

令和 6 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16113

研究課題名（和文）肺胞マクロファージによる2型肺胞上皮細胞の増殖・分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the mechanism regulating the proliferation and differentiation of type 2 alveolar epithelial cells by alveolar macrophages

研究代表者

渡辺 知志（Watanabe, Satoshi）

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：60772960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：マクロファージは、肺の生体防御や恒常性維持に働く主要な免疫担当細胞である。今回マウス肺切除後代償性肺再生モデルを用いてマクロファージを詳細に検討し、肺胞上皮細胞の増殖や分化への影響を検討した。代償性肺再生において間質マクロファージが重要な役割を有していること、肺胞上皮細胞の増殖・分化ではなく血管新生を介して代償性肺再生を促進することが明らかにされた。今後、間質マクロファージを介した肺修復・再生治療への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患や肺線維症の罹患率や死亡率は増加している。これらの慢性呼吸器疾患では肺修復機転の破綻を認めることから、肺修復・再生を促進するような治療戦略が必要である。本研究では肺の主要な免疫担当細胞であるマクロファージの働きに注目し、肺再生に関わるマクロファージのサブタイプと機能を明らかにした。マクロファージによる肺修復・再生機構が明確になることで、今後マクロファージを介した慢性呼吸器疾患の治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Macrophages are main immune cells involved in lung defense and homeostasis. In this study, we examined the effects of macrophages on the proliferation and differentiation of alveolar epithelial cells by using a murine postpneumectomy model. We found that interstitial macrophages promote compensatory lung growth. Interestingly, they are associated with lung regeneration not by influencing the proliferation and differentiation of alveolar epithelial cells, but rather through promoting angiogenesis. This suggests potential applications for interstitial macrophage-mediated lung repair and regeneration therapies in the future.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：マクロファージ 肺修復 肺再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化に伴い、慢性閉塞性肺疾患や肺線維症などの慢性呼吸器疾患は世界的に増加してきている。また世界的に流行した新型コロナウイルス感染症は、高率に肺炎を合併し、死亡原因として大きな問題となった。肺は外界に直接接しているため、喫煙、粉塵、病原微生物などの影響を受けやすい。肺胞表面の95%を占める1型肺胞上皮細胞が傷害を受けて脱落すると、2型肺胞上皮細胞は1型肺胞上皮細胞へ分化し、肺は修復・再生される。しかし、重度の肺傷害や修復機転の破綻が起こると、肺胞に不可逆性の組織破壊や線維化が起こり、疾病の発症につながる。現時点で肺を修復・再生させるような有効な治療法は存在しない。肺の修復・再生機構を明らかにすることは、多くの呼吸器疾患の病態解明や新規治療法の開発において必要不可欠である。

肺胞マクロファージは、肺の生体防御や恒常性の維持に関わる主要な免疫担当細胞である。申請者は、これまで肺傷害や線維化における肺胞マクロファージの役割について研究してきた (Watanabe S et al. J Clin Invest 2019)。そしてマウス肺線維症モデルにおいて、単球由来肺胞マクロファージが肺の線維化を促進し、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) シグナルを介して線維化部位に集積されることを見出した (Joshi N, Watanabe S et al. Eur Respir J 2020)。一方、マウス肺線維症モデルを長期間観察したところ、単球由来肺胞マクロファージは肺内に存在し続け、これをM-CSFR阻害薬で枯渇させたところ、肺の修復は阻害された。このことから、単球由来肺胞マクロファージには炎症や線維化の誘導のみならず、肺の修復や再生を促す働きがあるのではないかと考えた。しかし、マクロファージが肺修復・再生を促す仕組みやその分子学的機序は十分明らかにされていない。

肺の修復・再生の過程におけるマクロファージの機能や、マクロファージによる2型肺胞上皮細胞の増殖・分化への影響を明らかにするために本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺の再生過程におけるマクロファージの動態と機能を解析し、マクロファージによる2型肺胞上皮細胞の増殖・分化制御機構を明らかにすることである。そのためにマウス肺切除後代償性肺再生 (pneumectomy: PNX) モデルを使用し、次の3項目に分けて研究を行う。

PNX モデルにおける各種細胞数の解析

PNX モデルにおけるマクロファージの動態解析

マクロファージによる2型肺胞上皮細胞の増殖・分化への影響の解析

3. 研究の方法

PNX モデルにおける各種細胞数の解析

肺の修復・再生を誘導するため、マウス肺切除後代償性肺再生 (pneumectomy: PNX) モデルを作製する。人工呼吸管理下でマウスの左開胸を行い、左肺を全摘出し、閉創する。コントロールとして、左開胸を行うが、肺の摘出を行わずに閉創する“Sham”も作製する。各時点にてマウスを安楽死させ、右肺の肺容積を測定し、フローサイトメトリーや免疫蛍光染色などを用いて肺細胞分画を測定する。

2型肺胞上皮細胞を標識、追跡するため、Sftpc-CreER;RCL-ZsGreen マウス (Sftpc 遺伝子のプロモーター領域の下流に Cre-ER を発現させた Sftpc-CreER マウスと、ROSA26 遺伝子座内に EGFP 遺伝子を配置した RCL-ZsGreen マウスの掛け合わせ) を作製する。タモキシフェン投与し、2型肺胞上皮細胞を ZsGreen で標識した後、PNX モデルを作製する。左肺全摘術後0、3、7、10日目にマウスを安楽死させ、右肺を摘出し、フローサイトメトリーを用いて各種肺細胞数を解析する

PNX モデルにおけるマクロファージの動態解析

組織常在マクロファージと単球由来マクロファージを区別するため、単球を標識・追跡できる Cx3cr1-CreER;RCL-ZsGreen マウス (Cx3Cr1 遺伝子のプロモーター領域の下流に Cre-ER を発現させた Cx3cr1-CreER マウスと、ROSA26 遺伝子座内に ZsGreen 遺伝子を配置した RCL-ZsGreen マウスの掛け合わせ) を作製する。タモキシフェンにより単球を標識し、左肺切除後7日目にフローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色を用いてマクロファージを解析する。

マクロファージによる2型肺胞上皮細胞の増殖・分化への影響の解析

Sftpc-CreER;RCL-ZsGreen マウスを用いて PNX モデルを作製する。そして、肺胞マクロファージを枯渇させるためにクロドロン酸リポソーム (Clo-lip) の気管内投与を、間質マクロファージを枯渇させるために Clo-lip 静脈内投与または M-CSFR 阻害薬 (PLX3397) の経口投与を行う。肺胞マクロファージや間質マクロファージを枯渇させることによる2型肺胞上皮細胞の増殖や分化への影響を、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色を用いて解析する。

PNX モデルおよびコントロールよりマクロファージを分取した上でマクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を確認する。さらに PNX モデル肺とコントロール肺よりシングルセル RNA シークエンス解析を行い、肺再生の過程における各種細胞の挙動を一細胞レベルで解析する。

4. 研究成果

PNX モデルにおける各種細胞数の解析

Sham と比較して、PNX モデル day 7 は有意に肺容積が増加した (図 1A)。フローサイトメトリを用いて、PNX モデル day 0、3、7、10 における肺細胞数を解析したところ、day 3-7 の時点で肺マクロファージ (CD45+CD64+Siglec F+)、間質マクロファージ (CD45+CD64+Siglec F-)、古典的単球 (CD45+CD64-CD11b+Ly6C+)、2 型肺胞上皮細胞 (CD45-ZsGreen+ProSPC+)、2 型肺胞上皮細胞から分化した 1 型肺胞上皮細胞 (CD45-ZsGreen+Pdpn+)、血管内皮細胞 (CD45-CD31+) の増加を認めた (図 1B)。以上のことから、肺再生の過程で、肺マクロファージ、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞が増加することが示された。

図 1. PNXモデルの肺容積と主な細胞分画

PNX モデルにおけるマクロファージ動態解析

PNX モデル day 7 において、肺マクロファージ (CD45+CD64+Siglec F+) では ZsGreen 発現が見られなかったのに対し、間質マクロファージ (CD45+CD64+Siglec F-) では ZsGreen 発現を認めた (図 2A)。肺マクロファージでは EdU 発現を認めた。免疫蛍光染色では、PNX モデルにおいて間質マクロファージは胸膜近傍や血管周囲に存在していた (図 2B)。以上のことから、PNX モデルにおいて肺マクロファージは自己増殖により、間質マクロファージは単球の遊走により増加することが示された。

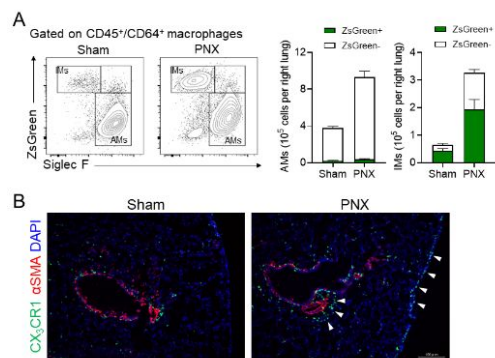


図2. PNXモデルにおけるマクロファージの動態解析

マクロファージによる 2 型肺胞上皮細胞の増殖・分化への影響の解析

PNX モデルにおいて、肺マクロファージを枯渇させたところ day 7 の代償性肺再生に変化を認めなかったが、間質マクロファージを枯渇させたところ day 7 の代償性肺再生は有意に抑制された (図 3)。

