

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890016

研究課題名(和文) ヒト肺胞上皮前駆細胞の分化を制御するmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of microRNAs that regulate differentiation of human lung progenitor cells

研究代表者

藤野 直也 (FUJINO, Naoya)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：10633670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：組織特異的幹細胞・前駆細胞は自己複製能・多分化能を有し、組織の恒常性の維持、傷害後の修復に重要な役割を果たしている。本研究はヒト肺胞上皮前駆細胞の機能を制御するmicroRNA(miRNA)を同定することを目的に行われた。網羅的miRNA発現解析の比較によりmiR-200cがヒト肺胞上皮前駆細胞で抑制されていることを発見した。合成miR-200cの投与によりヒト肺胞上皮前駆細胞において増殖能の低下が観察された。以上からmiR-200c標的遺伝子群がヒト肺胞上皮前駆細胞の増殖を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tissue-specific stem/progenitor cells have the ability to self-renew and the potential to differentiate into multiple cell-types and have a role in homeostasis and repair. The aim of this study was to identify microRNA(miRNA) that regulate function of human lung progenitor cells. We found that expression of miR-200c was inhibited in human lung progenitor cells compared with human mature alveolar epithelial cells. Transfection of a synthetic RNA, which mimics miR-200c, suppressed proliferation in human lung progenitor cells. This suggests that the genes targeted by miR-200c regulate growth of human lung progenitor cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：組織幹細胞 自己複製 分化 肺胞上皮前駆細胞 マイクロRNA 上皮間葉移行

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症は進行性に肺の線維化を引き起こす難治性疾患である。有効な治療法はなく、発症後の余命が3-5年と極めて予後不良である。病態として、肺胞上皮細胞の傷害と修復機構の破綻によって、線維芽細胞が無秩序に増殖し肺の線維化が進行していくと考えられている (Jenkins G, et al. Thorax 67: 179-182. 2012)。したがって、肺胞上皮細胞の修復を促す治療法の開発が求められている。

(2) 傷害を受けた細胞は、組織幹細胞・前駆細胞から供給された新たな細胞によって置換される。研究代表者はヒト成人肺組織から、肺胞 II 型上皮細胞への分化能を有する肺胞上皮前駆細胞 (Alveolar epithelial progenitor cells, AEPCs) の分離法を確立した (Fujino N, et al. Lab Invest 91: 363-378, 2011)。そして、特発性肺線維症では、AEPCs の割合は増加するが、AEPCs から供給される肺胞 II 型上皮細胞の割合は低下することを見出した (Fujino N, et al. Lab Invest 91: 363-378, 2011)。このことは、AEPCs の分化制御機構の異常が肺胞上皮修復を抑制し、肺線維化を進行させることを示唆している。したがって、増殖した AEPCs から肺胞 II 型上皮細胞への分化を適切に誘導することにより、肺線維化における傷害上皮の修復が期待される。

(3) AEPCs の肺胞上皮分化の評価には、ヒト肺組織から直接分離した肺胞 II 型上皮細胞をリファレンスとして用いることが必要である。そのために、研究代表者はヒト肺組織から肺胞 II 型上皮細胞を分離する方法を確立した (Fujino N, et al. Am J Respir Cell Mol Biol 46: 422-430, 2012)。さらに、AEPCs と肺胞 II 型上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、上皮間葉移行が AEPCs の肺胞上皮細胞分化を負に制御している可能性を示した (Fujino N, et al. Respir Investig 50:110-116, 2012)。しかしこの分化制御に関わるシグナル伝達経路は明らかにされていない。

(4) MicroRNA (miRNA) は18-25塩基程の一本鎖 RNA で、標的遺伝子を抑制的に制御し細胞の多彩な機能を制御することが知られている。さらに、多能性幹細胞・組織幹細胞の機能制御に重要な転写因子群の発現を抑制することによりこれらの幹細胞の自己複製能・多分化能を制御している。したがって、AEPCs の分化を司る miRNA を同定することは、AEPC の多分化能を制御するシグナル伝達経路を明らかにする上で重要なことであると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト肺胞上皮前駆細胞の分化能を制御する miRNA を同定することである。

