

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08655

研究課題名(和文) Club細胞の運命転換に着目した前癌病変の起源細胞の同定及び発生機構の解明

研究課題名(英文) Progenitor cells and initiation of squamous metaplasia focused on club cell fate conversion

研究代表者

松尾 顕 (MATSUO, Akira)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特別研究員

研究者番号：50735074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の発生母地である扁平上皮化生は、分化細胞が別の分化細胞へ運命転換する現象であるが、その起源細胞及び発生機序は不明瞭である。本研究では、細胞系譜解析とシングルセル遺伝子発現解析を用いて、Notchシグナル標的遺伝子の不活性化により、club細胞が基底細胞へ運命転換することを示した。我々は、誘導された基底細胞(induced Basal cell, iB cell)の一部の細胞集団が、扁平上皮細胞に発現するKrt4及びKrt13を発現していることを明らかにした。さらに、発癌モデルにて、iB細胞は、扁平上皮様細胞に分化していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の知見は、恒常性及び発癌(扁平上皮化生及び扁平上皮癌)におけるclub細胞の運命転換の理解と扁平上皮化生予防に着目した新規癌治療の基盤形成につながる。

研究成果の概要(英文)：Tracheobronchial squamous metaplasia is a precursor lesion to squamous carcinoma in smokers. However, the cell of origin of squamous metaplasia and the mechanisms that underlie the development of squamous metaplasia remain largely unknown. Here, we show that inhibition of Notch signaling can induce lineage conversion of club cells into basal stem cells, which can generate squamous cells. Using lineage tracing and single-cell transcriptomics, we find that club cells can convert into basal cells by inactivating Notch signaling. Induced basal (iB) cells show heterogeneity in the cell population. A subset of iB cells expresses squamous makers Krt4 and Krt13. Following the neoplastic process, we also reveal that iB cells can generate squamous-like cells expressing Krt13 in the mouse trachea. Our study provides new avenues for the understanding of club cell plasticity and novel cancer therapy based on the prevention of squamous metaplasia by club cell-derived basal cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：運命転換 Club細胞 基底細胞 扁平上皮化生

1. 研究開始当初の背景

成熟した細胞が別の細胞へ運命転換する化生という現象がある。前癌病変である扁平上皮化生は、気道上皮細胞が、運命転換し、扁平上皮化する現象であるが、起源細胞及び発生機構は不明瞭である。

扁平上皮化生は、その後、異形成、扁平上皮癌と進展することがあり、さらに、扁平上皮癌との共存する頻度も高い。そのために、扁平上皮癌の発生源母地(前癌病変の初期段階)と考えられている。扁平上皮化生の発生機構の理解は、扁平上皮化生病変の予防につながり、さらには、扁平上皮癌の早期発見及び予防につながることが期待される。

扁平上皮化生の発生機構を理解するためには、経時的に標的病変を追跡解析する必要がある。扁平上皮化生は、気道上皮細胞が基底細胞に運命転換し、その基底細胞が扁平上皮細胞に分化すると推測される。ヒト疾患検体では、経時的な標的病変の追跡は難しいため、形態変化の分子機構の知見は乏しい。そのため、基底細胞へ運命転換する起源細胞の予測は困難であった。そこで、起源細胞の系譜を解析し、病変を段階的に解析する遺伝子改変マウスを用いた解析が望まれている。

マウス気管において、幹細胞である基底細胞が障害を受けた際、損傷修復のために、気管 club 細胞が基底細胞へ運命転換(脱分化)することが明らかになった(図 1B1)。これまで、この脱分化機構は不明であったが、我々は、気管 club 細胞から基底細胞(iB 細胞、induced basal cell)への運命転換に Notch シグナル標的遺伝子の不活性化が重要であることを見出した(図 1B2)。

2. 研究の目的

本研究では、club 細胞の運命転換に着目して、club 細胞の基底細胞(iB 細胞)への運命転換が、扁平上皮化生及び化生病変による発癌(扁平上皮癌)に寄与するかを細胞系譜解析とシングルセル遺伝子発現解析(scRNA-seq)を用いて検証することを目的とした(図 1C)。

3. 研究の方法

Club 細胞から iB 細胞へ運命転換を誘導するために、club 細胞特異的に tdTomato の標識及び Notch シグナル標的遺伝子を不活性化させ、転換過程の club 細胞を追跡可能である *Scgbl1-rtTA;tetO-Cre;R26R-tdTomato/+*及び Notch シグナル標的遺伝子を不活性化する(運命転換)マウスを作製した。この結果、club 細胞から運命転換した iB 細胞は、tdTomato+Krt5+(tdTomato+Trp63+)として同定されることが期待できる。また、内在の基底細胞は tdTomato-Krt5+(tdTomato-Trp63+)として同定される。さらに、扁平上皮細胞マーカーKrt13を用いて、iB 細胞もしくは club 細胞が扁平上皮細胞に分化した場合は、Krt13+tdTomato+で評価可能である。Club 細胞(*Scgbl1*)、基底細胞(*Krt5*, *Trp63*)、扁平上皮細胞(*Krt4*, *Krt13*)及び club 細胞の子孫細胞(tdTomato)で同定する。

