

氏名	藤野 直也
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 27 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	ヒト肺胞上皮前駆細胞に関する研究
論文審査委員	主査 教授 永富 良一 教授 黒澤 一 教授 出澤 真理

論文内容要旨

再生医療は次世代の治療法として脚光を浴びている。慢性閉塞性肺疾患や特発性肺線維症等の難治性肺疾患に対しても、再生医療を利用した根治的な治療法の確立が期待されている。しかし、肺の再生医療・幹細胞研究は他の臓器に比べ非常に遅れている。その理由は2つある。幹細胞研究のためには、その幹細胞を組織から分離することが必要である。しかし、ヒト肺では、組織幹/前駆細胞を同定するための適切なマーカーが見つかっていない。これが1つ目の理由である。また、幹/前駆細胞は傷害後の修復過程において増殖、分化し、傷害された成熟細胞を置換していく。この機序の解明のためには、組織から成熟細胞を高純度に分離し、その遺伝子発現を明らかにする必要がある。しかし、肺は30種類以上の多様な細胞群から構成されている複雑な組織であるため、これらの肺構成細胞を体系的に分離する方法はなかった。これが2つ目の理由である。

近年、発生工学的手法を用いてマウス肺における幹/前駆細胞の存在が明らかにされてきた。しかし、上述の技術的な問題によりヒト肺においては幹/前駆細胞の研究が進んでいなかった。そこで私は、ヒト肺前駆細胞の分離に取り組んだ。ヒト肺single cell suspensionをマウス胎児線維芽細胞上で培養することにより、コロニー形成細胞が分離された。このコロニー形成細胞は、II型肺胞上皮細胞 (II型細胞) のマーカーであるpro surfactant protein-C (pro SP-C) と間葉系幹細胞のマーカーであるCD90を共発現する新規細胞群であった。このpro SP-C+/CD90+細胞は*in vitro*で自己複製能とII型細胞への分化能を有していた。網羅的遺伝子発現解析の結果、骨髄間葉系幹細胞に比べこのpro SP-C+/CD90+細胞では肺の発生に関与する遺伝子群が高発現していた。さらに、組織学的検討の結果、pro SP-CとCD90を共発現する細胞は、健常肺では肺胞壁に存在し、線維化肺ではII型細胞の過形成部位に局在していた。以上の検討から、私は、初めてヒト成人肺組織内の肺胞上皮前駆細胞の存在を明らかにした。次に、この肺胞上皮前駆細胞から分化誘導したII型細胞と、生体内に存在する成熟II型細胞の遺伝子発現の相同性を確認した。しかし、ヒト肺より純粋なII型細胞を分離する方法が存在しないため、私は、肺胞構成細胞の体系的な分離法の開発に取り組んだ。様々な細胞表面抗原の組み合わせを検討した結果、EpCAM, T1α, VE-cadheirnの発現パターンに基づいて、肺胞構成細胞を種類別に分類できることが明らかとなり、純粋なII型細胞の分離に初めて成功した。そこで、肺胞上皮前駆細胞から分化誘導したII型細胞と、生体から直接分離した成熟II型細胞の遺伝子発現を比較した。両者に共通な遺伝子群はtranscription, lung developmentに関する遺伝子セットから構成され、その中にはCEBPD, FOXP1等II型細胞の機能維持に重要な転写因子群が含まれていた。一方、II型細胞では肺内胚葉の転写因子、上皮細胞に発現する遺伝子、サーファクタント遺伝子が高発現しているのに対し、分化誘導したII型細胞では肺中胚葉の転写因子、間葉系細胞に発現する遺伝子が高発現しており、両者間で遺伝子発現に違いがみられた。この遺伝子発現の違いは、上皮間葉移行、エピゲノムによる遺伝子制御、上皮増殖因子/肝細胞増殖因子シグナルによって制御されている可能性が示唆された。今後、この肺胞上皮前駆細胞の分化誘導とII型細胞機能発現/

維持に重要な因子（転写因子，miRNA，エピジェネティック制御等）を明らかにすることにより，難治性肺疾患の病態形成過程が解明できると考える．さらに，そのことによって，新たな創薬ターゲットが見いだされるものとする．

審査結果の要旨

博士論文題目 ヒト肺胞上皮前駆細胞に関する研究

所属専攻・分野名 医科学 専攻 運動学 分野
学籍番号 氏名 藤野直也

本論文は、ヒト肺胞上皮前駆細胞の分離、ヒト肺胞構成細胞の分離、肺胞上皮前駆細胞から分化誘導したII型細胞とヒト肺組織から分離した成熟II型細胞の遺伝子発現の比較の3章より構成されている。それぞれ別々の論文の内容となっているが、全体として論理的なストーリーでまとめられている。

本論文では、ヒト末梢肺組織からII型細胞の前駆細胞である肺胞上皮前駆細胞（AEPC）を分離し、II型細胞への分化誘導過程で上皮間葉移行やチロシンキナーゼ型受容体シグナルが関与していることが述べられている。マウスでは肺組織幹・前駆細胞の存在は指摘されているが、ヒト肺では未だ明確には同定されていない。本論文が世界で初めてヒト肺組織に肺胞上皮細胞の前駆細胞が存在することを報告した論文であり、基礎医学的な報告として評価できる。また、同様のマーカーの発現パターンをもつ細胞が、肺線維症や一部の肺腺癌で増殖していることを見だし、AEPCが肺疾患の病態に関与する可能性を示した。さらに、このAEPCが創薬スクリーニングに利用可能であることが述べられている。このことは、未だ根治的治療法のない難治性肺疾患に対して、新規な治療法を開発するbreak-throughとなる可能性を示しており、臨床的にも極めて重要な意義のある論文である。

また、第二章では、FACSを用いて肺構成細胞を種類別に生きた状態で分離する新しい技術を開発した。II型細胞だけでなく、血管、リンパ管内皮細胞、間葉系細胞を高純度に分離することが可能になった。肺は極めて多種類の細胞から構成されており、疾患肺における細胞特異的な解析は重要である。しかし、細胞を種類別に分離する方法がなかったため今まで、そのような細胞特異的肺疾患解析はなされていなかった。本方法を応用することにより、今後、難治性肺疾患における細胞機能解析が可能になり応用範囲の広い、示唆に富む研究である。

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。