

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19462

研究課題名(和文) 上皮 間質の相互作用による気道上皮幹細胞の増殖制御

研究課題名(英文) Growth regulation of tracheal basal stem cells by mesenchyme during regeneration.

研究代表者

田所 友美 (TADOKORO, Tomomi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20507644

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)：気道上皮細胞は主に繊毛細胞と分泌細胞から構成され、その下に基底幹細胞が存在する偽重層構造を有する。基底幹細胞は自己増殖し、繊毛細胞と分泌細胞に分化して組織の維持や修復に働く。本研究において、3次元オルガノイド培養システムとマウス気道傷害モデルを用いて、平常時はBMPシグナルが基底幹細胞の細胞増殖を抑制し、傷害時にBMPのアンタゴニストが気道の間質細胞より産生され、基底幹細胞の増殖を促進するというモデルを示した。また、気道傷害時には一過性に細胞が過密状態になり、その後アポトーシス細胞が周囲の細胞に押し出されて細胞密度が平常時と同等に回復するという新たな上皮細胞の修復過程を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The airway epithelium is mainly composed of ciliated and secretory luminal cells. Basal stem cells self-renew and give rise to luminal cells at steady state and after injury. Using the 3D organoid culture system and in vivo gas injury model, it is revealed that BMP from the mesenchyme places a break on the proliferation of the epithelium at steady state. This break is released transiently during repair by the upregulation of BMP antagonists. As repair proceeds, cell density increases almost twofold over steady state because of an accumulation of suprabasal cells. If the BMP antagonist is given during repair, the maximum cell number is increased over controls. However, during the next phase of repair the density of epithelial cells is restored by the active extrusion of apoptotic cells. Taken together, these results reveal a critical role for both BMP signaling and cell shedding in homeostasis of the airway epithelium.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：組織幹細胞 気道上皮修復 上皮-間質相互作用 基底幹細胞 BMPシグナル 細胞増殖制御 細胞脱落

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞分野においては、スフィア形成アッセイと呼ばれる

In vitro 3D 培養系を用いて様々な組織より組織幹細胞が同定され研究が行われてきたが、気道や肺の上皮細胞においてもこの手法を用いた培養系が確立されてきた(図1)。同時に、遺伝子改変マウスを用いて組織幹細胞に特異的な

マーカーを発現した細胞の運命を追跡する Lineage tracing というアプローチにより、in vivo における気道や肺の組織幹細胞のダイナミクスが明らかとなってきた [Rock JR et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009; Barkauskas CE et al., J. Clin. Invest., 2013]。これらの研究によって、基底細胞が気道上皮の組織幹細胞として働いていることが明らかとなった。気道上皮においては、タバコ煙への曝露や喘息などの際に、杯細胞の過形成や基底細胞の扁平上皮異形成が見られる [Ordonez CL et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001; Shaykhiev R et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2013]。これは細胞外環境が基底細胞に影響を与えることで起こると考えられているが、組織幹細胞を支える周囲の細胞外環境(Niche)に関しては、腸や皮膚などの先行分野と比較すると研究が遅れている。

申請者は、気道上皮や肺胞上皮細胞の組織幹細胞生 物学分野の第一人者である Brigid Hogan 教授(Duke 大学メディカルセンター、米国)の研究室に留学し、基底細胞とそれ以外の細胞が作り出す細胞外環境との相互作用に着目して研究を行ってきた。申請者は気道上皮幹細胞の3D培養系を用いたスクリーニング系を確立し、遺伝子改変マウスを用いた解析と組み合わせることにより、気道傷害に応答して気道上皮を裏打ちする間葉系細胞から分泌される IL-6 が、基底細胞の Stat3 経路を活性化することで繊毛細胞へより選択的に分化させるよう制御していることを示した [Tadokoro T et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2014] (図2)。