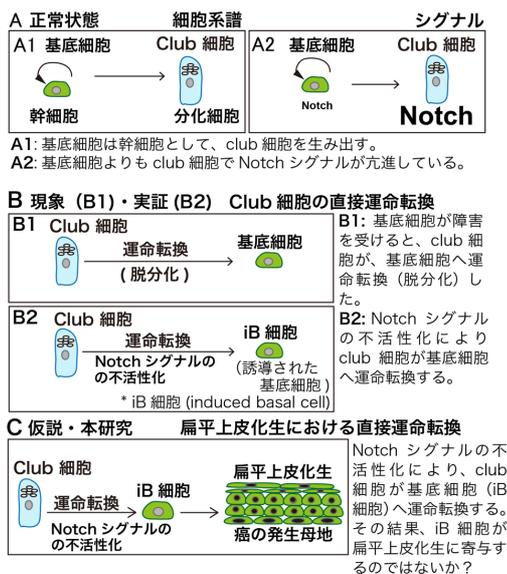


図 1 本研究における運命転換機構の仮説

Notch シグナルの標的遺伝子不活性化による club 細胞から基底細胞への運命転換

次に、運命転換の分子機構を明らかにするために、シングルセル遺伝子発現解析を行った(シングルセル RNA-seq, scRNA-seq)。マウス気管の細胞のシングルセル化には 10x Genomics 社の Chromium を用いて行い、その後、HiSeq (Illumina 社) を用いてシーケンスを行った。シーケンスデータは、Serat3.0 を用いて取得し、その後、データ解析は、Monocle3、Loupe Browser 及び RNA velocity を用いて行った。

4. 研究成果

(1) Notch シグナル標的遺伝子を不活性化した club 細胞の細胞系譜を解析したところ、club 細胞由来の基底細胞(iB 細胞、tdTomato+Krt5+)を確認した(図 2B、白矢頭)。さらに、この細胞は、基底細胞の転写因子である Trp63 を発現していた。

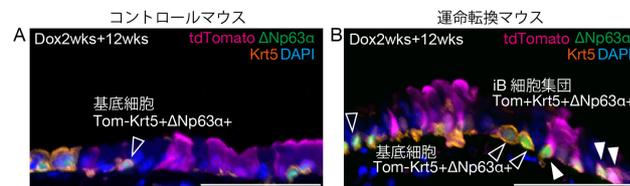


図 2 Notch シグナルの標的遺伝子の不活性化が Club 細胞から基底細胞への脱分化を制御している。Club 細胞 (Tom+ Δ Np63 α -Krt5-, Tom+Krt5-)、基底細胞 (Tom-Krt5+ Δ Np63 α +, 白抜き矢頭) 及び iB 細胞 (induced basal 細胞、club 細胞から脱分化した基底細胞、Tom+Krt5+ Δ Np63 α +, 白矢頭) を示している。

(2) Club 細胞から基底細胞への運命転換の分子機構解明を目的として、scRNA-seq を用いた遺伝子発現解析をのデータを基にして、擬似時間解析

(Monocle3)を行ったところ、club 細胞、iB 細胞及び基底細胞の軌道を描くのに成功した。Club 細胞 (Scgb1a1+tdTomato+)、iB 細胞 (Krt5+tdTomato+, Trp63+tdTomato+)、基底細胞 (Krt5+tdTomato-, Trp63+tdTomato-) は異なる細胞集団 (クラスター) に存在することが明らかになった。よって、軌道解析により、club 細胞から運命転換した iB 細胞と基底細胞は異なる軌道 (擬似時間軸) に存在することが示唆された。iB 細胞は、Krt4 及び Krt13 を発現していた。iB 細胞を誘導したマウス気管において、Krt4+Tom+, Krt13+Tom+ 及び Krt4+Krt13+Tom+iB 細胞を確認した。この結果は、scRNA-seq の結果と一致した。

