

令和 5 年 8 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17238

研究課題名（和文）オルガノイド技術を用いて、肺胞上皮細胞老化を標的とした肺線維症新規薬剤を探索する

研究課題名（英文）Explore novel treatment target for lung fibrosis using alveolar organoid

研究代表者

榎本 泰典（Enomoto, Yasunori）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90865297

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）：肺線維症の発症の起点として肺胞上皮傷害や細胞老化の関与が想定されているが、いまだ分子病態の解明が進んでいない。

本研究では、型肺胞上皮細胞(AT2)を用いて肺胞オルガノイドを作成し、これと初代肺線維芽細胞を共培養することで、線維化の主要な役割である筋線維芽細胞への分化を評価する、新たな肺線維症モデルを確立した。このモデルを用いることで、DNAダメージを受けp53シグナルを高発現したAT2が、TGF $\beta$ を産生して筋線維芽細胞を直接分化誘導すること、さらにオートクラインによりその作用が増強されることが明らかとなった。またこれらの結果はヒトAT2を用いた実験でも再現されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症は予後不良な難治性肺疾患である。従来の肺線維症治療薬は、線維芽細胞を主たる治療標的としており、また効果の面では残念ながら進行の抑制までしか成しえていない。

本研究では、本症の発症起点と考えられている肺胞上皮傷害に着目し、in vitroの肺線維症モデルを確立することで、病態のさらなる解明に迫った。研究結果は、既存薬ではアプローチできていない新規治療標的を示唆するものであり、今後の新薬開発への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Although the pathogenesis of lung fibrosis has been believed to start with epithelial injury or cellular senescence, the molecular mechanism remains elusive.

In this study, we used alveolar organoid technology and established in vitro lung fibrosis model by coculturing primary lung fibroblasts, in which we can evaluate the process of differentiation of the fibroblasts into myofibroblasts. Using this model, we revealed that damaged alveolar epithelial cell type 2 (AT2) could produce active TGF $\beta$  and directly induce myofibroblast differentiation. Additionally, we found that the pro-fibrotic potential of AT2 could be enhanced by their autocrine TGF $\beta$  signal. These findings were validated even in human AT2.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺線維症 肺胞オルガノイド 組織幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

肺線維症は加齢に伴い有病率が増加する予後不良な疾患である。発症には上皮、血球、間葉系細胞など複数の細胞種が相互に関与し、肺胞の不完全な組織修復により線維化に至る。病態の起点としては、肺胞上皮の傷害や細胞老化の関与が想定されている。実際、家族性肺線維症や特発性肺線維症患者では、高頻度にテロメアの短縮が見られ、加齢・細胞老化と肺線維症との関連を裏付けている。また最近では、老化細胞の genetic ablation、あるいは抗老化作用のある薬剤の全身投与がマウスの肺線維症を改善させるという報告もある。しかしこれらの既報では、どの細胞種の老化が、どの線維化プロセスに寄与しているのかが明確でなかった。また、肺線維症の代表疾患である特発性肺線維症は非炎症性疾患として位置づけられており、実際、本症に対する免疫抑制療法の効果は否定されている。よって、炎症に依存しない線維化プロセスの重要性が示唆されるが、既存の実験系では全身性作用と肺胞局所の細胞間相互作用の区別は難しく、本質的な分子病態解明へのアプローチが難しかった。

### 2. 研究の目的

肺線維症における細胞老化の病態的意義を細胞・分子レベルで明らかにすること。またこれを踏まえた肺線維化モデルを *in vitro* で確立し、炎症に依存しない肺胞上皮細胞由来の線維化プロセスを明らかにすること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線維化肺における主たる老化細胞種の同定

ヒト肺やマウス肺における既存の transcriptome データセットや、マウスブレオマイシン(BLM)肺線維症モデル肺切片を用いて、線維化肺においてどの細胞種が老化状態にあるのか検証した。

