

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19409

研究課題名(和文) ヒト肺における組織幹細胞ニッチの同定

研究課題名(英文) Identification of the niche of the tissue stem cells in human lung

研究代表者

丹藤 由希子 (Tando, Yukiko)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70596212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト肺から単離された組織幹細胞(AEPCs: alveolar epithelial progenitor cells)が分化する細胞周辺環境を明らかにすることを目的とした。細胞培養系でAEPCsが分化する条件を確立し、その様子を詳細に観察し、AEPCsは分化に先立って細胞分裂を停止することを明らかにした。また、マイクロアレイ解析に基づいて遺伝子発現解析を行い、細胞分裂の停止には細胞接着を介した細胞内シグナル伝達系であるNotchシグナルが関与していることが明らかにした。

研究成果の概要(英文)：AEPCs(alveolar epithelial progenitor cells), whose were isolated from human lung, is considered to differentiate into the lung epithelial cells in the specific extracellular environment. The aim of this study is to identify the niche of AEPCs differentiation. In the in vitro differentiation culture system, AEPCs exit from cell cycle and stop cell proliferation before differentiation. In addition, microarray analysis and pharmacological study revealed that Notch signaling is involved in the cell cycle exit. This finding suggests that upregulation of Notch signaling the early event of AEPCs differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：組織幹細胞 肺細胞 細胞外環境

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な臓器において、組織幹細胞を取り巻く微小環境、すなわち組織幹細胞ニッチが組織幹細胞の運命決定に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。外部環境とダイレクトに接している肺では、外部刺激による損傷と修復が繰り返されており、損傷からの修復に関わる組織幹細胞およびそのニッチの存在が、主にマウスの研究によって明らかになってきた。

一方、ヒトの肺においても、肺胞上皮細胞に分化する組織幹細胞の存在が報告されている。その一つであり申請者の所属研究室で分離された組織幹細胞 (AEPCs: alveolar epithelial progenitor cells) は、以下の性質を持つ。

- 間葉系と上皮系の両方の遺伝子を発現している。
- 自己複製能を持つ。
- マトリゲル上で特定の増殖因子を添加して培養すると肺胞 II 型上皮細胞に分化する。しかしながら、肺胞 II 型上皮細胞への分化における細胞内メカニズムおよび組織幹細胞ニッチとの関係は明らかになっていない。

2. 研究の目的

組織幹細胞ニッチの構成要素は、1) 細胞外マトリックス (ECM: Extracellularmatrix) 2) 細胞である。申請者はまず、AEPCs の分化における ECM の影響を検証するため、様々な ECM および人工ポリマーでコートされた培養基質上で AEPCs を培養し、肺胞 II 型上皮細胞への分化を誘導するものがないかを調べた。その結果、リン脂質ポリマーである MPC-co-BMA でコートした培養基質上において、通常は紡錘形で増殖する AEPCs 同士が集まり、スフィアを形成した (図 1)。このスフィアの遺伝子発現を調べたところ、培養前と比較して SP-C (Surfactant protein-C) の発現が著しく増加する一方で、間葉系マーカーである Vimentin および Thy-1 の発

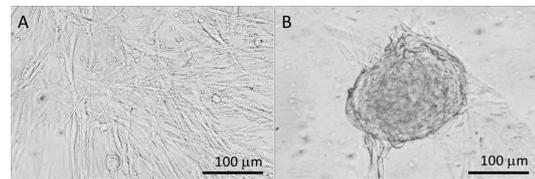


図1. 培養基質におけるAEPCsの形態の違い。A:未処理の細胞培養ディッシュ上。B:MPC-co-BMA上。

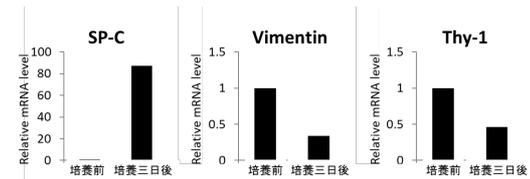


図2. AEPCsの培養前とMPC-co-MA上で培養した後における遺伝子発現の比較。

現が増加していた (図 2)。一方、基質との接着面を作らないハンギングドロップ法にて AEPCs を培地液滴中で培養したところ、MPC-co-BMA と同様のスフィアの形成は見られたものの、SP-C の発現上昇は見られなかった (図 3)。この培養基質に依存し

