

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17657

研究課題名（和文）肺胞幹細胞機能異常に関わる疾患スペクトラムの解明

研究課題名（英文）Elucidating disease spectrum associated with pulmonary stem-cell dysfunction

研究代表者

山本 佑樹 (Yamamoto, Yuki)

独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・展開医療研究部・研究員

研究者番号：10812133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺組織幹細胞の挙動を疾患病態との関連性に着目して解析することで、呼吸器疾患領域において、「組織幹細胞異常」の観点による新たな分子生物学的分類軸の創出に向けた端緒となる研究を目指した。特に、肺癌の臨床検体に着目し、臨床サンプル取得から肺組織幹細胞マーカーに着目した組織切片の解析を行い、腫瘍サンプルにおけるマーカー発現を確認できた。さらに、空間オミクスにより、病変不均一性や特定のニッチなどに着目した解析が可能になった。また、肺癌臨床検体からオルガノイドを作成する手法を確立し、異常な幹細胞ニッチや構成細胞群について詳細に解析することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、最近の肺幹細胞研究をリードする技術である先端的オミックス解析とiPS細胞モデルより得られた知見を、臨床検体をベースに融合させることが出来た。この研究により、肺胞幹細胞機能不全に基づく疾患スペクトラムの一端が解明され、将来的には共通ターゲットを標的とした疾患横断的治療への応用などが考えられ、今後急速にニーズが高まると想定されているプレジジョンメディシンへの貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research was to elucidate the disease spectrum focusing on pulmonary stem-cell dysfunction, which is highly associated with intractable lung diseases. We established the workflow for recruiting lung samples from patients followed by histologic analysis focusing on tissue-stem cell associated markers as well as spatial omics analysis, which enables us to understand cellular heterogeneity and stem-cell specific niches. We also established methods for lung cancer organoids from patient samples, which can recapitulate the stem-cell niche abnormality in cancer tissue using spatial omics analysis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：組織幹細胞 肺癌 肺線維症 オルガノイド

※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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患は、肺癌、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、肺感染症など多彩な疾患が存在し、腫瘍、免疫、アレルギー、環境因子への曝露などの観点を中心とした病態分類がなされてきた。一方で、特に肺癌などの領域については分子生物学的機序からの疾患層別化が進展し、治療方法に劇的な進歩をもたらされている。近年のトランスジェニックマウスなどを駆使した幹細胞生物学の発展に伴い、組織幹細胞を中心とする細胞系譜ヒエラルキーのもとに肺の恒常性が維持されていることが分かってきた(図1)。すなわち、細胞系譜ヒエラルキーに発生した何らかの破綻は、速やかに組織幹細胞による分化・増殖制御機構により修復される。

しかし、組織幹細胞が異常を来すと、この制御機構が機能せず疾患の発症に至る可能性が示唆される。これをふまえれば、既存の病態分類に加えて、「組織幹細胞の機能不全」という観点から呼吸器疾患に新たな疾患概念軸を導入することは出来ないだろうか？例えば、II型肺胞上皮細胞は肺サーファクタントを分泌して、ガス交換領域である肺胞の開存を維持するだけでなく、近年のマウスを用いた研究から、肺胞の組織幹細胞として自己複製しつつI型肺胞上皮細胞への分化能を持つことが分かってきた(Barkauskas CE, J Clin Invest, 2013)。このII型肺胞上皮細胞の異常が、肺気腫(Tsuji T, Am J Respir Crit Care Med, 2006)、肺線維症(Bueno M, J Clin Invest, 2015)や肺癌(Desai TJ, Nature, 2014)といった、難治性呼吸器疾患の病態形成に関与することが小動物実験レベルで示されており、これら疾患の共通機序として幹細胞機能不全が存在している可能性が考えられる。

このような知見は主にマウスなどの動物実験から得られてきたが、マウス肺とヒト肺で解剖学的構造や遺伝子発現パターンの違いがあることや、必ずしも動物モデルがヒト肺疾患を反映していない場合があることが分かってきており、実際のヒト呼吸器疾患における組織幹細胞の挙動に関する知見の集積が望まれている。しかし、①解析に十分量の細胞を得るためには侵襲性を伴う外科的切除検体が相当量必要であったこと、②幹細胞を単離できても培養維持できなかったこと、などが呼吸器疾患におけるヒト幹細胞の研究を困難にしてきた。こうした中で、最近になり①一細胞解析技術の進歩により微小検体から遺伝子発現情報など大量のデータを取得し、②試験管内で生体組織環境を再現するオルガノイド培養技術の進歩により組織幹細胞を培養維持できるようになり、呼吸器疾患の病態形成におけるヒト組織幹細胞の解析への応用が期待されている(Xu Y, JCI Insight 2016)。

2. 研究の目的

本研究では、肺組織幹細胞の挙動を疾患病態との関連性に着目して解析することで、呼吸器疾患領域において、「組織幹細胞異常」の観点による新たな分子生物学的分類軸の創出に向けた端緒となる研究を目指す。特に、間質性肺炎、肺気腫、肺癌といった致死性呼吸器疾患との関連性が深いとされるII型肺胞上皮細胞に着目して研究を行う。II型肺胞上皮細胞の肺胞幹細胞としての概念が確立されてきたのは比較的最近であり、中でもヒトにおける幹細胞としての挙動については未知の部分が多い。また、上記疾患は喫煙など外的因子の影響を多分に受けるため、エピジェネティック修飾などにより、同一疾患内での不均一性が高いと考えられる。このため、肺胞幹細胞の解析からこれらの疾患を横断的に再整理するための手段や知見に乏しいのが実情であった。

