

課題番号 1

高齢肺の炎症ストレスに対する脆弱性の検討

[1] 組織

代表者：松島 綱治
(東京理科大学生命医科学研究所)
対応者：岡田 克典
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：七野 成之
(東京理科大学生命医科学研究所)

研究費：物件費 50 万円

[2] 研究経過

新型コロナウイルス SARS-CoV2 の感染症 (COVID-19) では、高齢者における肺炎の重症化が深刻な問題になっており、死亡症例の 8 割以上が 70 歳以上の高齢者である。そして、重症化をもたらす原因はウイルス自体ではなくサイトカイン・ストームであるという報告が多数なされてきている。これは、高齢者の肺組織では炎症の収束機構が脆弱であることを示唆している。肺は常に外界の酸素に曝されており体内で最も酸素分圧の高い臓器であるため、酸化ストレスによる加齢変化が起こりやすく、ヒトでもマウスでも、高齢になるにしたがって気腔の拡大した「老人肺」の所見が認められる。しかし、ウイルス感染のような外界からのストレスに対する炎症応答において、若齢者と高齢者の肺がどのように異なっているのかはまだ十分に理解されていない。

肺は、上皮細胞、間質の線維芽細胞、免疫細胞、内皮細胞など、実に 30 種類以上もの細胞から構成されている。そのため、肺が臓器として呈する炎症応答を正確に理解するためには、肺を構成しているそれぞれの細胞集団の応答や、細胞集団自体の増減・消長を調べる必要がある。したがって、高齢と若齢で異なる炎症病態の制御因子を同定し、高齢者の肺の炎症に対する脆弱性をもたらす原因に迫るためには、個々の細胞集団とそれを構成する個々の細胞の応答を明らかにしなくてはならない。そのために極めて有効な手段が一細胞解析技術である。

近年、次世代シーケンサーを使用した大量シーケンス技術と一細胞解析技術がめざましく進歩し、一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析 (single cell

RNA-seq 解析) が可能となった。本研究では、高齢者における COVID-19 肺炎重症化の原因を解明する手がかりを得るために、申請者らが開発した、より正確な single cell RNA-seq 技術を用いて、老齡肺が若齡肺より炎症ストレスに対して脆弱である分子基盤を明らかにすることを目的とする。

研究活動状況の概要は以下の通りである。本研究期間においては、single cell RNA-seq 解析を実施するための準備をすすめた。加齢医学研究所のメンバーが 2 名、東京理科大学の松島研究室を訪問して、single cell RNA-seq 解析を実施するためのサンプル調製方法を見学し、必要な器具や試薬類などの情報提供を受けた。また、組織を構成する細胞を 1 細胞ずつの懸濁液にするための必要な酵素処理の条件検討の方法、細胞に対するダメージを最小限に抑えた形での処理方法とその判断の仕方などについても、指導が行われた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では、Single cell RNA-seq 解析での最も重要なプロセスである、組織を一細胞ずつ分離させて懸濁液にする部分の条件検討を実施した。コラゲナーゼを用いて組織の消化状態を検討し、フローサイトメトリを用いて single cell の状態と死細胞の割合を検討した。コラゲナーゼは、免疫担当細胞を活性化してしまう作用があるため、実際のサンプル調製では、リベラーゼを使用する。そこで、次に、リベラーゼの消化条件の最適化を行った。リベラーゼ TL とリベラーゼ TM について、濃度を 2-3 通りに条件を変えて、また消化時間を 2-3 通りに変えて、得られる細胞懸濁液のクオリティを、フローサイトメトリにより検討した。

パーコール比重遠心を行うことで死細胞はほぼ除去することができたと解釈できる結果になった。しかし、細胞のサイズが期待されるよりもかなり小さいことが判明した。細胞が破碎されてしまっているのか、あるいは、実際に細胞のサイズが小さいのかの区別をするために、現在、培養細胞株や、浮遊細胞系である骨髓細胞をコントロールとして、サイズの比較をすすめている。