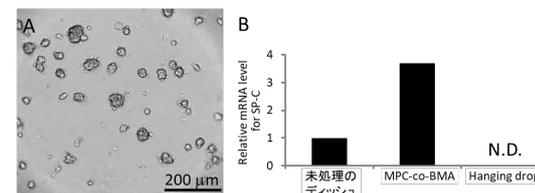


図3. ハンギングドロップ法で培養したAEPCsの表現型。AEPCsは培地液滴中でコロニーを形成するが(A)、SP-Cの発現上昇は見られない(B)。N.D.: Not Detected.

た肺胞 II 型上皮細胞への分化は、肺組織内で AEPCs に対する特異的な細胞外環境が存在し、AEPCs の分化を促すトリガーとなりうることを推測させるものである。

そこで本研究では、組織幹細胞ニッチを形成する二つの因子、ECM と周辺細胞が AEPCs の分化に果たす役割について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

MPC-co-BMA 上で AEPCs が肺胞 II 型上皮細胞に分化する時の遺伝子発現変化の解析

MPC-co-BMA 上で AEPCs が肺胞 II 型上皮細胞に分化する時の指標としてスフィア形成に着目し、AEPCs がスフィアを形成する時に起こる遺伝子発現変化を調べるためにマイクロアレイ解析を行った。

で検出された遺伝子の機能解析のマイクロアレイデータの解析により

得られた細胞接着関連遺伝子の発現を定量 PCR で確認した。また、AEPCs の培養下、当該の細胞接着により誘導されるシグナル伝達の阻害剤の添加し、スフィア形成などに影響が起こるかを検証した。

4. 研究成果

MPC-co-BMA 上で AEPCs が肺胞 II 型上皮細胞に分化する時の遺伝子発現変化の解析

はじめに解析を容易にするために、AEPCs が MPC-co-BMA と同様の挙動を示す培養条件を検討し、96well の低吸着プレートでスフィアを形成と SP-C の発現上昇が見られることを見出した。そこで、以降の実験は 96well のプレートで培養することにした。Ki67 の免疫染色により、この培養条件で AEPCs が経時的に細胞分裂を停止することが分かった (図 4)。この分裂停止は、細胞分化に先立って起

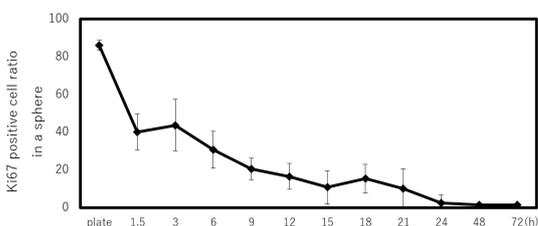


図4. AEPCsのスフィア形成培養中におけるKi67陽性細胞数の経時的変化

こる現象ではないかと考えられたため、この時の遺伝子発現変化を調べるために、スフィア形成前、スフィア形成後 1.5、12、24 時間後の細胞を回収してマイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイの結果、細胞接着を介したシグナルである Notch シグナルのリガンドで細胞膜タンパク質の Jagged1 の発現が、スフィア形成 1.5 時間後に急激に発現上昇していることが分かった。また、Notch シグナルで発現誘導される Hes、Hey などの転写因子の発現も同時期に上昇していた。一方、Jagged1 の受容体である Notch3 と Notch4 は、1.5 時間後には発現上昇せず、12 時間後に上昇していた (図 5)。よって、AEPCs のスフィア形成時には Notch シグナルの亢進が起きており、これは 1.5 時間後の Jagged1 の発現上昇、12 時

