

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03382

研究課題名(和文) 血管新生に着眼した肺胞形成・恒常性維持の分子機構の解明と呼吸器病態への応用

研究課題名(英文) Molecular and genetic research on the development and maintenance of alveolar structure in the lung.

研究代表者

江本 憲昭 (Emoto, Noriaki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30294218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、出生後に肺胞形成に異常を示すエンドセリン(ET)-2遺伝子改変マウスをツールとして用い、肺胞成熟過程の分子機構と呼吸器病態におけるET-2の役割を解明することを目的とする。シングルセルRNAシーケンス解析の結果、ET-2遺伝子欠損マウスの肺においては、活性化した未分化好中球が増加し、炎症を介して肺胞成熟を阻害することを示唆する所見を得た。また、肺上皮細胞および血管内皮細胞でET-2の発現は確認されたが、これらの細胞に発現するET-2は肺胞成熟には関与しないこと、肺上皮に発現するET-2は肺線維症などの呼吸器疾患の病態に対し保護的に機能することを遺伝子改変マウスを用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子の発見から30年あまりを経て、今なおET-2の生理学的・病態生理学的役割は謎に包まれている。今回、ET-2が肺において肺胞成熟ならびに肺胞構造の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにし、その分子機構に迫る知見を得た。さらに肺線維症を含め呼吸器疾患の病態に対しET-2が保護的に働くことを示した。エンドセリン受容体拮抗薬は、肺高血圧症やくも膜下出血後の血管攣縮予防として臨床応用されているが、その標的はET-2のアイソペプチドであるET-1と考えられている。ET-2の機能解析は、作用を最大限にし、副作用を最小限にしたエンドセリン受容体拮抗薬の開発に重要な情報をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to investigate the molecular mechanisms of the alveologenesis of the lungs and pathophysiological roles of endothelin-2 (ET-2) in the respiratory diseases.

The single cell RNA sequencing analysis demonstrated that the number of the activated undifferentiated neutrophils increased in the lungs of ET-2 deficient mice. The expression of ET-2 was confirmed in the pulmonary epithelial cells and vascular endothelial cells. However, both of the pulmonary epithelial cell-specific ET-2 deletion mice and the vascular endothelial cell-specific ET-2 deletion mice exhibited the normal alveologenesis, suggesting that ET-2 expressed in these cells are not essential for the alveologenesis. ET-2 deletion in epithelial cells of mice results in the exacerbation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, indicating that ET-2, expressed in epithelial cells, exerts protective effects against the development of pulmonary fibrosis in mice.

研究分野：血管生物学

キーワード：エンドセリン 気管支肺異形成 慢性閉塞性肺疾患 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

臓器の機能的な形態や細胞能力は発生過程で構築され、特に発生後期から生後初期における臓器の成熟過程は固有の生理機能の獲得に重要である。とりわけ肺は呼吸の開始に伴い臓器環境が劇的に変化することで生後の肺胞の成熟が促されるとされている。また、この生後初期の肺胞形成異常が小児期の気管支肺異形成症 (BPD) や成人期の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のリスクになると考えられている。しかしながら、生後の肺胞構造の成熟過程やその恒常性維持の分子メカニズムについては今なお不明な点が多い。

近年、生理活性物質であるエンドセリン-2 (ET-2) 遺伝子の欠損マウスが BPD や COPD に類似した表現型を示すことが報告された。その分子メカニズムは明らかではないものの、ET-2 シグナルを介した細胞間コミュニケーションが肺胞構造の形成および維持に重要であることが示唆された。

以上の背景のもと、研究代表者は、肺における ET-2 の役割の解明に取り組み、ET-2 がこれまで全く知られていなかった酸素濃度に依存する極めてユニークな発現調節を受け、一定の条件下でのみ高発現を示すこと、ならびに ET-2 が肺毛細血管の血管新生に重要な役割を果たしていることを示唆する予備研究結果を得た。

2. 研究の目的

本研究は、出生後に肺胞形成に異常を示す ET-2 遺伝子改変マウスをツールとして用い、血管内皮細胞と肺胞上皮細胞のクロストークによる肺胞成熟過程に着目して、呼吸の開始が肺胞の組織幹細胞を刺激して組織の再構築を促すメカニズムの解明を目指すとともに気管支肺異形成症や慢性閉塞性肺疾患の新たな病態を解明することを目的とするものである。

