

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16051

研究課題名(和文)肺発生時の上皮細胞運命制御とプログラムされた細胞老化におけるPtenの役割

研究課題名(英文)The Role of Epithelial Pten in Epithelial Cell Fate and Programmed Cellular Senescence during Lung Development

研究代表者

三浦 綾子(Miura, ayako)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70710903

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):哺乳類の正常な胚発生のためには、適切な細胞運命決定とプログラムされた細胞老化が重要である。肺発生時の上皮幹細胞・前駆細胞の分化におけるPtenの機能解析はこれまで詳細に検討されていない。この研究では、これまでの研究結果と予備実験の結果に基づいて、肺上皮特異的Pten欠損マウスを用い、肺上皮Ptenの機能を網羅的に解析した。上皮Ptenは、細胞運命決定の制御と紡錘体形成調節による「プログラムされた細胞老化」を制御していることを明らかにした。肺発生における細胞運命制御と形態形成分子機構を解析することは、発生学一般における臓器形成のプログラムを解明することに寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常肺発生における上皮Ptenの役割を、「上皮細胞運命制御」と「プログラムされた細胞老化」という本質的な視点から網羅的に解析し、普遍的な臓器形成の分子機構解明に資することを目的とした。本研究では、肺上皮特異的Pten欠損マウスを用い、上皮Ptenが与える肺構成細胞の細胞運命制御と、肺形態形成に重要な「プログラムされた細胞老化」への影響を解析した。本研究の推進は、肺上皮細胞での分化方向決定と細胞老化のメカニズムを解析するだけでなく、COPDやIPFをはじめとする多様な呼吸器リモデリング疾患の病態解明と治療薬開発に繋がる臨床応用への研究展開も期待できる。

研究成果の概要(英文):Proper cell fate determination and programmed cellular senescence are important for normal mammalian embryonic development.Functional analysis of Pten in the differentiation of epithelial stem cells and progenitor cells during lung development has not been investigated in detail.Based on the results of previous studies and the results of preliminary experiments, this study comprehensively analyzed the function of lung epithelial Pten using lung epithelial-specific Pten-deficient mice.We found that epithelial Pten expression has a decisive role in lung development by two mechanisms: regulation of cell fate determination and regulation of "programmed cellular senescence" by regulating mitotic spindle formation.Analyzing cell fate control and morphogenetic molecular mechanisms during development contributes to the elucidation of organ formation programs in embryology in general.

研究分野：呼吸器基礎研究

キーワード：肺発生 Pten 老化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の正常な胚発生のためには、適切な細胞運命決定とプログラムされた細胞老化が重要である。肺発生時の上皮幹細胞・前駆細胞の分化における Pten の機能解析の報告はない。一方、「プログラムされた細胞老化」とは、細胞傷害やストレスに非依存性に、制御下に特定領域の細胞老化が生じ、免疫細胞浸潤によって老化細胞が取り除かれ、正常胚発生過程において組織リモデリングが生じるものである。申請者は、上皮での Pten 発現が、1.細胞運命決定の制御、2.紡錘体形成を調節することによる「プログラムされた細胞老化」の制御の2つの機序により、肺発生に決定的な役割を有すると考えた。これまでの研究実績と予備実験の結果を元に、本研究は、肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウス (*ShhGFPCrePten^{-/-}*マウス)とコントロールマウス (*ShhGFPCrePten^{wt/wt}*マウス)を用い、肺上皮 Pten の機能を網羅的に解析する。

2. 研究の目的

本研究は、正常肺発生における上皮 Pten の役割を、「上皮細胞運命制御」と「プログラムされた細胞老化」という本質的な視点から網羅的に解析し、普遍的な臓器形成の分子機構解明に資することを目的とする。申請者らは、肺胞上皮細胞(AEC)での Pten 発現が、肺腺癌と肺線維症の発症抑制に必須であることを報告した。最近、申請者は AEC 特異的 Pten 欠損マウスを用い、AEC での Pten 発現が Notch シグナルを介し上皮細胞の分化方向制御に必須であることを明らかにした。本研究では、肺胞上皮 Pten が与える肺構成細胞の細胞運命制御と、肺形態形成に重要な「プログラムされた細胞老化」への影響を解析する。本研究の推進は、肺組織修復機構の理解と肺リモデリング疾患の病態解明への貢献も期待される。

3. 研究の方法

(1)肺発生における上皮細胞の分化方向制御機構の解析

AEC特異的Pten欠損マウスとコントロールマウスの胎生肺組織を用いた上皮分化に關与する遺伝子の発現を定量PCRと*in situ*ハイブリダイゼーションにより解析した。さらに、肺上皮分化を誘導する因子の発現を定量PCRにより解析した。また、AEC1、AEC2、神経内分泌細胞、Club細胞、線毛上皮細胞、杯細胞の発現時期を、E14.5、E16.5、E18.5の各発生段階におけるマウスの肺組織を用いて免疫染色を行った。そして、出生後の生存曲線を調べた。

(2)間葉系細胞の増殖メカニズム関連分子動態

線維芽細胞成長因子9 (Fgf9) が間葉系細胞の増殖に重要であることがマウスの不活化研究により実証されている。マウス胎児における増殖シグナル伝達関連分子の発現動態をRNAレベルにて定量、及び肺組織の免疫染色を行った。増殖能について、Ki67陽性細胞数を比較検討した。さらに、アポトーシスシグナルについてTUNEL染色にて評価を行った。

