

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08208

研究課題名（和文）気道上皮細胞による気道軟骨/平滑筋の恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of airway cartilage and smooth muscle balance by epithelial cells

研究代表者

田所 友美（Tadokoro, Tomomi）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20507644

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）：気道組織は軟骨と平滑筋が組み合わさり、管の強度を保つと同時に管の太さを調節可能である。我々は気道の発生や維持機構に気道上皮幹細胞のヘテロジェネイティが果たす役割を示唆した（Tadokoro et al., Biol Open, 2021）。この知見を元に、Mstnが気道上皮で欠失するマウス（ck0）を作製し、気道軟骨や気道平滑筋形成に対する影響について検討を行った。その結果、Mstnのck0マウスにおいて気道軟骨の形成不全が認められ、Cリング間の距離が有意に増加した。また、平滑筋の幅に有意な増加が認められた。以上より、上皮-間葉相互作用による気道形成メカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により気道上皮細胞からのシグナルによる気道軟骨/気道平滑筋の分化調節メカニズムの一部について明らかにすることができた。気管間葉系の維持機構の破綻は、気管軟化症などで見られる軟骨の強度低下や、喘息などで見られる平滑筋量の増加または平滑筋の収縮制御異常などが挙げられ、気道の適切な構造が保てずに気管の狭窄が生じる。本研究の成果を活かすことにより、将来的に上記病態の改善や気道の再構成の実現が期待される。

研究成果の概要（英文）：The outside of the airway is composed of a combination of cartilage and smooth muscle, which maintains the strength of the airway and allows for the regulation of the airway's thickness. We revealed the spatial heterogeneity in airway basal stem cells and suggested their roles in airway development and maintenance (Tadokoro et al., Biol Open, 2021). Among the genes expressed by basal stem cells, Conditional knockout mice (ck0) were generated by crossing airway epithelial-specific Cre mice with Mstn flox mice. Using these ck0 mice, we investigated the role of this gene in airway cartilage and smooth muscle formation. The results showed that airway cartilage was dysplastic in Mstn ck0 mice and an increase in the distance between the C-rings of the airway cartilage was evident. A significant increase in smooth muscle width was observed. In conclusion, we revealed a regulatory mechanism of airway formation by epithelial-mesenchymal interactions.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：上皮間葉相互作用 気道上皮幹細胞 気道軟骨 気道平滑筋

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞分野においては、スフィア形成アッセイと呼ばれる **in vitro 3D** 培養系を用いて様々な組織より組織幹細胞が同定され研究が行われてきたが、気道や肺の上皮細胞においてもこの手法を用いた培養系が確立されてきた。同時に、遺伝子改変マウスを用いて組織幹細胞に特異的なマーカーを発現した細胞の運命を追跡する **Lineage tracing** により、**in vivo** における気道や肺の組織幹細胞のダイナミクスが明らかとなってきた(1,2)。これらの研究によって、基底細胞が気道上皮の組織幹細胞として働いていることが明らかとなった。気道上皮においては、タバコ煙への曝露や喘息などの際に、杯細胞の過形成や基底細胞の扁平上皮異形成が見られる(3,4)。これは細胞外環境が基底細胞に影響を与えることで起こると考えられているが、組織幹細胞を支える周囲の細胞外環境 (**Niche**) に関しては、腸や皮膚などの先行分野と比較すると研究が遅れていた。

研究代表者は、気道上皮や肺胞上皮細胞の組織幹細胞生物学分野の第一人者である **Brigid Hogan** 教授 (**Duke** 大学メディカルセンター、米国) の研究室に留学し、基底細胞とそれ以外の細胞が作り出す細胞外環境との相互作用に着目して研究を行ってきた。気道上皮幹細胞の **3D** 培養系を用いたスクリーニング系を確立し、遺伝子改変マウスを用いた解析と組み合わせることにより、気道傷害にตอบสนองして気道上皮を裏打ちする間葉系細胞から分泌される **IL-6** が、基底細胞の **Stat3** 経路を活性化することで繊毛細胞へ選択的に分化させるよう制御していることを示した(5)。また、気道上皮が傷害を受けた際に、間葉系から **Bmp** シグナリングのアンタゴニストが放出されることで気道上皮幹細胞における **Bmp** シグナリングが一過性に抑制され、細胞増殖が促進されることを見出した(6)。このように気道上皮細胞の間葉系細胞による分化・増殖制御は研究されてきたが、気道の軟骨や平滑筋の増殖や分化を気道上皮細胞が制御しているという研究は、気管発生に関する研究が主であり既に形成された気管の間葉系の維持機構については研究が進んでいなかった(7,8)。気管間葉系の維持機構の破綻は、気管の気管軟化症などで見られる軟骨の強度低下や、喘息などで見られる平滑筋量の増加または平滑筋の収縮制御異常などが挙げられ、気道の適切な構造が保てずに気管の狭窄が生じる。このメカニズムを明らかにすることで、将来的に上記のような病態の改善や気道の再構成につながる知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