#### (2) 肺胞オルガノイドの作成と細胞老化誘導

マウス肺より型肺胞上皮細胞(AT2)を単離培養し、肺胞オルガノイドとして *in vitro* で肺胞上皮様組織を作成した。またそこに BLM を作用させ細胞老化を誘導した。

#### (3) *in vitro* 肺線維症モデルの確立とメカニズムの解析

老化誘導した肺胞オルガノイドと肺線維芽細胞を共培養し、老化 AT2 が、直接的に線維芽細胞を SMA(*Acta2*)陽性の筋線維芽細胞へと分化させるプロセスを再現した。またその分子メカニズムに迫った。

#### (4) ヒト AT2 におけるバリデーション

ヒト肺より AT2 を単離培養し、マウスで見られた現象がヒトでも保存されているのか検証した。

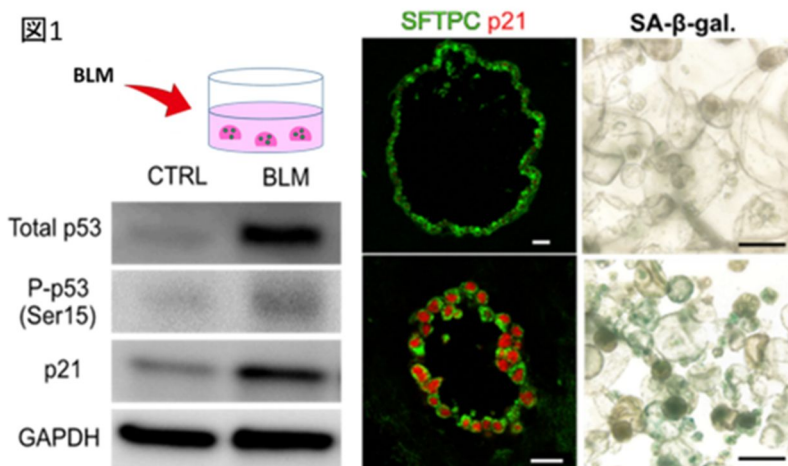
### 4. 研究成果

#### (1) 線維化肺における主たる老化細胞種の同定

既存 transcriptome データセットの再解析を行うと、ヒト線維化肺において上皮細胞で代表的な老化マーカーである p53 シグナルが活性化していた。またマウス BLM モデルにおいても、AT2-lineage 細胞で p53 シグナルの顕著な活性化とその下流因子 p21 の高発現を認めたことから、線維化肺における主たる老化細胞は肺胞上皮細胞、特に AT2-lineage 細胞であると結論づけた。

#### (2) 肺胞オルガノイドの作成と細胞老化誘導

AT2-lineage 細胞をマッキングできる *Sftpc-creERT2; Rosa-mTmG* マウスラインを用いて、そこから FACS で AT2(GFP+) を単離し、三次元培養法にて feeder-free 環境で肺胞オルガノイドを作成した。そこに BLM を作用させたところ、*in vivo* 同様、p53 シグナルの活性化を確認でき、また染色では Senescence-associated -gal. 陽性も確認されたことから、細胞老化の再現に成功した(図1)。



#### (3) *in vitro* 肺線維症モデルの確立とメカニズムの解析

肺線維化の代表的指標となる筋線維芽細胞の誘導を簡便に可視化するため、*Acta2-DsRed* マウス由来の肺線維芽細胞(PDGF $\alpha$  +DsRed-)を単離し、これを老化誘導後の肺胞オルガノイドと共培

養した。その結果、オルガノイド周囲に DsRed 陽性となった筋線維芽細胞を確認できたことから、炎症細胞を介在せずに傷害を受けた AT2 が直接筋線維芽細胞を誘導できることを明らかにした (図 2)。またこの反応は p53 のコンディショナルノックアウト (CKO) マウス (*Sftpc-creERT2; Trp53-flox/flox*) 由来の AT2 を用いた場合には抑制された。さらに遺伝子解析や、TGF 活性化因子である Integrin V 6 中和抗体を用いた実験結果から、AT2 由来の活性化 TGF が筋線維芽細胞の直接誘導因子であることがわかった。一方、AT2 における TGF シグナルを抑制する

