

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08558

研究課題名(和文) COPDにおける肺胞上皮細胞のストレス応答機構と微小環境相互作用の検討

研究課題名(英文) Molecular mechanisms on how alveolar epithelial cells respond to exogenous stress in COPD

研究代表者

藤野 直也 (Fujino, Naoya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10633670

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)：慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)は、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することなどにより、気道および肺胞構築が破壊され進行性の気流制限を呈する難治性呼吸器疾患である。本研究では、肺胞上皮細胞の幹細胞として知られる肺胞上皮II型細胞(II型細胞)を分離し、3次元培養系の確立を目指した。線維芽細胞との共培養系を行い、Rho kinase 阻害薬の使用で、II型細胞のスフェア形成能が向上した。健常肺組織、COPD肺組織を用いた免疫組織化学的検討を行い、COPD肺組織では、幹細胞性II型細胞の割合が減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の独自性は、新規開発したヒト肺組織細胞分離法を用い、これまで明らかにされていなかったヒト疾患肺組織におけるII型細胞の幹細胞性維持機構を分子レベルで解明できることが期待される点にある。さらに、II型細胞と線維芽細胞との共培養や、遺伝子発現解析を通して、COPD病態における多様な肺細胞ネットワークの一部が解明され、これまでの研究とは次元の違う精度の機能解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is an intractable respiratory disease that causes progressive airflow limitation due to the destruction of airways and alveolar structures caused by long-term inhalation of toxic substances, mainly tobacco smoke. In this study, we isolated alveolar epithelial type II cells (type II cells), which are known as stem cells of alveolar epithelial cells, and aimed to establish a three-dimensional culture system. A co-culture system with fibroblasts was performed, and the sphere-forming ability of type II cells was improved by the use of a Rho kinase inhibitor. Immunohistochemical studies were performed using healthy and COPD lung tissue, and the percentage of stem cell type II cells was decreased in COPD lung tissue.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 肺胞上皮細胞 組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) は、タバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することなどにより、炎症・酸化ストレス・プロテアーゼが過剰産生し、気道および肺胞構築が破壊され進行性の気流制限を呈する難治性呼吸器疾患である。近年、マウスモデルを利用し、修復・再生に寄与する組織幹細胞群やシグナル伝達経路が明らかにされてきた (Nat Rev Mol Cell Biol 2019;20:551)。これらの研究成果を応用し、COPD を含めた難治性呼吸器疾患に対してヒト内因性組織幹細胞を薬剤や増殖因子等により活性化させ、破壊された肺胞組織の修復・再生を誘導する「Regenerative Pharmacology」という新規概念が注目されている (Thorax 2019;74:890)。しかし、マウスモデルで得られた知見は必ずしもヒトに応用可能とは限らないため (Eur Respir J 2018;51:1702133)、疾患肺組織の修復・再生を目指すためには、疾患肺自体における組織幹細胞の機能変化およびそれを規定する分子メカニズムを十分に明らかにする必要がある。このような背景から本研究課題の臨床的問いは、「COPDにおいて、肺胞上皮幹細胞である肺胞 II 型上皮細胞 (II 型細胞) の機能はどのように変化しているのか?」ということである。このような機能変化を規定する分子メカニズムが解明できれば、COPD において組織修復を促進させる理論的基盤の構築が可能になると期待できる。

