

肺組織病態の形成・修復における細胞老化の役割に関する研究（19-14）

主任研究者 杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター

老化機構研究部・免疫研究室（室長）

研究要旨

本研究は、呼吸器疾患における新規創薬標的の探索や治療法開発の基盤形成を行うことを目的とする。

ヒトを含む哺乳動物の細胞は、DNA 損傷や酸化ストレスなどの慢性的なストレスを受けると細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る。細胞老化は、細胞自律的な癌抑制機構として、極めて重要な役割を持つことが古くから知られていた。さらに近年、申請者を含む複数の研究グループは、生体から細胞老化を起こした細胞（老化細胞）を排除（senolysis）可能な遺伝子可変マウスを樹立し、これらを用いて細胞老化が癌以外にも組織の老化や様々な加齢性疾患に関与することを明らかにした。

老化細胞からは、様々な生理活性物質が分泌され、周辺環境に影響を与える。このような老化細胞特異的な分泌表現型はSASP（senescence-associated secretory phenotype）と呼ばれ、現在ではSASPを介した老化細胞の細胞非自律的な働きが、組織の老化や疾患において重要な役割を持つと考えられている。

申請者は平成30年度までの長寿医療研究開発費（28-22）によって行った研究において、senolysisマウス（ARF-DTRマウス）を独自に作製し、肺組織の老化が加齢に伴って蓄積する老化細胞に起因すること、さらにエラスターゼ誘導性肺気腫モデルマウスを用いて、老化細胞が存在することにより気腫病態が増悪化されることを報告した（Hashimoto et al. 2016; Mikawa et al. 2018）。本年度は、よりヒトの病態に近い喫煙による肺障害モデルの解析と論文作成を行った。

主任研究者

杉本 昌隆 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部・免疫研究室（室長）

A. 研究目的

本研究では、モデル動物を用いた研究により、呼吸器疾患における新規創薬標的の探索や治療法開発の基盤形成を行うことを目的とする。

現在、先進国では慢性閉塞性肺疾患（COPD）や肺がんなどの呼吸器疾患が死因の上位を占めている。しかしながらこれら疾患の治療は困難であり、特にCOPDの主要病態である肺気腫に関しては、現時点で治療法は確立されていない。本研究では、細胞老化の視点からこれら呼吸器疾患の病態解明を目指す。

## B. 研究方法

本研究における動物実験は、すべて報告者の所属する機関の当該委員会の承認を得て行った。

### 喫煙モデルの解析

雌性 ARF-DTR もしくは野生型マウスを 1 日 30 分間、週 5 日間、4 週間タバコ煙（1.6 mg/m<sup>3</sup>）に暴露した。タバコ煙抽出液（CSE）は、50μL を経鼻投与した。

組織のサンプリングと解析は、以前の報告と同様に行った（Hashimoto et al. 2016; Mikawa et al. 2018）。呼吸機能検査（スパイロメトリー）は、SCIREQ 社 Flexi Vent システムを用いて行った。呼吸機能検査を行った後に、中性ホルマリンを気管から注入し定圧（25cmH<sub>2</sub>O）で 10 分間維持して膨張させて肺組織の固定を行った。固定した肺組織はパラフィンに包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。

遺伝子発現の解析を行うために、肺組織から total RNA を調製し、タカラバイオ社 Prime Script により逆転写し、cDNA を調製した。cDNA の解析は、TOYOBO 社 KOD SYBR を使用して、Bio Rad 社 CFX Connect リアルタイム PCR 解析システムにより行った。

### 肺スフェロイド細胞(LSC)の樹立

野生型マウスから肺組織を摘出し、コラゲナーゼ処理によって細胞を分散させ、フィブロネクチンコートしたフラスコで培養した。約 1 週間培養を行った後に、細胞を回収し、低接着表面処理したフラスコ内で 3~7 日間培養し、スフェロイドの形成を行った。肺スフェロイドは、免疫染色によりクオリティチェックを行った。

### 統計処理

データ統計解析は分散分析を行い、有意（ $P < 0.05$ ）であったものに対し多重検定を行った。

（倫理面への配慮）

実験上必要とされる遺伝子サンプル、動物の取り扱いは「生物の多様性に関する条約のバ

イオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守した。動物実験に関しては実験動物の福祉を遵守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、当該研究施設の動物実験倫理委員会で承認を受けた後に動物実験ガイドラインに則って実施した。

## C. 研究結果

### 喫煙モデルの解析

報告者は以前に、エラストラーゼ誘導性肺気腫モデルにおいて老化細胞の除去が病態を軽減することを報告した (Mikawa et al. 2018)。エラストラーゼ誘導性肺気腫モデルは、簡便で再現性の高いモデルであるが、ヒトで多く見られる病態とは乖離する部分も多い。本研究では、ヒト病態により近いモデルとして喫煙 (CS) 刺激による肺障害モデルの樹立を行い、老化細胞除去の効果について解析を行った。

