

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713029

研究課題名(和文) 気道上皮の多分化能細胞と組織構造の解析

研究課題名(英文) Multi-potential epithelial cells linked with branching airway structure.

研究代表者

森本 充 (Morimoto, Mitsuru)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・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) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では気管支分岐点の幹細胞-ニッチ複合領域 "NEB" の構成過程の解明と、NEB が含む分化多能性を持った細胞の分子動態解明を目的とする。新規Tgマウスの解析からNotch活性化細胞は細胞間作用でNE細胞数を抑制していないことが証明された。一方でマウス遺伝学解析からNotch-Hes1シグナルが発生初期の胎児肺でNE細胞の適度なNE細胞数の誘導に必要であった。さらに世界初のNE細胞の4Dライブイメージングに成功し、初期胎児肺の単独NE細胞は直線的に気管支分岐点まで移動し、集積してNEBになることを明らかにした。最後に胎児肺からのNE細胞を単離する技術の確立を確立し、遺伝子発現解析を実行した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to elucidate the developmental process of the stem cell - niche complex tissue "NEB" at the bronchial branch point, and elucidate the molecular dynamics of the tissue stem cells contained in NEB. Our new transgenic mice demonstrated that Notch-activated cells surrounding NE cells do not reduce the number of NE cells by cell-cell contact. On the other hand, mouse genetic analysis revealed that Notch-Hes1 cascade coordinates the number of NE cells by suppressing the NE cell fate in the cell autonomous fashion in the early stages of development. Furthermore, we succeeded in 4D live imaging of developing NE cells using multiphoton-microscopy in being the first in the world, and illustrated that solitary NE cells in the early fetal lung directionally migrate to the bronchial branch point to form NEBs. Finally, we established the technique to isolate NE cells from fetal lung and conducted a micro array analysis.

研究分野：呼吸器発生遺伝学

キーワード：呼吸器上皮 組織幹細胞 枝分かれ構造 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

i) 気道上皮細胞の分化プログラムとお互いの数量的バランスは厳密に制御されている。

日本人癌死の1位である肺がん、特に原発性肺の9割が気管-気管支-細気管支(以下、気道と総称)に由来するとされ、その発症機序は上皮細胞の分化増殖機構と密接に関与している。喘息やCOPDのような呼吸器慢性疾患では、上皮における粘液細胞の増加が粘液過分泌を引き起こし症状が悪化する。正常な上皮細胞分布の獲得、維持が健全な呼吸機能に必須である。気道の上皮組織は複数の細胞種から構成されるが、すべて共通の幹細胞より発生する(Perl et al., *PNAS* 2002, Rawlins et al., *Development* 2009)。発生過程でこの幹細胞は伸長中の気道の先端(肺芽)に局在し、気道の各領域の違いにより異なったバランスで各細胞を分布させる。近年、呼吸器の発生・再生に関する遺伝子が徐々に明らかになってきた(Morrissey & Hogan, *Dev Cell* 2010)。

申請者はこれまで、隣接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、気道上皮における線毛細胞、クラブ細胞、神経内分泌細胞(以下、NE細胞)の分化プログラムと数量的バランス制御機構の解析を行ってきた。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ブ細胞分化を誘導すること、さらに Notch1,2,3 が共役して NE 細胞クラスターのサイズを制御していることをマウス個体で明らかにした。この解析過程で、NE 細胞のクラスターサイズを制御する新規の Notch 活性化型細胞種”SPNC 細胞”を発見した。そして Notch1,2,3 遺伝子座を段階的に減少、もしくは過剰発現させることで、上記の4細胞種の数量バランスを *in vivo* で操作することに成功した。現在のところ、成体の呼吸器には5種類の組織幹細胞の存在が推定されている

(Review Liu and Engelhardt, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008)。本研究では、そのなかでも小細胞がんに関わりの深い幹細胞とその微小環境(ニッチ)の複合領域”Neuroendocrine body (以下、NEB)”に注目する。NEB は気管支の分岐点に存在するユニークな領域であり、呼吸器の幹細胞研究において早期にマウスで発見され良く認知されている(Hong et al. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2001)。NEB の中心に居る NE 細胞と、隣接する vClara 細胞の両方が多分化能を持った細胞種だと推定されている(図1)。申請者の観察では、胎児の上皮細胞が分化する時には、NE 細胞は気管支上皮に点

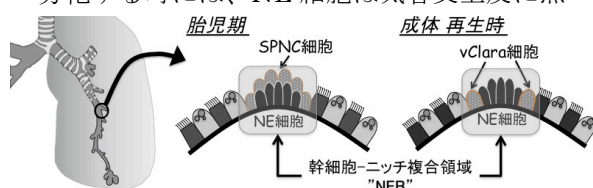
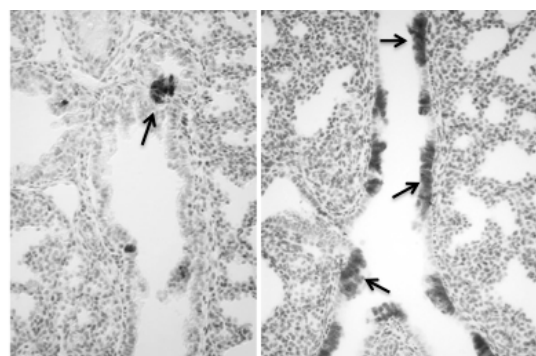