間後の Notch3、4 の発現上昇の上昇という異なる遺伝子の発現変化により生じている可能性が考えられた。

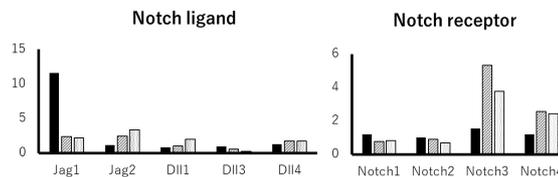


図5. AEPCsのスフィア形成時におけるNotchシグナルのリガンドと受容体のマイクロアレイ解析による発現量変化。グラフは左から1.5、12、24時間後を示す。

で検出された遺伝子の機能解析

で検出された Jagged1、Hes、Hey の発現上昇は、定量 PCR でも確認された (図 6)

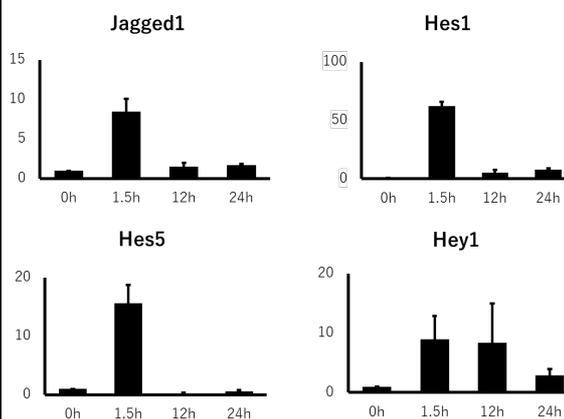


図6. AEPCsのスフィア形成時におけるJagged1、Hes、Heyの定量PCR

次に、Notch シグナルが阻害された時に AEPCs へのスフィア形成能にどのような変化が起こるかを調べるため、スフィア形成時に Notch シグナル阻害剤である DAPT を添加し、経時的に観察した。その結果、スフィアは通常と同様に形成されたものの、分裂停止していない細胞数が増加していることが分かった (図 7)。

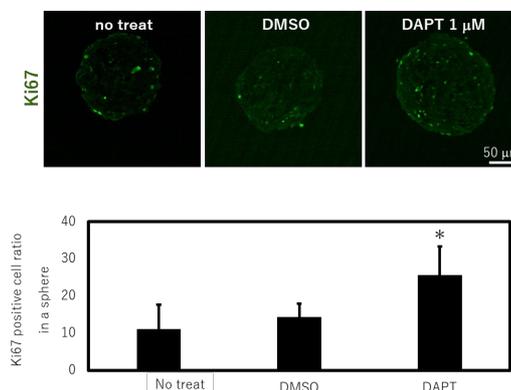


図7. AEPCsのスフィア形成時におけるJagged1、Hes、Heyの定量PCR

よって、Notch シグナルの更新が AEPCs の分化に先立つ細胞分裂停止の引き金になっていることが示唆される。しかしながら DATP の添加ですべての細胞で分裂が停止するわけではないため、Notch シグナルに加えて他の経路も分裂の停止に関与していると考えられる。

スフィア形成時において何が Notch シグナルの亢進をもたらしているのかを検証するためにマイクロアレイデータを再解析した結果、スフィア形成 1.5 時間後に TGFb の発現が上昇していた。TGFb は Notch シグナルを誘導することが知られているため、TGFb の阻害剤である SB431542 を添加し、分裂への影響を検証した。しかしながら、SB431542 添加では分裂停止の抑制は見られなかった。

以上の結果をまとめると、本研究によって AEPCs の培養基質に依存した肺胞 II 型上皮細胞への分化に先立って細胞の分裂停止が起こること、その細胞分裂停止には Notch シグナルが関与していることが明らかになった。今後は Notch シグナルを誘導するメカニズムおよび細胞分裂停止した後に肺胞 II 型上皮細胞に分化するメカニズムを検証し、組織内での AEPCs の分化必須条件を明らかにすることによって、AEPCs の生体内での役割と、肺疾患との関連性が解明されることが考えられる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Tando Y, Fujino N, Nagatomi R. Research on the molecular mechanism for cellular quiescence by novel method for cell cycle exit. 第 39 回日本分子生物学会年会. 横浜 . 2016 年 , 12 月 .

6 . 研究組織

丹藤 由希子 (TANDO, Yukiko)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号 : 7 0 5 9 6 2 1 2