気道傷害後に繊毛細胞が多く産生されることにより、死細胞などの気道からのクリアランスが速やかに行われると考えられ、気道上皮幹細胞シス

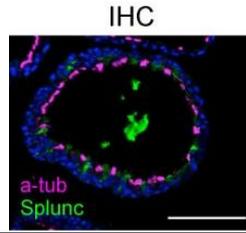


図1. 基底細胞の3D培養 14 日目 a-tub:繊毛細胞, Splunc:分泌細胞を示す。

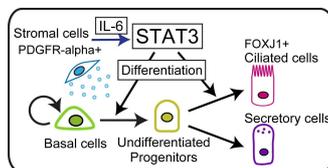


図2. 気道傷害時の間葉系細胞による基底細胞の分化制御

テムにおける細胞外環境の重要性を示すことができた。

2. 研究の目的

細胞のターンオーバーが遅い気道上皮や肺においては、平常時には幹細胞の増殖を抑制するメカニズムが強く働いていると考えられる。この幹細胞増殖抑制メカニズムを、気道上皮における基底細胞とそれ以外の細胞が作り出す細胞外環境との相互作用に着目し明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3D オルガノイド培養系によるスクリーニング

申請者が確立した気道上皮幹細胞を用いた3D オルガノイド培養系によるスクリーニングアッセイを用いて、細胞増殖を指標に低分子化合物やタンパク質のスクリーニングを行い、基底幹細胞の増殖制御に関連するシグナル伝達経路の絞り込みを行った。

(2) マウス気道上皮修復における BMP シグナル経路の変化

次に、オルガノイド培養によるスクリーニングで明らかになったシグナル伝達経路 (BMP シグナル経路) に関し、マウス気道上皮傷害モデルを用いて気道上皮細胞の修復過程における関連タンパク質や遺伝子発現の変化を解析した。

(3) In vivo における基底幹細胞の増殖制御

オルガノイド培養系で使用した BMP シグナル経路の阻害剤をマウスに投与し、基底幹細胞の増殖に影響があるか否か検討を行った。

(4) 気道上皮修復過程における細胞密度調節機構の解明

気道上皮の修復過程における一過性な過密状態を数値化する。また、遺伝子改変マウスを用いて、修復過程における細胞密度の調節機構をライブセルイメージングにより解析した。

以上の方法により、生体内における基底幹細胞の増殖制御機構の解明を行った。

4. 研究成果

(1) 3D オルガノイド培養系による基底幹細胞増殖に関わるシグナル伝達系のスクリーニング

基底幹細胞の増殖を制御しているシグナル伝達経路を明らかにするため、マウスの気道上皮細胞より基底幹細胞をソーティングし、マトリゲル内で3D オルガノイドを形成させる培養系を用いたスクリーニングを行った。具体的には、幹細胞の増殖を促進することが報告されている16化合物を3段階の異なる濃度でスクリーニングを行った。その結果、最も細胞増殖を促進した化合物は、

BMPシグナル経路やVEGFシグナル経路の阻害剤として知られる LDN-193189 であった (図3)

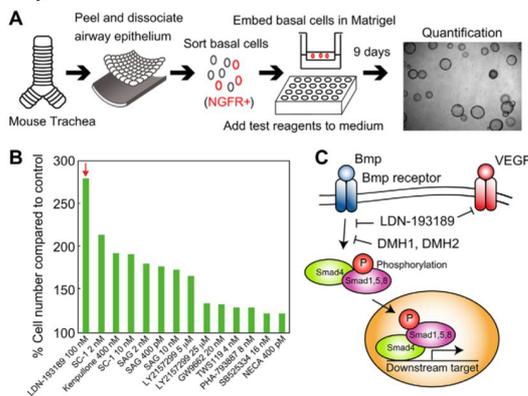


図3 基底幹細胞3Dオルガノイド培養を利用した薬剤スクリーニング

次に、生体内で働く BMPシグナル伝達経路のアゴニスト (Bmp4)、アンタゴニスト (Noggin, Chordin, Follistatin)について同様の検討を行った。その結果、Bmp4を作用させると基底幹細胞の増殖は抑制された一方でアンタゴニストでは基底幹細胞の増殖促進作用が観察された (図4)。

