

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16127

研究課題名（和文）生後3週間におこる時期限局的肺胞ダイナミクスの実態解明

研究課題名（英文）The mechanisms for the temporal dynamics of myofibroblasts in postnatal alveologenesis

研究代表者

桂 廣亮（Katsura, Hiroaki）

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・研究員

研究者番号：00894411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生後の肺胞成熟期に時期限局的に出現する筋線維芽細胞の動態を分子レベルで明らかにすることを目的としている。まず、組織透明化技術と免疫染色法を最適化し、複雑な構造変化を伴う肺胞成熟過程の3次元解析を行った。さらに筋線維芽細胞に関するTgマウスを導入し、RNA-seq解析や系譜追跡を行ったところ、筋線維芽細胞は肺胞形成完了後にアポトーシスを起こして組織内から除去されることがわかった。また弾性繊維形成に異常を示すKOマウスを解析したところ、筋線維芽細胞の生残期間の明らかな延長が確認された。この結果は、筋線維芽細胞の生存には肺胞組織の弾性力や機械的刺激が関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のDOHaD仮説の提唱に見られるように、胎児期や幼少期の環境が生後にわたり健康状態に影響を与えることが知られている。呼吸器領域においては、新生児期に気管支肺異形成を経験すると、成人になって肺高血圧や慢性閉塞性肺疾患など他の呼吸器疾患のリスクが高くなることが報告されているため、正常な肺胞発生の細胞・分子レベルでの理解は重要な課題である。また本研究で着目している筋線維芽細胞は、肺線維症などの疾患とも関わりが深い。従って、本研究が目指す発生段階における秩序だった運命制御機構の解明は、筋線維芽細胞の異常を起因とする呼吸器疾患の治療の足掛かりになりうる重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the molecular mechanisms of the dynamics of myofibroblasts which appear only in a certain period during postnatal alveologenesis. First, I optimized tissue clearing and immunostaining techniques to perform a 3D analysis of the alveolar maturation process. Furthermore, I introduced new Tg mice for myofibroblast characterization and performed RNA-seq and lineage tracing, and found that my-fibroblasts undergo apoptosis and are eliminated from the tissue after the completion of alveologenesis. Analysis of KO mice that have a defect in elastin fiber formation showed a significant prolongation of myofibroblast survival. These results suggest that elasticity and mechanical stimulation of alveolar tissue may be involved in the fate determination of myofibroblasts.

研究分野：呼吸器再生

キーワード：肺胞 筋線維芽細胞 発生

1. 研究開始当初の背景

近年の DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説の提唱に見られるように、胎児期や幼少期の環境が生涯にわたり健康状態に影響を与えることが知られている。呼吸器領域においては、新生児期に気管支肺異形成 (Bronchopulmonary Dysplasia: BPD) を経験すると、成人になって肺高血圧や慢性閉塞性肺疾患など他の呼吸器疾患のリスクが高くなることが報告されているため、正常な肺胞発生の細胞・分子レベルでの理解が求められている。出生直後の肺胞は中隔形成という成熟過程によって小嚢構造が構築され、限られた空間における表面積を最大化して、効率的なガス交換を可能にする。この肺胞全域にわたる大規模な形態変化には、smooth muscle actin (SMA) 陽性の筋線維芽細胞が中心的な役割を担っている。SMA 陽性細胞は出生直後から肺胞内に出現し、肺胞成熟化が完了する生後 3 週間ごろまでに速やかに消失する。このような特徴的な動態を示すにも関わらず、その運命制御の分子メカニズムは全くわかっていなかった。申請者は、肺胞成熟過程の筋線維芽細胞の消失が健全な肺胞発生に必須だと考え、マウスをモデルに出生後 3 週間で起こる筋線維芽細胞の運命制御機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究課題では、生後の肺胞成熟過程における筋線維芽細胞の時期限局的な動態の分子メカニズムの解明を目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 肺胞組織は 3 次的に極めて複雑な形態をしており、一般的な薄切した組織切片では全体的な構造の理解が難しい。そこで、組織透明化技術と免疫染色を組み合わせ、コンピューター上で 3 次元再構築することで、肺胞成熟化過程と筋線維芽細胞の 3 次元での空間的パターン解析を行った。
- (2) SMA-CreERT2 トランスジェニックマウスを新たに導入し、出生後肺胞に出現する筋線維芽細胞の系譜追跡を行った。
- (3) 肺胞筋線維芽細胞の状態変化を解析するために、新たに導入した SMA 陽性細胞のレポーターマウス (Acta2-DsRed マウス) を使って筋線維芽細胞を継時的に単離し、RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。
- (4) 肺胞成熟過程における筋線維芽細胞の重要な役割として細胞外マトリックスの産生が挙げられる。中でも弾性繊維は呼吸により伸縮を繰り返す呼吸器において極めて重要である。筋線維芽細胞も弾性繊維も組織に収縮力を付与する役割があるが、弾性繊維形成が筋線維芽細胞の運命に与える影響は全くわかっていない。そこで、弾性繊維の形成不全を起こす Fibulin5 ノックアウトマウスを新たに作製し、筋線維芽細胞の動態を観察した。

4. 研究成果

- (1) 肺胞全体の構造を可視化するために、肺胞上皮細胞のレポーターマウスである Nkx2.1-membrane tdTomato マウスの肺を出生後いくつかのタイムポイントで固定し、CUBIC L/RA による透明化処理と Tropoelastin の免疫染色を行った。また筋線維芽細胞の局在と弾性繊維形成のパターンを可視化するために、Acta2-DsRed マウスでも同様の観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像を画像解析ソフト Imaris にて 3 次元再構築を行ったところ、肺胞中隔に局在する弾性繊維が発達していく様子 (図 1) や、弾性繊維が筋線維芽細胞に沿って形成される様子 (図 2) を可視化することが出来た。