4ヶ月齢の ARF-DTR マウス (Hashimoto et al. 2016) を4週間タバコ煙に暴露した (図 1 a)。ARF-DTR マウスは老化細胞特異的にルシフェラーゼとジフテリア毒素 (DT) 受容体を発現するトランスジェニックマウスである。このマウスでは、生体イメージングにより老化細胞の動態を観察可能であり、また DT を投与することにより老化細胞を組織内から排除可能である。CS 刺激後に生体イメージングを行ったところ、ルシフェラーゼシグナルに増加傾向が認められた (図 1 b)。肺組織における細胞老化マーカー遺伝子 (*Arf* および *Ink4a*) の発現は、CS 刺激により増加していたことから、CS 刺激が肺組織の細胞老化を亢進させることが強く示唆された (図 1 c, d)。一方、DT を投与した ARF-DTR マウスでは、ルシフェラーゼおよび細胞老化マーカー遺伝子の発現は抑制されており、CS による細胞老化誘導も見られなかった (図 1 b-d)。野生型マウスでは DT の効果は見られなかったことから、細胞老化マーカーの変動はトランスジェニックマウスの特性に依存した現象である。また以前の解析では、p19<sup>Arf</sup> の発現は間葉系の細胞にのみ認められたが (Hashimoto et al. 2016; Mikawa et al. 2018)。CS 刺激を行ったマウスでは、細胞老化マーカー遺伝子の発現は、上皮細胞で多く見られるようになった (図 1 e-g)。

次に CS 刺激したマウス肺組織を定圧固定し、組織形態計測を行った (図 2 a)。CS 刺激を行った肺組織は、肺胞壁の崩壊により平均肺胞壁間距離に顕著な増加が認められた (図 2 b)。また、CS は肺組織内での炎症を惹起することが知られているが、CS 刺激を行ったマウス肺組織切片ではマクロファージ数およびマクロファージエラストラーゼ (*Matrix metalloproteinase-12; Mmp-12*) の発現量が増加しており、本実験系においても肺組織内の炎症が生じていることが確認された (図 2 c, d)。一方、DT を投与した ARF-DTR マウスでは、CS 刺激による肺胞壁崩壊、マクロファージ数の増加は抑制され、また *Mmp-12* 遺伝子の発現も低く保たれていた。

次にこれらマウスの呼吸機能についてスパイロメトリーによる評価を行った。CS 刺激を

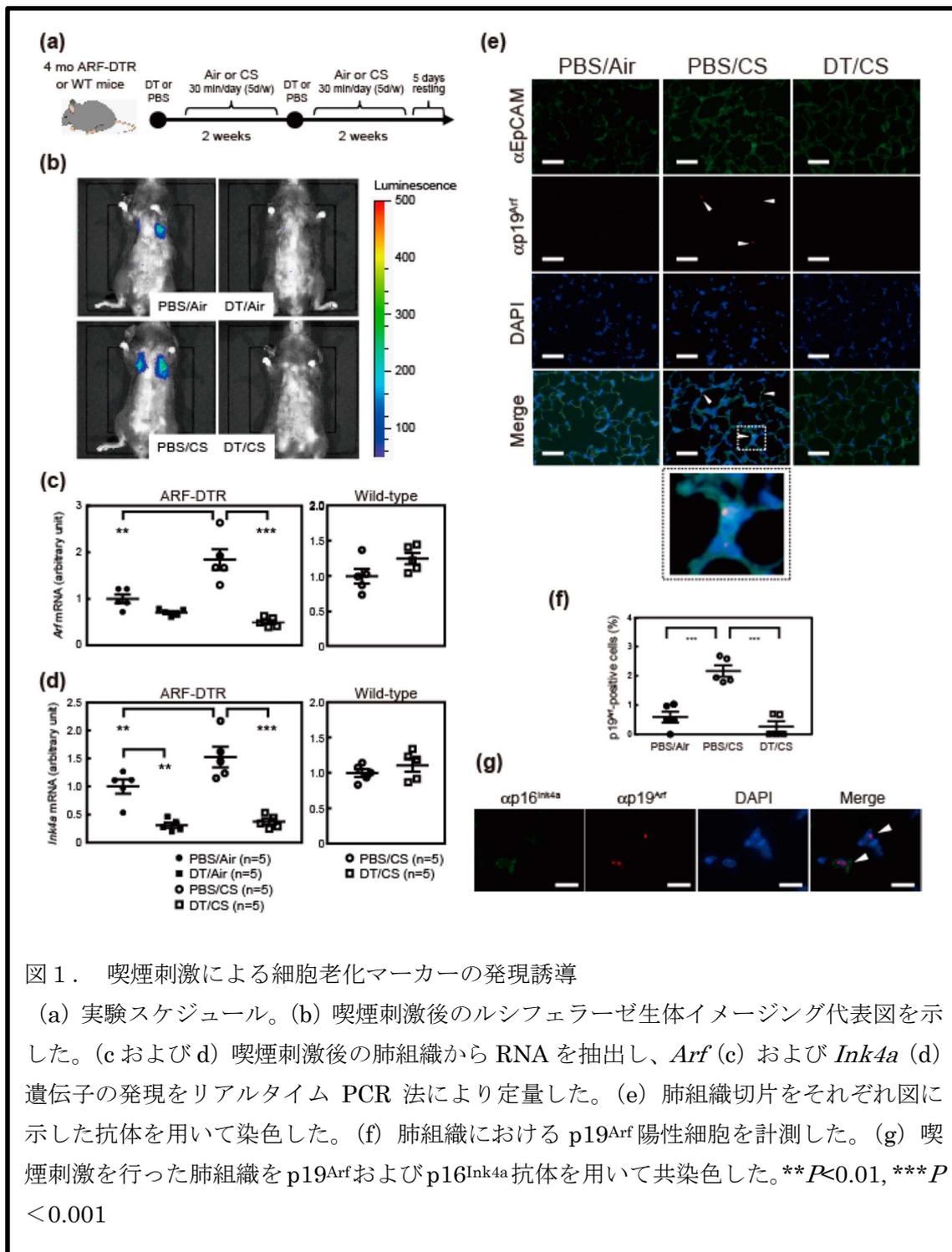


図1. 喫煙刺激による細胞老化マーカーの発現誘導

(a) 実験スケジュール。(b) 喫煙刺激後のルシフェラーゼ生体イメージング代表図を示した。(c) および (d) 喫煙刺激後の肺組織から RNA を抽出し、*Arf* (c) および *Ink4a* (d) 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量した。(e) 肺組織切片をそれぞれ図に示した抗体を用いて染色した。(f) 肺組織における p19<sup>Arf</sup> 陽性細胞を計測した。(g) 喫煙刺激を行った肺組織を p19<sup>Arf</sup> および p16<sup>Ink4a</sup> 抗体を用いて共染色した。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