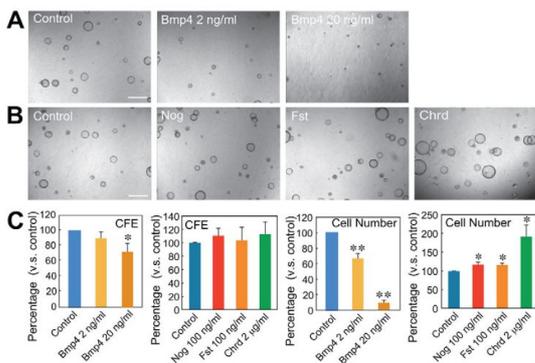


図4 基底幹細胞の増殖に対する BMP 関連タンパク質の効果

(2) マウス気道上皮修復における BMPシグナル経路の変化

1)の結果を受け、BMPシグナル経路が気道上皮幹細胞の増殖制御に関わることが明らかとなった。そこで本項では、マウス気道上皮傷害モデルを用いて、マウス気道上皮の修復過程における BMPシグナル伝達系の変化について、免疫組織学的解析・遺伝子発現解析を行った。

まず、気道上皮を二酸化硫黄ガスで傷害し、その修復過程における BMPシグナルの下流分子である phosphoSmad1,5,8 の発現を免疫組織学的に解析した (図5A)。その結果、ガス傷害前は気道上皮・間質共に phosphoSmad1,5,8 の発現が観察されたが、傷

害24時間後においては上皮細胞における発現は見られず、間質においてのみ発現が見られた。その後2週間後までの間に上皮においても phosphoSmad1,5,8 の発現が戻ることが明らかとなった (図5B)。

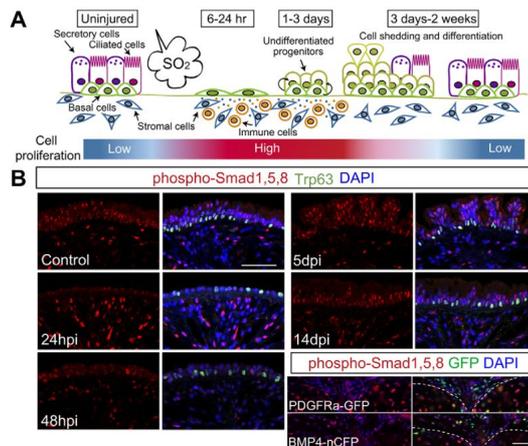


図5. 気道上皮修復過程における BMPシグナル伝達経路の変化

次に、気道上皮傷害前後における BMPシグナル関連分子の遺伝子発現解析を行った (図6A)。その結果、傷害前と比較して傷害24時間後では Bmp タンパク質 (BMP2, 4, 5, 6) や BMP 受容体 (Acvr1, Bmpr1a, Bmpr1b) の発現量が有意に減少していた。一方で、BMPのアンタゴニストである Fst の発現量は著明に増加していた (図6AとB)。

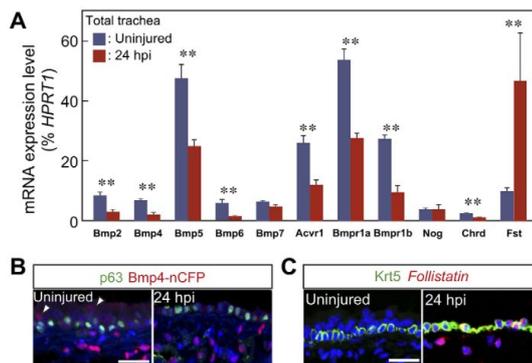


図6. 気道上皮修復過程における BMPシグナル伝達関連分子の遺伝子発現解析

以上の結果より、以下のような BMPシグナル経路による細胞増殖制御モデルを提唱できる。すなわち、BMPシグナルは平常時は気道上皮細胞・間質で活性化し基底幹細胞の増殖を抑制している。しかしながら、気道上皮に傷害が起こった際には、BMPアンタゴニストの発現が上昇し、BMPタンパク質や受容体の発現量が低下することによって基底幹細胞に入る BMPシグナルが減少する。これにより、基底幹細胞の細胞増殖が促進され、組織の修復が進むと考えられる。

