

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08530

研究課題名(和文) 肺組織幹細胞の制御を応用した新規肺損傷治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel lung injury therapies based on the regulation of lung tissue stem cells

研究代表者

遠藤 元誉 (Endo, Motoyoshi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40398243

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)：eR1はRunx1の発現を制御しているエンハンサーであり、様々な組織幹細胞で活性化していることが知られている。本研究では、肺におけるeR1の活性化と肺組織幹細胞との関連について解析を行った。肺におけるeR1陽性細胞はCD44、OCT4、SOX2を発現している細胞であることを見出した。またeR1陽性細胞は通常状態では基底膜辺縁に存在し休眠状態にあるが、肺損傷時には増殖分化し肺組織の再生に関与することを明らかにした。以上の結果より、肺におけるeR1陽性細胞は肺組織幹細胞の一つである可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

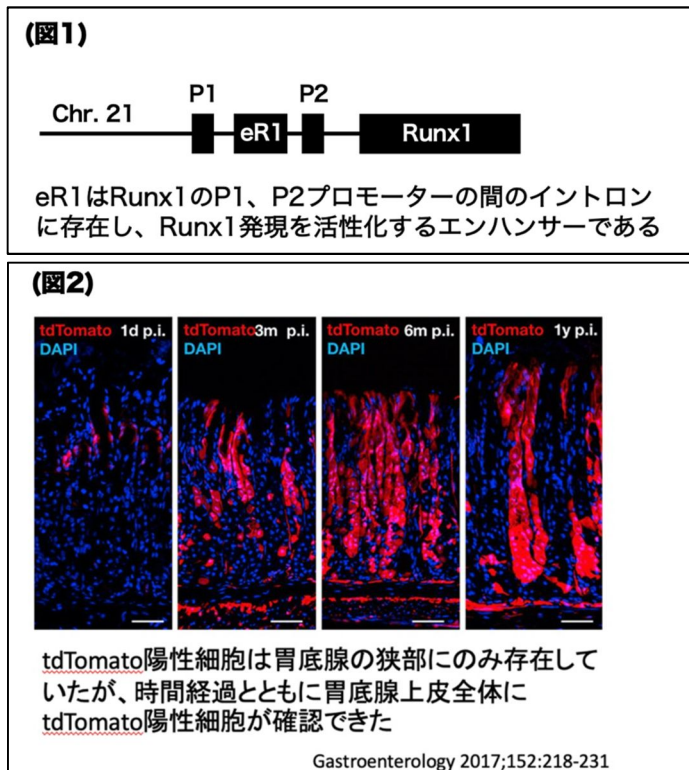
間質性肺炎の急性増悪期やALI/ARDSなどの肺損傷では、肺組織の急速な破壊が進んでおり、肺組織の修復・再生の促進はその治療において極めて重要である。また、組織修復には組織固有に存在する組織幹細胞の制御が重要であることが知られている。本研究では、Runx1の発現を制御するエンハンサーeR1を発現している細胞が肺組織幹細胞である可能性を見出した。eR1発現細胞の制御は新たな肺損傷治療法開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：eR1 is an enhancer that regulates the expression of Runx1 and is known to be activated in various tissue stem cells. In this study, we analyzed the relationship between eR1 expressing cells in the lung and tissue stem cells. We found that eR1-positive cells in the lung are expressing CD44, OCT4, and SOX2. We also found that eR1-positive cells are dormant at the basement membrane periphery under normal conditions. However, eR1-positive cells proliferated and differentiated when lung injury was occurred. These results suggest that eR1-positive cells in the lung may be one of the lung tissue stem cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：肺損傷 eR1 組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景



