慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	代償性肺再生で肺胞マクロファージの役割 : エクソソームを中心に
Sub Title	The role of alveolar macrophages in compensatory lung regeneration
Author	栗山, 翔司(Kuriyama, Shōji)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	代償性肺再生における再生のトリガーとしてマクロファージに注目しマウスにおける左肺切除モデルを用いて肺胞マクロファージの表現系解析を行った。しかしマクロファージ分画に大きな変化を認める事ができず、miRNAの遺伝子発現制御の役割と変化をmiRNA arrayを解析することによって網羅的に検索することに計画を変更し、thyroid transcription factor-1 (TTF-1)の発現に関与するmir 200cを同定した。 The purpose of this study was focusing on macrophages as a trigger for regeneration in compensated lung regeneration, phenotypic analysis of alveolar macrophages was performed using the left lung resection model in mice. However, no major changes could be observed in the macrophage fraction, and the plan was changed to exhaustively search for roles and changes in miRNA gene expression control by analyzing the miRNA array. Mir 200c involved in the expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) was identified.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2017 ~ 2018 課題番号 : 17K16616 研究分野 : 呼吸器外科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16616seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 １８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１６６１６

研究課題名（和文）代償性肺再生で肺胞マクロファージの役割～エクソソームを中心に～

研究課題名（英文）The role of alveolar macrophages in compensatory lung regeneration

研究代表者
栗山　翔司（KURIYAMA, SHOJI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：２０７６８７３３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：代償性肺再生における再生のトリガーとしてマクロファージに注目しマウスにおける左肺切除モデルを用いて肺胞マクロファージの表現系解析を行った。しかしマクロファージ分画に大きな変化を認める事ができず、miRNAの遺伝子発現制 御の役割と変化をmiRNA arrayを解析することによって網羅的に検索することに計画を変更し、thyroid transcription factor-1 (TTF-1)の発現に関与する mir 200cを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回代償性肺成長のkey regulatorと成りうる遺伝子発現制御機構としてmiRNAを同定した。機能解析・阻害実験が必要であるが今後代償性肺性の機能解析が進むことにより肺胞再生の新治療を樹立できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was focusing on macrophages as a trigger for regeneration in compensated lung regeneration, phenotypic analysis of alveolar macrophages was performed using the left lung resection model in mice. However, no major changes could be observed in the macrophage fraction, and the plan was changed to exhaustively search for roles and changes in miRNA gene expression control by analyzing the miRNA array. Mir 200c involved in the expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) was identified.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺再生　呼吸器

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

齧歯類の肺は再生能に富み、霊長類とちがい肺の損傷後に代償性に肺再生が起こることが知られている。マウスで肺切除を行うと、残存肺が「代償性肺再生」を経て本来の体積・機能を回復し約 3 週間の過程で、残存肺が損傷前の体積と機能を回復するように増大することが報告されている。

肺胞の再生は、肺胞腔内をあらたに分け隔てるように肺胞中隔が血管新生を伴って伸展し、同時に肺胞上皮細胞が分裂・上皮間質転換を経て新しい肺胞壁を形成して生じると形態学的に理解されている。しかしその過程の分子生物学的制御は不明な点が多い。肺胞中隔の進展には①肺胞上皮幹細胞の分化・分裂、②肺胞中隔への血管新生、③肺胞再生の場（肺胞中隔の間質の進展）の形成、の 3 つのステップが必須である。肺胞上皮の分化分裂について、肺胞上皮幹細胞の挙動を制御する幹細胞性維持因子群として Notch1 および c-kit について報告がなされている（Cao Z et al Nat Med 2016, Kajstura J et al 2011 NJEM）。
また研究代表者のグループは発生過程で肺胞中隔に進展する血管新生の重要性について解析を試みた。肺胞上皮特異的な遺伝子改変モデル（prosurfactant protein C-Cre マウス）の樹立、あるいは経気道的に肺胞上皮特異的に siRNA を伝達するモデルを樹立し、Angiopoietin1-Tie2 シグナルの肺特異的過剰発現や VEGF の肺胞特異的阻害を行い、肺再生での血管新生の重要性を報告した（Hato T et al. BBRC 2009, Takahashi Y et al. Int J Med Sci 2013）。

ただし上記 2 因子の解析は肺発生・再生に必須の要因ではあるが実際の肺再生の「トリガー」がいったい何であるのかは不明であり、本研究では再生の場の形成に注目して、肺発生・再生の開始シグナルの発見を目指した。

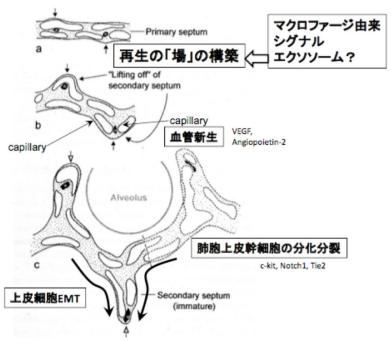
２．研究の目的

マウスで肺切除を行うと、残存肺が「代償性肺再生」を経て本来の体積・機能を回復する。肺発生・再生の過程について上記の再生の場の構築に着目して分子機構の解明を目指す。組織損傷の修復過程では臓器特異的マクロファージの機能が重要であることが知られており、皮膚損傷モデルでよく解析されている。ひとたび皮膚の損傷が加わると、急性期には外来病原体からの防御機構が発動し、損傷部に浸潤したマクロファージは創部に浸潤してきた病原体を貪食しながら、インターロイキン-6 や TNF-α といった炎症性サイトカインを盛んに放出する形質（M1）となり、リンパ球を活性化させる。やがて病原体が排除され、急性期炎症が完了すると、マクロファージはインターロイキン-10 やアルギナーゼ-1 といった抗炎症サイトカインを放出し炎症反応を収束させる（M2）。M2 形質に傾いたマクロファージは、組織中にオルニチンやポリアミンの供給を行い、組織修復を促進するとともに、線維芽細胞の創部への浸潤や増殖を促進して欠損部の充填を促進する。

