

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19551

研究課題名（和文）肺発生時の二種類の上皮前駆細胞を制御する細胞ダイナミクスと細胞老化機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of the regulation system of cellular dynamics and senescence during lung development

研究代表者

中里 雅光（Nakazato, Masamitsu）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：発生期における上皮前駆細胞内分子の意義を解明することで、普遍的な臓器形成プログラムや発生異常に關与する疾患を理解することが本研究の目的である。肺上皮細胞特異的Pten欠損マウスは生後21日までに、肺上皮細胞特異的RhoA欠損マウスは生後14日までに全頭死亡した。肺上皮細胞特異的Pten欠損マウスの肺胞形成不全はI型肺胞上皮の扁平化不全によることが明らかになった。E18.5肺上皮特異的PtenKOマウス肺胞上皮細胞ではdNTP metabolic process関連遺伝子群の発現亢進がみられた。以上より、肺胞形成過程では肺上皮でのdNTP代謝を介する細胞骨格の制御が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、多様な呼吸器リモデリング疾患やがんの病態解明と治療薬開発に繋がる極めて意義深い研究課題である。特に、老化に伴う細胞生物学的特徴の一つである細胞老化が、臓器形成と細胞分化を制御するというアイデアは斬新な発想であり、現在の学術体系の方向性を大きく転換する潜在力がある。本研究で標的とした細胞特性と制御分子の重要性と普遍性を検証する。形態形成不全と細胞分化不全の解析は、先天性心疾患などの臓器形成異常や肝硬変などの後天的な臓器リモデリング疾患の病態解明と治療法創出への発展が期待され、現代医療に計り知れない福音をもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigate the role of Pten, RhoA, and Ror2 in lung epithelium during the lung development. Lung-epithelial cell specific-Pten knockout mice and RhoA knockout mice died within postneonatal day 21 and day 14, respectively. Dysregulated alveolization of lung-epithelial cell specific-Pten knockout mice was attributed to flattening failure of alveolar type I cells. Population RNA-sequencing of isolated embryonic 18.5 lung epithelial cells demonstrated that increased expressions of dNTP metabolic process-related genes in Pten knockout mice. These data suggest that epithelial Pten plays a vital role in the mechanisms of alveolization by regulating dNTP-metabolism mediated cellular senescence.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：細胞老化 細胞運命決定 肺発生 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生過程で構築される臓器特有の構造と多様な分化細胞は、生物が生存していくために不可欠であり、特に発生後期から生後初期における臓器の成熟過程は、各臓器が特化した生理機能を獲得するために重要である。正常な発生には、各細胞の適切な数量での分化、適切な分化細胞の配置、適切な臓器形態形成が必要である。肺は、呼吸のために特有の分化をした 40 種以上の異なる細胞から構成され、高効率にガス交換を行うための複雑な三次元的構造を持つ精緻を極めた臓器である。中枢気道と末梢肺に存在する肺上皮前駆細胞(細気管支前駆細胞と肺胞前駆細胞)は、それぞれ多様な分化上皮細胞を、領域によって変化する適正な配分で供給し、間充織組織との同調により気管支や肺胞形態形成を指揮する。しかし、鍵となる分子や細胞特性を含め、肺上皮前駆細胞の制御機構と臓器形態形成機構は未解明である。申請者は、肺発生過程での幹細胞運命決定と臓器形態形成機構の核心には、上皮幹細胞内の細胞極性・細胞移動機構と細胞老化制御機構の恒常性があり、それらの制御機構の破綻は、上皮幹細胞が間充織組織と適切に同調するための空間配置の乱れや、上皮幹細胞と間充織組織間の secretome-receptome 同調の異常、持続的な老化細胞の残留による臓器リモデリング不全が生じ、肺発生障害に陥ると考えた。

2. 研究の目的

発生期における中枢気道と末梢肺組織の上皮前駆細胞内分子の意義を、「細胞ダイナミクスと細胞老化が統制する、幹細胞の運命決定と臓器の形態形成」という独創的な観点から解明することで、普遍的な臓器形成プログラムや発生異常に関与する疾患の理解のみならず、生後におこる外界からの損傷からの組織修復・再生機構の理解を飛躍的に前進させ、特発性肺線維症や慢性閉塞性肺疾患等の呼吸器リモデリング疾患やがんの病態解明と、これらの難治性疾患に対する治療戦略を創出することが本研究の目的である。本研究では、発生における細胞老化と細胞極性・細胞移動調節機構という本質的かつ独創的な観点から、Pten/RhoA-ROCK/Wnt5a-Ror2 経路の肺胞前駆細胞での役割を、肺胞前駆細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いて解明する。