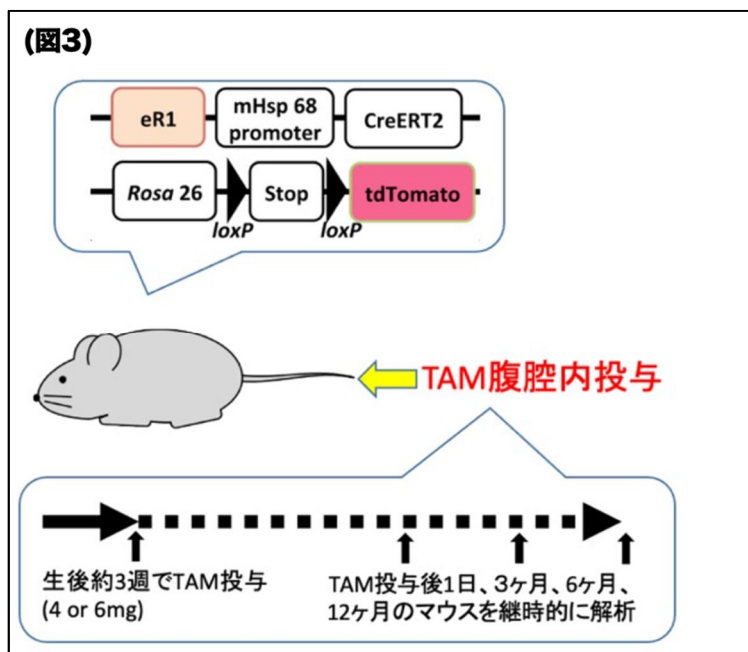
RUNX1 は、造血幹細胞や骨髄球、リンパ球の分化、恒常性維持に関与する遺伝子であることが知られているが、造血系細胞のみならず、様々な細胞で発現し多様な機能を有している。eR1 は比較ゲノムクスとレトロウイルス取り込み部位を含むコンピューター解析により見出された RUNX1 エンハンサーである(図1)。シンガポール国立大学の太田らは eR1-EGFP マウスを作成し、eR1 活性化細胞が血球細胞に分化することを明らかにした。また eR1 は造血系以外の細胞でも発現、活性化していることが示された。例えば、胃における eR1 活性化細胞は組織損傷時に増殖し修復を行うこと、胃の様々な細胞に分化する組織幹細胞であることが報告された(Matsuo et al, 2017)(図2)。一方、肺における eR1 活性化細胞の存在は知られていなかった。また肺組織幹細胞に関して、未だ不明な点が多い状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は 肺組織における eR1 活性化細胞の意義を明らかにし、 eR1 活性化を応用した新規肺損傷治療法開発の基盤研究を行うことである。肺細胞における eR1 活性化のメカニズム解明は、新たな肺組織修復・再生を促進する治療法開発に繋がる可能性を有している。肺における eR1 活性化細胞の制御が可能となれば、肺組織再生・修復の積極的な制御が可能となり、間質性肺炎の急性増悪期や ALI/ARDS などの急速に進行する肺損傷に対する新たな治療法開発への展開が期待できる。

