

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04185

研究課題名(和文) 気道上皮幹細胞 - ニッチ複合領域の分子制御と再構成論的解析

研究課題名(英文) Reconstructive analysis of molecular regulation in epithelial stem cell and its niche in the lung

研究代表者

森本 充 (Morimoto, Mitsuru)

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・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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：気道上皮の組織幹細胞-ニッチ複合領域"NEB"の形成原理と、維持のための分子制御機構の解明に取り組んだ。NEBの主要構成細胞であるNE細胞の胎児期1細胞解析、ex vivo器官培養を組み合わせNEB形成に必須なNE細胞の遊走能の分子機構の解析を行った。結果、Robo-Slitシグナル経路はNE細胞の移動に必須だが、既報と異なり反発的細胞移動による制御に関わっていた。Eph-Ephrinシグナル経路は、NE細胞の分岐点で停止に必要であることが示唆された。Trpc4チャンネルは、NE細胞の正確な停止機構に関わることが示唆された。ヒトNE細胞研究のためヒトiPSCから呼吸器上皮前駆細胞を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器は常に外気に触れている臓器であるため、損傷と再生を繰り返している。気道上皮の幹細胞生物学の中でも、本研究課題で扱うNEBは最初に同定された呼吸器上皮の幹細胞であり、これまで多くの研究者がその実態解明に取り組んできた。その後、基底細胞、BASCsやLNEPなど新しい幹細胞が発見されていく中で、今でもNEBは謎が多い。本研究の成果により、NEBの維持にROBO-Slit, Eph-Ephrin, Trpc4が重要な役割を果たしていることが示唆され、また、その分子機構についても考察がなされた。将来的には小細胞肺癌細胞とそのがん組織環境の分子実態解明、さらに新薬開発へと発展することができる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the principle of development of the tissue stem cell-niche complex "NEB" in the fetal airway epithelium. Using single cell RNA sequencing and ex vivo organ culture experiments, we attempted to elucidate the regulatory mechanism of NE cell migration that is essential for NEB formation. The results showed that the Robo-Slit signaling pathway is essential for NE cell migration via its cell repulsive function. Eph-Ephrin was found to be involved in regulation by repulsive cell migration. Trpc4 channels were also suggested to be involved in the precise mechanism of NE cell arrest. Furthermore, we induced respiratory epithelial progenitor cells from human iPSCs for human NE cell studies.

研究分野：呼吸器細胞生物学、発生学

キーワード：気管支 気道 幹細胞 ニッチ 神経内分泌細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺の生物学分野では NEB の多機能性が知られている。NEB は酸素濃度センサーとして機能していると考えられ、また気道が損傷を受けた時は組織修復に働く組織幹細胞のための幹細胞ニッチになることがよく研究されている。最近では過剰免疫反応を抑制する働きが報告されるなど、多機能な細胞種であることが報告されている(図1)。一方で、健常であった NE 細胞のゲノム中で、p53, RB, PTEN 遺伝子に変異が入ることが小細胞肺癌細胞の起源になることがマウスの実験で証明されている。小細胞肺癌は転移能(走化性を反映)が高く予後が悪いことで知られる。研究代表は、これまでの NEB 形成過程の研究により NE 細胞が隣接する細胞の Notch シグナルを活性化し、NE 細胞自身の数を調整していることを発見した。そして最近、独自の臓器培養技術と多光子顕微鏡による撮影技法の開発によって発生中の上皮細胞のライブイメージングに成功し、NE 細胞が直線的に遊走しながら気管支分岐点に集積する様子を観察して報告した(図2)。