3. 研究の方法

(1)肺胞前駆細胞でのPten/RhoA/Ror2発現が分化能と肺胞形成能に与える影響の解析

Shh^{CreGFP} マウスに *RhoA^{fllox}* マウスまたは *Ror2^{fllox}* マウスまたは *Pten^{fllox}* マウスを交配する。肺胞前駆細胞特異的に RhoA/Ror2/Pten を欠損かつ GFP で lineage-tracing されたマウスを作製する。各遺伝子欠損が与える肺胞形成への影響を解析する。肺胞前駆細胞数への影響を、podoplanin(I 型肺胞上皮細胞<AT1>マーカー)と Sftpc(II 型肺胞上皮細胞<AT2>マーカー)二重陽性細胞数、電子顕微鏡で肺胞前駆細胞(空胞を有する立方状細胞)を測定する。AT1 と AT2 への分化について、AT1 マーカー(podoplanin)と AT2 マーカー(Sftpc)の免疫染色、単離上皮細胞(CD31^{neg}CD45^{neg}EPCAM^{pos})を用いた各マーカーの定量 PCR、電子顕微鏡での AT1 と AT2 の形態評価を行う。

(2)肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損によるセクレトーム:レセプトームの変化

E18.5 の *Shh^{CreGFP}:Pten^{fllox}* マウスより肺胞前駆細胞(CD31^{neg}CD45^{neg}EPCAM^{pos})を単離する。Pten 欠損による遺伝子発現動態を RNA sequencing にて網羅的に解析する。

(3) 肺発生時の細胞老化と紡錘体形成機構の解析

E18.5 の *Shh^{CreGFP}:Pten^{fllox}* マウス肺を用い老化細胞数を α -ガラクトシダーゼ活性染色で評価する。紡錘体形成能について、単離前駆細胞を用い α -tubulin と β -tubulin の二重免疫染色で解析する。紡錘体チェックポイント分子動態をウエスタンブロッティングで解析する。

4. 研究成果

(1) 肺胞前駆細胞特異的 Pten/Ror/RhoA 欠損が与える肺発生への影響

肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損マウスは生後 21 日までに、肺胞前駆細胞特異的 RhoA 欠損マウスは生後 14 日までに全頭死亡した。肺胞前駆細胞特異的 Ror2 欠損マウスは胎生致死や生後早期の死亡はみられなかった。肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損マウス肺組織で肺胞上皮細胞(TTF1 陽性細胞)での細胞増殖停止がみられ、肺胞壁での老化細胞 (α -ガラクトシダーゼ活性染色陽性

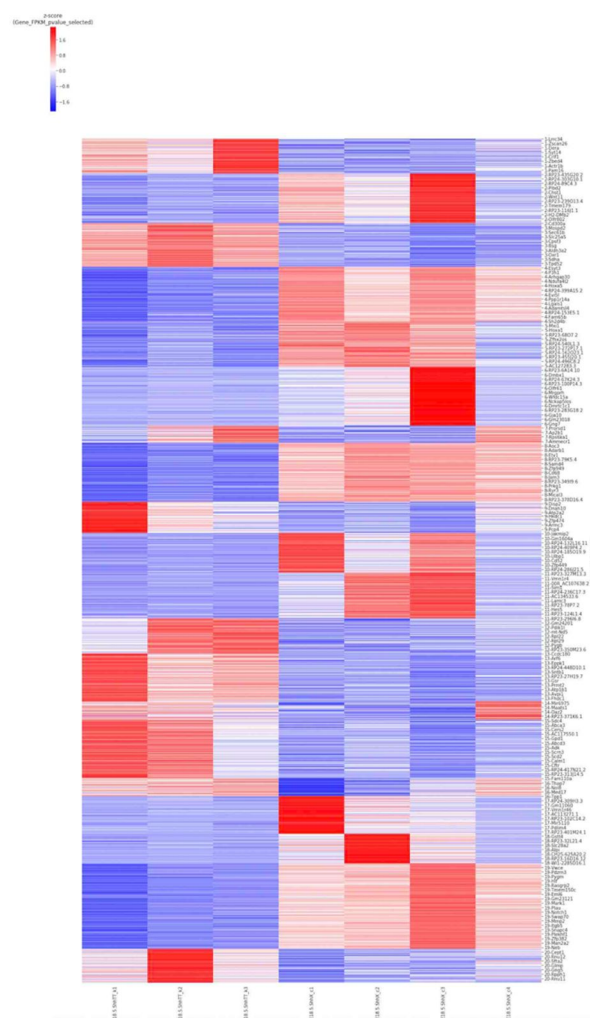
細胞)の増加が見られた。さらに、E18.5での肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損マウス肺は肺胞壁への lipoblast (ADRP 陽性細胞)と血管内皮細胞 (PECAM1 陽性細胞)が増加していた。以上の結果から、肺胞前駆細胞での Pten 発現は肺胞前駆細胞の細胞老化、SASP と間充織分化を制御し、肺胞形成に重要であることが示唆された。

