

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17655

研究課題名（和文）分岐点を目指す肺NE細胞の道しるべは何か？

研究課題名（英文）Does Chemotaxis direct lung NE cell migration in developing lung?

研究代表者

古川 可奈（Furukawa, Kana）

大阪大学・基礎工学研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：70807461

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、E14.5とE18.5の胎児肺を用いた一細胞シーケンス解析から、肺NE細胞の遊走時期特異的に発現している遺伝子を複数ピックアップすることに成功した。結果、Slit-Robo pathwayが肺NE細胞の一方方向性遊走制御の一端を担う可能性が示唆された。また、Eph-Ephrin pathwayが末端気管支エリアの肺上皮細胞の分化を制御し肺NE細胞を適切な数に抑える可能性を示唆する結果も得られた。今後、本研究で得られた結果や作製したノックアウトマウスを用いて更に解析を進めることで、肺NE細胞の一方方向性遊走制御メカニズムの全容を明らかにしたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官が持つ感覚器は器官の生理機能を発揮するためにはなくてはならないものだが、肺に限らずその研究は進んでいない。感覚器の研究は、再生医療分野において生理機能を持つ人工臓器を形成させるために必須である。本研究では、肺の感覚器であるNEBに着目し、NEBの形成メカニズムの詳細解析に挑んだ。NEBの外環境応答能力に着目し、肺NE細胞が何等かの液性因子による外部刺激によって一方方向性の遊走制御が行われていると仮説を立て研究を遂行した。本研究の成果は、将来的に適切な場所にNEB形成を誘導させ、適切な生理機能を発揮できる人工肺誘導の実現へ向けた第一歩となったと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, I succeeded in picking up several genes that are specifically expressed at E14.5, the migration stage of lung NE cells, from single-cell RNA sequencing analysis using E14.5 and E18.5 fetal lungs. The analysis of Slit3 knockout mice also suggested that the Slit-Robo pathway may be involved in the regulation of unidirectional migration of lung NE cells in developing lung. In addition, the analysis of EphrinB2 knockout mice also suggested that the Eph-Ephrin pathway may regulate the differentiation of lung epithelial cells in the terminal bronchial area and suppress lung NE cells to an appropriate number. In the future, I would like to clarify the regulatory mechanism of unidirectional migration of lung NE cells by further analyzing the results obtained in this study and the knockout mice I have created.

研究分野：発生生物学

キーワード：肺NE細胞 Neuroendocrine cell 神経内分泌細胞 NEB lung 感覚器

1. 研究開始当初の背景

皮膚や、食道、気管などの器官は上皮組織が表面を覆い体の『外側と内側』を隔てている。上皮組織の働きの1つに、外側の環境状態を内側に伝えるというものがある。皮膚は何かに触れると圧力を感知し、何かに触れているということを体内に伝える。食道は食物が食道に触れていることを感知し、食物の位置を体内に伝える。肺は呼吸によって空気を取り込まれたことを感知する。この『感知する』というメカニズムが、体外の環境状態を体内に伝える上でとても重要であることがわかる。では、上皮組織の『何』を介して感知に至るのだろうか。

『感知する』を研究する分野として、近年注目を浴びているのがメカノバイオロジーである。これは、物理的な力をシグナル伝達に変換するメカノセンシングに着目した研究分野である。申請者は上皮組織におけるメカノセンシングと器官が有する生理機能の関係を明らかにすべく、空気圧を感知する感覚器を持った肺に着目した。肺が空気圧を感知する重要な領域として neuroendocrine body (NEB) が最近報告されたことから(1)、NEB の全容解明が肺のメカノセンシング機能を明らかにする重要項目であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、肺の機能維持に必要不可欠な肺の感覚器 NEB を構成する肺 NE 細胞に着目し、発生期においてどのような制御メカニズムが NEB 形成に寄与するのかを明らかにすることを目的としている。ヒトの肺と構成している細胞種や構造が酷似しており、各発生ステージによる肺組織像がおおよそ判明しているマウス胎児肺を用いて、解析を進めた。