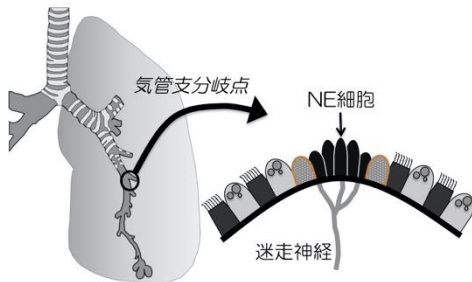


図1 気管支分岐点に局在する NE 細胞とそのクラスターNEB

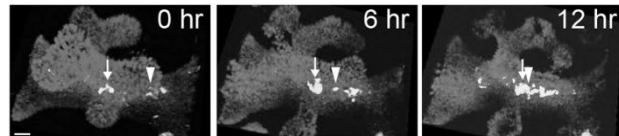


図2 発生中の気管支上皮(灰色)で移動する NE 細胞(白)。分岐点(矢印)に向かって個々の NE 細胞(矢頭)が自ら歩いて移動する様子のライブイメージング

2. 研究の目的

NE 細胞の解析を中心とした幹細胞-ニッチ複合領域の分子制御を解明し、ヒト iPS 細胞を用いた再構成的理解に挑戦する。

3. 研究の方法

- (1) 走化性の制御因子について、1細胞転写解析で候補遺伝子を探索すると主に、単離細胞の培養系を使って検証する。
- (2) 制御因子の作用について、器官培養系と遺伝子改変マウスを使って解析する。
- (3) ヒト iPS 細胞から NE 細胞を分化誘導し、ヒト NEB の in vitro 再構成を行う。

4. 研究成果

(1) 胎児期の NE 細胞の遊走性を制御する分子を同定するため、マウス胚 E14.5 および E18.5 の NE 細胞を単離し、10xGenomicsChromium を使った 1細胞転写解析を行った(図3)。また、NE 細胞の移動様式や細胞生物学的な特性を解析するため、胎児肺から NE 細胞を単離し、培養する実験系の開発に取り組んだ。いくつかの培養皿表面コートを試した結果、ラミニンコートによって NE 細胞が張り付くことがわかり、培養条件を確立できた。

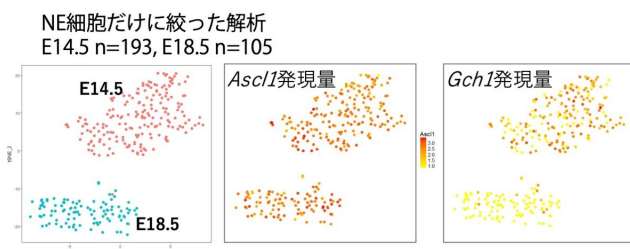
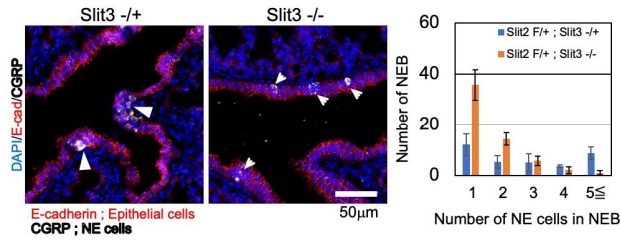


図3 NE 細胞を抽出して行なったクラスター解析。(左)各ステージでトランスクリプトームを示した。(中)NE 細胞のマーカとして知られる遺伝子は常に発現しているが、(右)E14.5 に固有の発現を示す遺伝子も見出された。

(2) 上記解析で同定された候補因子について、器官培養と阻害剤を使った実験、および関連遺伝子の変異マウスの解析から、特に Robo-Slit シグナル経路、Eph-Ephrin シグナル経路、Trpc4 チャネルに着目した解析に取り組んだ。Robo-Slit シグナル経路は NE 細胞の移動に必須であること示されたが、既報と異なり反発的細胞移動による制御に関わっていることがわかった(図4)。Eph-Ephrin シグナル経路は、NE 細胞の分岐点で停止するのに必要なシグナルであることが示唆された。また Trpc4 チャネルは、NE 細胞の正確な停止機構に関わることが示唆された。