(2) 肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損の肺胞形成不全機構

E18.5 の肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損マウス肺について、AT1 マーカー (podoplanin) と AT2 マーカー (Sftpc) の免疫染色、電子顕微鏡での解析を行った。その結果、用肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損マウスの sacculatation、 alveolization 障害は I 型肺胞上皮細胞の扁平化障害が原因であることが明らかになった。E18.5 マウス単離肺上皮を用いた alpha-tubulin と gamma-tubulin の二重免疫染色の結果、ShhCreGFP:Ptenflox マウス肺上皮でみられる細胞老化は、紡錘体形成不全が原因であること、染色体コングレッション制御分子 EG5 のリン酸化が亢進していることが明らかになった。

(3) 単離肺胞前駆細胞の網羅的解析による肺胞形成不全分子機構の解明

肺胞前駆細胞特異的 Pten 欠損によるセクレトーム:レセプトームの変化について解析した。胎生期 E18.5 の ShhCreGFP:PtenFl マウス (n=3) とコントロールマウス (n=4) より肺胞上皮細胞 (CD31negCD45negEpCAMpos) を Magnet sorting および FACS sorting の 2 ステップで単離し、population RNA シークエンス解析を行った。heatmap 解析、dendrogram 解析の結果、肺上皮特異的 PtenKO マウス由来の肺胞上皮細胞とコントロールマウス由来の肺胞上皮細胞の各々のサンプル間で遺伝子発現パターンが類似することを確認した(図)。Gene ontology 解析の結果、肺上皮特異的 PtenKO マウス由来の肺胞上皮細胞では、epithelial tube branching involved in lung morphogenesis (5.24×10^{-6})、surfactant homeostasis (8.11×10^{-6}) に関連する遺伝子群の発現亢進のみならず、dNTP metabolic process に関連する遺伝子群 (7.24×10^{-11}) の極めて高い発現亢進がみられた。以上より、肺胞形成過程では肺上皮での dNTP 代謝を介する細胞骨格と細胞老化の制御が重要であることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Zhang Weidong, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 34
2. 論文標題 Neuromedin U suppresses insulin secretion by triggering mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in pancreatic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 133 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901743R	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 Islam Md Nurul, Mita Yuichiro, Maruyama Keisuke, Tanida Ryota, Zhang Weidong, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 244
2. 論文標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 13 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0102	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 Nakahara Keiko, Maruyama Keisuke, Ensho Takuya, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Uemura Ryoko, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu, Murakami Noboru	4. 巻 521
2. 論文標題 Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 521 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.156	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 Okada Tadashi, Mita Yuichiro, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 7
2. 論文標題 Impaired adaptation of energy intake induces severe obesity in aged mice on a high-fat diet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13989 ~ e13989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13989	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 Katoh S, Matsumoto N, Tanaka H, Yasokawa N, Kittaka M, Kurose K, Abe M, Yoshioka D, Shirai R, Nakazato M, Kobashi Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Elevated levels of periostin and TGF- 1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic eosinophilic pneumonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12932/AP-111018-0414	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 Shigehisa, Sato Takahiro, Kangawa Kenji, Nakazato Masamitsu	4. 巻 27
2. 論文標題 The Homeostatic Force of Ghrelin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 786 ~ 804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2018.02.008	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 Tanokashira Daisuke, Kurata Eiko, Fukuokaya Wataru, Kawabe Kenshiro, Kashiwada Mana, Takeuchi Hideyuki, Nakazato Masamitsu, Taguchi Akiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory via phosphorylation of insulin receptor substrate 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1104 ~ 1118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12436	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 Okamoto S, Sato T, Tateyama M, Kageyama H, Maejima Y, Nakata M, Hirako S, Matsuo T, Kyaw S, Shiuchi T, Toda C, Sedbazar U, Saito K, Asgar NF, Zhang B, Yokota S, Kobayashi K, Foufelle F, Ferre P, Nakazato M, Masuzaki H, Shioda S, Yada T, Kahn BB, Minokoshi Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 706 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.102	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 Okada Tadashi, Waise T.M. Zaved, Toshinai Koji, Mita Yuichiro, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 681