気道上皮細胞からのシグナルが気道軟骨や気道平滑筋の形成/維持にどのように影響を与えるか明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. 気道上皮に発現する気道軟骨・気道平滑筋調節因子のスクリーニング

気道の腹側と背側を分割し、気道上皮を **Dispase** で剥離した後、**NGFR** 陽性気道上皮幹細胞を **FACS** により各々から分離した。RNA-seq 解析を実施した後、背側と腹側で遺伝子発現に差異のある遺伝子群を抽出した(図 1A)。2 倍以上の差異があった遺伝子に対し、**DAVID** (<https://david.ncifcrf.gov/>) による GO 解析を行った(図 1B, C)。背側において特徴的に発現していた **KRT13** と気道上皮の繊毛細胞に発現している **acetylated tubulin** の Whole mount 免疫染色を行った(図 1D, E)。

3-2. 気道上皮特異的遺伝子発現ノックアウトマウスの作製

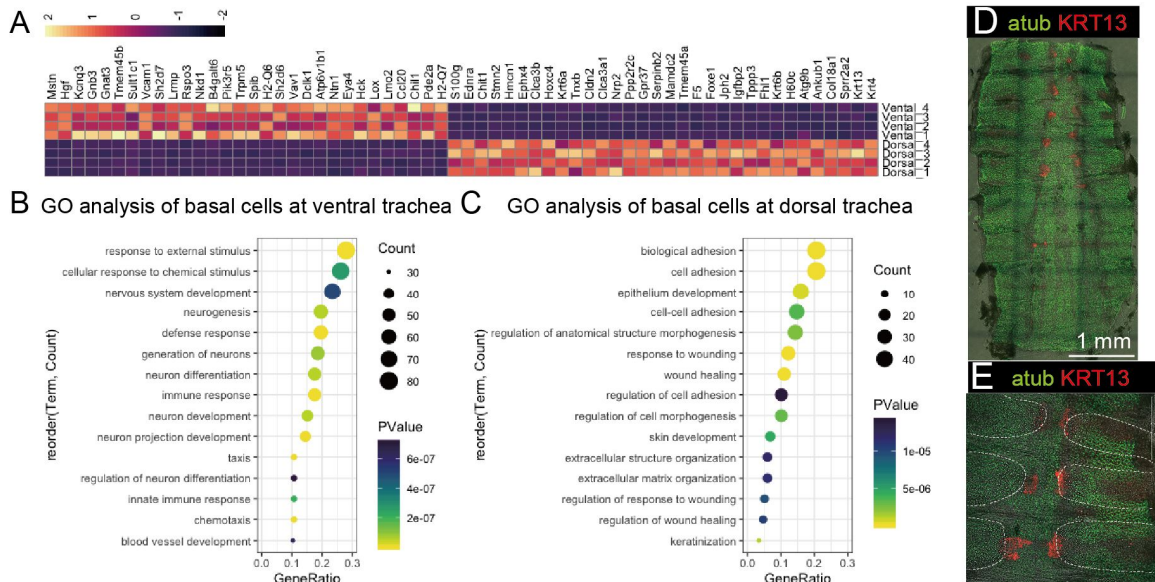
上記方法でスクリーニングされてきた遺伝子の中で、周囲の間葉系細胞に作用する可能性のある細胞増殖・分化因子の選択を行った。選択された遺伝子 (**Mstn**) について、時期や場所特異的な遺伝子ノックアウトができるよう **Mstn flox** マウスを作製し、**ShhCre** マウスと掛け合わせるにより気道上皮特異的な遺伝子発現ノックアウトマウスを作製し、気道軟骨および気道平滑筋の形成にどのような影響が生じるか検討を行った。具体的には、E17.5 の妊娠マウスより仔を回収し、気道を 4% PFA/PBS で固定した。その後、Wholemount 免疫染色を実施し、気道軟骨を **Sox9** 抗体で、気道平滑筋を **Smooth muscle actin (SMA)** 抗体で染色し、気道軟骨と気道平滑筋の形成について定量的評価を実施した。