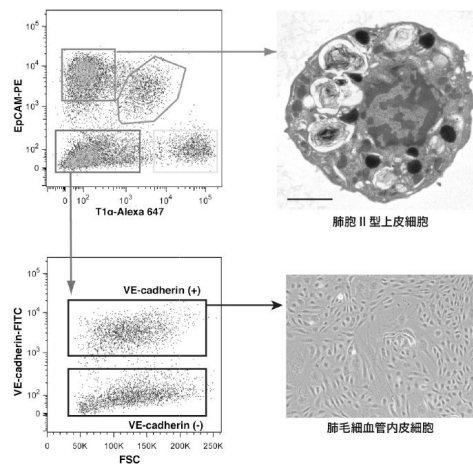


図 1: ヒト肺構築細胞の分離・培養

上記の問いに答えるためには、COPD の肺組織を構成する細胞群、特に II 型細胞の遺伝子発現変化、エピゲノム変化、機能的変化を明らかにすることが必要である。研究代表者はヒト健常および疾患肺における組織構築細胞を個別に分離する技術を開発し、II 型細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、肺線維芽細胞をそれぞれ同一肺組織より分離培養することを可能にした (図 1, Fujino N, et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:422)。この技術を活かして、COPD の II 型細胞におけるインターフェロン誘導遺伝子群、特に MHC Class I 経路分子の発現亢進 (Fujino N, et al. *BMJ Open* 2012;2:e001553) を明らかにした。また、肺線維症における II 型細胞のインフルエンザウイルス感染感受性 (Fujino N, et al. *J Infect Dis* 2013;207:692) についても明らかにした。

2. 研究の目的

近年、ヒト末梢気道およびヒト肺胞組織には、幹細胞活性を有する種々の上皮系前駆細胞が存在することが示されている。本研究では、II 型細胞の表現型や機能変化について、以下の点を明らかにするために研究を行った。

- (1) COPD の II 型細胞は、健常肺と同様に炎症・酸化ストレス刺激下でも適切に応答し増殖・分化できるのか。
- (2) II 型細胞の niche 細胞として知られる線維芽細胞・血管内皮細胞の支持機能は変化しているのか。

本研究では、主に、上記研究を行うための基盤技術の整備を確立した。

3. 研究の方法

● 肺組織の処理

東北大学病院呼吸器外科で肺癌により肺葉切除術を施行した患者より提供された非癌部肺組織を研究に用いた。切除肺組織をいくつかの部分に切離し、免疫染色研究用 (ホルマリン固定パラフィン包埋)、単一細胞懸濁液作成用とした。肺組織を Stem Survive 肺保存液で保存し、Dispase II、Dispase/Collagenase, DNase からなる酵素カクテルで処理したのち、手動的に肺組織を細切した。注射針で余分な結合組織を除去した後、セルストレイナーで単一細胞懸濁液を作成した。

● 免疫蛍光染色

TM4SF1 陽性 II 型細胞の同在、および COPD における割合の変化を検討するために、免疫蛍光染色を行った。Nikon C2 共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得し、ImageJ にて細胞数を計測した。

- 肺構築細胞の分離

CD45、EpCAM、T1、VE-cadherin に対する抗体を用いて、FACS Aria II cell sorter にて肺構築細胞のサブセットを同定し、細胞をソーティングした。ソートした細胞を、セルカルチャーインサートを用い、上段にはマトリゲル上に CD45-EpCAM⁺ T1⁻ である II 型細胞を、下段のカルチャープレート上には CD45-EpCAM⁻ T1⁻ VE-cadherin⁻ である肺間質細胞（大部分線維芽細胞と考えられる）を培養した。培地には、human recombinant keratinocyte growth factor (KGF) を用いた。

- single cell RNA シークエンス解析 (scRNA-seq)

BBrowserX/Talk2Data (Bioturing) を用いて、公開されている COPD 肺組織由来細胞の scRNA-seq データを取得し、II 型細胞におけるインターフェロン誘導遺伝子群 (ISG) 陽性細胞のフェノタイピングを行った。

4. 研究成果

(1) COPD 肺では TM4SF1+II 型細胞の割合が減少する。

TM4SF1+II 型細胞は wnt 活性を有し、II 型細胞の中でも幹細胞活性の強い細胞と報告されている (Nature 2018;555:251)。健康人に比較し、COPD 患者において、TM4SF1+II 型細胞の割合の変化を検証するため、蛍光免疫染色を行った。TM4SF1+II 型細胞の分布には特異的なものはなかった。非喫煙者、既喫煙者では全 II 型細胞のうち TM4SF1+II 型細胞は 60%程度であったが、GOLD2 の COPD 患者では、30%程度に減少した (図 2)。以上から、健康肺組織に比較し COPD 肺組織では幹細胞活性を有する II 型細胞が減少している可能性が示唆された。