一方で、代表者(山本)らは、オルガノイド培養技術を用いてヒトiPS細胞から肺胞幹細胞を効率的に分化誘導し、さらに長期に渡って安定的に増殖する方法を開発してきた(Yamamoto Y, Nat Methods 2017)。この技術によりヒト肺胞領域のモデリングが可能となり、シングルセル解析などを用いて肺胞幹細胞の分化に関わる候補遺伝子群を同定できた(図2)。この新たなiPS細胞由来肺胞幹細胞モデルより得られた知見を、未知な部分が多く複雑な呼吸器疾患の病態解析における、いわば「道標」として活用することが出来ると考えている。すなわち、呼吸器疾患

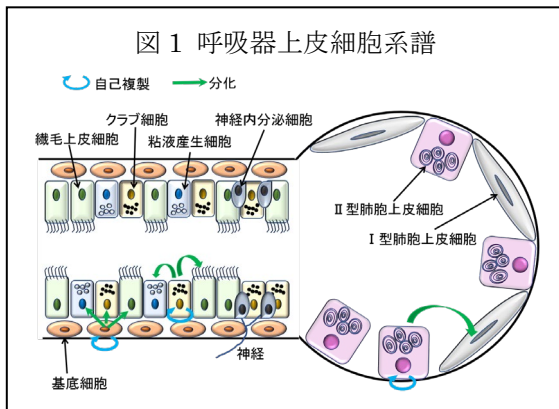
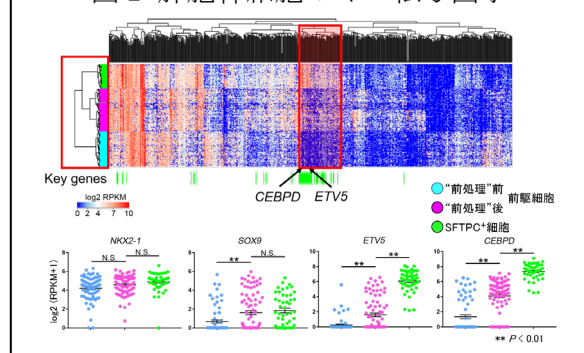


図2 肺胞幹細胞のキー転写因子



における臨床的知見と、幹細胞生物学的知見および技術とを融合させることで、今までなし得なかった新たな疾患横断的な病態研究が可能になると考える。

3. 研究の方法

本研究では、主に肺癌、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患患者の臨床検体を用いた疾患横断的な肺胞幹細胞マーカーの検討、細胞解析を行い、iPS 細胞由来肺胞幹細胞モデルから得られた知見と併せて、肺胞幹細胞機能異常に関与する遺伝子やバイオマーカーの同定を行うことを目指した。また、オルガノイド培養技術を用いて、肺胞幹細胞の病的動態を明らかにするために、下記の研究を行った。

① 臨床検体を用いた肺胞幹細胞マーカーの探索 (2019～2022 年度)

主に肺癌の外科的切除検体の集積を開始した。初期の検討は、肺胞幹細胞に特徴的なサーファクタント蛋白、NKX2-1 などの主要転写因子群、また代表者らが行った iPS 細胞を用いた先行研究で同定された肺胞幹細胞の分化に関連する遺伝子群などについて、組織の免疫染色などを行って疾患横断的なデータを蓄積した。

② 肺胞幹細胞のオミックス解析 (2022 年度)

上記臨床検体から、これら分子の発現を組織切片を用いて網羅的に解析することを可能にし、疾患内における病変不均一性を解析するために、空間オミックス解析である 10x Visium を用いた組織切片解析を行った。このデータを解析することで、幹細胞機能異常スペクトラムを定義し得るマーカー候補の抽出を試みた。また、これらのデータについてバイオインフォマティクスを用いてマーカー間の関連性、関連伝達経路などについても検討を行った。

③ オルガノイド培養を用いた機能解析 (2023 年度)

臨床検体から単離した細胞を、オルガノイド培養することで、増殖能、分化能などを中心に機能解析を行った。また、オルガノイドについて空間オミックス解析を行った。

4. 研究成果

肺癌を中心に、臨床検体取得～解析体制を確立して、20 症例を得ることができた。これらの検体につき、非癌部と癌部を分けて解析用の切片を作成することができた。これら肺癌患者には肺気腫・肺線維症の合併例も含まれており、背景肺と肺癌部分を対比して解析することが出来るため、肺胞幹細胞機能異常を軸とした疾患の連続性を考察するうえで、大変重要と考えられる。これら、臨床サンプルを用いて、肺胞幹細胞に特徴的なサーファクタント蛋白、NKX2-1 などの主要転写因子群、また代表者が iPS 細胞を用いた先行研究で同定された肺胞幹細胞の分化に関連する遺伝子群における免疫染色の検討を進めており、重要な知見を得ることができた。さらに、空間オミックスを用いた解析手法で、網羅的な解析を行い、同じ病変の中にヘテロな細胞集団を含むことを明らかに出来た。また、患者肺癌検体からオルガノイドを作成する方法を確立し、空間オミックスを用いて幹細胞や周囲ニッチを意識した解析が可能になった。

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

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