

平成30年6月9日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15463

研究課題名(和文) “生まれる” ことで始まる肺胞成熟の分子機構

研究課題名(英文) Mechanism of lung alveolar maturation upon "Birth"

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は出生後の新生児期に肺胞がNotchシグナルを介して成熟するメカニズムの解明を目的としている。申請者はNotch2遺伝子を欠損した肺胞上皮細胞の解析により、Notchシグナルが生後の肺胞成熟に重要であり、特にII型肺胞上皮(AT2)細胞がNotch活性化細胞であることを発見した。Notchシグナルは組織幹細胞であるAT2細胞の増殖と分化を制御することで上皮の組織拡大を促していた。またNotchの標的遺伝子としてPDGF-Aを同定し、肺胞中隔を作る筋繊維芽細胞の増殖に必要であることを示した。肺胞オルガノイド培養技術を確立し、Notch欠損表現型をin vitroで再現することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated alveolar epithelial Notch signaling deletion mice, which show the emphysema phenotype with within 2 weeks after birth, to elucidate the mechanism of alveolar maturation through Notch signaling during neonatal period. We discovered that Notch signaling is important for postnatal alveolar tissue maturation and in particular type II alveolar epithelium (AT2) cells are Notch activated cells, indicating that the Notch signaling promoted epithelial tissue expansion by controlling the proliferation and differentiation of AT2 cells as the tissue stem cell. We also identified PDGF-A as a target gene for Notch and showed that it is necessary for the proliferation of myofibroblasts that make alveolar septa. We also established an alveolar organoid culture technique and succeeded in reproducing the Notch deficient phenotype in vitro.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：肺胞 Notchシグナル オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

肺胞の形成は胎児発生の後期に始まる。出生前には最低限必要な I、II 型肺胞上皮細胞と間充織細胞を配備するだけで、本格的な肺胞の拡大、成熟化は出生直後に行われる。健全な小児の肺胞では、吸気で膨らんだ肺胞空間で上皮細胞が増殖、分化するとともに、間充織から肺胞中隔がせり上がり肺胞面積を拡大させる。本研究計画では、肺胞上皮細胞の増加、マーカー遺伝子発現増加、肺胞中隔の形成を“生後の肺胞成熟”と定義する。申請者はこれまで呼吸器の発生生物学を細胞、分子レベルで研究してきた。特に細胞間の情報伝達経路である Notch シグナルの肺発生、および生後の肺機能における役割の研究において業績を上げている。申請者は最近、Notch2 シグナルが生後の肺胞成熟に重要な役割を果たすことを発見した。肺上皮細胞選択的な Notch2 ノックアウト(以下、N2-cKO)マウスが、生後すぐに肺胞形成異常を起こして BPD 様の表現型を示す(図1)。N2-cKO は生後3日目頃から肺胞形成の遅延が見られ、2ヶ月齢になるころには肺気腫様の組織像を示すようになる。成獣マウス肺の生理機能解析でも、N2-cKO マウスが肺の機械的機能を損ねていることが示された。

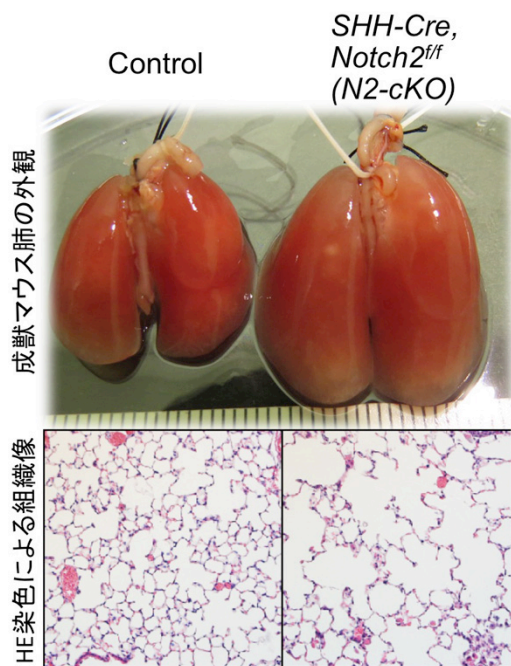


図 1

2. 研究の目的

本研究では“生まれる”ことがきっかけとなる II 型肺胞上皮細胞の増殖制御、成熟化制御の分子メカニズムの解明を試みる。具体的には、II 型肺胞上皮細胞を単離する技術を利用して、Notch2 シグナルを失った肺胞上皮細胞の挙動と転写ネットワークを解析する。II 型上皮細胞の増殖/成熟の理解のため、*in vitro* の II 型肺胞上皮細胞の培養と肺胞オルガノイド培養の開発に取り組む。

3. 研究の方法

N2-cKO マウスの肺気腫表現型を免疫組織化学、および qRT-PCR 法で詳細に解析し、Notch2 遺伝子の肺胞形成における役割を解析する。N2-cKO マウスから II 型肺胞上皮細胞を単離し、3次元培養により *in vitro* で増殖と分化を促す。特に肺胞オルガノイドの作成と観察手法の確立を行う。Notch2 欠損の表現型を *in vitro* の細胞レベルで確認したのちに、トランスクリプトーム解析を行うことで、出生直後に Notch2 の下流で発現変動を示す遺伝子を探索する。