行ったマウス肺組織では、肺胞壁の崩壊や弾性線維の減少により、組織弾性が低下することが多くの先行研究によって明らかになっている。本実験においても、CS 刺激を行った ARF-DTR マウスでは、IC の増加とともに組織弾性 (Cst, Crs) および末梢肺胞組織の粘弾性 (G) の上昇が認められた。しかしながら DT を投与したマウスではこのような CS の効果は殆ど

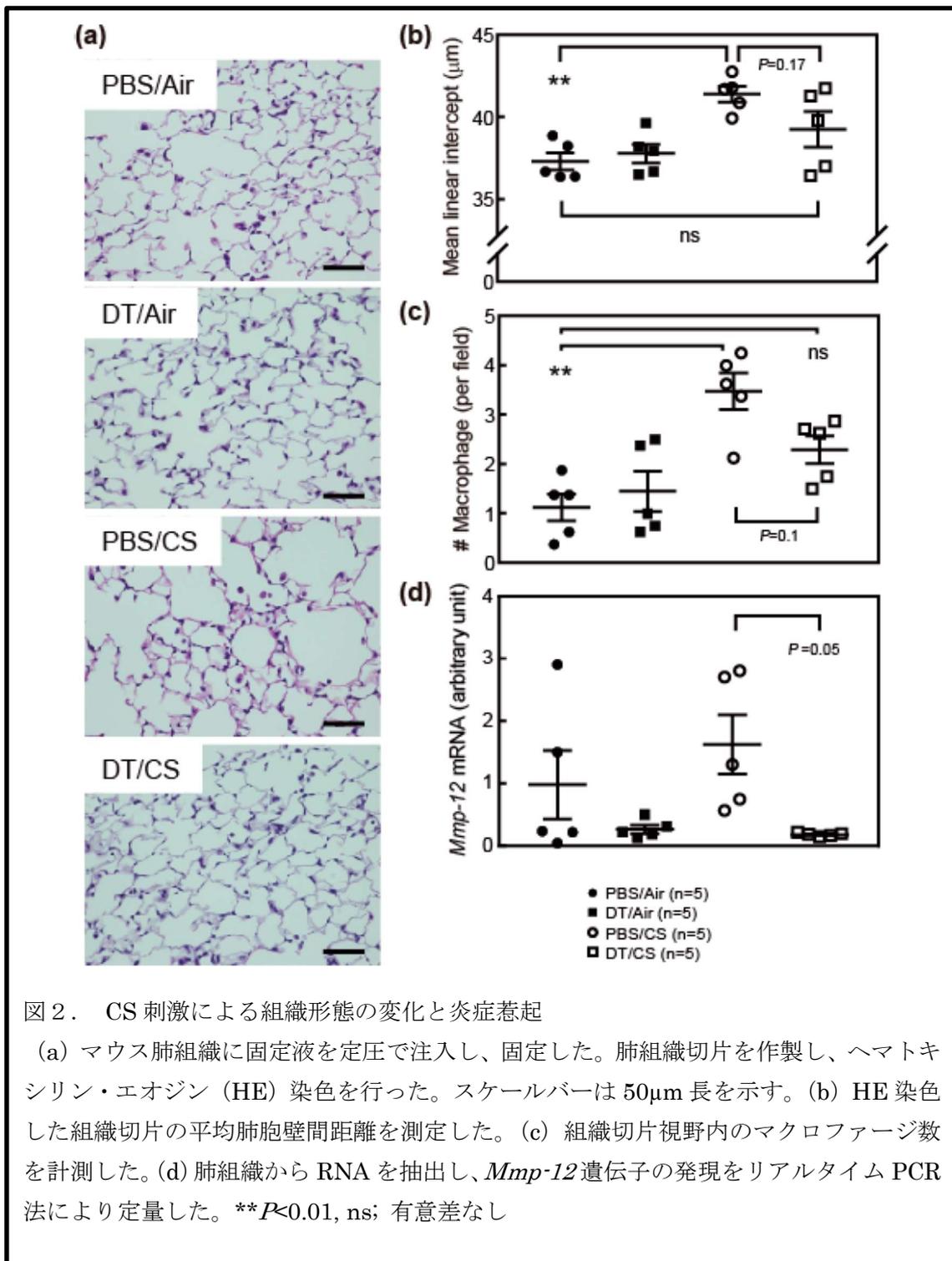


図2. CS刺激による組織形態の変化と炎症惹起

(a) マウス肺組織に固定液を定圧で注入し、固定した。肺組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。スケールバーは 50 μm 長を示す。(b) HE 染色した組織切片の平均肺胞壁間距離を測定した。(c) 組織切片視野内のマクロファージ数を計測した。(d) 肺組織から RNA を抽出し、*Mmp-12* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量した。\*\* $P < 0.01$ , ns; 有意差なし

