させる。再度 35um のフィルターを通した後、細胞数を 1.0×10^6 に調整する。BD IntraSure™ Kit を用いて、FACS で白血球・肺胞マクロファージを除去し、細胞内抗原を染色・ソーティングする。まず、細胞表面抗原に対する 1 次抗体 (CD45・epCAM) を添加し、室温・暗所にて 15 分間放置する。Kit の A 液を 100ul 加え、室温・暗所にて 5 分間放置する。蒸留水にて 10 倍希釈した Lysing2 mL を加え、室温、暗所にて 10 分間放置する。遠心分離後に上清を除去し、Kit の B 液を 50ul 加える。1 次抗体 (Pdpn・Sftpc) を添加し攪拌後、室温・暗所にて 15 分間放置する。遠心分離後、PBS にて再懸濁させ、FACS にてソーティングし、Pdpn+/Sftpc+ の細胞群を bipotential 細胞とする。

4. 研究成果

胎齢 15 日・17 日・19 日・生後 0 日・7 日のラット肺組織を用いた、ラット肺組織における bipotential 細胞の局在は同定可能となった。多くの bipotential 細胞を有する donor 肺組織は、胎齢 17 日のものが分化の程度や安定して採取できることなどから適していると判断し、この時期のものに決定した。

移植の手技は安定的に行うことができるようになり、control 群と胎仔肺移植群の各タイムポイント (1・3・7・14・28 日) で 6 匹ずつの移植実験を行い、サンプル採取を終了した。また、レシピエントへの steroid 投与により肺組織の分化誘導が促進するとされている既報告から着想を得て、移植後のレシピエントに Dexamethasone を 7 日間投与する群を追加した。この群についても上記の各タイムポイントで 6 匹ずつの移植実験を行い、サンプル採取を終了した。更に、移植肺組織に対する客観性の補強を目的に、control 群と胎仔肺移植群と Dexamethasone 投与群のそれぞれについて、上記の各タイムポイントと移植術後 56 日目の CT 撮影を行うこととし、各群 4 匹の CT 撮影を行った。また、CT 撮影が終了したラットは 56 日目にサンプルとして肺組織を採取した。

採取したサンプルの H.E. 染色では、移植肺が生着して経時的に拡張していく所見を認めた。また、Dexamethasone 投与群では非投与群に比べて移植肺が良好に拡張しており、この所見は画像解析ソフト (ImageJ) を用いた解析においても有意であった。とくに 7 日目から 14 日目にかけて良好な拡張を認めたため、この時期の遺伝子発現等についても今後詳細に検討を進める予定である。また、CT において移植肺の最大断面面積と CT 値の検討を行い、これでも Dexamethasone 投与群での良好な移植肺の拡張が確認できた。免疫染色については Podoplanin と Surfactant proteinC での免疫染色から開始しており、使用する抗体の種類や濃度調整が完了した。現在はこのプロトコルに則って、順に採取組織の染色と観察を行っている。また、移植肺における血管新生について CD200 抗体の染色での評価方法を予定しており、準備を進めている。

全ての実験結果を統合して判断すべきであるとは考えるが、現時点では移植肺は良好に生着し、肺の正常な分化を模倣するように分化する可能性が高い。Bipotential 細胞が胎仔肺に多く存在し、特に気腔となって拡張しようとしている部分に密度が高く存在していそうである。

移植早期の Dexamethasone 投与は移植肺の気腔の増加を促進する影響を与える。の 3 点の結果が得られている。実験を継続して全ての結果を鑑み、最終的な結論を導いて、論文化する予定である。

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