4. 研究成果

まずは気道の軟骨に囲まれている腹側と気道平滑筋に裏打ちされている背側の気道上皮幹細胞において、どのような遺伝子発現の差異が生じているかについて、RNA-seq 解析を実施した。その結果、腹側の気道上皮幹細胞において筋肉の形成を阻害する働きをしている **Mstn** の発現が背側の気道上皮幹細胞と比較すると高発現していることが明らかとなった。その他に Gene ontology 解析によって、背側の気道上皮幹細胞において創傷治癒の能力が高いなどの特徴が見出されており、**in vitro** のオルガノイド培養や **in vivo** における気道上皮幹細胞のクローナルな細胞増殖評価系の結果を裏打ちする結

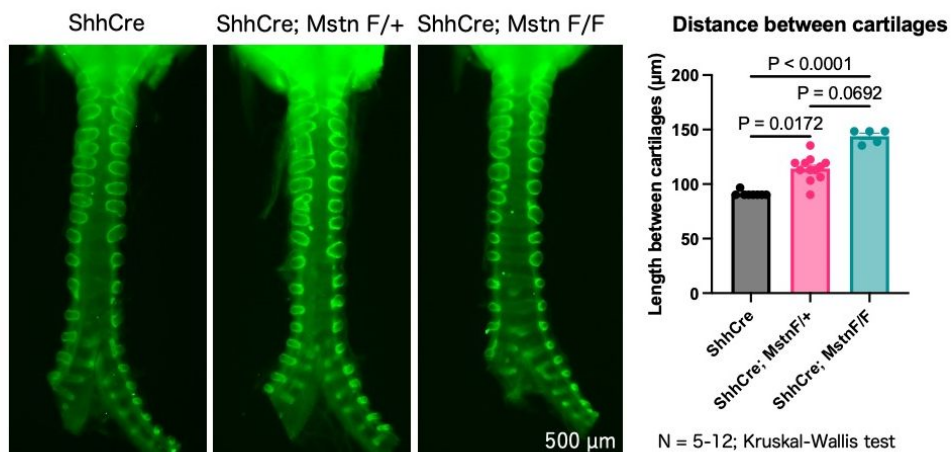
果であった。また、Krt13 陽性の特徴的な気道上皮幹細胞の Sub population が背側の気道平滑筋と気道軟骨の境目に存在していることを明らかにした。これらの成果について、2021年にBiology Open誌に報告した(9)。この気道上皮幹細胞 Sub population は、最近、Rajagopal らのグループにより気道傷害に対する耐性の高い気道上皮幹細胞群であることが報告されており、我々の報告も引用された(10)。

図 1. 気道上皮の背腹側における遺伝子発現の差異



次に、腹側背側の気道上皮幹細胞間で際のある遺伝子群の中から Mstn に着目し、Mstn flox マウスを理化学研究所との共同研究により作製した。ShhCre マウスとの掛け合わせにより、仔を得て、気道軟骨と気道平滑筋の解析を実施した。ShhCre; Mstn Flox/+ マウスは生殖も可能であった。その結果、気道上皮特異的に Mstn を欠損したマウス (ShhCre; MstnF/F) において、背側における気道軟骨 (Sox9 陽性、緑) 間の距離が有意に広いことが示された(図 2 グラフ)。この違いは、ShhCre マウスと ShhCre; MstnF/+ マウス間においても認められた。また、ShhCre マウスと比較すると、Sox9 陽性気道軟骨の形成がやや遅れている様子が観察された(図 2)。