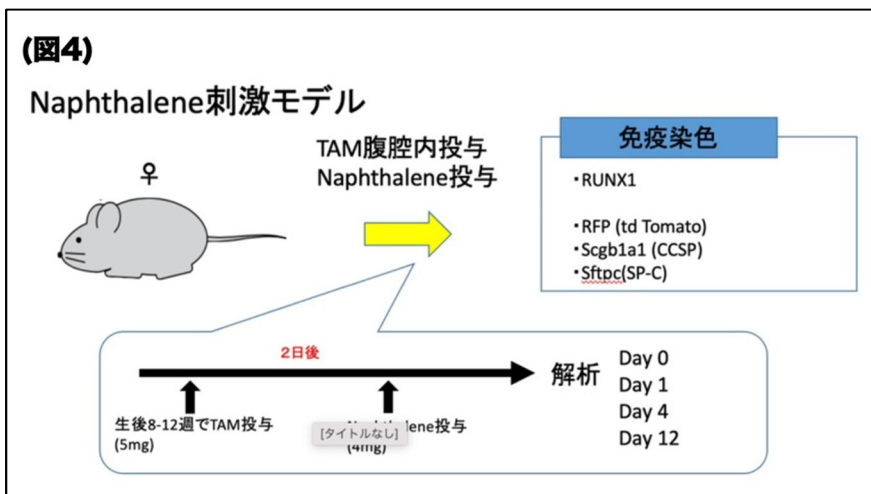
3. 研究の方法

(1) eR1 トランスジェニックマウスを用いた eR1 活性化細胞の細胞系譜解析



申請者は eR1 の活性を tdTomato シグナルにて検出できるトランスジェニックマウス (eR1-Tg マウス: eR1 CreERT2 トランスジェニックマウスと Rosa26-LSL-tdTomato レポーターマウスの交配マウス) を保持している。本マウスを用いることで、eR1 陽性細胞から分裂・産生される全ての娘細胞は分化段階に関わらず tdTomato シグナルを維持することになるため、ラベル細胞の挙動を追跡することで、eR1 活性化細胞の修復・再生への貢献度を観察することが可能である(図3)。申請者は、肺組織において eR1 活性化細胞が少数存在していることは、予備研究によって見出していた(eR1 活性化細胞

の分布状態から eR1 活性化細胞は、基底細胞、クラブ細胞、型肺胞上皮細胞の一部である可能性が考えられたが、詳細は不明であった)。本研究では、肺組織における eR1 活性化細胞が肺の組織幹細胞の一部である可能性を明らかにするために、クラブ細胞特異的にダメージを与え脱



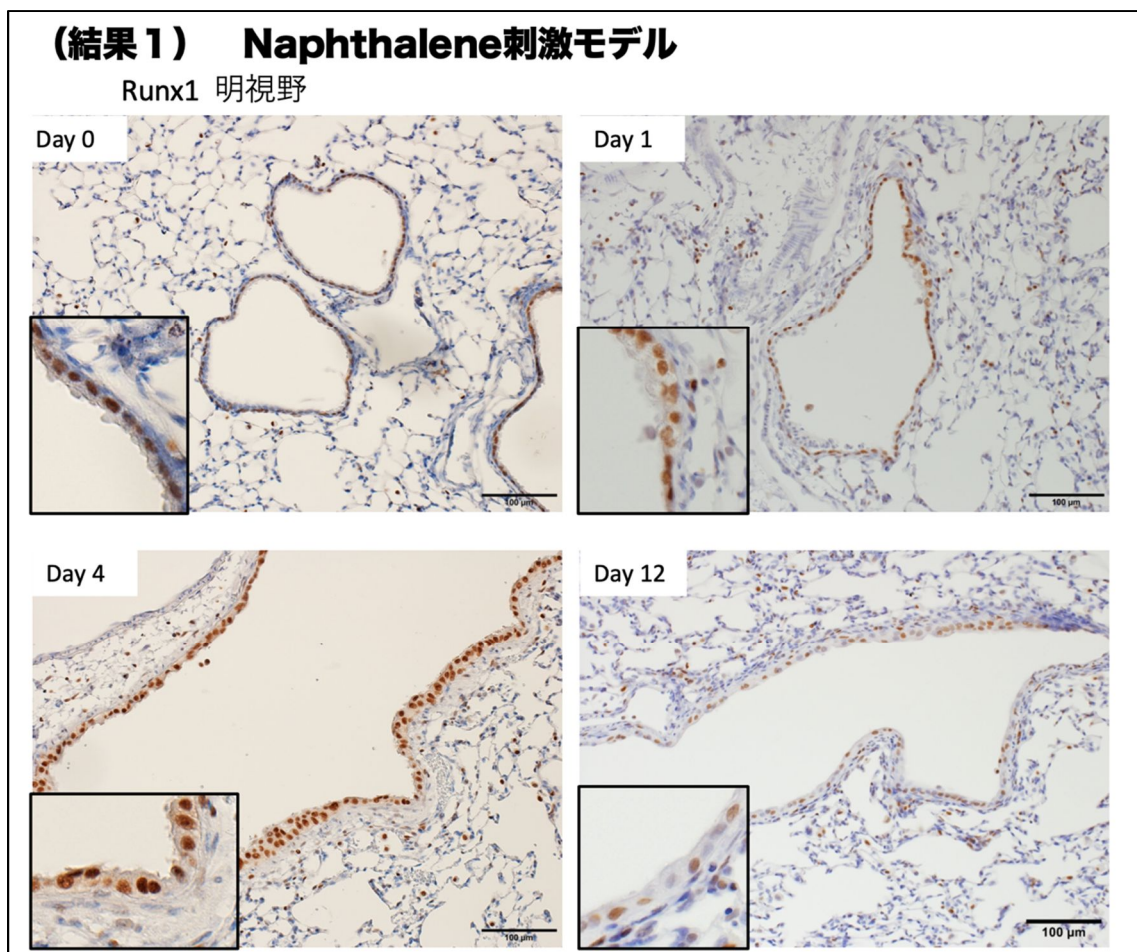
落させるナフタレン誘発性肺傷害モデル(図4)を作成し、そのモデルの創傷治癒過程における eR1 活性化細胞の発現、増殖および分化を解析した。