3. 研究の方法

E14.5(肺 NE 細胞が遊走している時期)と E18.5(気管支分岐点に肺 NE 細胞が集積し終え NEB 形成がほぼ完了する時期)のマウス胎児肺を用いた一細胞シークエンス解析を行い、遊走時特異的に肺 NE 細胞や周辺上皮細胞に発現している遺伝子のピックアップから開始した。この解析から、細胞遊走に関わると報告のある複数の遺伝子が遊走時特異的に発現していることがわかった。次に、野生型マウス胎児肺を培養し、各遺伝子の阻害剤を添加することで NEB 形成に異常が生じるかを観察した。これと並行し、細胞遊走に重要であるとの報告がある遺伝子のノックアウトマウス作製に進んだ。作製したノックアウトマウス(KO マウス)の E18.5 において、NEB 形成に異常が生じるかを解析を行った。さらに、遊走時の肺 NE 細胞が発現している遺伝子の中から、細胞膜に局在し受容体としての働きのあるものに結合する因子が肺組織中のどの細胞で発現しているかを免疫組織化学染色法にて解析した。

4. 研究成果

本研究から、肺 NE 細胞の遊走時期(E14.5)特異的に肺 NE 細胞や周辺上皮細胞にて一時的に複数の遺伝子が発現していることがわかった。作製した KO マウス全ての解析には至らなかったが、一部の KO マウスの解析より、Slit-Robo 経路は NEB のサイズを減少させ、NEB の数を増加させる可能性が高いことが示唆され、Eph-Ephrin 経路は末端気管支上の NEB サイズを増加させる傾向にあることがわかった(図1,図2)。

さらに、Slit と Robo のそれぞれの因子の組織上の発現パターン解析を進めた。一細胞シークエンス解析の結果より、肺 NE 細胞に発現が認められた細胞膜局在型の受容体 Robo1/2 の発現には時期特異性は認められなかったが、Robo のリガンドである Slit3 は特徴的な発現を示した。Slit3 は近位(Proximal)

図1 Slit3 KO マウスの解析結果

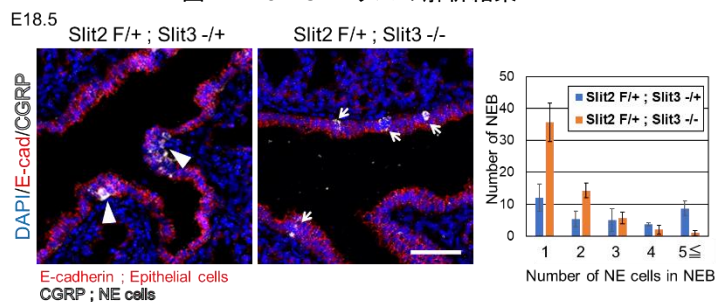
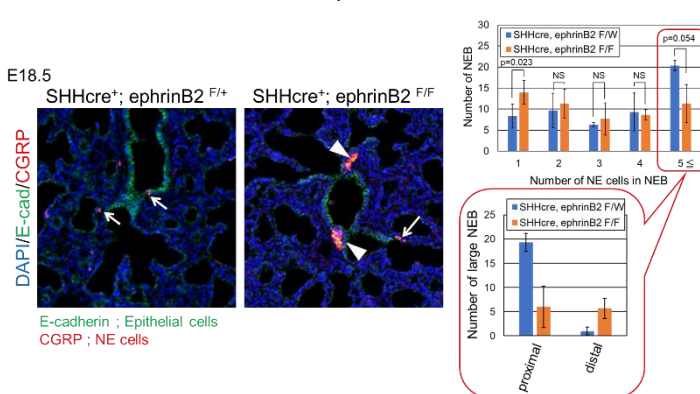


図2 肺上皮細胞特異的 EphrinB2 KO マウスの解析結果



side)の成熟平滑筋細胞分布エリアに多く発現しており、遠位(Distal side)の未成熟平滑筋細胞分布エリアでは発現が少ない様子が観察された(図3)。さらに、肺NE細胞がSlit3に対してどのような応答を示すかをE15.5胎児肺由来の肺NE細胞を用いてボイデンチャンバーアッセイにて解析したところ、コントロールと比較し、Slit3添加培地側から積極的に避ける方向性の遊走を肺NE細胞が示すことがわかった(図4)。これらの結果から、肺NE細胞の気管支分岐点への一方向性遊走を制御する重要なメカニズムの1つに、Slit3を受容したRoboから走るシグナル伝達経路が生む“反発性細胞運動”が関与していることが示唆された。