今回の研究でもマクロファージに注目し解析を行っていく。左肺切除モデルを用いて肺胞マクロファージの表現系解析を行う。肺損傷直後にはマクロファージは M1 優位な形質であるが、再生過程において M2 優位な形質へと変化することをフローサイトメトリーを用いて立証し、また肺切除後の経過とマクロファージの表現系が M2 に変化するタイミングを確定する。

また細胞間のコミュニケーションにエクソソーム（あるいは細胞外小胞 Extracellular vesicle, EV とも呼ばれる）を介する機構の重要性が明らかになってきた。エクソソームは内腔にタンパク質、mRNA や miRNA を内包した状態で細胞外に放出されるため、指向性のある安定した情報伝達機構が可能である。とくに循環血液中に漂うエクソソームの機能がよく解析されており、心筋などの再生過程で間葉系幹細胞を損傷部に誘導する過程で重要な役割を果たすことが報告されている。

肺再生にも同様に図の様なエクソソームを介した細胞間コミュニケーションが存在している可能性があり、代償性肺再生過程での肺胞被覆液および循環血液中に含まれるエクソソームから miRNA を抽出しマクロファージの表現系の変化と併せて解析を行う事とした。



３．研究の方法

(1)左肺切除モデル
実験動物：マウス（C57Bl/6 と BALB/c の 2 種 8 週齢）を使用。
ケタミンおよびキシラジンの筋肉注射で全身麻酔をかけたのち、気管挿管を行い右側臥位とし皮下組織・前鋸筋を切開し骨性胸郭を露出させる。第 5 肋間で開胸し左肺門を絹糸で一括結紮ののち、左肺を摘出する。肋間、筋層、皮膚を閉鎖する。自発呼吸確認後、抜管し術後疼痛管理を行いながら通常飼育に戻す。

(2)肺胞マクロファージの表現形解析
肺切除施行前,肺切除 12 時間後, 1 日後, 3 日後, 1 週間後, 2 週間後, 3 週間後後で気管支肺胞洗浄を施行し,肺胞マクロファージを回収する。同様に全身麻酔を導入後、気管挿管を行う。挿管チューブからリン酸緩衝バッファーを注入し、直ちにマウスの胸部をマッサージし、注入したリン酸緩衝バッファーを回収する。回収した気管支肺胞洗浄液に含まれるマクロファージをフローサイトメトリーと定量的 PCR で解析する。M1 マーカーとして CD80、CD86、CD25 を、M2 マーカーとして CD206, CX3CR1, CCR2 を染色し M1/M2 陽性細胞比率を比較する。フローサイトメトリーや磁気ソーティングを用いて mRNA を回収し逆転写反応で cDNA ライブラリーを作成した後, 定量的 PCR 反応でマクロファージ分化に関わる分子群を解析する。得られた M1/M2 比率の推移を比較し、最も大きくマクロファージの表現形が変化するタイミングを同定する。

(3)代償性肺再生過程での肺胞被覆液および循環血液中に含まれるエクソソームの解析
肺切除施行前,肺切除 12 時間後, 1 日後, 3 日後, 1 週間後, 3 週間後でマウスを犠牲死させ、気管支肺胞洗浄、血液の回収および再生途上肺の切除を施行する。回収したエクソソームから miRNA を回収し比較を行い肺再生に関与する一連の miRNA 群を同定する。

４．研究成果
左肺全摘術モデルを確立し肺胞マクロファージの解析を行う予定であったが、FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)ではマクロファージ分画に大きな変化を認めなかったことから、miRNA に着目し、miRNA array 解析へと切り替えた。

代償性肺再生した右肺を用いて miRNA アレイを作成し、代償性肺成長時期における遺伝子発現制御に有意差がないか検討を行う事とした。C57/BL6J マウス（♀、9 週齢）に全身麻酔をかけ左肺を摘出した。閉胸ののち、残存右肺の変化を形態学的解析および乾燥重量の評価によって左肺全摘術後の代償性肺成長の変化を記録する系を確立した。
miRNA の時間的な変化に着目してコントロールとして sham operation（開胸のみの群）を設定し、左肺全適後 12 時間および 48 時間の検体を miRNA array にかけて miRNA の時間的な発現量の変化を網羅的に検索した。この結果から、左肺全摘術後 12 時間で発現が有意に低下し、48 時間後に sham operation 群と同等レベルまで戻るものを検索した。これで上がった候補の中からネットワーク解析および文献的な検索から、thyroid transcription factor-1 (TTF-1)の発現に関与する mir 200c を同定した。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計　0 件）

〔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)研究分担者
なし
(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。