## 3. 研究の方法

### (1) AEPCs と肺胞 II 型上皮細胞の miRNA 発現プロファイルの解明

3人の患者から提供された肺組織の健常部分より肺上皮前駆細胞を分離し細胞株を樹立した。肺 single cell suspension から CD45 陰性肺細胞を磁気細胞分離装置にて分離した。この分画をマウス胎児線維芽細胞上で培養し、得られたコロニーを継代培養することにより前駆細胞を分離した。肺上皮前駆細胞の増殖能を限界希釈法にて確認した。また間葉系細胞 (骨芽細胞・脂肪細胞)、肺胞上皮細胞への分化能をそれぞれ既報の培養法にて確認した (Fujino N, et al. Lab Invest 91: 363-378, 2011)。また、それとは異なる3人の患者から提供された健常肺組織よりフローサイトメトリーにて II 型肺胞細胞を分離した。細胞分離には、EpCAM, T1-alpha に対する抗体を用い、EpCAM 陽性 T1-alpha 陰性分画として II 型細胞を分離した。このような手法で分離した肺前駆細胞および II 型細胞から TRIzol にて total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用い cDNA を合成した。miRCURY LNA microRNA Array (Exigon) にて発現 miRNA のスクリーニングを行った。PCR は Light Cycler 480 で行い、GenEX (Multi D Analyses) にて解析した。本研究は、東北大学病院倫理委員会にて承認され、すべての患者よりインフォームドコンセントを得た。

### (2) 合成 miRNA のトランスフェクション

合成 miRNA をリポフェクタミン (HiPerfect Reagent, QIAGEN) 用い AEPCs にトランスフェクションした。合成 miRNA およびリポフェクタミンの至適濃度は、トランスフェクションコントロールとして使用した cell death siRNA (QIAGEN) にて決定した。また、陰性コントロールとして non-targeted siRNA (QIAGEN) を用いた。トランスフェクション後、4, 8 日後に細胞の形態・増殖を光学顕微鏡にて観察した。RNA を分離し ZEB1, ZEB2, E-cadherin の mRNA 発現を SYBR Green を利用した qRT-PCR 法にて検討した。

#### 4. 研究成果

(1) AEPCs では miR-200c の発現が強く抑制されている。

網羅的 miRNA 発現解析により AEPC, II 型細胞間で発現変動のある miRNA を同定した。II 型細胞に比べ AEPCs で 2 倍以上発現が増加していた miRNA は 131 種類あり, 2 倍以上発現が減少していた 120 種類あった。表 1, 2 に上位 20 の miRNA をあげる。このうち, miR-200c の発現が AEPCs で最も強く抑制されていた(表 2; 6672.9 倍 P-value 1.00E-08)。

表 1 AEPC で発現が増加していた miRNA

miRNA	Fold change	P-Value
hsa-miR-143	491.143	0.000246729
hsa-miR-155	462.544	8.33E-05
hsa-miR-145	385.343	4.35E-05
hsa-miR-199a-3p	328.779	1.36E-06
hsa-miR-424	292.711	0.000388947
hsa-miR-127-3p	187.928	2.44E-06
hsa-miR-493*	126.884	7.39E-07
hsa-miR-376a	106.200	3.96E-07
hsa-miR-382	101.265	1.80E-06
hsa-miR-365*	96.782	0.002130776
hsa-miR-214*	62.280	1.90E-08
hsa-miR-503	60.969	0.000578064
hsa-miR-31*	60.828	0.000120958
hsa-miR-199b-5p	52.248	0.002224059
hsa-miR-31	51.625	0.000398241
hsa-miR-450a	48.953	0.000820498
hsa-miR-432	43.411	0.000107267
hsa-miR-100*	42.616	0.000548901
hsa-miR-1	42.030	0.000632734
hsa-miR-370	41.355	7.06E-05

表 2 AEPC で発現が減少していた miRNA (Fold change のマイナスは発現減少を示す)

miRNA	Fold change	P-Value
hsa-miR-200c	-6672.944	1.00E-08
hsa-miR-652	-59.991	2.07E-06
hsa-miR-34b	-55.715	0.003523752
hsa-miR-146b-5p	-54.695	0.00035266
hsa-miR-34b*	-49.341	0.001598991
hsa-miR-182	-34.688	4.58E-05
hsa-miR-148a	-33.513	0.00018627
hsa-miR-449b	-29.041	0.002672697
hsa-miR-34c-5p	-24.876	0.003847441
hsa-miR-95	-23.363	0.000234483
hsa-miR-449a	-21.015	0.000895346
hsa-miR-204	-19.790	0.00333311
hsa-miR-326	-19.700	0.000262104
hsa-miR-135a	-19.608	0.001099521
hsa-miR-101	-19.382	4.81E-07
hsa-miR-205	-19.071	0.000762678
hsa-miR-126	-17.428	0.003947684
hsa-miR-224	-17.348	0.000639564
hsa-miR-942	-16.564	0.000803406
hsa-miR-451	-16.336	0.000221057