見られなかった。

以上の結果から、継続的な CS 刺激は慢性的に肺組織内の炎症を引き起こし、同時に呼吸機能の低下を招くが、老化細胞の除去は CS による肺障害を抑制することが強く示唆された。

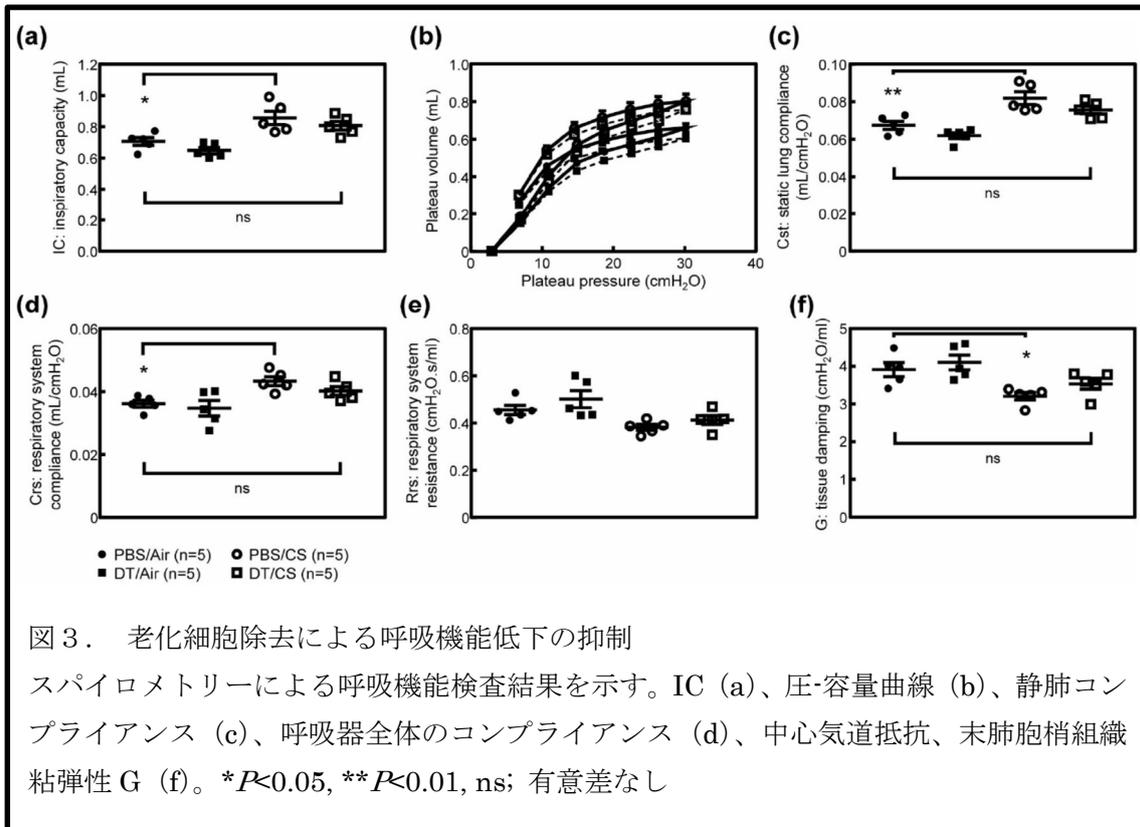


図3. 老化細胞除去による呼吸機能低下の抑制

スパイロメトリーによる呼吸機能検査結果を示す。IC (a)、圧-容量曲線 (b)、静肺コンプライアンス (c)、呼吸器全体のコンプライアンス (d)、中心気道抵抗、末肺胞梢組織粘弾性 G (f)。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , ns; 有意差なし