*Tgfbr2*-CKO マウス (*Sftpc-creERT2; Tgfbr2-flox/flox*) を用いた場合にも共培養の反応は抑制され、逆に AT2 に TGF を作用させた場合には筋線維芽細胞誘導がより促進されることから、AT2 由来の TGF はオートクラインとして AT2 に作用し、その筋線維芽細胞誘導能をさらに増強するといった positive feedback ループを形成していることが示唆された。これらの結果と一致して、*in vivo* において、AT2 特異的 p53-CKO、*Tgfbr2*-CKO マウスいずれでも BLM 誘導性の肺線維化が軽減されることがわかった。

#### (4) ヒト AT2 におけるパリエーション

マウスにおける実験系をベースとして、ヒト正常肺から単離した AT2 の三次元培養及び肺線芽細胞との共培養を行った。その結果、マウス同様、ヒト AT2 においても BLM 刺激に伴う p53 シグナルの亢進 (図 3) と筋線維芽細胞誘導能の獲得 (図 4)、ならびに AT2 自身への TGF 刺激による筋線維芽細胞誘導能の増強を確認できた。

図 3

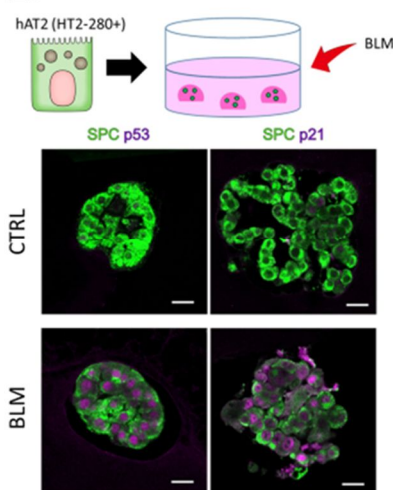
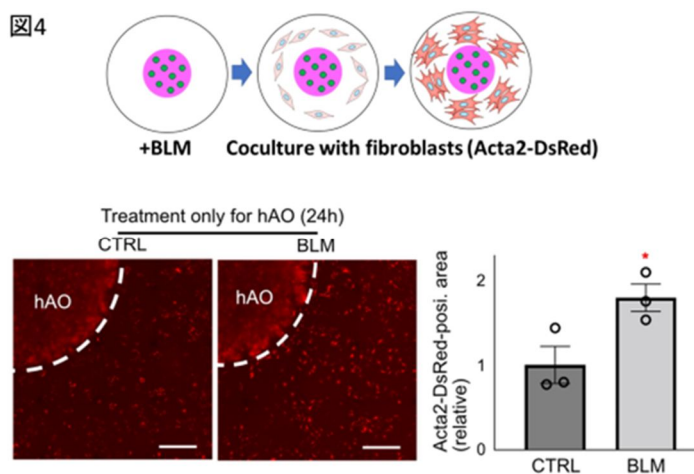


図 4



以上の結果により、炎症非依存的な環境下で、傷害を受けた AT2 がいかにして肺線維化を誘導するのか、そのプロセスを *in vitro* で再現・可視化し、その分子病態メカニズムを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Enomoto Yasunori, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Autocrine TGF- $\beta$ positive feedback in profibrotic AT2-lineage cells plays a crucial role in non-inflammatory lung fibrogenesis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 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 -

1. 著者名 Takashi Fujimura, Enomoto Yasunori, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identifying a Lung Stem Cell Subpopulation by Combining Single-Cell Morphometrics, Organoid Culture, and Transcriptomics.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells	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） 10.1093/stmcls/sxad044	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 Aoshima Yoichiro, Enomoto Yasunori, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Metformin reduces pleural fibroelastosis by inhibition of extracellular matrix production induced by CD90-positive myofibroblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 12318 ~ 12337
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎本 泰典
2. 発表標題 肺胞オルガノイドを利用した免疫非依存的肺線維化誘導プロセスの解明
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------