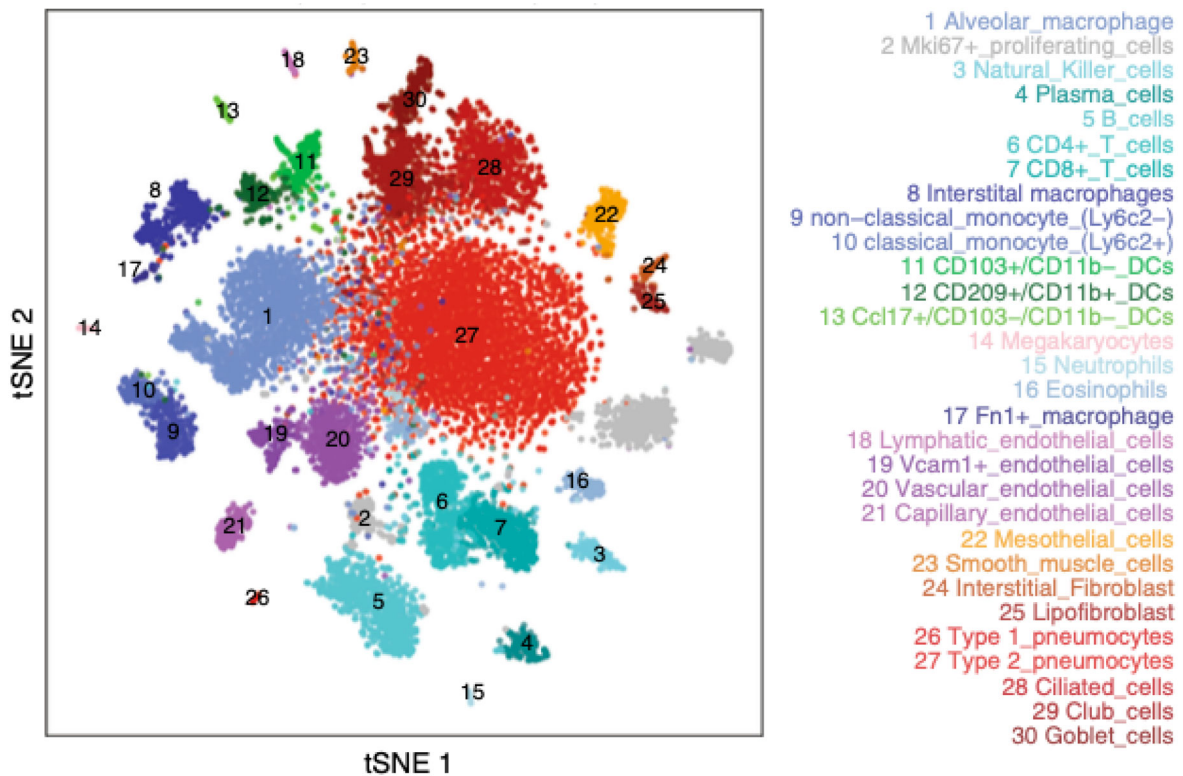
今後 Single cell 懸濁液を作成するための条件の最適化が完了でき次第、single cell RNA-seq 解析を実施する。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、高齢マウスの肺組織の細胞集団とその炎症応答が、若齢マウスのもとのように異なっているのかが明らかになる。特定の細胞集団の応答の違いが主たる要因であると判断される場合には、高齢、若齢の肺からその細胞集団をあらためて分取して、さらに詳細な解析を行う。高齢、若齢の肺において、異なる細胞集団の出現が認められる場合には、それぞれの細胞集団の特性を調べるための実験を組み立てる。これらの追加の研究により、COVID-19にとどまらず、肺炎の重症化を予防するための標的因子や標的細胞集団が得られると期待される。また、肺における細胞集団とその遺伝子発現の変化は、喀痰細胞診やその中の分泌物、呼気中の代謝物として検出できる可能性があり、重症化のリスクファクターや予後予測のためのバイオマーカーにも応用できると期待される。

[4] 成果資料

該当なし



想定されるマウス肺のsingle cell RNA-seqの結果

Angelidis et al., Nat Commun 2019より改変