また、EphとEphrinについても組織上の発現パターン解析を進めた。一細胞シーケンス解析の結果より、肺NE細胞には細胞膜局在型の受容体EphB2が発現しており、Sox9を発現している遠位にある肺NE細胞以外の上皮細胞でEphrinB2を発現していることがわかった(図5)。さらに、データベースGENE PAINTを用いた解析により、EphrinB2がE14.5の遠位の肺上皮細胞で発現していることも確認できた。上皮細胞特異的にEphrinB2をノックアウトしたマウスを免疫組織化学染色法にて解析したところ、Club細胞のマーカ因子であるFoxf1やCiliated細胞のマーカ因子であるCC10の発現がどちらも約10%程度低下傾向にあることもわかった。これらの結果から、遠位エリアにおける上皮細胞の分化パターンがEphrinB2のノックアウトによって肺NE細胞へ分化する割合が増加した結果、末端の気管支分岐点に形成されるNEBのサイズが大きくなったのではないかと考えられる。しかし、NEBの形成位置は分岐点であったことから(図2)、Eph-Ephrin経路は肺NE細胞の一方向性遊走制御へ寄与している可能性は低いと考えられる。

新型コロナウイルス感染拡大の影響により、2年間あった本研究期間の約8カ月は実験をまともに行うことができない状態であったことが悔やまれる。今後は、本研究期間で解析しきれなかったKOマウスの表現型解析を進め、肺NE細胞の気管支分岐点への一方向性遊走を積極的に引き起こす制御機構を明らかにすると共に、誘導系と合わせてin vitroでのNEB形成誘導を実現させたい。

図3 気管支平滑筋細胞におけるSlit3の発現パターン

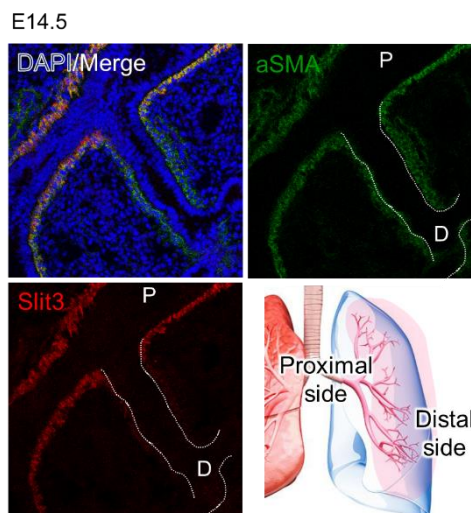


図4 Slit3を用いたBoyden Chamber Assayの結果

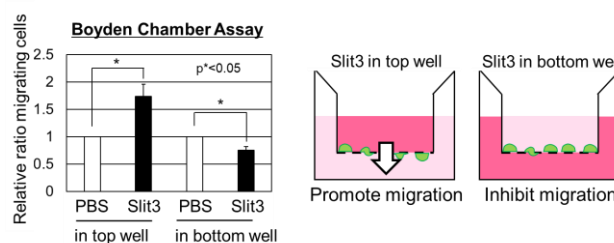
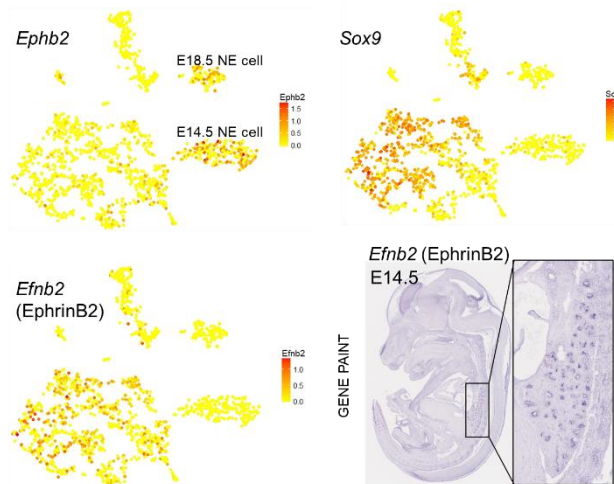


図5 一細胞シーケンス解析の結果とマウス胎児肺でのEfnb2の発現場所



<引用文献>

(1) Nonomura et al., Nature 2017, 541(7636):176-181.

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 Noguchi Masafumi, Furukawa Kana T., Morimoto Mitsuru	4. 巻 13
2. 論文標題 Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm046920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.046920	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kana Tamura
2. 発表標題 Does Chemotaxis or Durotaxis direct NE cell migration in developing lung?
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Tamura Furukawa
2. 発表標題 Does Durotaxis direct NE cell migration in developing lung?
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------