

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20654

研究課題名（和文）気管幹細胞におけるミトコンドリアダイナミクスの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Role of Mitochondrial Dynamics in Tracheal Stem Cells

研究代表者

野口 雅史（Noguchi, Masafumi）

和歌山県立医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50714870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア形態形成因子OPA1がどのように呼吸器幹細胞を制御するか、分子機構解明を目的とし研究を実施した。結果、OPA1欠損によるエピジェネティクス変化や線毛形成構造とミトコンドリアとの位置的相関を見出した。また、ミトコンドリア内膜因子が呼吸器遠位の肺胞形態形成に重要であることを発見、国内、国際学会において成果を発表した（特に、生体機能と創薬シンポジウム2023において優秀発表賞を受賞）。さらに、肺腺がんのEGFR阻害剤耐性へのOPA1の関与を示し論文公表（Cell Death & Disease, 2023）、OPA1の呼吸器上皮における重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、組織幹細胞におけるミトコンドリア機能の分子メカニズムを明らかにすることで、ミトコンドリアを標的とした組織幹細胞制御による組織再生促進医療の開発へと波及する可能性を秘めている。本成果で示唆されるミトコンドリア融合因子による呼吸器幹細胞の染色体修飾制御機構は、そのメカニズムの一端を明らかにしたものと考えられ、同作用点に注目した幹細胞制御法の確立に向けて前進したと考えられる。また、ミトコンドリアと線毛形成機構の位置的関与という細胞生物学分野における将来的な学術的新展開に貢献する可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：The study aimed to elucidate the molecular mechanisms by which the mitochondrial shaping factor OPA1 regulates respiratory stem cells. As a result, we identified epigenetic changes due to OPA1 deficiency and found a positional correlation between ciliary structures and mitochondria. Additionally, we discovered that mitochondrial inner membrane factors are crucial for alveolar morphogenesis. Our findings were presented at domestic and international conferences, particularly receiving the Outstanding Presentation Award at the Symposium on Biological Functions and Drug Discovery 2023. Furthermore, we demonstrated the involvement of OPA1 in EGFR inhibitor resistance in lung adenocarcinoma, publishing our findings in Cell Death & Disease (2023), thereby highlighting the significance of OPA1 in the respiratory epithelium

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 幹細胞 シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

定常時、気管上皮幹細胞である基底幹細胞 (Basal stem cells; BSCs) は低頻度の自己複製により自身の数量を維持し、線毛、粘液 (クラブ) 細胞への分化により気管上皮細胞種の数的バランスを維持する (Liberti and Morrisey, 2021, Trends in Molecular Medicine)。上皮損傷時に BSCs は急速に増殖、分化し上皮再生に寄与する。また慢性閉塞性肺疾患等の疾患では、BSCs の異常増殖、分化によりこの細胞種の数的バランスが崩れる。一方、細胞内代謝を担うミトコンドリアは、融合と分裂を繰り返す動的な細胞内小器官である。ミトコンドリアは形態変化 (ミトコンドリアダイナミクス) により、細胞内のカルシウム恒常性と古典的なシグナル経路を制御、組織発生や細胞分化を調節する (A. Kasahara et al., 2013, Science, M. Khacho et al., 2016, Cell Stem Cell)。特にミトコンドリア融合は、内膜 (クリステ) の GTPase タンパク質 OPA1 により制御される。OPA1 はクリステ構造を維持し、呼吸鎖酵素複合体を安定化、酸化リン酸化の効率化に寄与することでミトコンドリア呼吸を制御する。これまでに応募者は、OPA1 が気管幹細胞の維持や分化に関与することを見出したが、どのように OPA1 の下流シグナル経路が制御されるかは未解明である。すなわち、**ミトコンドリアに局在する OPA1 がどのように、ミトコンドリア外の自己複製、分化関連因子を制御するのであろうか**が、本研究の学術的「問い」である。

