

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790895

研究課題名（和文） リゾリン脂質による肺幹細胞調節機構の解明ならびに肺疾患治療に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Clarification of physiological function of lysophosphatidic acid in maintenance of lung stem cells and application for respiratory diseases.

研究代表者

兼平 雅彦（KANEHIRA MASAHIKO）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90374941

研究成果の概要（和文）：肺幹細胞の維持におけるリゾリン脂質シグナルの位置づけを解明するため、マウス肺より肺幹細胞のプールと考えられている SP (side population) 分画をソーティングし、解析を行った。リゾリン脂質シグナルを阻害することで、細胞老化 (cellular senescence) の指標である SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) 活性の上昇が有意に抑制された。リゾリン脂質は種々の生理活性を有する物質として注目されているが、本研究において、新たに細胞老化に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：I tried to determine the relationship between lysophosphatidic acid (LPA) signaling and maintenance of stemness in lung stem cells. In lung SP cells, inhibition of LPA signaling significantly inhibited SA-β-gal activity compared to control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺幹細胞、リゾリン脂質、細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 各臓器にはその臓器の修復・再生に関わる組織幹細胞が存在することが知られているが、近年、肺においても組織幹細胞（肺幹細胞）が存在することが報告された。幹細胞は一般に、ニッチ (niche) と呼ばれる特殊な環境に存在し、自己複製と分化の精緻なバランスを維持しているが、その詳細は不明であった。組織幹細胞の stemness 維持やニッチに関する研究は、造血幹細胞における骨髓間質 (ストローマ) や毛包におけるバルジを中心に行なわれてきたが、肺幹細胞における stemness 維持機構ならびにニッチに関する研究は皆無であった。

(2) 近年、マウスにおける酸や活性酸素種 (ROS) 等による肺障害モデルにおいて、肺

胞内面を覆うサーファクタントの酸化により産生された物質が、肺の修復を遅延させるという報告がなされた。サーファクタントの主成分はリン脂質であることから、研究代表者は、リン脂質の加水分解産物であるリゾリン脂質による肺幹細胞の枯渇が、肺修復遅延の一因であると予想した。

## 2. 研究の目的

これまで肺幹細胞に関する研究は、肺幹細胞の同定はなされたものの、遅々として進んでいない。その理由として、肺幹細胞に限らず、分離後の幹細胞は、継代を重ねるにつれて分化もしくは細胞老化により多分化能を喪失することから、未分化能を維持したまま増幅させることが困難であることが挙げられる。これまでに、種々の遺伝子導入により、多分

化能を保持したまま幹細胞を維持する試みがなされてきたが、癌化の可能性を完全に除去することはできなかった。そこで研究代表者は、肺幹細胞に存在する分化能維持ならびに細胞老化のメカニズムを解明することを目指した。そして、そのメカニズムを肺の組織修復、ひいては難治性肺疾患の治療へ応用することを視野に実験を開始した。

### 3. 研究の方法

(1) 肺幹細胞モデルとして、肺癌細胞株 A549 細胞における SP (side population) 分画<sup>\*1</sup>をフローサイトメトリーを用いてソーティングした。SP と non-SP でリゾリン脂質シグナルに関する分子の発現の違いを mRNA レベルで比較した。

(2) マウスの肺より SP 分画のソーティングし、リゾリン脂質シグナルのアンタゴニストを添加し、細胞老化 (cellular senescence)<sup>\*2</sup>の進行を非添加群と比較した。

(3) 体性幹細胞における細胞老化とリゾリン脂質シグナルの関係を明らかにするため、同じ体性幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell; BMMSC)<sup>\*3</sup>にリゾリン脂質シグナルのアンタゴニストを添加し、細胞動態を非添加群と比較した。

#### < 語句説明 >

<sup>\*1</sup>SP (side population) 分画：蛍光色素 Hoechst33342 に染まらない細胞集団。幹細胞のプールと考えられている。

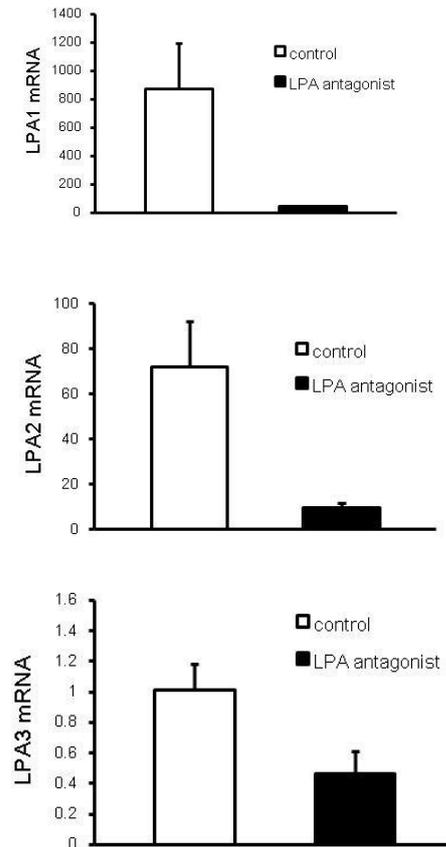
<sup>\*2</sup>細胞老化 (cellular senescence)：細胞が分裂を停止し、増殖できない状態が不可逆的に引き起こされること。種々の DNA 損傷(放射線、酸化ストレス、薬剤)や、テロメアの短小化によって誘導される細胞癌化を防ぐ機構と考えられている。

<sup>\*3</sup>骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSC)：骨髄に存在し、脂肪、軟骨ならびに骨への分化能を有する細胞として発見された。現在では骨髄のみならず、臍帯血、脂肪組織、皮膚、歯髄などに存在することが報告されており、また、骨格筋、心筋、肝、神経細胞など胚葉を超えた種々の細胞への分化能を有することから、ES 細胞、iPS 細胞にならび、再生医学の分野で注目されている細胞である。

### 4. 研究成果

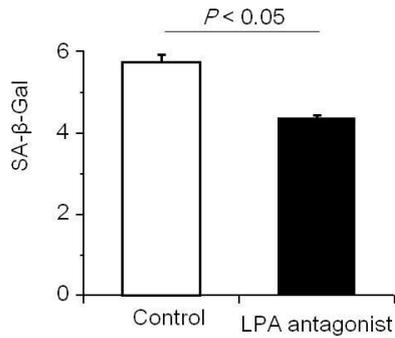
(1) A549 細胞よりソーティングした SP 分画においてリゾリン脂質受容体 (LPA1-3) の mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析したところ、SP 分画は non-SP 分画に比べ、LPA1-3 いずれの遺伝子発現も有意に減少していた (図 1)。このことより、肺幹細胞はリゾリン脂質シグナルが低く抑えられていることが予想された。

図 1



(2) 次に、実際の肺幹細胞においてリゾリン脂質シグナルと幹細胞性の維持について検討を行った。肺幹細胞の表面マーカーとして、CD34+/Sca-1+/CD31+/CD45-が報告されていることから、これらのマーカーを指標にマウス肺より肺幹細胞の分離を試みた。しかし、非常にマイナーな分画であることから、実験に供する十分量を得ることが困難であった。そこで (1) と同様にマウス肺より SP 分画をソーティングし、リゾリン脂質受容体アンタゴニストを添加し、細胞老化の指標の 1 つである SA- $\beta$ -gal (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase) 活性を測定した。SP 分画はリゾリン脂質受容体アンタゴニスト添加により、非添加群に比べ有意に SA- $\beta$ -gal 活性が抑制されていた (図 2)。このことから、リゾリン脂質シグナルの阻害は、肺幹細胞の細胞老化を抑制することが示唆された。