次に Sftpc-CreER;RCL-ZsGreen マウスを用いて間質マクロファージを枯渇させたときの非血球細胞への影響を検討したところ、2 型肺胞上皮細胞 (AT2) の増殖や AT2 から 1 型肺胞上皮細胞 (AT1) への分化には影響を認めなかったのに対し、血管内皮細胞の増殖が有意に抑制された (図 4)。免疫蛍光染色を用いて同解析したところ、PNX モデルでは間質マクロファージの近傍に増殖した血管内皮細胞を認め、間質マクロファージを枯渇させたところ、血管内皮細胞の増殖は抑制された。以上のことから、間質マクロファージは血管新生を介して代償性肺再生を促進することが示唆された。

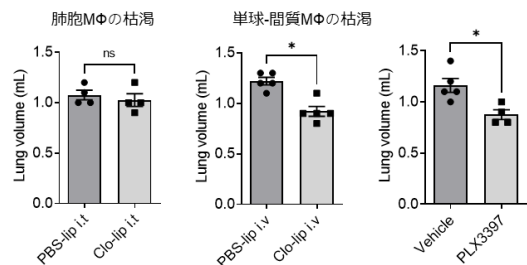


図3. 肺胞/間質マクロファージの肺再生への影響

マクロファージのマイクロアレイ解析により、PNX モデルでは間質マクロファージにおいて細胞外マトリックスや恒常性維持に関わる遺伝子発現の上昇を認めた。また PNX モデルのシングルセル RNA シークエンス解析より、間質マクロファージにはいくつかのサブタイプが存在すること、PNX モデルで割合が増加する間質マクロファージのクラスターにおいて血管新生に関わる遺伝子発現が上昇することが示された。さらに単球由来間質マクロファージを枯渇させた際のシングルセル RNA シークエンス解析において、血管内皮細胞の増殖に関わるクラスターが抑制されることも確認された。

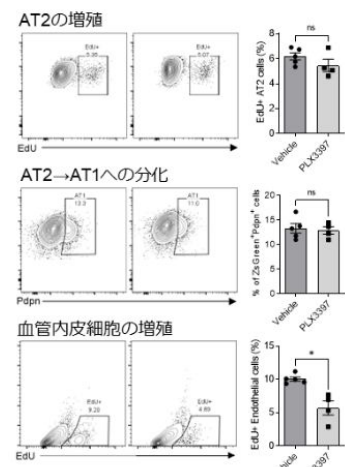


図4. 間質マクロファージの非血球系細胞への影響

以上の結果から、PNX モデルにおいて間質マクロファージが肺の代償性肺再生に関与することが示された。さらに肺再生メカニズムとして、2 型肺胞上皮細胞の増殖・分化ではなく、血管新生を促進する可能性が示唆された。本研究により肺再生に関与するマクロファージのサブタイプと新たな機能が明らかとなり、今後の肺再生を促進する治療戦略を考える上で重要な成果と考えられる。本研究を基盤として、間質マクロファージを介した新たな治療標的を探索する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡辺知志, 加瀬一政, 佐伯啓吾, 古林崇史, 武田仁浩, 大倉徳幸, 阿保未来, 堀家慎一, 内藤尚 道, 矢野聖二
2. 発表標題 単球由来間質マクロファージは血管新生を介して代償性肺再生を促進する
3. 学会等名 第63回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加瀬一政, 渡辺知志, 佐伯啓吾, 古林崇史, 武田仁浩, 大倉徳幸, 阿保未来, 矢野聖二
2. 発表標題 慢性肺線維症の維持には単球由来マクロファージの持続的な遊走が必要である
3. 学会等名 第63回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡辺知志
2. 発表標題 特発性肺線維症における肺細胞の不均一性の解明と治療戦略
3. 学会等名 第63回 日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Watanabe, Kazumasa Kase, Keigo Saeki, Takahumi Kobayashi, Yoshihiro Takeda, Noriyuki Ohkura, Miki Abo, Masafumi Horie, Hisamichi Naito, Seiji Yano
2. 発表標題 Monocyte-derived interstitial macrophages stimulate angiogenesis to promote lung regeneration following pneumonectomy
3. 学会等名 ATS 2023 International Conference（国際学会）
4. 発表年 2023年

1．発表者名 Kazumasa Kase, Satoshi Watanabe, Keigo Saeki, Takahumi Kobayashi, Yoshihiro Takeda, Noriyuki Ohkura, Miki Abo, Masafumi Horie, Hisamichi Naito, Seiji Yano
2．発表標題 Ongoing recruitment of monocyte-derived macrophages is necessary for the maintenance of chronic pulmonary fibrosis
3．学会等名 ATS 2023 International Conference (国際学会)
4．発表年 2023年

1．発表者名 渡辺知志
2．発表標題 肺線維症における肺胞マクロファージ、肺胞上皮細胞の機能的多様性
3．学会等名 第6回肺トランスレーショナルメディシン研究会 (招待講演)
4．発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1．著者名 渡辺 知志	4．発行年 2023年
2．出版社 科学評論社	5．総ページ数 141
3．書名 月刊 呼吸器内科	

〔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
---------	---------