2. 研究の目的

本研究では、OPA1 下流のシグナル経路がどのように気管幹細胞の振る舞いを制御するか、核心となる分子機構を解明する。特に、ミトコンドリアとミトコンドリア外の幹細胞制御機構をつなぐ新規の“メディエーター分子”を見出す。

現在まで、呼吸器の組織幹細胞におけるミトコンドリアの役割は研究されておらず、本研究が初めてこの未踏領域に挑むものである。既に応募者は、OPA1 が気管幹細胞の振る舞いを制御することを新規に見出しており、OPA1 下流のシグナル経路の解明はさらにその先を行くものである。本研究では特に、呼吸器、ミトコンドリア双方の研究者が注目してこなかった、気管幹細胞のミトコンドリア代謝によるエピジェネティクス制御という分野横断的な領域に焦点を当てる。また気管幹細胞の線毛細胞分化に注目することで、応募者が独自に見出した、ミトコンドリア形態によるシグナル制御や、ミトコンドリア-線毛形成構造という新規の細胞内構造の相互作用に注目する。

さらに、ミトコンドリアダイナミクスと肺細胞の関連性を解明すべく、Gefitinib 耐性肺腺がんに関する研究を併せて実施した。これまでにファースト・イン・クラスの OPA1 阻害剤 (MYLS22) を添加、投与することで、Gefitinib 耐性肺腺がん細胞においてアポトーシス活性が高まることを見出していたが、本研究ではその作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BSCs 特異的 OPA1 欠損マウス (OPA1cK0) を用いた、in vivo における OPA1 の役割の解明

OPA1 ノックアウトマウスは胎生致死だが、OPA1 flox マウスに *Krt5-Cre-ER^{T2}* マウスを交配することで、BSCs 特異的、時期特異的に OPA1 を欠損させ解析することができる。さらに BSCs に由来する細胞をラベルし細胞系譜を追跡するため、mito-YFP flox マウスを掛け合わせ、*Krt5-Cre-ER^{T2}; OPA1^{flox/flox}; mito-YFP^{flox/flox}* (OPA1cK0) を作成した。同マウスにタモキシフェンを投与することで、ミトコンドリア形態を観察しつつ OPA1cK0 BSCs の系譜を追跡できる。

同マウスを共同研究先のイタリア、パドヴァ大学 Scorrano 研究室より輸入し、繁殖を行った。

(2) OPA1KO BSCs の自己複製、分化欠損が histone lactylation の亢進によるか検証

OPA1KO 二次元培養法では培養上清 pH の変化がみられ、Lactate 産出亢進が示唆された。これは OPA1KO により、細胞呼吸がミトコンドリア呼吸から解糖系にシフトしたことを意味する。特に解糖系亢進による lactate 産生は、histone lactylation を誘導し、創傷治癒に関与する因子群の発現を制御することが報告されている (Zhang et al., Nature, 2019)。そこで、Scorrano 研究室より導入した tsBSCs 細胞株に、MYLS22 を投与、抗 L-lactyl lysine 抗体を用いて、histone lactylation 状態を検証する。もし、lactylation 状態が亢進していた場合、既報の histone lactylation 阻害剤を用いて、OPA1KO BSCs の自己複製、分化の欠損が回復するかを検証する。

(3) 成熟マウス気管上皮の線毛細胞及び BSC の 3 次元電子顕微鏡画像取得

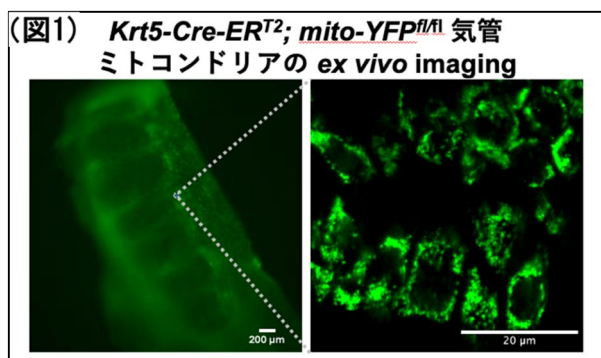
ミトコンドリアと線毛構造の位置的相互作用とその線毛形成機構への関与が推察された。しかしミトコンドリアと線毛基部構造の高解像な 3 次元的情報が欠落しており、両者の真の位置関係、形態が不明であった。そこで ABIS のご支援により、成熟マウス気管上皮の線毛細胞及び BSC の 3 次元電子顕微鏡画像取得 (array tomography 法) を行った。