図 1

在する単独細胞として出現し、分岐点に限局しない。その後、NE 細胞はただちに分岐点に集積してクラスターを作り、NEB の一部になる。またクラスター化した NE 細胞が、SPNC 細胞に囲まれていることを発見した。そして Notch シグナルが完全に欠損した気道上皮では、SPNC 細胞が消失して、代わりに NE 細胞の著しい過形成が観察された(図2)。さらに同時期に他の研究グループから、この SPNC 細胞が vClara 細胞と良く似た、分化多能性を秘めた細胞種であることが示された(Guha et al., *PNAS* 2012)。これらの結果は、①気管支の分岐点に幹細胞が集積し易いこと、②NE 細胞はリガンド発現により SPNC 細胞の Notch シグナルを維持し、SPNC 細胞は NE 細胞の数を抑えて、お互いの数量的バランスを決める仕組みがあることを示唆していた。



野生型

Notch1,2,3  
トリプルKO肺

図 2

2. 研究の目的

本研究では、呼吸器の発生・再生の基本理を理解するため、呼吸器の組織幹細胞の成り立ちとその周辺環境に注目した研究を行う。特に気管支分岐点の幹細胞-ニッチ複合領域”NEB”の構成過程の解明と、NEB が含む分化多能性を持った細胞の誘導メカニズムの解明を目的とする。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トランスクリプトーム解析を平行して行なう。将来的に幹細胞/細胞分化の基礎研究から疾患原因解明、新薬開発へと発展させるために個体-細胞-分子の連動的解析の研究基盤確立を目指す。

3. 研究の方法

気管支分岐点の幹細胞-ニッチ複合領域”NEB”の構成過程と、多分化能を維持する分子メカニズム解明のため、遺伝学解析では、先行研究で作成したトランスジェニックマウスを使って SPNC 細胞の選択的除去、もしくは単離を行い、SPNC 細胞による NE 細胞の数量制御メカニズムを解明する。また、分岐構造に立脚する NEB の形成過程を、胎児気管支中で3次元かつ動的に明らかにするた

め、多光子励起顕微鏡を使った 4D イメージングを行う。さらに NEB 領域に存在する細胞が多分化能を維持、もしくは再生を促進する因子の同定のために、発生・再生中の NE 細胞の遺伝子発現を平常時のものと比較する。

#### 4. 研究成果

我々は SPNC 細胞を蛍光標識すると共に薬剤誘導で選択的に死滅させるトランスジェニックマウス (*Nkx2.1-CreER<sup>T2</sup>; UPK3-mRFP-flxSTOP-DTA*) を作成した。このマウスを用いて、NE 細胞が拡大する胎児期 E14.5, E15.5 にタモキシフェンを注射し、SPNC 細胞を死滅させる実験を行った。E17.5 で肺組織を回収し、NE 細胞のクラスターサイズを観察した。その結果、NE 細胞の数に変化はなかった。SPNC 細胞は NE 細胞を細胞間相互作用で抑制しているわけではないことが証明された。そこで初期の胎児肺を詳細に解析したところ、NE 細胞は気道上皮で分化した時にはクラスターは作らず、多くの単独細胞として出現していることを発見した。また、Notch シグナル関連因子である *Hes1* をノックアウトすると、初期肺の単独 NE 細胞が単独ではなく細胞塊として現れた (図 3)。すなわち、Notch-*Hes1* シグナルは NE 細胞の過剰な分化を抑止することで適度な NE 細胞数の誘導に必要であることがわかった。

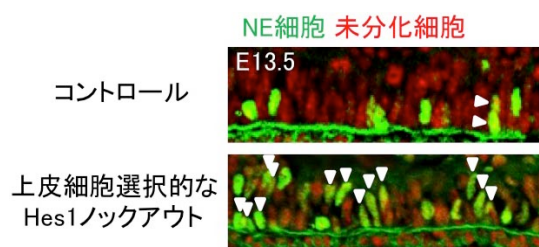


図 3

NE 細胞の発生過程を理解するためには胎児肺が成長する様子をリアルタイムで撮影する必要があった。胎児肺の臓器培養と多光子励起顕微鏡技術を組み合わせ、NE 細胞の 4D ライブイメージングに成功した (図 4)。画像解析から、単独 NE 細胞は直線的に気管支分岐点まで移動し、集積して NEB になる様子が見えた。NE 細胞が歩く様子を世界で初めて撮影に成功した。