(3)間葉系細胞の分化メカニズム関連分子動態

マウス胎児における間葉系細胞マーカーの発現動態を定量RT-PCRおよび免疫染色にて解析した。さらに、間葉系細胞の分化誘導因子の発現動態を定量RT-PCRにて解析した。

(4)肺発生細胞分裂時の紡錘体形成機構の解析

紡錘体と紡錘極形成への影響について、マウスからの単離肺上皮とPTEN siRNA導入BEAS2B細胞を用いて α -tubulinと β -tubulinの二重免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて解析した。さらに、RNAシーケンスにより確認された遺伝子群と細胞分裂中期における紡錘体チェックポイント遺伝子の発現動態をmRNA発現およびタンパク質発現にて定量した。そして、細胞老化マーカーであるsenescence associated β -galactosidase (SA- β -gal)染色、p21、p16、p15発現を免疫染色にて確認した。

4. 研究成果

*ShhGFPCrePten^{-/-}*マウスと *ShhGFPCrePten^{wt/wt}* マウス肺(E18.5)を用いた電子顕微鏡解析により、*ShhGFPCrePten^{-/-}*マウスは、AEC2がみられず、未分化の肺胞前駆細胞、Club細胞、杯細胞の過形成がみられた(図1)。さらに、FACSにて肺上皮細胞のみ単離し、RNAシーケンス、定量PCR解析を行ったところ、*ShhGFPCrePten^{-/-}*マウスの神経内分泌細胞、Club細胞の発現上昇を確認した。実際、免疫染色においても神経内分泌細胞、Club細胞の発現上昇を確認している。よって、肺上皮特異的 Pten 欠損マウスの肺は、各種上皮細胞形成のバランスが悪く、肺胞および

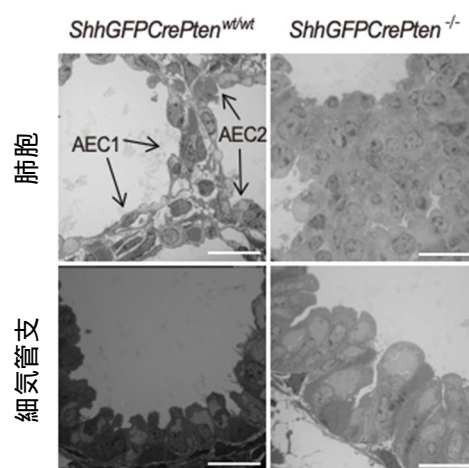


図1

び気管支上皮細胞の形成障害が起きていることが示唆された。さらに、*ShhGFPCrePten^{-/-}*マウスの単離肺上皮細胞とヒト肺上皮細胞株 BEAS2B 細胞への *Pten* siRNA を用いたノックダウンにおいても、紡錘体形成不全と細胞老化を確認した。

以上より、上皮での *Pten* 発現が、1. 細胞運命決定の制御、2. 紡錘体形成を調節することによる「プログラムされた細胞老化」の制御、の2つの機序により、肺発生に決定的な役割を有すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shimizu K, Yonekawa T, Yoshida M, Miyazato M, Miura A, Sakoda H, Yamaguchi H, Nakazato M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Conformational Change in the Ligand-Binding Pocket via a KISS1R Mutation (P147L) Leads to Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 1259-1271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2017-00277.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishii N, Tsubouchi H, Miura A, Yanagi S, Ueno H, Shiomi K, Nakazato M.	4. 巻 819
2. 論文標題 Ghrelin alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy by reducing oxidative stress and enhancing mitochondrial anti-oxidant functions in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 35-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2017.11.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang W, Sakoda H, Miura A, Shimizu K, Mori K, Miyazato M, Takayama K, Hayashi Y, Nakazato M.	4. 巻 493
2. 論文標題 Neurodynin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 677-683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.08.132.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsubouchi H, Onomura H, Saito Y, Yanagi S, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M.	4. 巻 64
2. 論文標題 Ghrelin does not influence cancer progression in a lung adenocarcinoma cell line.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocr J.	6. 最初と最後の頁 S41-S46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.64.S41.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi S, Tsubouchi H, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M.	4. 巻 3
2. 論文標題 The Impacts of Cellular Senescence in Elderly Pneumonia and in Age-Related Lung Diseases That Increase the Risk of Respiratory Infections.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18030503.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ayako Matsuo, Ryota Tanida, Shigehisa Yanagi, Hironobu Tsubouchi, Ayako Miura, Takafumi Shigekusa, Nobuhiro Matsumoto, Masamitsu Nakazato	4. 巻 892
2. 論文標題 Significance of nuclear L0XL2 inhibition in fibroblasts and myofibroblasts in the fibrotic process of acute respiratory distress syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ayako Miura, Shigehisa Yanagi, Hironobu Tsubouchi, Ayako Matsuo, Nobuhiro Matsumoto, Masamitsu Nakazato
2. 発表標題 The role of epithelial Pten in programmed cellular senescence during lung development
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦綾子、坪内拓伸、柳重久、中里雅光
2. 発表標題 グレリンの癌進行への影響と抗悪液質作用の検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、中里雅光
2. 発表標題 肥満状態に合併した喘息にグレリンが果たす役割
3. 学会等名 平成30年 日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、中里雅光
2. 発表標題 肺発生時の上皮細胞分化と肺形態形成におけるPTENの役割
3. 学会等名 第57回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、中里雅光
2. 発表標題 肥満状態に合併した喘息にグレリンが果たす役割
3. 学会等名 平成30年 日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、中里雅光
2. 発表標題 グレリンの癌進行への影響と抗悪液質作用の検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------