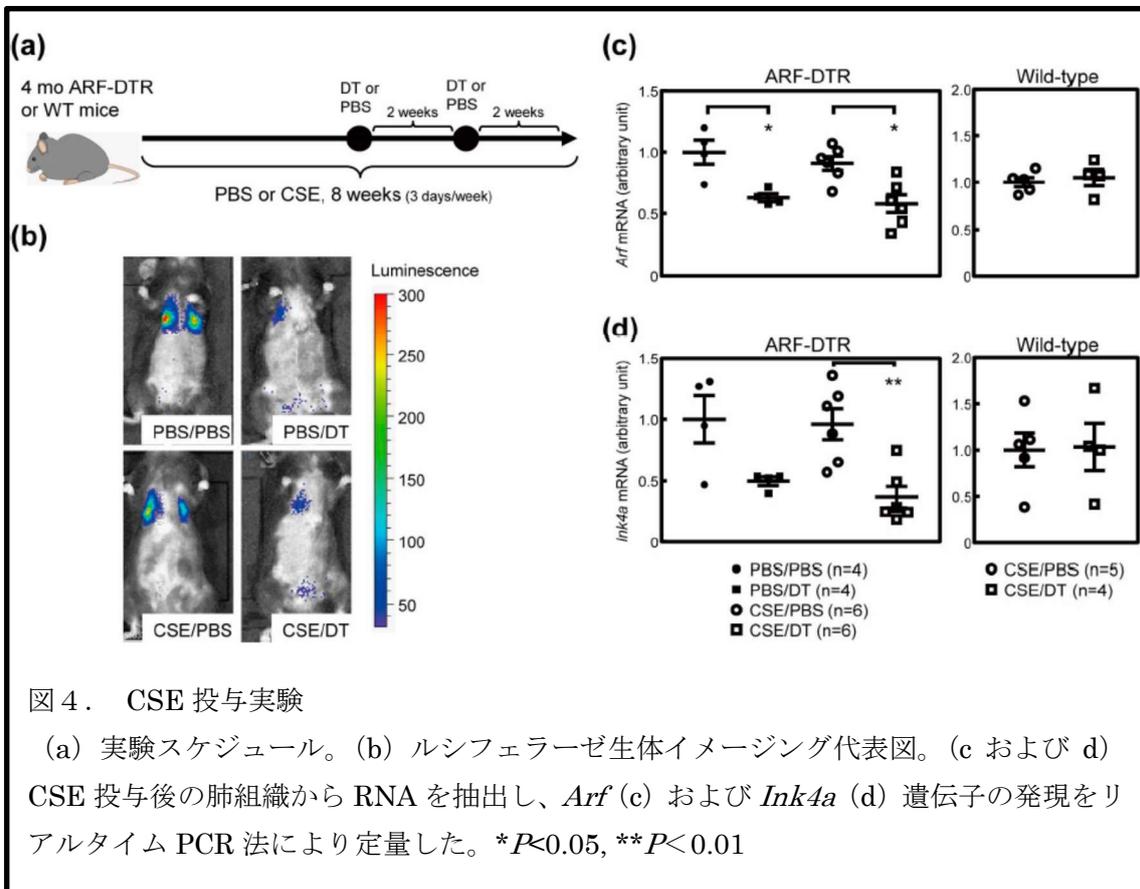


図4. CSE 投与実験

(a) 実験スケジュール。(b) ルシフェラーゼ生体イメージング代表図。(c) および (d) CSE 投与後の肺組織から RNA を抽出し、*Arf* (c) および *Ink4a* (d) 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量した。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

CS 刺激モデルは、エラスターゼモデルと比較してヒトで多く見られる中心細葉性肺気腫に近い病態を引き起こすと考えられている。しかしながら CS 刺激には専用の設備が必要であり、また多くの検体を同時に処理することは難しい。そこで本研究ではより簡便な系としてタバコ抽出液 (CSE) による肺障害モデルの樹立を試みた。

本実験系では、多く行われている先行研究を参考に、CSE を ARF-DTR マウスに 8 週間 (週 3 回) 経鼻投与を行った (図 4 a)。生体イメージングを行った結果、CSE 投与ではルシフェラーゼ活性の増加は見られなかった (図 4 b)。またリアルタイム PCR による細胞老化マーカーの発現解析においても、CSE による上昇は認められなかった。これらの結果から、CSE は CS 刺激とは異なり、肺組織内での細胞老化を亢進させる働きは持たないことが強く示唆された。DT を投与したマウスでは、CSE 投与の有無にかかわらず、細胞老化マーカーの発現は低く保たれていた。

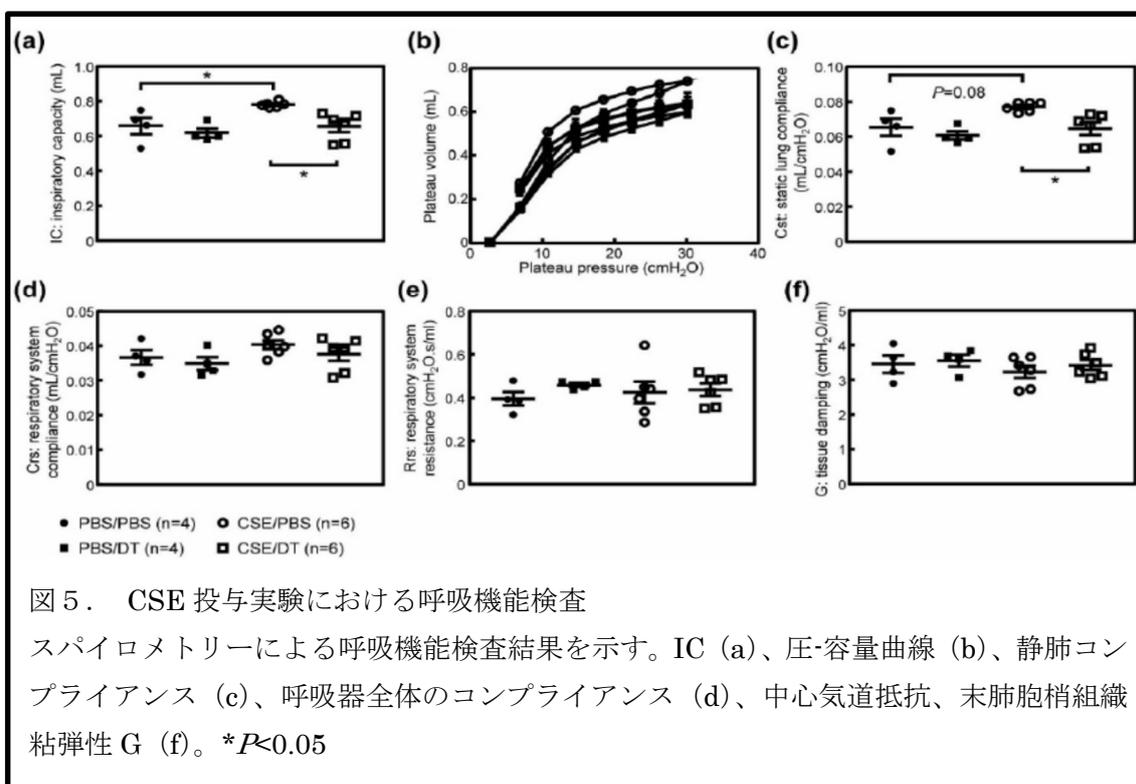


図 5. CSE 投与実験における呼吸機能検査

スパイロメトリーによる呼吸機能検査結果を示す。IC (a)、圧・容量曲線 (b)、静肺コンプライアンス (c)、呼吸器全体のコンプライアンス (d)、中心気道抵抗、末肺胞梢組織粘弾性 G (f)。\* $P < 0.05$

次にこれらマウスの呼吸機能検査を行った。細胞老化マーカーの発現には変化は認められなかったが、CSE を投与したマウスでは、呼吸機能が低下する傾向が認められた。しかしながら DT を投与したマウスでは、CSE による変化は抑制されていた (図 5)。

さらにこれらマウス肺胞洗浄液の細胞成分を調べたところ、マクロファージ数には差が見られなかったが、好中球の数は CSE により上昇する傾向が認められた (図 6)。DT を投与したマウスでは、好中球の数は低く抑えられ、CSE の効果も見られなかった。また、肺

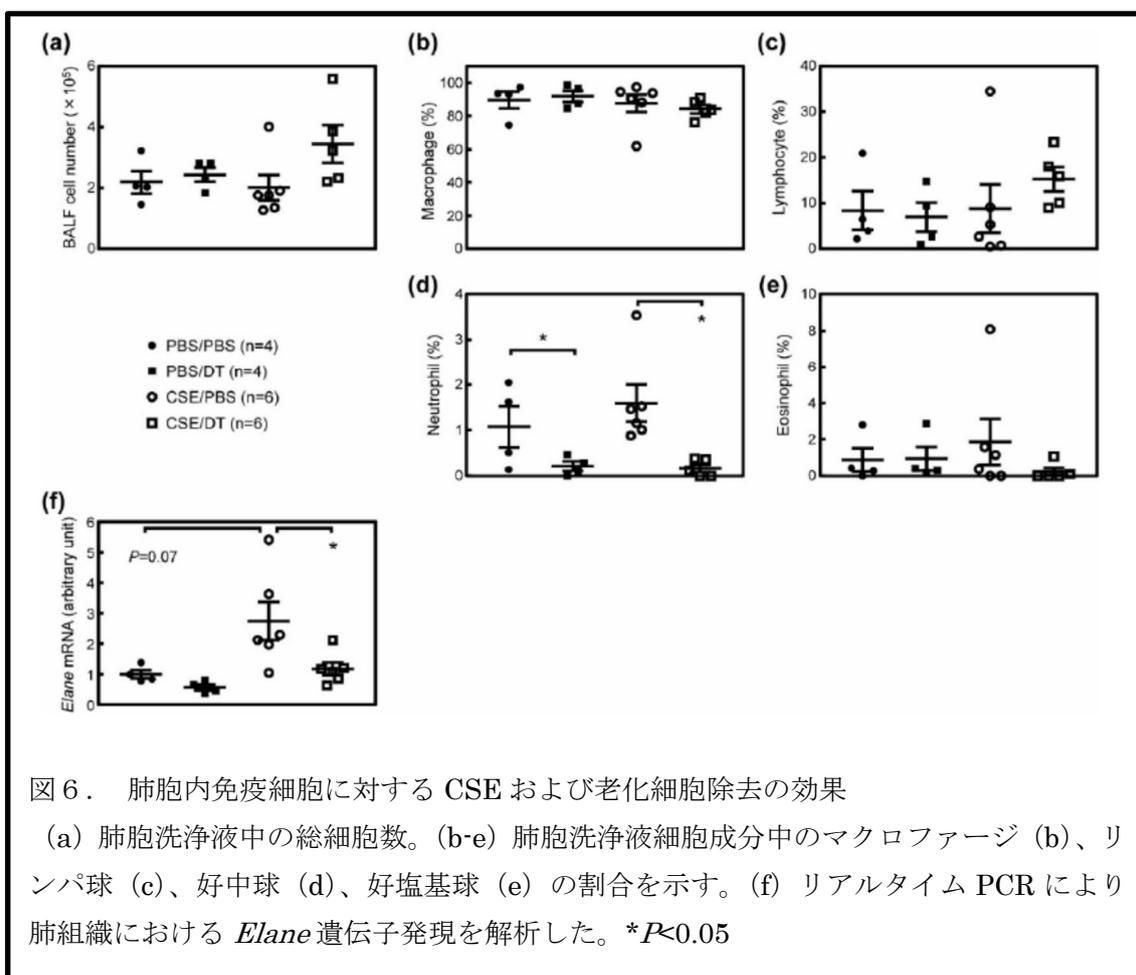


図6. 肺胞内免疫細胞に対する CSE および老化細胞除去の効果

(a) 肺胞洗浄液中の総細胞数。(b-e) 肺胞洗浄液細胞成分中のマクロファージ (b)、リンパ球 (c)、好中球 (d)、好塩基球 (e) の割合を示す。(f) リアルタイム PCR により肺組織における *Elane* 遺伝子発現を解析した。\* $P < 0.05$

組織における好中球エラスターゼ (*Elane*) 遺伝子の発現を調べたところ、CSE 処理による発現上昇と、DT による低下が認められた。

以上の結果から、CSE は肺組織の機能低下を誘導し、老化細胞の除去はその効果を抑制することが示唆された。しかしながら CS と比較して CSE の効果は限定的であった。