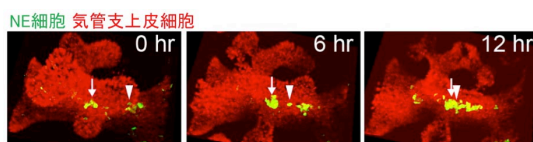


図 4

さらに、NEB の細胞が多分化能を維持できる原理、および NEB の中核である NE 細胞が分岐点まで移動するメカニズムの理解のため、NE 細胞の遺伝子発現の解明に取り組んだ。マイクロアレイを用いた発現解析のため、胎

児肺からの NE 細胞単離実験を行なった。検討の結果、セルソーターを使った手法の改良により、90%以上の純度で NE 細胞を単離することに成功した。単離した NE 細胞を、マイクロアレイを使ってトランスクリプトーム解析した。解析データを用いて細胞移動に関わるケモカインや細胞接着因子を調べたところ、*Cxcr4* と *N-cadherin* の発現を確認できた。そこで胎児肺を *Cxcr4* 阻害剤とともに臓器培養を行ったが、NE 細胞の分布に変化は見られなかった。呼吸器上皮細胞特異的 *N-cadherin* KO マウスを作成したが、NE 細胞は正常な位置に存在した。今後さらに解析を続け、NE 細胞が遊走するメカニズムに迫る。

#### 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 7 件)

- (1) Tsao P, Matsuoka C, Wei SC, Sato A, Sato S, Chena HK, Ling TY, Mori M, Cardoso WV, Morimoto M. Epithelial Notch signaling regulates lung alveolar morphogenesis and airway epithelial integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読あり 2016, 113, 8242-7.
- (2) 山本慎也、森本充、概論-Notch シグナルの世界、『実験医学 ; Notch シグナルの新世紀』羊土社、34 巻 3 号 2016 年 2 月
- (3) 野口雅史、森本充、臓器の多彩な細胞パターン形成を指揮する Notch、『実験医学 ; Notch シグナルの新世紀』羊土社、34 巻 3 号 2016 年 2 月
- (4) Noguchi M, Sumiyama K, Morimoto M. Directed migration of pulmonary neuroendocrine cells toward airway branches organizes the stereotypic location of neuroepithelial bodies. *Cell Reports* 査読あり 2015, 13, 2679-86.
- (5) 森本充. 胎児期の気道上皮幹細胞と呼吸器の形態形成 『分子呼吸器病』先端医学社、19 巻 1 号 2015 年 3 月
- (6) 森本充. 気道上皮組織の再生と Notch シグナル 『呼吸器内科』科学評論社、27 巻 2 号 2015 年 2 月
- (7) 森本充. 多様な気道上皮細胞と Notch シグナルによる分化制御 『呼吸と循環』医学書院、62 巻 7 号, 689-696, 2014 年 7 月

[学会発表] (計 16 件)

- ① 千里ライフサイエンスセミナー 「組織を支える幹細胞と微小環境(ニッチ)」 . 2017/3/3
- ② 第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会. 2017/1/27
- ③ 第 39 回日本分子生物学会年会ワークショップ. 2016/11/7
- ④ Malaysia Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2016. 2016/12/1
- ⑤ 日本肺サーファクタント・界面医学会第 52 回学術研究会 2016/10/29
- ⑥ FASEB Science Research Conferences LUNG REPAIR AND REGENERATION CONSORTIUM 2016, 2016/9/15
- ⑦ 第 14 回幹細胞シンポジウム 2016/5/20
- ⑧ 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 2016/4/10
- ⑨ 第 23 回呼吸器疾患・感染症研究会 2015/8/29
- ⑩ Stem Cells and Cell Therapies in Lung Biology and Diseases Conference 2015/7/28
- ⑪ 日本呼吸器学会 第 36 回生涯教育講演会 2015/4/16, 11/1
- ⑫ 再生医療学会総会シンポジウム 2015/3/19
- ⑬ Keystone Symposia: Endoderm Lineages in Development and Disease 2015/2/10
- ⑭ 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム 2014/10/17
- ⑮ 第 47 回発生生物学会年会シンポジウム 2014/5/28

〔図書〕 (計 1 件)

Mitsuru Morimoto, Building Functional Internal Organs from a Naive Endodermal Sheet [New Principles in Developmental Processes], (総ページ数 316) Part I-5, Springer 社 (2014)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

理化学研究所 肺の細胞が自ら歩いて集まる様子を撮影－呼吸器学者の長年の疑問を解明－

[http://www.riken.jp/pr/press/2015/20151218\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2015/20151218_1/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 充 (MITSURU MORIMOTO)  
 国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム研究センター・チームリーダー  
 研究者番号：7 0 5 4 4 3 4 4

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

野口 雅史 (MASAFUMI NOGUCHI)  
 国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム研究センター・研究員  
 研究者番号：5 0 7 1 4 8 7 0

隅山 健太 (KENTA SUMIYAMA)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー  
 研究者番号：0 0 3 7 0 1 1 4

### (4) 研究協力者

なし