(2) miR-200c は AEPCs の増殖を抑制する

研究代表者は以前 AEPCs と II 型細胞の遺伝子発現プロファイルを用いた Gene Set Enrichment Analysis から, 上皮間葉移行 (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) が AEPCs の肺胞上皮分化を負に制御している可能性を見出した (Fujino N, et al. Respir Investig 50:110-116, 2012)。また先行研究により miR-200c は EMT 誘導転写因子である ZEB1 の発現を抑制することにより EMT を負に制御することが明らかにされていた (Korpál M, et al. J Biol Chem 283:

14910-14914, 2008). 今回の網羅的 miRNA 発現プロファイルの検討から, AEPCs では miR-200c の発現が強く抑制されていたことを考え合わせ, miR-200c の発現は AEPCs の上皮分化を促進させると仮説をたてた. この仮説の検証のため, 合成 miR-200c の AEPCs へのトランスフェクションを行った. その結果, トランスフェクション 4 日後までに細胞の増殖が抑制されることが分かった (図 1). 一方, 上皮分化を示す細胞の形態変化は観察されなかったことから明らかな上皮細胞への分化は否定的と考えられた.

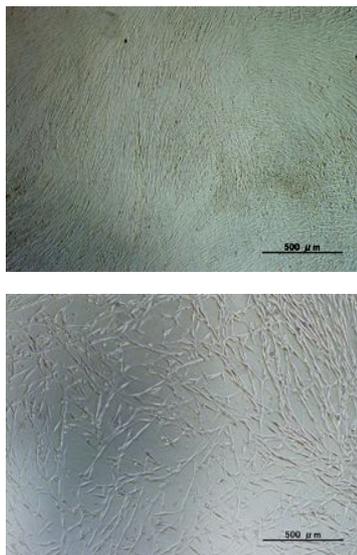


図 1: トランスフェクション 4 日後の細胞形態・増殖. 上図: non-targeted siRNA (25 nM), 下図: 合成 miR-200c (25 nM). 合成 miR-200c は肺上皮前駆細胞の増殖を抑制した.

### (3) 合成 miR-200c による遺伝子発現の変化

合成 miR-200c のトランスフェクションにより, ZEB1 および ZEB2 の mRNA 発現が低下した (図 2). ZEB1, ZEB2 によって転写が負に制御されている E-cadherin の発現はトランスフェクション後でも認められなかった. 今後, ZEB1, ZEB2 蛋白の定量が必要であると考えられた.

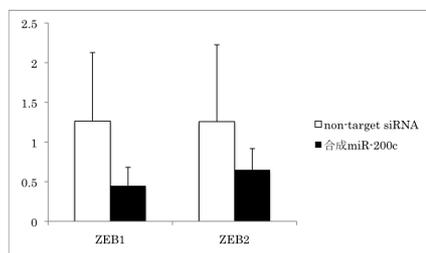


図 2: トランスフェクション 8 日後の ZEB1, ZEB2 の mRNA の相対発現. 18S rRNA にて発現量を標準化した. 一人の患者より得られた肺上皮前駆細胞で検討した. Well replicate を

3 とした. グラフは平均値, エラーバーは標準偏差を示す.

### 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 2 件)

- (1) Fujino N, Kubo H, Ota C, Suzuki T, Takahashi T, Yamada M, Suzuki S, Kondo T, Nagatomi R, Tando Y, Yamaya M. Increased severity of H1N1 pandemic influenza virus infection in alveolar type II cells from patients with pulmonary fibrosis. *J Infect Dis* 207:692, 2013. doi:10.1093/infdis/jis739. 査読有
- (2) Fujino N, Ota C, Takahashi T, Suzuki T, Suzuki S, Yamada M, Nagatomi R, Kondo T, Yamaya M, Kubo H. Gene expression profiles of alveolar type II cells of chronic obstructive pulmonary disease: A case-control study. *BMJ Open* 2:e001553, 2012. doi:10.1136/bmjopen-2012-001553. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 直也 (FUJINO NAOYA)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号: 10633670

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし