

氏名	おた ちはる 大田 千晴
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成26年3月26日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	肺細胞分離法の開発と疾患肺における細胞種特異的解析
論文審査委員	主査 教授 呉 繁夫 教授 仁尾 正記 教授 黒澤 一

論文内容要旨

急性肺傷害、肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、気管支肺異形成など難治性肺疾患の病態には、肺細胞レベルの細胞傷害が関与している。しかし、その詳細なメカニズムは解明されていない。マウスやヒト肺における従来の研究は、全肺を対象に行われてきた。しかし、肺は約40種類の異なる細胞で構成されており、遺伝子発現やエピジェネティック修飾は上皮・内皮など細胞種ごとに異なる。つまり、肺組織全体での解析では真の病態を反映し得ない可能性がある。このため、上皮細胞、内皮細胞、間葉系細胞などの肺胞構成細胞を個々に分離・採取し、様々な肺病態における個々の細胞の機能解析を行わなければ、真の病態解明は不可能である。そこで、本研究では、様々な病態における肺細胞機能解析を行う技術基盤を開発することを目的とした。そして、その技術を用いて、マウス肺疾患モデルおよびヒト疾患肺由来肺細胞の解析を行った。

私はこの博士論文において、まずマウス肺における肺血管内皮細胞分離法の開発を行った。Collagenase Aを用いて細胞懸濁液を作成し、磁気ビーズを用いた血球細胞マーカーおよび線維芽細胞マーカー陽性細胞の除去を行った後、内皮細胞マーカー陽性細胞を採取することによって、線維芽細胞の混入を避けて高純度、かつ大量に肺血管内皮細胞を分離、培養できる方法確立した。次にマウス肺における2型肺胞上皮細胞分離法について、dispaseとelastaseの2種類の酵素を用いて検討し、最適化を行った。Dispaseを用いて作成した細胞懸濁液から磁気ビーズを用いて肺胞上皮細胞を採取し、さらに1型肺胞上皮細胞を含む死細胞除去を行うことで、高純度かつ生存率の高い2型肺胞上皮細胞を分離可能であることがわかった。この肺血管内皮細胞および肺胞上皮細胞分離技術を用いて、さまざまな肺病態における肺細胞機能解析を行った。まず、高濃度酸素曝露による肺傷害モデルにおける、*in vitro*および*in vivo*での肺血管内皮細胞および肺胞上皮細胞のアポトーシスに関する研究を行った。その結果、(1)高濃度酸素曝露による肺傷害における肺胞上皮-内皮バリアの破綻のメカニズムには、肺胞上皮細胞に発現しているreceptor for advanced glycation end-products (RAGE)によるアポトーシスの亢進が関与していることを明らかにした。さらに、ブレオマイシン肺傷害モデルにおけるエピジェネティック修飾に関する研究を行った。分離したマウス肺胞上皮細胞を用い、2型肺胞上皮細胞特異的遺伝子におけるヒストンの翻訳後修飾に関する研究を行った。その結果、(2)2型肺胞上皮細胞特異的な遺伝子(*Sftpc*)プロモーター領域のエピジェネティックなヒストン修飾が肺胞上皮細胞傷害に関与している可能性があることが示唆された。最後に、ヒト肺組織より分離した2型肺胞上皮細胞特異的遺伝子におけるDNAメチル化の定量的解析を行った。その結果、(3)2型肺胞上皮細胞特異的遺伝子(*NKX2.1*)のメチル化が肺線維症の病態に関与している可能性を明らかにした。

肺胞構成細胞を個々に分離・採取する方法の確立によって、これまでの全肺解析で困難であっ

(書式 1 2)

た，様々な肺病態における個々の細胞の細胞種特異的な機能解析が可能になった．肺細胞分離による細胞種特異的解析は，これまで詳細が不明であった肺疾患の病態解明および治療法の開発にとって有用である．

審査結果の要旨

博士論文題目 肺細胞分離法の開発と疾患肺における細胞種特異的解析.....

所属専攻・分野名 医科学専攻 小児病態学 分野

氏名 太田 千晴.....

急性肺傷害、肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、気管支肺異形成など難治性肺疾患の病態には、肺細胞レベルの細胞傷害が関与している。しかし、その詳細なメカニズムは解明されていない。マウスやヒト肺における従来の研究は、全肺を対象に行われてきた。しかし、肺は約 40 種類の異なる細胞で構成されており、遺伝子発現やエピジェネティック修飾は上皮・内皮など細胞種ごとに異なる。つまり、肺組織全体での解析では真の病態を反映し得ない可能性がある。このため、上皮細胞、内皮細胞、間葉系細胞などの肺胞構成細胞を個々に分離・採取し、様々な肺病態における個々の細胞の機能解析を行わなければ、真の病態解明は不可能である。そこで、本研究では、様々な病態における肺細胞機能解析を行う技術基盤を開発することを目的とした。そして、その技術を用いて、マウス肺疾患モデルおよびヒト疾患肺由来肺細胞の解析を行った。

私はこの博士論文において、まずマウス肺における肺血管内皮細胞分離法の開発を行った。Collagenase A を用いて細胞懸濁液を作成し、磁気ビーズを用いた血球細胞マーカーおよび線維芽細胞マーカー陽性細胞の除去を行った後、内皮細胞マーカー陽性細胞を採取することによって、線維芽細胞の混入を避けて高純度、かつ大量に肺血管内皮細胞を分離、培養できる方法を確立した。次にマウス肺における 2 型肺胞上皮細胞分離法について、dispase と elastase の 2 種類の酵素を用いて検討し、最適化を行った。Dispase を用いて作成した細胞懸濁液から磁気ビーズを用いて肺胞上皮細胞を採取し、さらに 1 型肺胞上皮細胞を含む死細胞除去を行うことで、高純度かつ生存率の高い 2 型肺胞上皮細胞を分離可能であることがわかった。この肺血管内皮細胞および肺胞上皮細胞分離技術を用いて、さまざまな肺病態における肺細胞機能解析を行った。まず、高濃度酸素曝露による肺傷害モデルにおける、*in vitro* および *in vivo* での肺血管内皮細胞および肺胞上皮細胞のアポトーシスに関する研究を行った。その結果、(1) 高濃度酸素曝露による肺傷害における肺胞上皮-内皮バリアの破綻のメカニズムには、肺胞上皮細胞に発現している receptor for advanced glycation end-products (RAGE) によるアポトーシスの亢進が関与していることを明らかにした。さらに、ブレオマイシン肺傷害モデルにおけるエピジェネティック修飾に関する研究を行った。分離したマウス肺胞上皮細胞を用い、2 型肺胞上皮細胞特異的遺伝子におけるヒストンの翻訳後修飾に関する研究を行った。その結果、(2) 2 型肺胞上皮細胞特異的な遺伝子 (*Sftpc*) プロモーター領域のエピジェネティックなヒストン修飾が肺胞上皮細胞傷害に関与している可能性があることが示唆された。最後に、ヒト肺組織より分離した 2 型肺胞上皮細胞特異的遺伝子における DNA メチル化の定量的解析を行った。その結果、(3) 2 型肺胞上皮細胞特異的遺伝子 (*NKX2.1*) のメチル化が肺線維症の病態に関与している可能性を明らかにした。

肺胞構成細胞を個々に分離・採取する方法の確立によって、これまでの全肺解析で困難であった、様々な肺病態における個々の細胞の細胞種特異的な機能解析が可能になった。肺細胞分離による細胞種特異的解析は、これまで詳細が不明であった肺疾患の病態解明および治療法の開発にとって有用である。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。