

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers
別タイトル	急性肺障害マウスモデルを用いた増殖因子およびバイオマーカーの同定
作成者（著者）	黒澤, 武介
公開者	東邦大学
発行日	2019.03.13
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 62.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：赤坂喜清 / タイトル：A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers / 著者：Takeyuki Kurosawa, Shion Miyoshi, Soh Yamazaki, Takashi Nishina, Tetuo Mikami, Akira Oikawa, Sakae Homma, Hiroyasu Nakano / 掲載誌：Genes Cells / 巻号・発行年等：24 (2):112-125, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第913号
学位記番号	甲第626号
学位授与年月日	2019.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD20035301

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

黒澤武介より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 626 号

学位申請者 : 黒 澤 武 介

学位審査論文: A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers

(急性肺障害マウスモデルを用いた増殖因子およびバイオマーカーの同定)

著 者 : Takeyuki Kurosawa, Shion Miyoshi, Soh Yamazaki, Takashi Nishina, Tetuo Mikami, Akira Oikawa, Sakae Homma, Hiroyasu Nakano

公 表 誌 : Genes to Cells DOI: 10.1111/gtc.12659

論文内容の要旨 :

肺は気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ (AM; alveolar macrophage) など様々な細胞から構成され、BASCs (bronchioalveolar stem cells) 細胞など複数の幹細胞が存在する。II型肺胞上皮細胞 (AEC2; alveolar epithelial cells type2) は自己再生能と I 型肺胞上皮細胞 (AEC1) へ分化能を有し、肺胞領域において幹細胞と考えられている。また難病である間質性肺炎においては微小な上皮細胞障害が根幹にあり、アポトーシスに陥った AEC1 および AEC2 は AM に食食されることが知られている。アポトーシス細胞が食食されることで再生が誘導されホメオスタシスを維持している。この AEC2 の再生メカニズムはいまだに解明されておらず、関わる因子とバイオマーカーを同定するために、我々は *Lysozyme M(LysM)-Diphtheria toxin receptor (DTR)* マウスを使用した。マウスは生来 DT に対する感受性を持っていないため、DTR を発現させた AEC2、AM、骨髄系細胞にアポトーシスを誘導可能なモデルである。

まず DT 投与後 48 時間で CD11c⁺Siglec-F⁺である AM の消失を確認したが 96 時間から 144 時間でマウスは全例死亡した。次に 96 時間以内で AEC2 のアポトーシスを確認するために免疫組織染色を行った。肺胞領域においては、24 時間で CC3 (cleaved caspase-3) 陽性であるアポトーシスシグナルの亢進を認め、SP-C (surfactant protein-C) および TTF-1 (Thyroid transcription factor-1) 陽性の AEC2 は 48-72 時間に最も少なくなり、AEC2 のアポトーシスを確認した。アポトーシスに引き続く増殖シグナル (Ki-67⁺) を測定したが、96 時間でわずかな増加のみに留まり顕著な亢進は確認できなかった。気管支においては 48 時間

でアポトーシスを確認し、引き続き 72-96 時間で増殖シグナルを確認した。

野生型マウス (WT; wild type) の AM や骨髄系細胞を移植することで肺胞領域におけるホメオスタシスが維持され増殖シグナルが亢進することを期待し、骨髄移植を行った。移植骨髄の組織への定着を待ち、DT 投与を行った。*LysM-DTR* マウスでは 96 時間で増殖を確認できたが、移植マウスにおいては WT の骨髄を *LysM-DTR* へ移植した群 (W-L 群) で DT 投与後 72 時間での増殖シグナルを確認できた。注目すべきことに、*LysM-DTR* の骨髄を *LysM-DTR* へ移植した群 (L-L 群) と比較し、W-L 群は気管支の増殖シグナルに差がなく肺胞領域の増殖シグナルでの顕著な差を認めた。WT の骨髄移植により肺胞領域の増殖を亢進させることに成功した。

肺胞領域の増殖シグナル亢進を確認できたため、これらのマウス肺をマイクロアレイを用いて解析した。マイクロアレイにおいて他群と比較し W-L 群で PI3K/AKT、FGF、WNT など増殖関連因子が確かに亢進していた。マイクロアレイの結果からいくつかの因子を選択し、qPCR を行った。qPCR において FGF2 (fibroblast growth factor-2)、IL (interleukin)-11、Wisp1 (WNT-inducible signal pathway protein-1) などが亢進していた。またこれらのマウス血清のメタボライト解析では、Deoxyguanosine、Glycocyamine、Serotonin などが AEC2 の障害に伴い減少していた。これらは *LysM-DTR* マウスの骨髄を WT へ移植した群 (L-W 群) では減少を認めなかった。