### LSC の解析

予備実験の結果から、エラスターゼ誘導性肺気腫モデルにおいて、老化細胞の除去により、肺柔組織の細胞の増殖が亢進する傾向を見出している (未発表)。このことは、老化細胞の除去が障害後の組織再生を促進することを示唆している。この可能性について検証するために、外来性の肺組織幹/前駆細胞を移植することによって niche 環境を整え、老化細胞除去との併用効果について検証し、肺気腫の新規治療モデルの確立を目指す。

これまでに多くの肺幹細胞に関する報告があるが、一貫性が乏しい。そのために本研究では敢えてマーカーによる選別を行わず、試験管内で肺スフェロイド形成可能な細胞 (LSC; lung spheroid cell) を選別する。この方法は米国のグループが既に確立を行い、動物モデルにおける近交系 LSC の移植実験により有効性が確認されており、さらに人に

においても経気管支生検により得ることが可能であることが報告されている。本年度はまず、LSCの培養系の確立と肺組織への移植と生着の確認を行った。

野生型雄性マウス肺組織の細胞を分散させ、一定期間フィブロネクチンコートしたフラスコで培養し、低接着表面処理したフラスコで培養することによりスフェロイドを形成させた（図7a）。肺スフェロイドでは気道マーカー（Ccsp）、肺胞マーカー（Sp-c）および幹細胞マーカー（p63、Krt-5）の発現が確認された（図7b）。

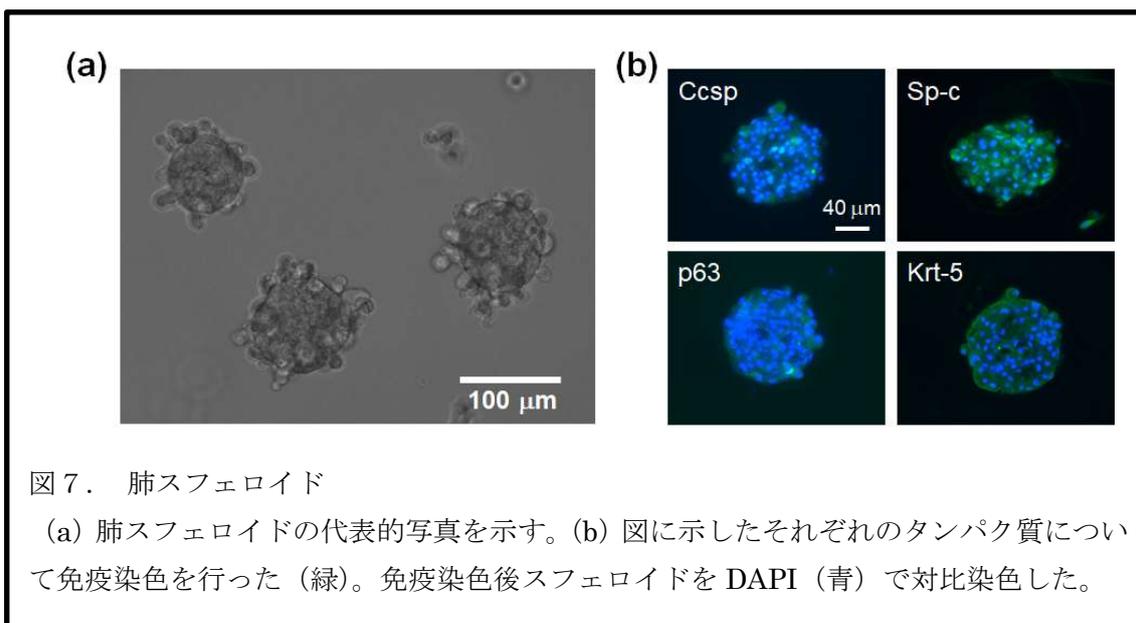


図7. 肺スフェロイド

(a) 肺スフェロイドの代表的写真を示す。(b) 図に示したそれぞれのタンパク質について免疫染色を行った（緑）。免疫染色後スフェロイドをDAPI（青）で対比染色した。

肺スフェロイドを回収し、再びフィブロネクチンコートしたフラスコに播種し、単層培養を行った。肺スフェロイド由来の単層培養細胞（肺スフェロイド細胞、LSC）をエラストラーゼ処理したメスマウスに尾静脈から移植した。移植してから4週間後に肺組織の切片を作製し、Y染色体FISHを行った。その結果、移植していない肺組織では、Y染色体シグナルは全く感知できなかったが、移植したマウス肺組織からは明らかなシグナルが確認され、移植4週間後も肺組織にLSCが生着していることが確認された（図8）。