#### (2) ヒト培養細胞株を用いた eR1 活性化細胞の機能解明

申請者はヒト細胞において eR1 が活性化した際に EGFP を発現するベクター(eR1-EGFP)を構築した。ヒト肺がん細胞株(H460)に eR1-EGFP を導入し、eR1 が活性化している細胞を FACS にて単離し、eR1 活性化細胞がどのような性質(がん幹細胞の性質など)を有しているのかを検討した。さらに、eR1 を活性化する刺激を探索するために、様々な刺激(炎症刺激、小胞体ストレス惹起刺激など)を行い eR1 活性を評価した。

### 4. 研究成果

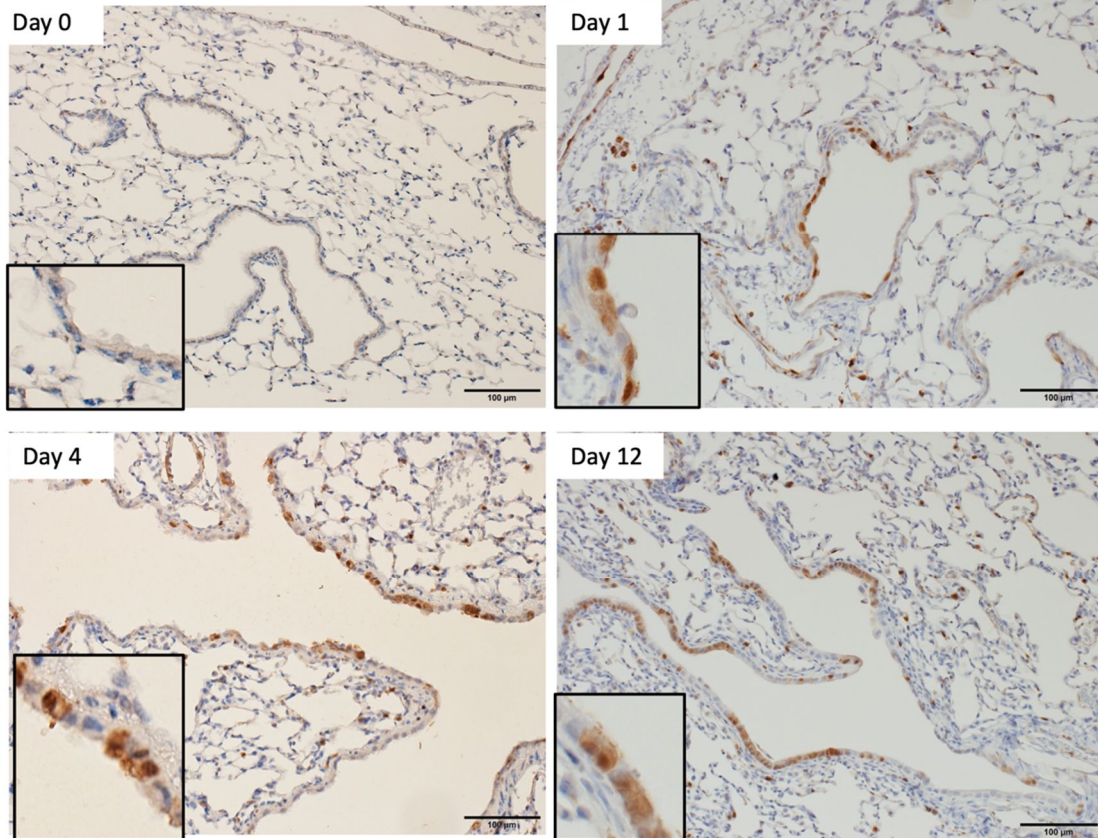
#### (1) eR1 トランスジェニックマウスを用いた eR1 活性化細胞の細胞系譜解析