(4) MYLS22 による Gefitinib 耐性肺腺がん細胞のアポトーシス活性変化の検証

MYLS22 によるアポトーシス誘導メカニズムを解明するため、アポトーシス誘導に必要な、ミトコンドリアクリステ内からの Cytochrome c 放出について免疫蛍光抗体染色法にて検証した。

4. 研究成果

(1) Scorrano 研究室より OPA1cK0 マウスの現所属への搬入に成功した。現在、自身が助成期間中に習得したマウス生殖工学を用いて、復元した少数マウスを元に、実験に供するに十分な数まで繁殖させている。さらに、繁殖過程で生まれた *Krt5-Cre-ER^{T2}; mito-YFP^{flox/flox}* マウスに対して、タモキシフェン投与を行い、mito-YFP が BSCs にて発現することを確認している (図 1)。このことから、本マウスの Cre-ERT2 システムが正常に機能することを明らかにし、最適なタモキシフェン濃度の設定が可能となった。

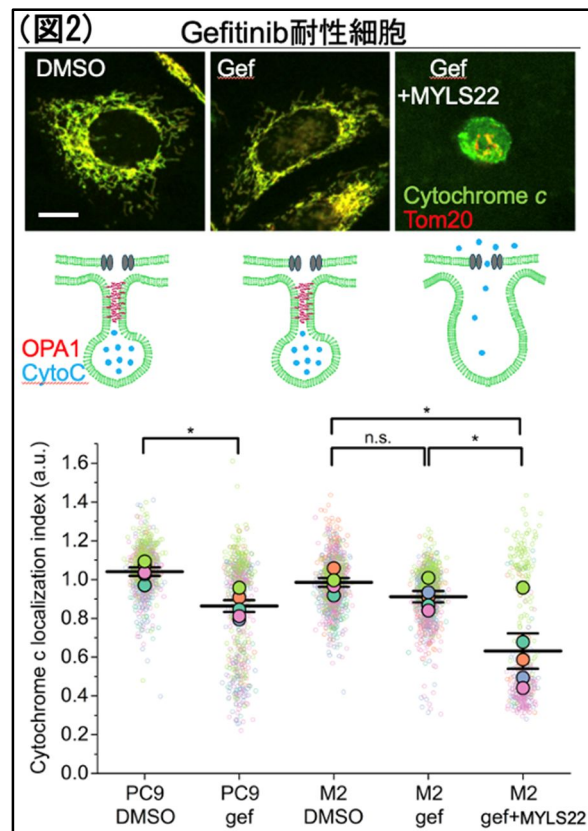


(2) tsBSCs 細胞株に、MYLS22 を 72 時間投与し、histone lactylation また histone acetylation を検出したところ、予想に反して histone lactylation また acetylation の両修飾が低下するという結果が得られた。Complex I の阻害剤である rotenone 添加により、両修飾が低下するという報告があるため、MYLS22 でも同様の現象が起きている可能性がある。本結果について、再

試を行い、実際にエピジェネティクスが変化したのか再検証を行う予定である。また、MYLS22 投与時間を変更、OPA1 の遺伝的 KO 株で検証を行うなど、他の方法も用いて再検証する。