2. 論文標題 Analysis of peripheral ghrelin signaling via the vagus nerve in ghrelin receptor?restored GHSR-null mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 50 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.05.035	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 Nakazato Yuki, Fujita Yuki, Nakazato Masamitsu, Yamashita Toshihide	4. 巻 10
2. 論文標題 Neurons promote encephalitogenic CD4+ lymphocyte infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64363-z	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 Weidong, Waise T. M. Zaved, Toshinai Koji, Tsuchimochi Wakaba, Naznin Farhana, Islam Md Nurul, Tanida Ryota, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional interaction between Ghrelin and GLP-1 regulates feeding through the vagal afferent system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75621-5	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 Weidong, Sakoda Hideyuki, Nakazato Yuki, Islam Md Nurul, Pattou Fran?ois, Kerr-Conte Julie, Nakazato Masamitsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Neuromedin U uses G i2 and G o to suppress glucose-stimulated Ca2+ signaling and insulin secretion in pancreatic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0250232	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 Sakai Katsuya, Shiomi Kazutaka, Mochizuki Hitoshi, Islam Md Nurul, Nabekura Hiroki, Tanida Ryota, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Human liver expressed antimicrobial peptide 2 elevation in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 e02111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/brb3.2111	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11件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 中里雅光
2. 発表標題 Gut Controls Brain
3. 学会等名 日本内科学会学術集会 第47回 内科学の展望 「臓器間ネットワーク」 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中里雅光
2. 発表標題 高度肥満症に対する薬物療法 .
3. 学会等名 第40回日本肥満学会 シンポジウム8 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakazato M
2. 発表標題 Gut-brain axis in energy balance.
3. 学会等名 The IDF (International Diabetes Federation) Congress 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakazato M
2. 発表標題 近代の神経内分泌の歴史
3. 学会等名 ICN (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakazato M.
2. 発表標題 Single cell analyses on vagal nodose ganglion neurons verify functional interaction of feeding-regulatory gut peptides.
3. 学会等名 Cell Symposia「Single Cells: Technology to Biology」(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakazato M.
2. 発表標題 Development of Diagnostic Biomarkers of Lung Neuroendocrine Tumors by the Detection of Cancer-Derived Protein Fragments in the Urine Using Original Mass Spectrometric Methods.
3. 学会等名 16h Annual ENETS Conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masamitu Nakazato
2. 発表標題 Peptide researches on energy metabolism
3. 学会等名 AMED-CREST恒常性領域 適応修復領域 合同シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中里雅光
2. 発表標題 自律神経・ペプチド連関を基軸とするエネルギー代謝と免疫制御機構の解明
3. 学会等名 AMED-CREST恒常性領域 適応修復領域 合同シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masami tu Nakazato
2. 発表標題 Feeding-regulatory Peptides in Type 2 DM and Obesity
3. 学会等名 AOCE-SICEM2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中里雅光
2. 発表標題 新規ホルモンによる内分泌代謝制御
3. 学会等名 日本内科学会 第69回九州支部 生涯教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中里雅光
2. 発表標題 新規ホルモンによる内分泌代謝制御
3. 学会等名 日本内科学会 第63回四国支部 生涯教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中里雅光 監修：矢崎 義雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2002 (795-798)
3. 書名 新臨床内科学 [デスク判] 第10版 第6章 2. アミロイドーシス	

1. 著者名 中里雅光 監修：矢崎 義雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2002 (957-959)
3. 書名 新臨床内科学 [デスク判] 第10版 第7章 6. 異所性ホルモン症候群	

〔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
研究分担者	柳 重久 (Yanagi Shigehisa) (60404422)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	坪内 拡伸 (Tsubouchi Hironobu) (60573988)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	松尾 彩子 (Matsuo Ayako) (40776332)	宮崎大学・医学部・医員 (17601)	

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
---------	---------