eR1 の活性化を測定できる eR1-Tg マウスを用いて、ナフタレン傷害モデルを作成した。まずは、ナフタレン刺激による肺傷害にて、RUNX1 の発現に変化が生じるかを検討した(結果1)。RUNX1 は無刺激な状態でも気道上皮細胞に発現しており、ナフタレン刺激後においても発現の程度に変化はないが、ナフタレン刺激後4日目での重層化した修復細胞においても RUNX1 陽性細胞が見出されており、修復によって増殖する細胞は RUNX1 の発現を伴っていることが確認できた。ナフタレン刺激後12日目の組織では、一部の細胞にて RUNX1 の発現が減弱していることが観察されたが、その意義に関しては今後検討する必要があると考えられた。次に、肺における eR1 活性

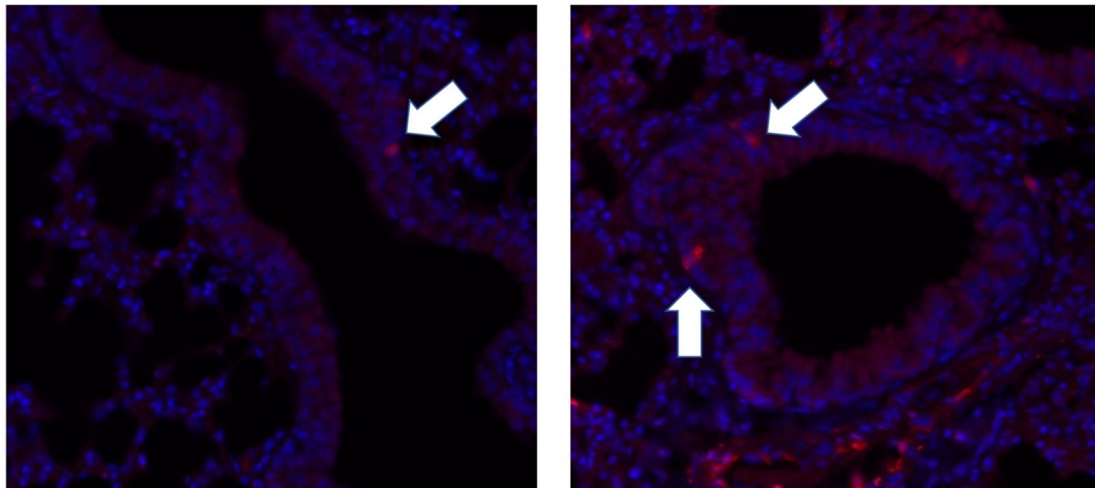
## (結果2) Naphthalene刺激モデル

RFP(tdTomato) 明視野



Naphthaleneの刺激により気管支上皮にtdTomato陽性細胞を確認した

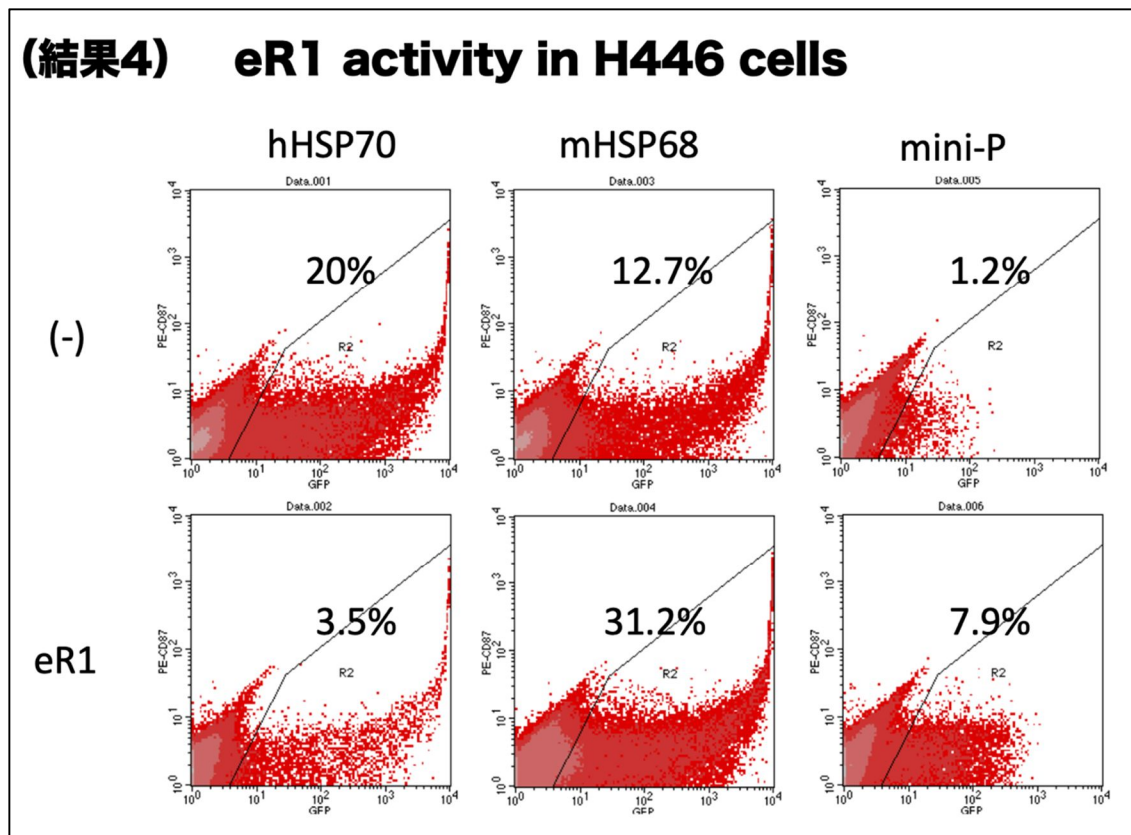
## (結果3) 無刺激モデル



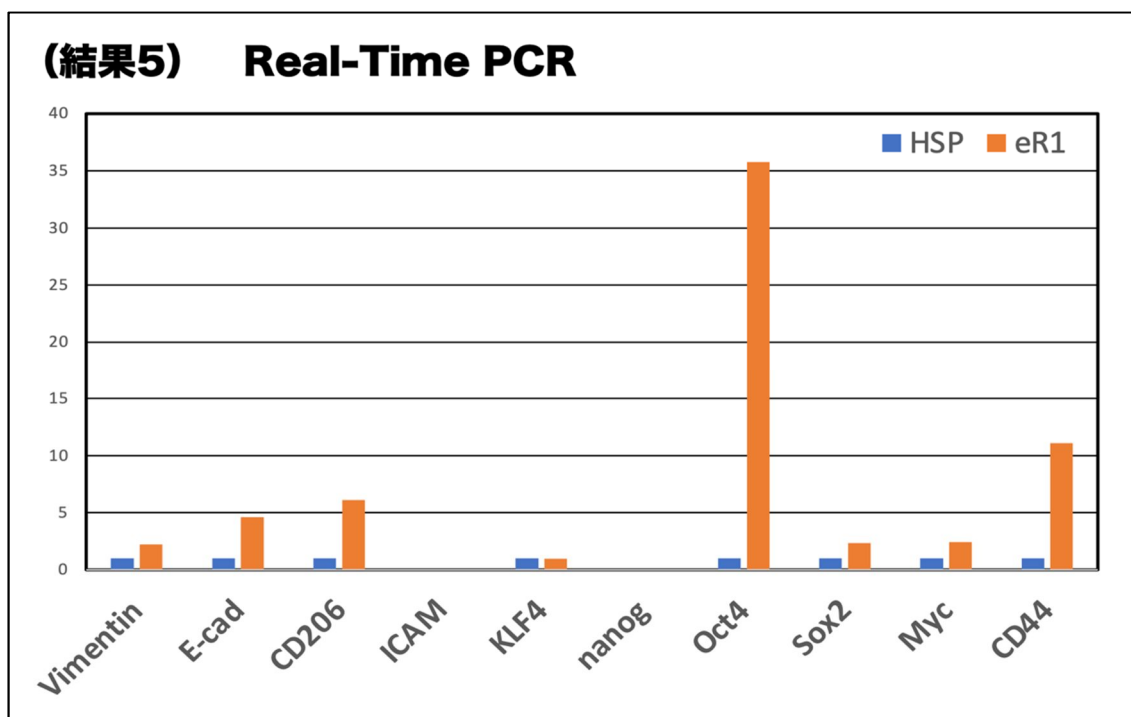
化細胞を解析した(結果2), eR1-Tg マウスでは, eR1 が活性化すると tdTomato を発現するため, RFP 抗体を用いることで組織学的に eR1 活性化細胞を確認できる。ナフタレン刺激後 1 日目の肺組織において eR1 陽性細胞は気道上皮に集積して増殖していることが明らかになった。ナフタレン刺激後, 4 日目, 12 日目では RFP 陽性細胞が増加し, 連続して RFP 陽性細胞がみられたことより, ナフタレン傷害後の肺組織では eR1 活性化細胞が増殖して修復に関与していることを見出した。一方で, コントロールでは eR1 陽性細胞は気道上皮の底部に存在するわずかな細胞においてのみしか発現がみられず, 無刺激状態における eR1 陽性細胞を詳細に解析するために, 蛍光免疫染色を用いて無刺激状態の肺における eR1 活性化細胞を観察した(結果3)。その結果, 解剖学的位置より eR1 活性化細胞は Basal Stem Cell である可能性が考えられた。しかしながら, 現時点では Basal Stem Cell のマーカーを用いた解析ができていないため, 今後さらなる検討が

必要である。

(2) ヒト培養細胞株を用いた eR1 活性化細胞の機能解明



eR1-EGFP ベクターを H446 細胞に導入し eR1 が活性化している細胞を GFP にて観察できる実験系を作成した。まず eR1-EGFP ベクターに hHSP70 をプロモーターとして組み込んだものを構築したが、hHSP70 を組み込んだ場合にはコントロールにても GFP が陽性となったため、新たに mHSP68、mini-P を組み込んだベクターも構築し検討した。その結果、mini-P を組み込んだベクターにおいてのみ eR1 の活性を適切に評価することができた (結果 4)。



次に、mini-p を組み込んだベクターを導入した H446 細胞を用いて eR1 活性化細胞と eR1 非活性化細胞を FACS にて分離し mRNA を抽出後、リアルタイム PCR を用いて Stem cell 関連遺伝子の誘導について検討した。その結果、eR1 活性化細胞は CD44、Oct4、Sox2 の発現が上昇していることを見出した (結果 5)。さらに eR1 を活性化させる刺激について検討を行ったが小胞体ストレスを惹起する薬剤 (タブシガルギン、ツニカマイシン) や LPS では eR1 の活性化はみられなかった。eR1 活性化方法については、今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshita Yuko, Motohara Takeshi, Kadomatsu Tsuyoshi, Doi Tomomitsu, Obayashi Kunie, Oike Yuichi, Katabuchi Hidetaka, Endo Motoyoshi	4. 巻 561
2. 論文標題 Angiopoietin-like protein 2 decreases peritoneal metastasis of ovarian cancer cells by suppressing anoikis resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 26 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.008	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 -

1. 著者名 Doi Tomomitsu, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Obayashi Kunie, Endo Motoyoshi, Ishizaki Toshimasa, Katoh Akira, Kouji Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of activator protein-1 family members in -catenin and p300 association on the genome of PANC-1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08890 ~ e08890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e08890	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 -

1. 著者名 Osumi Hironobu, Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Tashiro Kyosei, Morinaga Jun, Takahashi Takashi, Ikeda Koei, Ito Takaaki, Suzuki Makoto, Endo Motoyoshi, Oike Yuichi	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor cell derived angiopoietin like protein 2 establishes a preference for glycolytic metabolism in lung cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14337	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 -

〔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
---------	---------