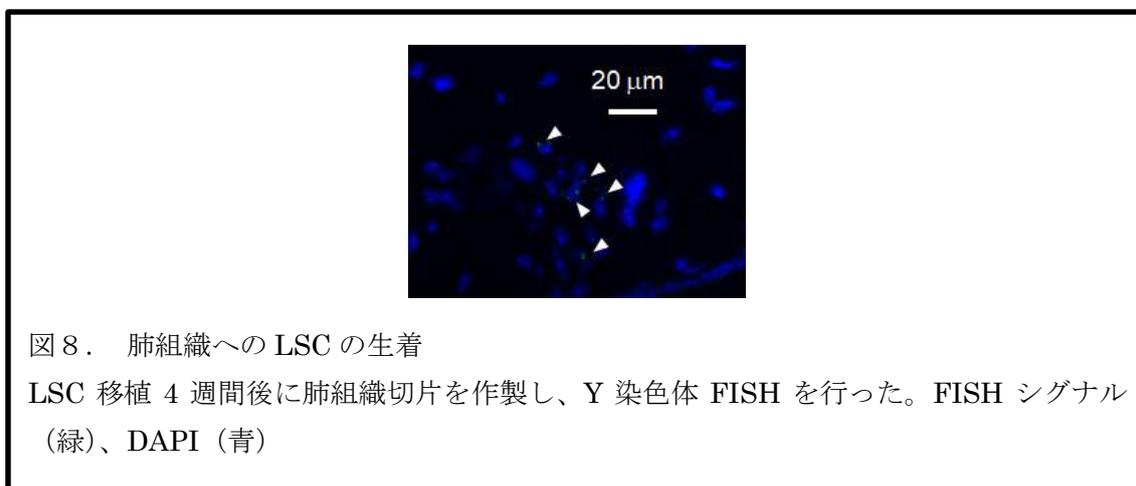


図8. 肺組織へのLSCの生着

LSC移植4週間後に肺組織切片を作製し、Y染色体FISHを行った。FISHシグナル（緑）、DAPI（青）

#### D. 考察と結論

報告者は以前にエラストアーゼ誘導性肺気腫モデルを用いて老化細胞の除去が病態を軽減させることを報告した (Mikawa et al. 2018)。エラストアーゼ誘導性肺気腫モデルは、簡便で再現性の高いモデルだが、ヒトでは希少な汎小葉性肺気腫に近い病態を示す。ヒト肺気腫の殆どは、喫煙などを原因として生じる中心細葉性肺気腫である。本研究では、よりヒトの病態に近いモデルとしてマウス喫煙モデルの解析を行った。

エラストアーゼ同様に喫煙刺激をマウスに行うと、肺胞壁の崩壊、炎症性細胞の増加、呼吸機能の低下が誘導され、老化細胞を除去することによりこれらの病態は緩和された。エラストアーゼ誘導性肺気腫モデルとの相違点として、肺組織における細胞老化の亢進が認められた。エラストアーゼ誘導性肺気腫モデルは一過的な炎症により気腫病態が誘導されるのに対し、喫煙モデルは継続的に刺激を行うため、慢性的な炎症が誘導される。ヒト肺気腫患者のサンプルでは細胞老化の亢進が見られることから、この点に関してもよりヒト病態に近いモデルであると考えられる。喫煙モデルにおいても、エラストアーゼ誘導性肺気腫モデル同様に老化細胞の除去は、病態を緩和させたことから、ヒト肺気腫においても老化細胞は有効な治療標的となることが期待される。

喫煙モデルはヒト病態に近いモデルであるが、特殊な機器を必要とし一度に処理できる動物個体の数も限られている。そこで本研究では、より簡便な系としてタバコ抽出物投与モデルの樹立と解析を行った。タバコ抽出物投与により、呼吸機能の低下が見られたが、その程度は喫煙モデルやエラストアーゼ誘導性肺気腫モデルと比較すると弱く、また炎症も軽微なものであった。タバコ抽出物には、タバコ煙に含まれる化合物のごく一部しか含まれないことが、部分的な効果しか見られなかった原因であると考えられる。現時点でこの系は、継続して定量実験に使用するには不向きであり、より効果の高い系を樹立する必要がある。

エラストアーゼ誘導性肺気腫モデルを用いた予備実験から、肺気腫誘導後に老化細胞を除去すると、病態の修復は見られないが組織細胞の増殖が亢進することを見出している。このことは、不完全ながらも組織が修復・再生に向かっていることを示唆する。本研究では、外来性組織幹/前駆細胞が組織修復・再生の促進可能であるかについて検証を行う。本年度はその準備段階として、肺組織スフェロイド細胞 (LSC) の培養系の樹立と移植による生着の確認を行った。LSC を移植したマウスでは 4 週間後にも肺組織への外来性細胞の生着が認められた。先行研究により、間葉系幹細胞や脂肪幹細胞の移植が肺線維症モデルで有効であることが確認されているが、長期間の生着は見られなかった。一方、LSC の移植は同じモデルマウスにおいて長期間の生着が見られている。報告者の樹立した実験系においても長期間の生着が確認されており、次年度以降この系を使用して解析を進める。

#### E. 健康危険情報

なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mikawa R., Sato T., Suzuki Y., Baskoro H., Kawaguchi K., and Sugimoto M. p19<sup>Arf</sup> exacerbates cigarette smoke-induced lung dysfunction. *Biomolecules* 10. E462. 2020.
- 2) Kawaguchi K., Kim SE., Sugiyama D., Sugimoto M., and Maruyama M. Age-associated alterations in murine dermis through inflammatory response with mitochondrial DNA deletions. *Geriatr Gerontol Int.* 19. 451-457. 2019.
- 3) 杉本昌隆 組織老化・疾患における細胞老化の役割 *Aging & Health* Vol. 28 No. 2, 38-41, 2019 年
- 4) 杉本昌隆、三河隆太 老化細胞除去マウスと senolytic 薬 *実験医学* Vol. 37 No.11, 1755-1760, 2019 年

### 2. 学会発表

- 1) 杉本昌隆 疾患モデルにおける senolysis の効果 第 40 回日本基礎老化学会シンポジウム、名古屋、2020 年 2 月 9 日
- 2) 川口耕一郎、古茂田かおり、三河隆太、杉本昌隆 肺組織の老化細胞は転移性肺がんを促進する 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡、2019 年 12 月 6 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし