

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689044

研究課題名(和文) 気道上皮細胞の分化プログラムと数量的バランス制御の解明

研究課題名(英文) Analyzing Differentiation Programs and Population Regulation of Airway Epithelial Cells.

研究代表者

森本 充 (Morimoto, Mitsuru)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生総合科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70544344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円、(間接経費) 5,730,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、呼吸器の発生の基本原理を解明するため、気道上皮組織における3つの主要細胞種の分化プログラム、数量的バランス制御機構の解明を行なった。発生中の気道上皮においてNotch2が線毛細胞分化を抑制してクララ細胞分化を誘導すること、さらにNotch1,2,3が共役して神経内分泌細胞(NEC)クラスターのサイズを制御していることを明らかにした。また胎児期のNECを被っている新規のSSEA-1陽性のSPNC細胞を発見し、この細胞種がNECクラスターのサイズ制御に機能する可能性を見いだした。気道上皮細胞の初代培養系を使った線毛細胞分化誘導系を利用して、線毛細胞の分化プログラムの解明に挑戦した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to decipher the principal mechanism of lung organogenesis by investigating cell differentiation programs and population balance regulations among airway epithelial cells. We determined that Notch2 promotes Clara cell differentiation by suppressing the ciliated cell program, and Notch1, 2, 3 cooperate in size regulation of neuroendocrine cell clusters. We further identified a novel cell population SPNC cell and proposed an idea that these SPNC cells regulate the size of the NEC clusters. On the other hand, transcriptome analysis for primary culture cells of tracheal epithelium revealed the differentiation program of ciliated cells from the basal cell type progenitors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：発生学 Notchシグナル 呼吸器

1. 研究開始当初の背景

呼吸器の発生・再生に関する研究が徐々に盛んになり、関連する遺伝子が明らかになりつつあった。我々は気道上皮細胞種間の数量的バランスが呼吸器の生理的・病理的機能に深く関わると考え、各気道領域によって異なる数量的バランスで特殊化細胞が出現し、維持されるメカニズムの解明を目指していた。そして、我々を含む複数のグループが、呼吸器の発生過程で Notch シグナルが線毛細胞の分化を抑えてクララ細胞を誘導していることを明らかにした (Morimoto et al., J Cell Sci. 2010)。

2. 研究の目的

本研究では、呼吸器の発生・再生の基本原則を解明するため、近距離細胞間の情報伝達経路である Notch シグナルの役割に注目し、気道上皮組織における線毛細胞、クララ細胞、神経内分泌細胞の分化プログラム、数量的バランス制御機構を解明することを目的とした。当時の予備実験から、我々は胎児肺の神経内分泌細胞が、未分化細胞マーカーである SSEA-1 抗原陽性細胞に囲まれていることを発見した。そしてこの細胞種を SPNC 細胞と名付けた。Notch シグナルが完全に欠損した気道上皮では、この SPNC 細胞が消失していることを発見した。さらなる解析により、この Notch シグナル完全欠損の上皮では、上記の線毛細胞増加に加えて神経内分泌細胞の著しい過形成が観察された。これらの予備実験をふまえ、我々は神経内分泌細胞が Notch シグナルを介して SPNC 細胞を維持し、SPNC 細胞は神経内分泌細胞の増加を抑制することでお互いの数量的バランスを決めるネガティブフィードバックを形成していると仮説を立てた。具体的に以下の3項目を研究目的として定めた。

- (1) 神経内分泌細胞-SPNC 細胞間の Notch シグナルを介した相互作用と、それによる両細胞の数量的バランス制御機構をマウス個体で解明
- (2) SPNC 細胞の機能をマウス個体で検証
- (3) 線毛細胞とクララ細胞の分化過程におけるトランスクリプトームの変化を解明

3. 研究の方法

正確かつ詳細な理解のため、マウス個体を使った遺伝学的解析と、細胞分化過程のトランスクリプトーム解析を平行して行なった。具体的にマウス個体解析では Notch1, 2, 3 レセプターの個別、もしくは複数欠損マウスの作成や、Notch シグナルの過剰活性化解析を行った。さらに、SPNC 細胞の機能解析のために *Upk3-STOPflox-DTA* マウスを新たに作成した。初代培養細胞を用いた解析では、基底細胞型の気管上皮幹細胞が線毛細胞へ分化する過程の分化プログラムを、次世代シーケンサーを用いた deepCAGE 法で全体像を把握する事を試みた。

4. 研究成果

(1) 神経内分泌細胞-SPNC 細胞間の Notch シグナルを介した相互作用と、それによる両細胞の数量的バランス制御機構をマウス個体で解明するため、Notch シグナルを完全に失う Notch1,2,3 トリプルノックアウトマウス (TriNKO) を作成した。TriNKO の肺は神経内分泌細胞のクラスターが著しく大きくなるとともに、SPNC 細胞が消失していた (図 1)。

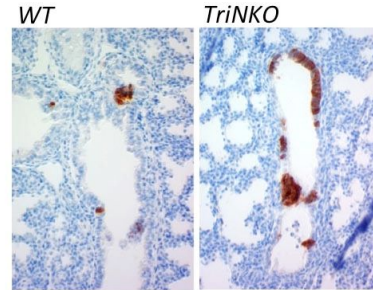


図1 TriNKO肺では神経内分泌細胞クラスターが大きくなる

SPNC 細胞の維持に Notch シグナルが必須であること、SPNC 細胞の出現が神経内分泌細胞のクラスターサイズ制御に必須であることが分かった。次に気道上皮で Notch 活性が過剰に誘導されるトランスジェニックマウス *SP-C-rtTA, TetO7-Cre, Rosa-NIICD* マウスを作成したところ、今度は逆に SPNC 細胞が増大し、神経内分泌細胞の著しい減少が観察された。SPNC 細胞の誘導に Notch シグナルが必要充分であり、過剰な誘導が神経内分泌細胞に対してネガティブな効果があることが分かる。さらに神経内分泌細胞が消失する *Mash1 KO* マウスを解析した所、SPNC 細胞も居なくなっていた。この結果は SPNC 細胞の数とユニークな局在を誘導しているのは神経内分泌細胞が発現する Notch リガンドであることを示唆していた。また、SPNC 細胞が消失する TriNKO の表現型は Notch1, 2, 3 それぞれのシングル、ダブルノックアウトでは再現されなかったことから、Notch1, 2, 3 の3種が共役して SPNC 細胞、そして神経内分泌細胞クラスターのサイズを制御していることが明らかになった。

(2) SPNC 細胞の機能をマウス個体で検証するために、SPNC 細胞を選択的に標識、操作できるトランスジェニックマウスの作成に取り組んだ。この研究は思いのほか難航した。原因は、当初計画していた SSEA-1 抗原の合成に関わる酵素の同定ができなかったことが大きい。そんな中、SPNC 細胞が発現するマーカー遺伝子 *Upk3* が他のグループから発表された。我々も自分たちでこのことを確認した (図 2)。この結果を踏まえ、SPNC 細胞の細胞系譜追跡と同細胞の選択的な除去の両方ができる遺伝子改変マウス *Upk3-STOPflox-DTA* の作成に取り組み、成功した。

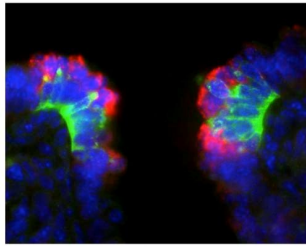


図2 神経内分泌細胞クラスター（緑）の周辺細胞がUpk3a遺伝子（赤）を発現している様子をRNA probe+抗体で二重染色した。神経内分泌細胞を覆うSPNC細胞でUpk3a遺伝子が発現しているのが分かる。

このマウスとタモキシフェン（Tmx）誘導により気道上皮細胞にCre組み替え活性を誘導できる *Nkx2.1-CreERT2* マウスとかけ合わせた。妊娠中にTmxを注射することで、*Upk3* 遺伝子を発現する SPNC 細胞を DTA の毒素によって選択的に除去する事を試みた。肺を回収し、免疫染色により SPNC 細胞の顕著な減少を確認できた。現在、神経内分泌細胞の分布の解析を行っている。この結果を解析し、SPNC 細胞の神経内分泌細胞への作用を解明する予定である。

(3) 線毛細胞とクララ細胞の分化過程におけるトランスクリプトーム変化の解明のために、気管上皮細胞の初代培養技術を応用した。この初代培養系は大変ユニークで、基底細胞型の未分化な前駆細胞が、成熟した気管上皮細胞へ分化する過程を培養皿上で再現できる。さらに、通常 30~50%の初代培養細胞が線毛細胞へ分化するが、我々は Notch シグナルを薬理的に抑制する事で全体の 95%以上という高効率で繊毛細胞を誘導する培養手法を確立していた。この高効率線毛細胞誘導系を利用して、線毛細胞の分化プロセスを明らかにしようとした。培養している前駆細胞に分化誘導を行い、線毛細胞が確立するまでの4日間で 17 タイムポイントのサンプルを回収し、理化学研究所オミックス領域の協力のもと、次世代シーケンサーを用いた deepCAGE 法によるトランスクリプトーム解析を行った（図3）。