(3) それぞれ apico-basal 方向の撮像に成功した。結果、線毛細胞の頂端部では、線毛基部近接領域にはミトコンドリアは観察されず、滑面小胞体が直近に、その下方にミトコンドリアは分布していた。また、線毛基底小体と接続する構造体にミトコンドリアが近接することを見出した。さらに、BSC における一次線毛の撮像に成功し、一次線毛基部の近接領域にはミトコンドリアが局在しないことも見出した (N=1)。次年度は、lateral 方向の array tomography を予定しており、複数の細胞で線毛構造とミトコンドリアの位置的关系性を見出す予定である。また、線毛構造形成過程等における一時的構造として、特異な関係がある可能性が否定できないことから、培養細胞系にてミトコンドリアー線毛形成構造近接アッセイ等のシステムを作製し、CLEM 観察を試みる方向で検討する。

(4) Gefitinib 耐性細胞に MYLS22 と gefitinib を同時に投与することで、Cytochrome *c* がミトコンドリアから放出された。また、MYLS22 は単独で添加しても、Cytochrome *c* はミトコンドリアから放出されなかった(図2)。これらのことから、MYLS22 はミトコンドリアからの Cytochrome *c* の放出を促すことで、Gefitinib 耐性肺腺がん細胞のアポトーシス活性を高めるという作用機序が明らかとなった。本発見について、Noguchi et al., 2023, Cell Death and Disease にて公表した[1]。



[1] M. Noguchi, S. Kohno, A. Pellattiero, Y. Machida, K. Shibata, N. Shintani, T. Kohno, N. Gotoh, C. Takahashi, A. Hirao, L. Scorrano, A. Kasahara, Inhibition of the mitochondria-shaping protein Opa1 restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma-resistant cell line, Cell Death Dis 14 (2023) 241. 10.1038/s41419-023-05768-2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Noguchi Masafumi, Kohno Susumu, Pellattiero Anna, Machida Yukino, Shibata Keitaro, Shintani Norihito, Kohno Takashi, Gotoh Noriko, Takahashi Chiaki, Hirao Atsushi, Scorrano Luca, Kasahara Atsuko	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of the mitochondria-shaping protein Opa1 restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma-resistant cell line	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-023-05768-2	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 Noguchi M, Scorrano L	4. 巻 load015
2. 論文標題 Mitochondrial cristae: lung cancer metabolism architects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Metabolism	6. 最初と最後の頁 load015
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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiko Iwata, Yusuke Onaka, Masafumi Noguchi, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani
2. 発表標題 Long-term social impairment in an animal model of cancer survivors
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masafumi Noguchi, Keiko Iwata, Norihito Shintani, Luca Scorrano
2. 発表標題 Exploring the role of mitochondrial dynamics in tracheal basal stem cells.
3. 学会等名 Redox Week in Sendai 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口 雅史, 松尾 若菜, 宇佐美 悠, 岩田 圭子, 原 さとみ, 橋本 均, 新谷 紀人
2. 発表標題 ミトコンドリア局在タンパク質p13欠損マウスにおける脳の奇形
3. 学会等名 第142回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 さとみ , 植野 寛貴 , 野口 雅史 , 岩田 圭子 , 橋本 均 , 新谷 紀人
2. 発表標題 ミトコンドリア蛋白質p13欠損マウスはホルモンの異常により白色脂肪組織量が減少する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masafumi Noguchi, Susumu Kohno, Anna Pellattiero, Yukino Machida, Keitaro Shibata, Norihito Shintani, Takashi Kohno, Noriko Gotoh, Chiaki Takahashi, Atsushi Hirao, Luca Scorrano, Atsuko Kasahara
2. 発表標題 Inhibition of the mitochondrial shaping protein OPA1 restores lung adenocarcinoma cells sensitivity to gefitinib.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiko Iwata, Hideo Matsuzaki, Masafumi Moguchi, Norihito Shintani
2. 発表標題 Exploring the novel role of mitochondria dynamics in neuron and oligodendrocyte differentiation.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口 雅史、松尾 若菜、宇佐美 悠、岩田 圭子、原 さとみ、橋本 均、新谷 紀人
2. 発表標題 ミトコンドリア局在タンパク質p13欠損マウスにおける頭蓋骨形成異常
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
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
---------	---------