図 2



(3) リゾリン脂質シグナルと幹細胞性維持ならびに細胞老化の関係を明らかにするため、肺幹細胞と同じ体性幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSCs) を実験に供した。リゾリン脂質シグナルの阻害により、ユビキチンリガーゼの1種であるFbw7によりc-Mycの分解が促進されることがウェスタンブロットの結果明らかとなった (図3)。それに伴い、細胞周期が休止期であるG<sub>0</sub>期に留まることがフローサイトメトリーによる解析の結果確認された (DNAを7-AADで染色、RNAをpyronin Yで染色) (図4)。同様に、細胞老化の指標であるp16<sup>INK4a</sup>、Rb、p53、p21<sup>Cip1</sup>の発現が有意に抑制されることをウェスタンブロットにて確認した (図5)。

図 3

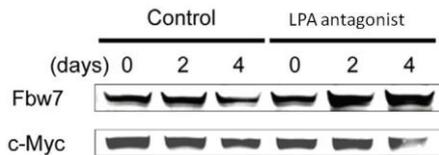


図 4

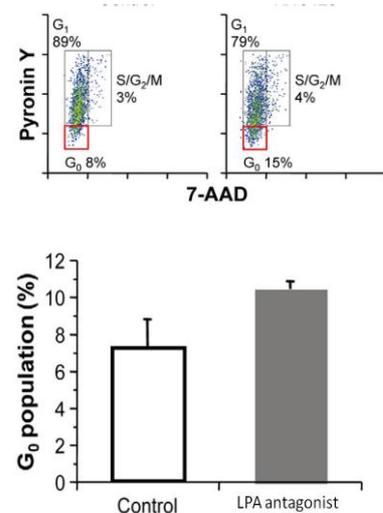
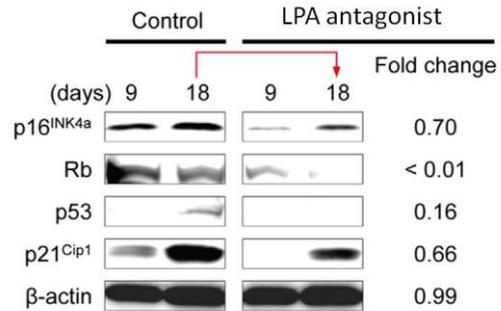


図 5



(4) 本研究により、リゾリン脂質シグナルの阻害により、肺幹細胞の細胞老化が抑制されること、ならびに、幹細胞性が維持される可能性が明らかとなった。本研究課題により得られた結果は、新たな幹細胞維持機構の存在を示唆するものであり、今後、肺幹細胞の長期培養法の確立、ならびにこれまで困難であった肺の再生の研究を大きく進める原動力になるものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Targeting lysophosphatidic acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells. Kanehira, M., Kikuchi, T., Ohkouchi, S., Shibahara, T., Tode, N., Santoso, A., Daito, H., Ohta, H., Tamada, T., Nukiwa, T. *PLoS ONE* 7 : e32185 (2012)  
査読有 10.1371/journal.pone.0032185
2. Mesenchymal stromal cell (MSC) derived Stanniocalcin-1 promotes survival of injured lung cancer epithelial cells by upregulation of Uncoupling protein Ohkouchi, S., Block, G.J., Katsha, A.M., Kanehira, M., Ebina, M., Kikuchi, T., Saijo, Y., Nukiwa, T., Prockop, D.J. *Mol Ther* 20 : 417-423 (2011)  
査読有 10.1038/mt.2011.259
3. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth Through the Enhancement of Neovascularization. Suzuki, K., Sun, R., Origuchi, M., Kanehira, M., Takahata, T., Itoh, J., Umezawa, A., Kijima, H., Fukuda, S., Saijo, Y. *Mol Med* 17 : 579-587 (2011)  
査読有 10.2119/molmed.2010.00157

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称：リゾリン脂質シグナル制御による幹細胞の維持増殖培養法

発明者：菊地利明、兼平雅彦、貫和敏博

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-001441

出願年月日：24年1月6日

国内外の別：国内

2. 名称：リゾリン脂質シグナル制御による幹細胞の維持増殖培養法

発明者：菊地利明、兼平雅彦、貫和敏博

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2012/82979

出願年月日：24年1月6日

国内外の別：国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

兼平 雅彦 (KANEHIRA MASAHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：9037491