3. 研究の方法

ET-2 遺伝子欠損マウス、ET-2 floxed マウス (ET-2 をコードするエクソンを loxP で挟み込んだ flox マウス)、iCre-ET-2 RFP マウス (ET-2 が発現した細胞で相同組換えが起こり蛍光タンパク質である RFP を発現するマウス)、vascular endothelial cadherin (VEcad)-Cre-Tg マウス (血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウス) は共同研究者から譲渡された。Shh-Cre-Tg マウス (肺胞上皮細胞特異的に Cre を発現するマウス)、ROSA26-CreERT2 マウス (タモキシフェンで誘導される Cre 発現マウス) は、The Jackson Laboratory から購入した。

マウスの呼吸機能は flexiVent (EMKA TECHNOLOGIES JAPAN INC) を用いて評価した。

シングルセル RNA シークエンス解析には Chromium コントローラー (10X GENOMICS) を用いた。

4. 研究成果

(1) 肺における ET-2 発現細胞の同定

iCre-ET-2 RFP マウスの肺では、血管内皮細胞および肺上皮細胞で RFP の発現が認められた。すなわち、肺においては、発現のタイミングは不明であるが、少なくとも血管内皮細胞および肺上皮細胞で ET-2 が発現していることが示唆された (図 1)。

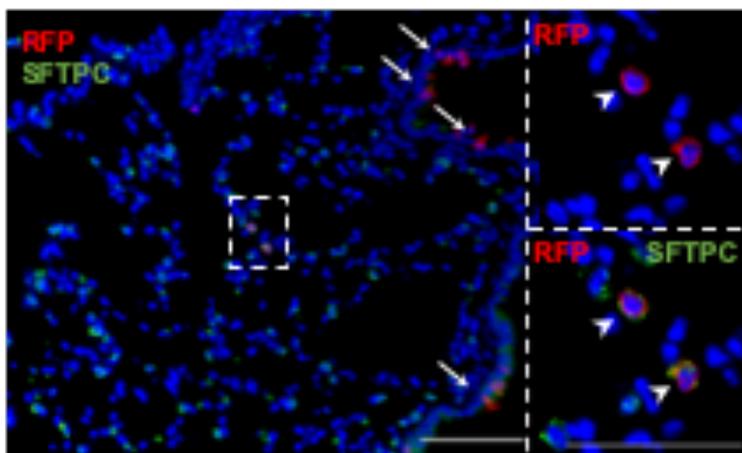


図 1 マウスの肺における ET-2 の発現 ET-2 は肺気管上皮ならびに肺胞上皮に発現している。

(2) 細胞特異的 ET-2 欠損マウスの作出と表現型の解析

ET-2 をコードするエクソンを loxP で挟み込んだ flox マウスに血管内皮細胞特異的に Cre を発現する vascular endothelial cadherin (VEcad)-Cre-Tg マウス、また、肺胞上皮細胞特異的に Cre を発現する Shh-Cre-Tg マウスと交配し、その肺の表現型を確認し、肺胞成熟に役割を果たす ET-2 の産生部位を同定することを試みた。その結果、両系統のマウスとも出生後の肺胞形成は正常であった。すなわち、血管内皮細胞、肺上皮細胞ともに ET-2 欠損による肺胞成熟異常の表現型に関与しないことが明らかとなった。

(3) シングルセル RNA シークエンス解析による ET-2 欠損マウスの評価

血管内皮細胞、肺上皮細胞以外で肺において ET-2 を発現している細胞群を同定する目的で野生型マウスおよび ET-2 遺伝子欠損マウスの新生児から肺を摘出し、シングルセル RNA シークエンス解析を実施した。その結果、肺において ET-2 を発現する細胞種を複数同定した。さらに ET-2 の欠損により出現した細胞クラスターを同定した。具体的には未分化な好中球が多数出現し、ET-2 欠損の表現型に炎症が関与していることが明らかとなった (図 2)。