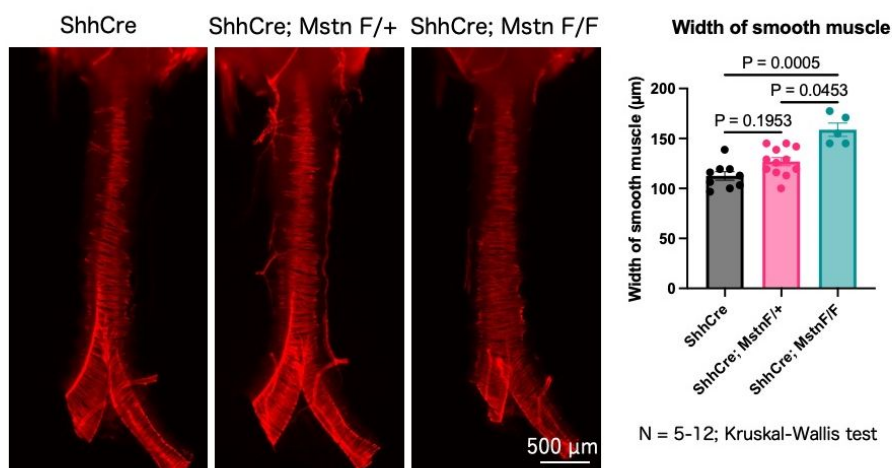
図 2. 気道上皮特異的Mstnノックアウトの気道軟骨形成に対する影響



同様に気道平滑筋について検討した結果、形態上の大きな変化は認められなかったが、気道上皮特異的に *Mstn* を欠損したマウス (*ShhCre*; *Mstn*F/F) において、気道平滑筋 (SMA 陽性、赤) の幅が有意に広いことが示された (図3グラフ)。この違いは *ShhCre* マウスと *ShhCre*; *Mstn*F/+マウス間においては認められなかったことから、気道平滑筋の形成にはある一定の *Mstn* 発現があれば大きな影響がない可能性が考えられた。*Mstn* 遺伝子は気道上皮幹細胞の腹側で多く発現していることが示されていたが、背側の気道平滑筋の形成にも影響を与えていたことは予想と異なる結果であった。

図 3

気道上皮特異的*Mstn*ノックアウトの気道平滑筋形成に対する影響



本研究より、気道上皮細胞からのシグナルが気道の間葉系細胞に作用し、気道軟骨、気道平滑筋の形成を制御しているメカニズムの一端について明らかにすることができた。

引用文献

1. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):12771-5.
2. Barkauskas CE, Crouce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest*. 2013 Jul;123(7):3025-36.
3. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and Moderate Asthma Is Associated with Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb 1;163(2):517-23.
4. Shaykhiev R, Zuo W-L, Chao I, Fukui T, Witover B, Brekman A, et al. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Jul 16;110(29):12102-7.
5. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BLM. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc*

Natl Acad Sci U S A. 2014 Sep 2;111(35):E3641-9.

6. Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D, Hogan BLM. BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. *Development*. 2016 Mar 1;143(5):764-73.
7. Hines EA, Jones M-KN, Verheyden JM, Harvey JF, Sun X. Establishment of smooth muscle and cartilage juxtaposition in the developing mouse upper airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 26;110(48):19444-9.
8. Hou Z, Wu Q, Sun X, Chen H, Li Y, Zhang Y, et al. Wnt/Fgf crosstalk is required for the specification of basal cells in the mouse trachea. *Development* [Internet]. 2019 Feb 11;146(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.171496>
9. Tadokoro T, Tanaka K, Osakabe S, Kato M, Kobayashi H, Hogan BLM, et al. Dorso-ventral heterogeneity in tracheal basal stem cells. *Biol Open* [Internet]. 2021 Sep 15;10(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/bio.058676>
10. Lin B, Shah VS, Chernoff C, Sun J, Shipkovenska GG, Vinarsky V, et al. Airway hillocks are injury-resistant reservoirs of unique plastic stem cells. *Nature*. 2024 May;629(8013):869-77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Koike Naoto, Tadokoro Tomomi, Ueno Yasuharu, Okamoto Satoshi, Kobayashi Tatsuya, Murata Soichiro, Taniguchi Hideki	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of the nervous system in mouse liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4254/wjh.v14.i2.386	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 Tadokoro Tomomi, Tanaka Keisuke, Osakabe Shun, Kato Mimoko, Kobayashi Hisato, Hogan Brigid L. M., Taniguchi Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dorso-ventral heterogeneity in tracheal basal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio058676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.058676	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
1. 著者名 Qiu Rong, Murata Soichiro, Cheng Chao, Mori Akihiro, Nie Yunzhong, Mikami Satoshi, Hasegawa Shunsuke, Tadokoro Tomomi, Okamoto Satoshi, Taniguchi Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 A Novel Orthotopic Liver Cancer Model for Creating a Human-like Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3997 ~ 3997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13163997	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 田所 友美、谷口 英樹	4. 巻 279
2. 論文標題 宇宙におけるヒト臓器創出研究の最新動向	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 602-607
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 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 田所 友美、谷口 英樹	4. 巻 28
2. 論文標題 微小重力を活用しヒト臓器を創る ~宇宙実験が開く新たな再生医学の扉~	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11378/organbio.28.147	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 Oba Takayoshi, Okamoto Satoshi, Ueno Yasuharu, Matsuo Megumi, Tadokoro Tomomi, Kobayashi Shinji, Yasumura Kazunori, Kagimoto Shintaro, Inaba Yutaka, Taniguchi Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 In vitro elastic cartilage reconstruction using human auricular perichondrial chondroprogenitor cell?derived micro 3D spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/20417314221143484	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0件

〔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
研究協力者	田中 啓介 (Tanaka Keisuke) (60747294)	東京情報大学・総合情報学部・准教授 (32515)	

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	Duke University			
----	-----------------	--	--	--