4. 研究成果

先行研究で発見した N2-cKO マウスの肺胞における表現型の詳細な解析を行った。Notch2 シグナルは生後の肺胞成熟に重要な役割を果たし、シグナルを失った N2-cKO マウスは成体で肺気腫になる。免疫組織化学解析と qRT-PCR 解析により、Notch2 シグナルが II 型肺胞上皮細胞で活性化し、細胞自律的な増殖と成熟化を制御していることがわかった。さらに、Notch 下流遺伝子の探索から、PDGF-A の発現が減少していることがわかった。肺胞間充織組織の筋繊維芽細胞は PDGF シグナルを受け取って増殖、変形して肺胞中隔形成に貢献するが、N2-cKO では筋繊維芽細胞の増殖は減少し、肺胞中隔の形成に異常が出ていることを突き止めた。すなわち、Notch2 シグナルは肺胞の上皮と間充織の両方を制御することで生後の肺胞形成を促している (Tsao et al., 2016)。

次に、肺胞細胞の3次元培養による肺胞オルガノイドの形成に挑戦した。マウス肺から II 型肺胞上皮細胞を単離し、肺胞間充織細胞と混ぜてマトリゲル中で3次元培養を行なった。肺胞上皮の組織幹細胞である II 型肺胞上皮細胞は、3次元培養下で増殖すると、上皮構造を保ったまま中空の球体“alveolosphere”を形成する。Alveolosphere は肺胞オルガノイドと考えられており、II 型肺胞上皮細胞だけでなく、II 型から分化した I 型も多く含まれる。すなわち、alveolosphere の実験系では肺胞上皮細胞の増殖と分化を *in vitro* で再現できる。すでに II 型肺胞上皮細胞の単離法を確立していた京都大学呼吸器内科に出張し、同技法を習得した。我々の研究室で、野生型マウス肺から II 型肺胞上皮細胞を単離した。II 型肺胞上皮細胞の培養には肺間充織細胞を加える必要があったため、肺組織を消化し、上皮、血管、血球を取り除いた細胞集団を回収した。II 型肺胞上皮細胞と肺間充織細胞を 1:1 で混合し、マトリゲルに埋め込んで 10-14 日間培養を行った。マトリゲル中に alveolosphere を検出した。組織切片の観察から中空状の組織構造と、I 型、II 型肺胞上皮細胞を検出することに成功した(図2)。次に N2-cKO マウス肺から II 型肺胞上皮細胞

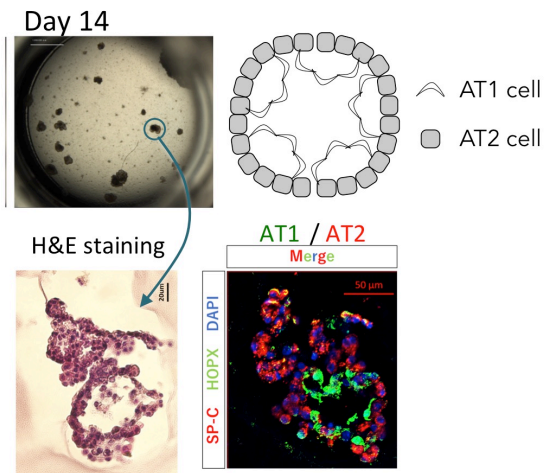


図 2

を単離し、同培養を行ったところ、alveolosphere がほとんど形成されなかった。NotchシグナルはII型肺胞上皮細胞の増殖維持に必要であることがわかった。さらに野生型マウスから作った alveolosphere を作成する過程でNotchシグナル阻害剤を添加して培養すると、驚いたことにII型肺胞上皮細胞の増殖とAlveolosphere形成が無事に観察された。これらの結果から、Notchシグナルは発生過程でII型肺胞上皮細胞に十分な幹細胞能を与えることに必要で、II型肺胞上皮細胞が確立した後は必要無いと考えられる。今後はN2-cKO及び野生型マウス肺から単離したII型肺胞上皮細胞からmRNAを単離してそれぞれマイクロアレイにかけ、同細胞内のトランスクリプトーム解析を行う。その結果から呼吸を始めた肺で起こる幹細胞の成熟が何のトリガーで始まり、Notchシグナルを活性化し、幹細胞能の獲得に至るのかを調べていきたい。

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 3件)

(1) Tsao P, Matsuoka C, Wei SC, Sato A, Sato S, Hasegawa K, 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.

DOI: doi: 10.1073/pnas.1511236113.

(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

[学会発表] (計 12件)

① 森本充、第40回日本分子生物学会ワークショップ 2017/12/9

② 森本充、The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease, 2017/10/6

③ 森本充、第50回日本発生生物学学会シンポジウム. 2017/5/11

④ 森本充、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

⑤ 森本充、第9回呼吸機能イメージング研究会学術集会. 2017/1/27

⑥ 森本充、第39回日本分子生物学会年会ワークショップ. 2016/11/7

⑦ 森本充、Malaysia Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2016. 2016/12/1

⑧ 森本充、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

⑨ 森本充、LUNG REPAIR AND REGENERATION CONSORTIUM 2016, 2016/9/15

⑩ 森本充、FASEB Science Research Conferences, 2016/8/1

⑪ 森本充、第14回幹細胞シンポジウム 2016/5/20

⑫ 森本充、第56回日本呼吸器学会学術講演会 2016/4/10

[図書] (計 0件)

[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

理研CDBニュース Notchシグナルが出生後の肺胞形成に果たす役割

http://www.cdb.riken.jp/news/2016/researches/0712_11200.html

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・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー
研究者番号：70544344

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松岡 智沙 (CHISA MATSUOKA)
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・技術補佐員

菊地 侑樹 (YUKI KIKUCHI)
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・大学院生

(4) 研究協力者

長谷 川浩一 (KOICHI HASEGAWA)
京都大学呼吸器内科
大学院生

Po-Nien Tsao
国立台湾大学医学部
准教授

Willington Cardoso
Columbia University
Professor