RNA velocity は、scRNA-seq データを用いて、spliced RNA と unspliced RNA の比を基に細胞の分化系譜を予測する技術である。そこで、RNA velocity を用いて、club 細胞から iB 細胞への運命転換の軌道予測を行った。まず、クラスタリングによって、Trp63+Krt5+基底細胞、Krt4+/Krt13+陽性細胞、club 細胞を検出した。Krt4 及び Krt13 は、基底細胞から club 細胞への移行細胞に発現しており、Krt4+ 及び Krt13+細胞は hillock 上皮細胞とよばれ、細胞のターンオーバーが速く、扁平上皮様の特徴を形成する細胞群である。さらに、Krt4+club/goblet 細胞、club/goblet 細胞、goblet 細胞、undifferentiated club 細胞 (Krt5+, Krt4+, Calca+) を検出した。次に、各々の細胞群の分化経路を予測するために、RNA velocity 解析を行った。その結果、club 細胞から iB 細胞への脱分化経路、または、iB 細胞から club 細胞の分化経路が予測された。

コントロールマウスと運命転換マウスの scRNA-seq のデータを基にして、ドットプロットを用いてコントロールマウスと運命転換マウスの基底細胞群 (Trp63+細胞、Krt5+細胞及び Trp63+Krt5+細胞) において、基底細胞マーカー (Krt5, Krt14)、扁平上皮細胞マーカー (Krt4, Krt13) 及び transitional state 細胞マーカー (Krt8, Krt18, Krt19) の発現を評価した。運命転換マウスの基底細胞群 (Trp63+, Krt5+, Trp63+Krt5+) では、Krt14, Krt8, Krt4, Krt13 の発現が強かった。一方で、コントロールマウスの基底細胞群 (Trp63+, Krt5+, Trp63+Krt5+) では Krt5 の発現が強かった。この結果は、運命転換マウスの iB 細胞は扁平上皮細胞の遺伝子発現に類似していることを示唆している。

(3)扁平上皮癌は、扁平上皮化生-異形成-扁平上皮癌と進行していく多段階発癌が考えられている。扁平上皮化生は、可逆的な反応である。一方で扁平上皮癌の起源細胞と考えられている。そこで、扁平上皮癌発癌剤を用いて、iB 細胞が扁平上皮化生に寄与するかを評価した。この扁平上皮癌発癌剤は、扁平上皮癌だけでなく、扁平上皮化生及び扁平上皮異形成も出現させることが可能である。運命転換マウスに発癌剤を用いて、club 細胞が扁平上皮細胞に分化するのか、さらに、club 細胞由来の扁平上皮化生病変が出現するかを評価した。現在解析中ではあるが、運命転換マウスに発癌剤を用いた気管では、通常観察されないと考えられる扁平上皮様細胞(squamous-like cell)が細胞系譜標識されていた(tdTomato+Krt13+)。この結果は、Notch シグナルの不活性化により club 細胞から運命転換した基底細胞 (iB 細胞) が、扁平上皮細胞を生み出す能力を有する可能性を示唆している。

以上より、本研究では、club 細胞から基底細胞への運命転換には、Notch シグナル標的遺伝子の不活性化の寄与が示唆された。今後、Notch シグナル標的遺伝子の不活性化により、扁平上皮化生を防ぐことが可能となれば、本研究の知見は、扁平上皮化生予防に着目した新たな癌治療の基盤形成につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Haruki, Tenjin Yuki, Yamada Tatsuya, Kudoh Shinji, Kudo Noritaka, Sanada Mune, Sato Younosuke, Matsuo Akira, Orita Yoriyhisu, Ito Takaaki	4. 巻 35
2. 論文標題 The role of YAP1 in small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 628 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-022-00669-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo Noritaka, Kudoh Shinji, Matsuo Akira, Motooka Yamato, Ito Takaaki	4. 巻 54
2. 論文標題 ZMYM3 May Promote Cell Proliferation in Small Cell Lung Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 143 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00012	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudoh Shinji, Tenjin Yuki, Kameyama Hiroki, Ichimura Takaya, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Kudo Noritaka, Sato Younosuke, Ito Takaaki	4. 巻 153
2. 論文標題 Significance of achaete-scute complex homologue 1 (ASCL1) in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and Ascl1-induced pulmonary neuroendocrine carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 443 ~ 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01863-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudoh S, Tenjin Y, Kameyama H, Ichimura T, Yamada T, Matsuo A, Kudo N, Sato Y, Ito T	4. 巻 -
2. 論文標題 Significance of achaete-scute complex homologue 1 (ASCL1) in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and Ascl1-induced pulmonary neuroendocrine carcinoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biology	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) 10.1007/s00418-020-01863-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tenjin Yuki, Kudoh Shinji, Kubota Sho, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Sato Younosuke, Ichimura Takaya, Kohrogi Hirotsugu, Sashida Goro, Sakagami Takuro, Ito Takaaki	4. 巻 99
2. 論文標題 Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0277-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松尾 顕 伊藤隆明
2. 発表標題 Club細胞から基底細胞への運命転換
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Matsuo, Takaaki Ito
2. 発表標題 Club cell dedifferentiation induced by Notch inactivation
3. 学会等名 第52回 発生生物学会大会
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
---------	---------