本研究では *LysM-DTR* マウスが AEC2 に特異的な急性肺障害モデルであることを証明した。これまでの報告ではブレオマイシン、感染、放射線などによる肺障害が多いが、*LysM-DTR* マウスは肺胞領域において AEC2 特異的に障害可能な点において有用と考えられる。このマウスを用いることで FGF2、IL-11、Wisp1 が AEC2 の増殖因子であることを明らかにし、また Deoxyguanosine、Glycocyamine、Serotonin などいくつかの因子が急性 II 型肺胞上皮細胞障害の減少するバイオマーカーであることを明らかにした。残念ながら増加するマーカーの同定には至らなかったものの、既存の報告では認めないバイオマーカーを同定した。間質性肺炎を始めとする肺胞上皮細胞障害をきたす疾患において有用な可能性がある。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 626 号	氏 名	黒 澤 武 介
学位審査担当者	主 査	赤 坂 喜 清
	副 査	海 老 原 覚
	副 査	松 瀬 厚 人
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	澁 谷 和 俊

学位審査論文の審査結果の要旨 :

学位審査会は平成 31 年 1 月 22 日午後 6 時より医学部第 2 セミナー室にて 5 名の審査員の出席の下に開催された。

研究概要： 肺は様々な細胞から構成され、II型肺胞上皮細胞 (alveolar epithelial cells type2; AEC2) と BASCs (bronchioalveolar stem cells) 細胞が肺胞上皮細胞への分化能を有する。難病である特発性肺線維症は微小な上皮細胞障害に対する異常な組織修復が病態の首座であり、障害された上皮細胞はマクロファージにより貪食される。本研究はII型肺胞上皮細胞を特異的に障害するモデルマウスを使用することで、肺胞上皮細胞の増殖因子および障害バイオマーカーを同定した。LysozymeMのプロモーター下にジフテリア毒素受容体を発現させたトランスジェニックマウス (*LysM-DTR*) を使用し、ジフテリア毒素 (DT) 投与により骨髄細胞、AEC2 にアポトーシスを誘導した。DT 投与後 AEC2 の消失を認めたが、その後長時間再生および増殖を認めなかった。マクロファージを含む骨髄細胞の存在により肺胞上皮細胞の増殖を誘導するため、野生型マウスの骨髄を *LysM-DTR* マウスへ移植した。野生型マウスの骨髄移植により肺胞上皮細胞の増殖及び AEC2 の再生を認めた。この骨髄移植マウスをマイクロアレイ及び qPCR で解析することにより肺胞上皮細胞の増殖因子として Interleukin (IL)-11, Fibroblast growth factor (FGF)-2, WNT-inducible signal pathway protein-1 (Wisp1) などを同定し、メタボローム解析を行うことで Glycocyamine や Stachydrine が AEC2 障害のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

学位審査会では申請者による研究要旨の発表後、審査委員より活発な質疑応答がなされた。DT 投与後 *LysM-DTR* マウスの死因は何か。DT 投与後 *LysM-DTR* マウスに対する骨髄移植は延命効果があるのか。本マウスでは肺線維症が発症するのか、組織像から肺線維症よりびまん性肺胞傷害モデルに近いのではないのか。本マウス II 型肺胞上皮細胞の再生には気管支肺胞上皮幹細胞は関与しないのか。血清メタボライト解析で同定されたバイオマーカーの臨床応用は可能かなど質問があった。申請者は全ての質問に的確に返答した。本研究は① *LysM-DTR* マウス開発により既存モデルで報告がない AEC2 特異的障害モデルの確立に成功した。② 同マウス骨髄移植実験から AEC2 修復過程を臓器レベルで再現可能とし、その増殖因子として FGF2, IL-11, Wisp1 を同定した。また AEC2 障害の新規バイオマーカーとして、Deoxyguanosine, Glycocyamine, Serotonin を同定した。以上から本研究は種々の肺胞疾患の基盤となる AEC2 の修復機序を分子レベルまで解析し、今後の新規治療に有効な AEC2 の人為的制御の開発に重要と考えられ、審査委員全員の一致で学位授与に相当すると判断し、学位審査会を終了した。