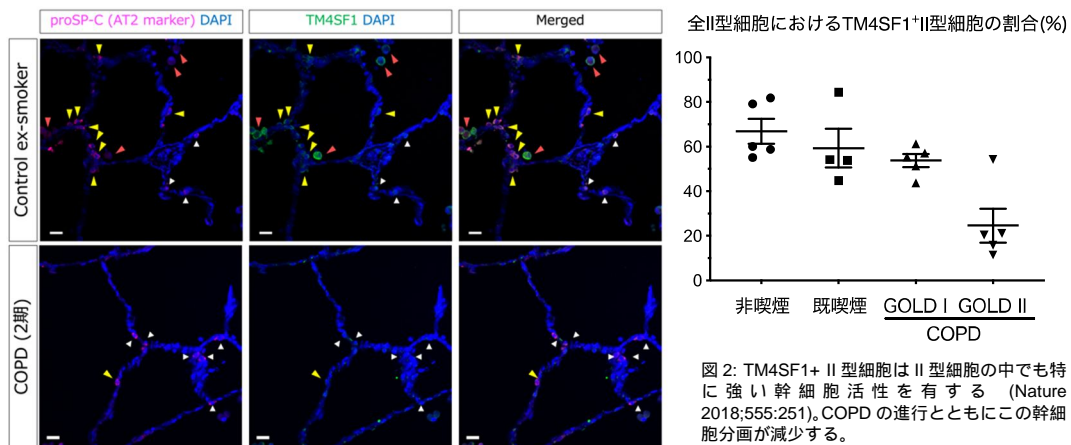


図 2: TM4SF1+ II 型細胞は II 型細胞の中でも特に強い幹細胞活性を有する (Nature 2018;555:251)。COPD の進行とともにこの幹細胞分画が減少する。

(2) ヒト II 型細胞 sphere の持続的な培養には肺線維芽細胞と ROCK 阻害剤が必要である。

ヒト II 型細胞の長期培養系を確立するため、ソーティングした II 型細胞を、肺線維芽細胞 (Feeder)、ROCK 阻害剤 (Y-27632) の有無で 4 つのグループに分類し培養を行った。その結果、効率的な sphere の形成には、肺線維芽細胞と ROCK 阻害剤が必要だった (図 3)。

II 型細胞 sphere を長期に培養するため、Dispase と Trypsin/EDTA を用い、II 型細胞 sphere を分散し、継代を重ねた。現時点では、56 日間、4 継代まで可能であることを確認した (図 4)。

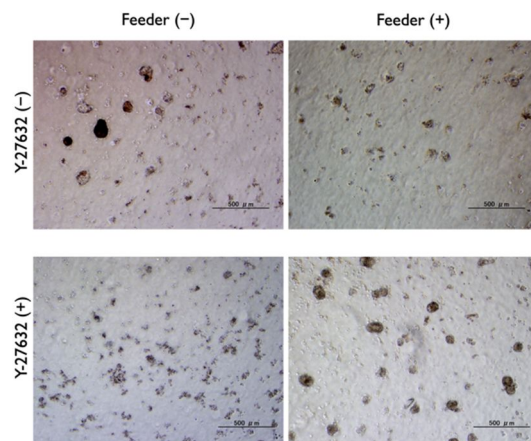


図 3: II 型細胞を肺線維芽細胞 (feeder)、ROCK 阻害剤 (Y-27632) の有無で培養した。II 型細胞はマトリゲル上で培養し、培地には KGF を添加した。

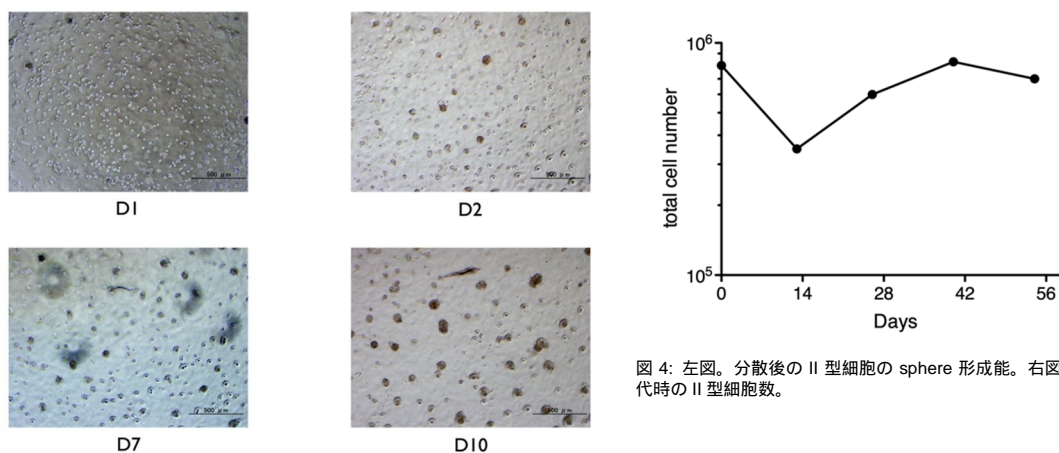


図 4: 左図。分散後の II 型細胞の sphere 形成能。右図。継代時の II 型細胞数。

(3)

パブリックデータベースに登録されている scRNA-seq データを利用し、インターフェロン誘導遺伝子群を多く発現する II 型細胞のサブセットを同定した (GSE136831)。先行研究で抽出した COPD の II 型細胞で有意に発現する遺伝子群のうち (Fujino N, et al. *BMJ Open* 2012;2:e001553)、ISG を抽出し、31 個の遺伝子を含むセットを作成した。この遺伝子セットの中で少なくとも 1 つの遺伝子を発現する細胞数は、1,156 細胞数あり、全体の 32% にのぼった。今後、このインターフェロンで誘導させる遺伝子群を多く発現する II 型細胞に選択的に発現する表面マーカーを探索し、prospective isolation の確立を試みる。

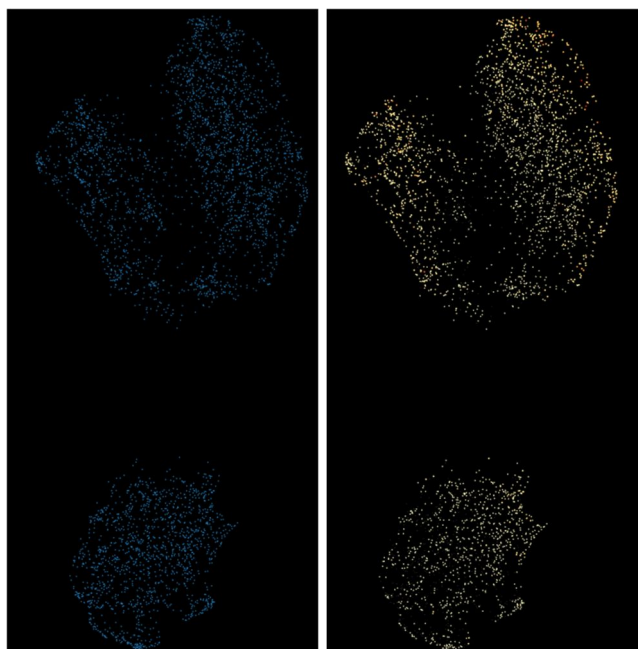


図 5: COPD 肺由来 II 型細胞 (左図)。および、ISG-hi II 型細胞の集団 (右図)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okutomo K, Fujino N, Yamada M, Saito T, Ono Y, Okada Y, Ichinose M, Sugiura H	4. 巻 60
2. 論文標題 Increased LHX9 expression in alveolar epithelial type 2 cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respir Investig	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2021.08.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takuya Saito, Naoya Fujino, Yorihiro Kyogoku, Koji Okutomo, Mitsuhiro Yamada, Hisatoshi Sugiura
2. 発表標題 Siglec-1-negative Alveolar Macrophages May Represent Pro-inflammatory Phenotypes And Are Associated With COPD Exacerbation
3. 学会等名 ATS 2021 International Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤拓矢, 藤野直也, 京極自彦, 山田充啓, 杉浦久敏
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患の増悪における肺胞マクロファージのSiglec-1発現低下
3. 学会等名 第61回 日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Fujino, A. Tanno, M. Yamada, H. Sugiura, T. Hirano, R. Tanaka, H. Sano, M. Ichinose
2. 発表標題 Sialic Acid-binding Immunoglobulin-type Lectin1 (Siglec1) Is Important For Bacterial Engulfment By Alveolar Macrophages And Is Down-regulated In COPD Patients
3. 学会等名 American Thoracic Society 2020 International Conference（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------