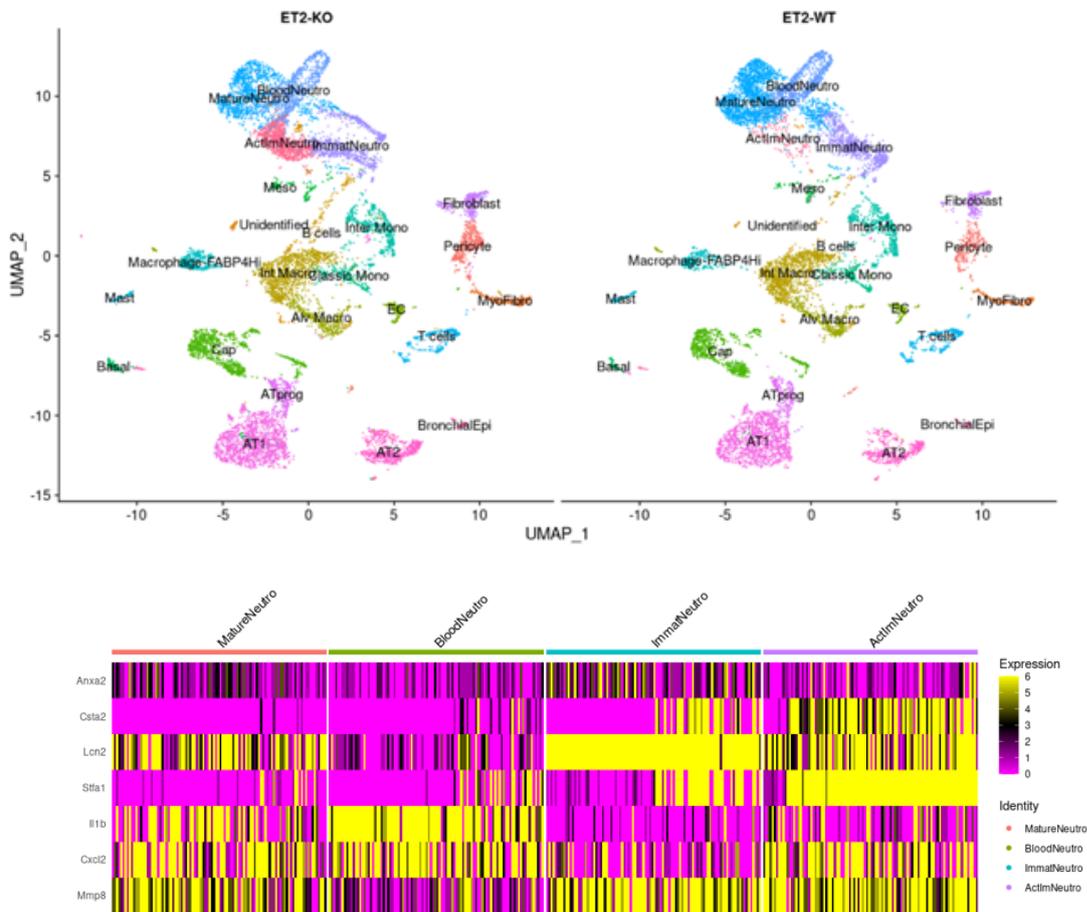


図 2 シングルセル RNA シークエンス解析 ET-2 欠損マウスの肺では野生型マウスと比較して未分化で活性化された好中球が増加している。

(4) 成体における ET-2 の役割の解明

タモキシフェン投与により ET-2 を時間依存的に欠損する ET-2^{f/f};ROSA26-CreERT2 マウスを用いて、成体における ET-2 の役割の解明を試みた。8 週齢のマウスにタモキシフェンを投与し、ET-2 を欠損させたマウスでは、14 週後に呼吸機能検査にて呼吸機能障害を認め、組織学的には肺胞腔の拡大を認めた (図 3)。以上の結果から ET-2 は肺胞の成熟のみならず、肺胞の構造維持にも重要であることが明らかとなった。

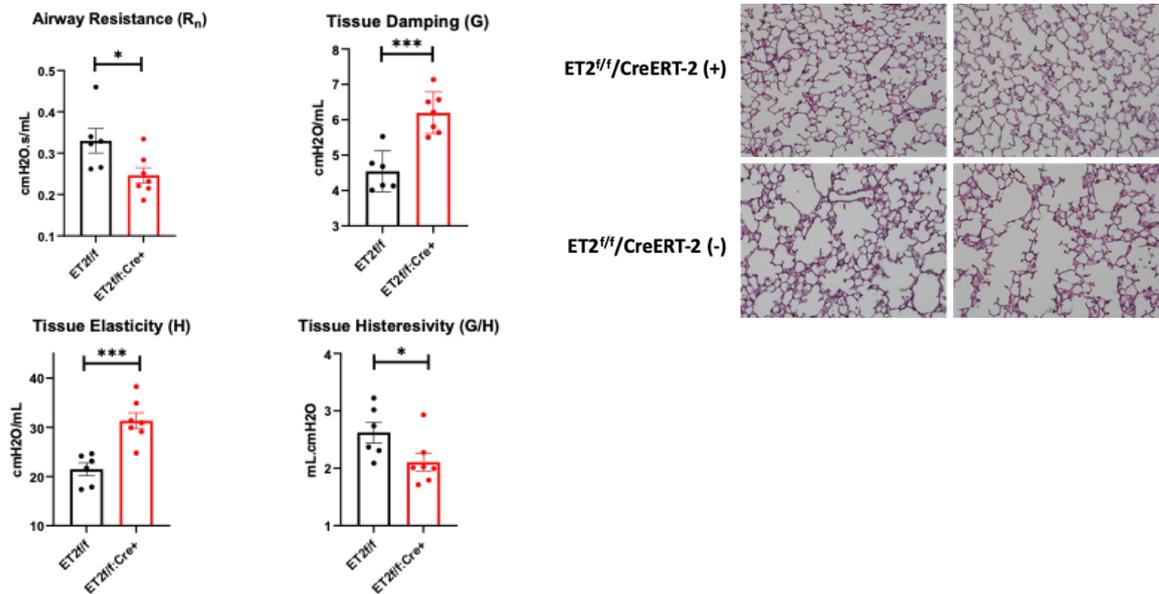


図3 マウス成体におけるET-2欠損の肺の表現型
左：呼吸機能検査結果、右：肺組織像

(5) ET-2 生体イメージング法の開発

ET-2の特異的な発現様式を明らかにするために、生体イメージング法を用いた解析を試みた。具体的には、ET-2プロモーター下に発光レポーター遺伝子をCRISPR/Cas9システムを用いて組み込んだノックインマウスを作出した。このマウスでは、腸管にてレポーターの発現を確認することができた。現在、これらのマウスを用いて、多光子顕微鏡を用いて、生体で酸素濃度を変化させることにより肺におけるET-2の発現と肺血管をリアルタイムで観察することを試みている。

(6) 呼吸器疾患モデルにおけるET-2機能の解析

肺上皮細胞特異的にET-2遺伝子欠損したET-2^{fl/fl};Shh-Creマウスを用いて、プレオマイシンを用いた肺線維症モデル、低酸素誘導性の肺高血圧症モデル、エラストアーゼを用いた慢性閉塞性肺疾患モデルを作製した。その結果、ET-2遺伝子欠損マウスではこれらの病態が増悪したため、ET-2がこれらの呼吸器病態に保護的に働くことが示された。

肺線維症モデルに関しては、ET-2の欠損で病態が悪化することを明らかにし、その分子メカニズムとして、ET-2がTGF-β-SMAD2/3経路を阻害することによって、線維芽細胞の活性化を抑制し、結果として肺の線維化を抑制することを明らかにした(図4)。

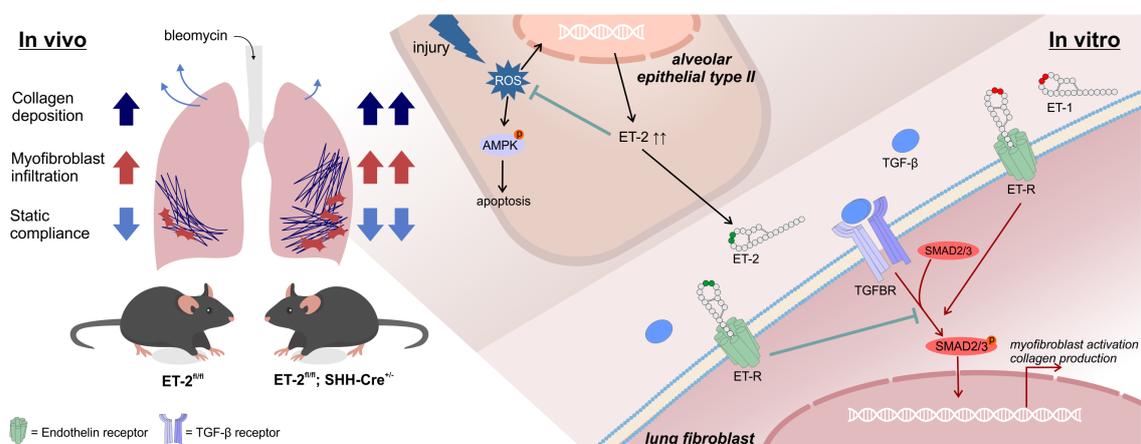


図4 ET-2はプレオマイシンで誘導される肺線維症の病態においてTGF-β-SMAD2/3経路を阻害することによって保護的に働く。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Soraya AI, Suzuki Y, Morimoto M, Ko CJ, Ikeda K, Hirata KI, Emoto N.	4. 巻 67
2. 論文標題 Protective Effects of Endothelin-2 Expressed in Epithelial Cells on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci .	6. 最初と最後の頁 E61-E70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noriaki Emoto
2. 発表標題 Endothelin: Visiting Old and Learning New
3. 学会等名 The Sixteenth International Conference on Endothelin（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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		
米国	University of Illinois		