(3) In vivoにおける基底幹細胞の増殖制御
BMP シグナル伝達経路が基底幹細胞の増殖制御を通して、気道上皮の修復に関与することが明らかとなったが、その過程におけるBMP シグナル阻害剤の効果を検討した。

その結果、傷害後3日目にBMP シグナル阻害剤投与群において、コントロール群と比較して有意に基底幹細胞の増殖が観察された。

(4) 気道上皮修復過程における細胞密度調節機構の解明

気道上皮修復過程における細胞増殖の定量化を行っている過程で、一過性に細胞が過密になることが明らかとなった(図7AとB)。傷害後4-5日目に、平常時の約2倍の細胞密度に達し、その後2週間までの間に平常時と同じ密度まで減少していた。BMP シグナル阻害剤投与群においては、傷害後4日目においてはコントロール群と比較して有意に細胞数が増加していたが、その後7日目においては両群に有意な差は見られなかった(図7C)。

次に、傷害後4日目以降の細胞数が減少していく過程をライブセルイメージングで観察した。その結果、平常時の気道上皮細胞と比較して多くのアポトーシス細胞が存在し、アポトーシス細胞が周囲の細胞に押し出される様子が観察された(図7D-F)。

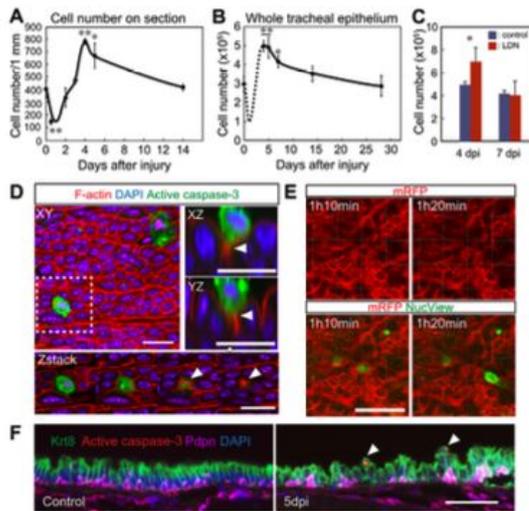


図7. 気道上皮修復過程における細胞密度の変化

以上の結果より、気道上皮の修復過程は2つのフェーズに分けることができることが明らかとなった。フェーズ1：気道上皮傷害後にBMP シグナル系が抑制され、傷害後4日目までは細胞増殖が盛んに起こることで組織の修復が進む。フェーズ2：4日目以降は、アポトーシス細胞がアピカル面より押し出されることで気道上皮の過密状態が解消され、2週間で元の偽重層構造の上皮に回復さ

れる。傷害後7日目にコントロール群とBMP阻害剤投与群の間に細胞数の差が見られないことから、フェーズ2の過程にBMP シグナル伝達経路は関与していないと考えられた。

本研究で得られた知見は、気道上皮の治療薬の開発などに役立てることができると考えられる。

<引用文献>

Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BL. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 12771-5, (2009)

Barkauskas CE, Crouce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, Randell SH, Noble PW, Hogan BL. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest.* 123, 3025-36 (2013)

Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 163, 517-23. (2001)

Shaykhiyev R, Zuo WL, Chao I, Fukui T, Witover B, Brekman A, Crystal RG. EGF shifts human airway basal cell fate toward a smoking-associated airway epithelial phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 12102-7. (2013)

Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, E3641-9. (2014)

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)

Zhang, R.R., Koido M., Tadokoro T., Uchi R., Matsuno T., Ueno Y., Sekine K., Takebe T., Taniguchi H.: Multiple Endodermal Organoid Generation from Robustly Amplified Human Posterior Gut Progenitors. *Stem Cell Reports* 10, 780-793 (2018). doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.006. (査読あり)

田所 友美 呼吸器系組織の創出へ向けた基礎研究の進展 『移植』 52 (4-5), 339-345 (2017)

<https://doi.org/10.11386/jst.52.4-5>

339 (査読なし)

田所 友美 幹細胞による気道上皮の維持と再生: IL-6/STAT3 経路の働きを中心に分子呼吸器病 20(1), 1-5 (2016)
http://www.sentan.com/products/detail.php?product_id=68 (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

Tomomi Tadokoro, Tatsuya Matsuno, Tasuku Yamazato, Hideki Taniguchi. Generation of the vascularized liver organoids by a fusion of iPSC liver buds. 第 95 回日本生理学会, 2018

鈴木 優衣、田所 友美、松野 達也、山里 輔、谷口 英樹 大血管付与臓器の創出に向けた次世代組織培養技術の開発 第 17 回日本再生医療学会, 2018

Tatsuya Matsuno, Tomomi Tadokoro, Tasuku Yamazato, Yui Suzuki, Hideki Taniguchi. Development of the next generation tissue culture technology towards creating tissue with a large blood vessel. ConBio 2017, 2017

Junichi Saito, Utako Yokoyama, Takashi Oshima, Tomomi Tadokoro, Yoshinobu Sugo, Kentaro Kurasawa, Miyuki Ogawa, Etsuko Miyagi, Hideki Taniguchi, Makoto Kaneko, Yoshihiro Ishikawa. Mechanoresponse to Periodic Hydrostatic Pressure Enables Fabrication of Human Arterial Graft Consisting of Vascular Smooth Muscle Cells. The American Heart Association Scientific Sessions 2017, 2017

Junichi Saito, Utako Yokoyama, Hiroaki Ito, Tomomi Tadokoro, Yoshinobu Sugo, Kentaro Kurasawa, Miyuki Ogawa, Etsuko Miyagi, Hideki Taniguchi, Makoto Kaneko, Yoshihiro Ishikawa. Fabrication of Implantable Human Arterial Graft by Periodic Hydrostatic Pressure. The 8th TAKAO International Symposium, 2017

Tomomi Tadokoro, Xia Gao, Charles C. Hong, Danielle Hotten, Brigid L. Hogan. The role of BMP SIGNALING AND CELLULAR DYNAMICS DURING REGENERATION OF AIRWAY EPITHELIUM FROM BASAL PROGENITORS. ISSCR 2016 meeting, 2016

Tomomi Tadokoro, Xia Gao, Charles C. Hong, Danielle Hotten, Brigid L. Hogan. BMP SIGNALING AND CELLULAR DYNAMICS DURING REGENERATION OF AIRWAY

EPITHELIUM FROM BASAL PROGENITORS. JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB, 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 3 件)

名称 : 細胞塊融合法

発明者 : 谷口 英樹、田所 友美

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2018-61095

出願年月日 : 平成 30 年 3 月 28 日

国内外の別 : 国内

名称 : 細胞塊を集合させる方法及び細胞塊を集合させる装置

発明者 : 谷口 英樹、田所 友美、東端 晃、

坂下 哲也

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2017-230609

出願年月日 : 平成 29 年 11 月 30 日

国内外の別 : 国内

名称 : 異種構造体と細胞塊を連結した構築物

発明者 : 谷口 英樹、田所 友美

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2017-208853

出願年月日 : 平成 29 年 10 月 30 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田所 友美 (TADOKORO, Tomomi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号 : 20507644

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Brigid L.M. Hogan (Brigid L.M. Hogan)