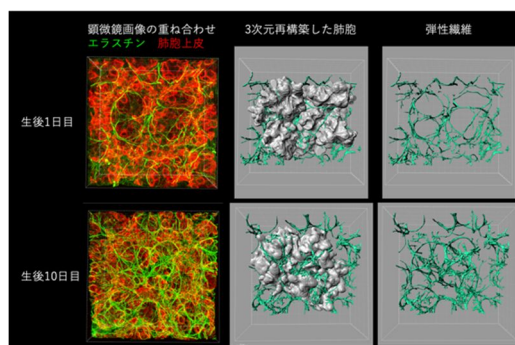


図 1. 肺胞発生の 3 次元解析

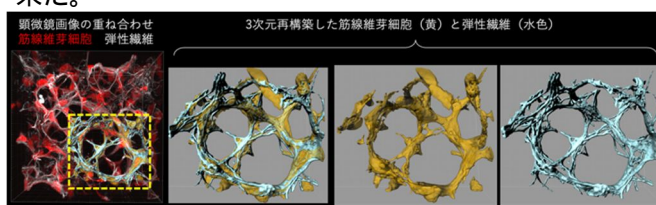


図 2. 弾性繊維と筋線維芽細胞の 3 次元解析

- (2) SMA 陽性細胞の系譜追跡を行うために、新たに導入した SMA-CreERT2 マウスを Ai9 マウスと交配した。タモキシフェンを生後 3 日目に注射し追跡したところ、生後 10 日目ではほとんどの筋線維芽細胞が lineage 陽性であることが確認できたが、生後 20 日目では lineage 陽性細胞そのものが消失していた。この結果は生後の肺胞に出現する筋線維芽細胞は、肺胞形成完了後に分化転換して SMA 陰性細胞として生残するのではなく、細胞そのものが肺胞から除去されていることを示している。
- (3) 生後の筋線維芽細胞の数がピークとなる生後 10 日目と消失途中である生後 15 日目において、Acta2-DsRed マウスより DsRed 陽性細胞を FACS を用いて単離し、RNA-seq を行った。解析の結果、生後 15 日目の細胞ではアポトーシス関連遺伝子の発現が有意に変動していることが示された。そこでカスパーゼ阻害剤である Ac-DEVD-CHO を生後のマウスに腹腔内投与したところ、筋線維芽細胞の生残期間の延長が見られた。またアポトーシスの誘導において重要な役割を担う Bax 遺伝子のノックアウトマウスを解析したところ、同様の生残期間の延長が確認できた。以上の結果から、筋線維芽細胞は肺胞形成が完了するとアポトーシスを起こして肺胞内から除去されていることが明らかとなった。

- (4) 新たに樹立したノックアウトマウスにて免疫染色を行い、目的遺伝子である Fibulin5 が発現していないことを確認した。生後継時的に肺を固定し、HE 染色による肺胞構造の観察と SMA の免疫染色による筋線維芽細胞の動態観察を行った。その結果、弾性繊維不全を呈するノックアウトマウスにおいても筋線維芽細胞は正常に発生し、生後 10 日程度まではコントロールマウスと比べて肺胞構造に大きな変化は見られなかった。しかし、筋線維芽細胞が消失していくにつれてノックアウトマウスでは肺胞構造が壊れ始め、肺気腫様の表現型を示すことがわかった(図 3)。この結果は、正常な肺胞形成において、まず筋線維芽細胞が中隔構造を作り、そこに弾性繊維が形成されることで筋線維芽細胞が除去された後も構造を維持できることを示している。また興味深いことに、コントロールマウスの肺胞で筋線維芽細胞が全く観察されない生後 20 日以降においても、ノックアウトマウスの肺胞では一部の筋線維芽細胞が生残していた(図 4)。この結果は、筋線維芽細胞の生存には肺胞組織の弾性力や機械的刺激が関与している可能性を示唆している。

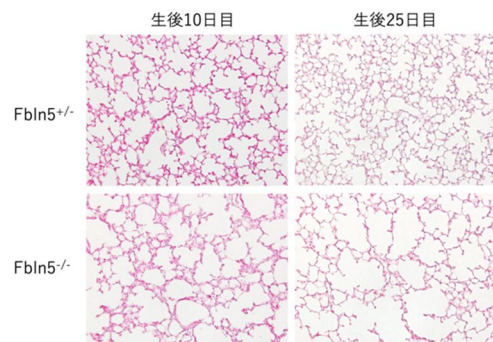


図 3. Fbln5 KO マウスの生後の肺胞形成

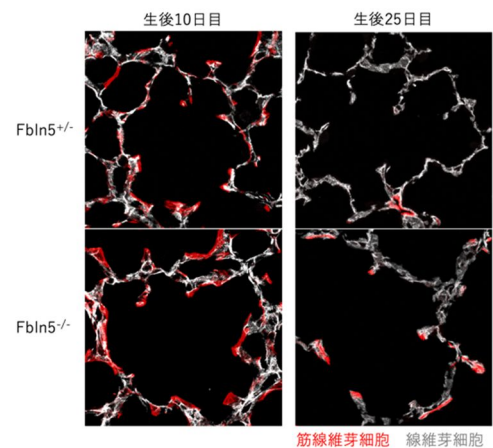


図 4. Fbln5 KO マウスの筋線維芽細胞の動態

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------