Slit3 ノックアウトマウスにおけるNE細胞クラスター異常の表現型



Boyden Chamber Assay

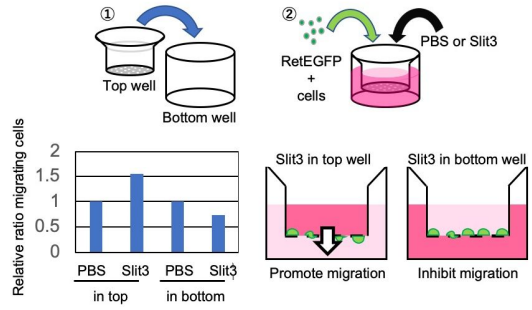


図4 Slit3 の NE 細胞クラスター形成に与える影響

(3) 研究成果をヒト呼吸器の幹細胞-ニッチの理解に役立てるため、NEB をヒト iPS 細胞から分化誘導によって再構成する研究に挑んだ。研究協力者の後藤慎平博士（京都大学医学部）の指導を受けて、iPS 細胞から内胚葉細胞の誘導、腹側前腸の誘導、そして呼吸器上皮前駆細胞の誘導まで行うことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirofumi Kiyokawa, Mitsuru Morimoto	4. 巻 62(1)
2. 論文標題 Notch Signaling in the Mammalian Respiratory System, Specifically the Trachea and Lungs, in Development, Homeostasis, Regeneration, and Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, growth & differentiation.	6. 最初と最後の頁 67-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12628.	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15件（うち招待講演 14件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 Alternative cell fate selection and following directed cell migration coordinate epithelial pattern of branching airways
3. 学会等名 第50回日本発生生物学学会シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 Lung Development in Single Cell Resolution
3. 学会等名 第45回箱根呼吸討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 Alternative cell fate selection and following directed cell migration coordinate epithelial pattern of branching airways
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本充、岸本圭史
2. 発表標題 Wnt5a-Ror2シグナルは気管の間充細胞の極性を同調させ管腔の長さを制御する
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清川寛文、森本充
2. 発表標題 The Dynamic Epithelial Transition of Developing Trachea Unveiled by Single Cell RNA-Seq
3. 学会等名 Keystone Symposia; Endoderm Development and Disease: Cross-Organ Comparison and Interplay. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 呼吸器の発生・再生ロジック
3. 学会等名 新生児慢性肺疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 呼吸器の発生・再生ロジック
3. 学会等名 日本脈管学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 1 細胞解像度で理解する呼吸器発生の動態
3. 学会等名 第 1 1 回呼吸器イメージング研究会. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Morimoto
2. 発表標題 SYNCHRONIZED MESENCHYMAL CELL POLARIZATION TOWARD EPITHELIUM SHAPES THE TRACHEA AND ESOPHAGUS
3. 学会等名 Fusion Conferences: The Epithelial Mesenchymal Interactions in Lung Development and Fibrosis Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 Complete mapping for developing trachea
3. 学会等名 第139回日本薬学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本充
2. 発表標題 1細胞解像度で探る呼吸器の発生
3. 学会等名 第 4 9 回呼吸器学会学術講演会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Morimoto
2. 発表標題 Single-cell transcriptome and morphogenesis of developing trachea.
3. 学会等名 OIST Symposium: The State-of-the-Art 3D Tissue Culture & Organoids schedule (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 1細胞解像度で見る呼吸器細胞パターンニング
3. 学会等名 第9回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本 充
2. 発表標題 呼吸器の成り立ちと肺神経内分泌細胞の起源
3. 学会等名 第23回日本臨床内分泌病理学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Morimoto
2. 発表標題 Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Coordinate Trachea Development in vivo and in vitro
3. 学会等名 Keystone Symposia: Tissue Organoids as Models of Host Physiology and Pathophysiology of Disease. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<http://www.cdb.riken.jp/lungdev/>

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
連携研究者	清川 寛文 (KIYOKAWA HIROFUMI) (40790621)	理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	
連携研究者	田村(古川) 可奈 (TAMURA, FURUKAWA KANA) (70807461)	理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	
連携研究者	榎本 泰典 (ENOMOTO YASUNORI) (90865297)	理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	