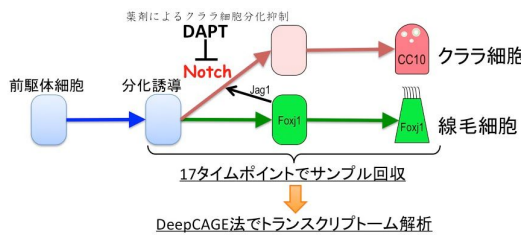


図3 実験計画の概略。気道上皮細胞の初代培養を利用して、先駆体細胞から線毛細胞が分化していく過程の分化プログラムを解析した。

解析は現在も続けており、線毛細胞分化の制御因子の候補が上がってきている。また、今回の解析結果は理研オミックス領域の主導する FANTOM5 プロジェクトの一環として Nature 誌 (Vol. 507, 462-470) に掲載された論文に貢献した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 2件)

The FANTOM Consortium (研究代表は 261 人中第 152 著者). "A promoter-level mammalian expression atlas" Nature, 査読有, Vol. 507, 2014, pp462-470 DOI:10.1038/nature13182

Mitsuru Morimoto, Ryuichi Nishinakamura, Yumiko Saga, Raphael Kopan. "Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells" Development, 査読有, Vol.139, 2012, pp4365-4373. DOI:10.1242/dev.083840

[学会発表](計 21件)

森本充, 「呼吸器はどこからやってくる? ~発生学に見る気道の成り立ち~」第40回難治性気道疾患研究会特別講演, 2014/2/1, 東京

Mitsuru Morimoto, 「Different Notch receptor-ligand combinations cooperate in epithelial patterning during lung organogenesis.」第36回分子生物学会年会ワークショップ, 2013/12/12, 神戸

Keishi Kishimoto, Mitsuru Morimoto, 「The mechanism of trachea enlargement」第36回分子生物学会年会ポスター発表, 2013/12/12, 神戸

Masafumi Noguchi, Mitsuru Morimoto, 「Three dimensional imaging of bronchial bifurcations with single-cell-resolution.」第36回分子生物学会年会ポスター発表, 2013/12/12, 神戸

森本充, 「呼吸器の機能を支える気道上皮細胞の分布パターン決定機構~呼吸器発生研究の最前線~」日本肺サーファクタント・界面医学会 2013/11/16, 新宿

森本充, 「呼吸器上皮細胞の適切な空間配置は Notch シグナルによって調整される」日本遺伝学会第85回大会ワークショップ 2013/9/19, 横浜

森本充, 「呼吸器の機能を支える気道上皮細胞の分布パターン決定機構」第1回 Tubulology 研究会(新学術領域研究 上皮管腔組織形成 若手の会) 2013/8/25, 東京

Mitsuru Morimoto, 「Two types of Notch signaling coordinate in epithelial patterning during lung organogenesis.」第35回分子生物学会年会ワークショップ 2012/12/12, 福岡

Mitsuru Morimoto, 「Two Modes of Notch Signaling Coordinate the Distribution of the Major Bronchial Clara, Ciliated.」Keystone Symposia Lung

Development, Cancer and Disease,
2013/2/6, New Mexico USA.

Mitsuru Morimoto, 「Two types Notch
signalings coordinate the three major
epithelial cell types in the airways.」
Asia Pacific Developmental Biology
Conference, 2012/10/6, 台北 台湾
森本充, 「呼吸器の機能を支える気道上
皮細胞のパターン形成」第22回日本数
理生物学会大会 2012/9/10, 岡山

Mitsuru Morimoto, “Two types Notch
signalings coordinate the three major
epithelial cell types in the
airways.” 第46回発生生物学会年会シ
ンポジウム, 2012/5/31 神戸

Mitsuru Morimoto, 「Two types Notch
signalings coordinate the three major
epithelial cell types in the airways.」
FASEB Science Research Conferences,
The Lung Epithelium in Health and
Disease 2012/3/31, New Hampshire
USA.

そのほか、日本呼吸器学会学術講演会、日京
都大学医学部内セミナー、東北大学 加齢医
学研究所セミナー等 8 件

〔図書〕(計 1 件)

Mitsuru Morimoto 他、Springer 社、”New
Principles in developmental processes:
Chapter 5, Building functional internal
organs from Naive endodermal sheet.” 2014,
55-68.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/lungdev/index-en.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森本 充 (MORIMOTO, Mitsuru)

独立行政法人理化学研究所 発生・再生総
合科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70544344