

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08170

研究課題名(和文)肺線維芽細胞の特殊性に基づいた呼吸器疾患の病態理解

研究課題名(英文)Organ-specificity of lung fibroblast and its relationship to lung disease

研究代表者

齋藤 朗(Saito, Akira)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90591412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：異なる臓器由来の線維芽細胞の遺伝子発現の比較解析により、肺線維芽細胞で発現が高く、スーパーエンハンサーと関連する8個の転写因子(TBX2・TBX4・TBX5・HOXA5・FOXL1・FOXP1・MEIS1・TGIF1)を同定した。TBX4はマスター転写因子として機能しており、TGF-beta刺激により発現が抑制され、肺癌での発現が低かった。肺線維芽細胞においてFOXL1はFOXF1・FOXC2と共に活性化されており、TAZ/YAPシグナルやBMPシグナルの制御に関与しており、肺線維症での発現が高かった。肺線維芽細胞に特徴的な転写因子群が、肺癌・肺線維症の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺組織に由来する線維芽細胞において、組織特異的に発現している遺伝子群を同定し、機能的に重要性が高いと思われる転写因子(TBX4およびFOXL1)を選定し、その生理的・病理的な役割を検討した。これらの転写因子は肺癌や肺線維症において発現変化がみられており、これらの疾患の分子病態に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By comparing the gene expression profiles derived from different organs, we identified eight transcription factors that show relatively higher expression and are associated with super-enhancers (TBX2, TBX4, TBX5, HOXA5, FOXL1, FOXP1, MEIS1 and TGIF1). TBX4 functions as a master transcription factor in lung fibroblasts. TBX4 expression is downregulated by TGF-beta and is lower in lung cancer-associated fibroblasts. Highly activated FOX gene cluster (FOXL1, FOXC2 and FOXF1) is a hallmark of lung fibroblasts. FOXL1 is involved in the regulation of TAZ/YAP and BMP signaling, and its expression is higher in pulmonary fibrosis. Transcription factors unique to lung fibroblasts are involved in the pathogenesis of lung cancer or pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：線維芽細胞 肺線維症 肺癌 転写因子 スーパーエンハンサー TBX4 FOXL1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺は外界からの微生物・アレルゲン・酸化ストレスに常に晒されており、感染・炎症・アレルゲン・リモデリングが生じやすい臓器である。肺は心臓とともに高度に動的な器官で、1日約2万回におよぶ呼吸が終生持続する。肺の mechanical stress は呼吸運動によって変動するほか、疾患病態によっても変容する。肺線維症では肺組織の硬度が増大し、癌組織では癌間質の線維化が、組織の硬度や組織圧の上昇につながり、癌細胞の浸潤を促進させ、薬剤送達の障壁になる。

線維芽細胞はあらゆる臓器にみられ、細胞外基質を産生・分解し、組織構造の構築・維持・改変を司る。液性因子(増殖因子・サイトカインなど)を分泌し、上皮細胞の増殖・分化や、炎症反応の制御も担う。肺線維症や肺気腫では、病的に活性化した肺線維芽細胞が、不可逆性の線維化や気腫化をもたらす責任細胞であり、治療標的でもある。

mechanical stress を感知して細胞応答に反映させる内在的制御システムとして、転写コアクチベーター-TAZ/YAP が重要である。細胞外基質・細胞密度・細胞骨格などの情報は、アクチン線維の再構成を介し、TAZ/YAP の核内移行と活性化を惹起し、標的遺伝子の転写制御を介して細胞応答が調節される。TGF- β は線維芽細胞を活性化し、細胞外基質の産生・分解を促進させる最も強力なサイトカインであり、肺線維症や肺癌間質の病態に深く関与している。

2. 研究の目的

線維芽細胞には特異的なマーカーは存在せず、形態学的な特徴や複数の細胞マーカーの発現情報を組み合わせることで同定される。しかし近年では、単一細胞解析などにより、線維芽細胞の起源や形質の多様性が認識されるようになってきている。様々な組織に由来する線維芽細胞は、各々に特徴的な遺伝子発現パターンを示し、上皮細胞との相互作用において、組織特異的な機能を示すことが示唆されている。

本研究では、肺組織に由来する線維芽細胞において、組織特異的に発現している遺伝子群を同定する。さらに機能的に重要性が高いと思われる転写因子を選定し、その生理的・病理的な役割を検討する。すなわち肺線維芽細胞の identity を形成する転写制御機構を探究する。さらに肺癌や肺線維症における発現変化や病態形成における意義を検証し、線維芽細胞を標的とした治療戦略の可能性を探索する。

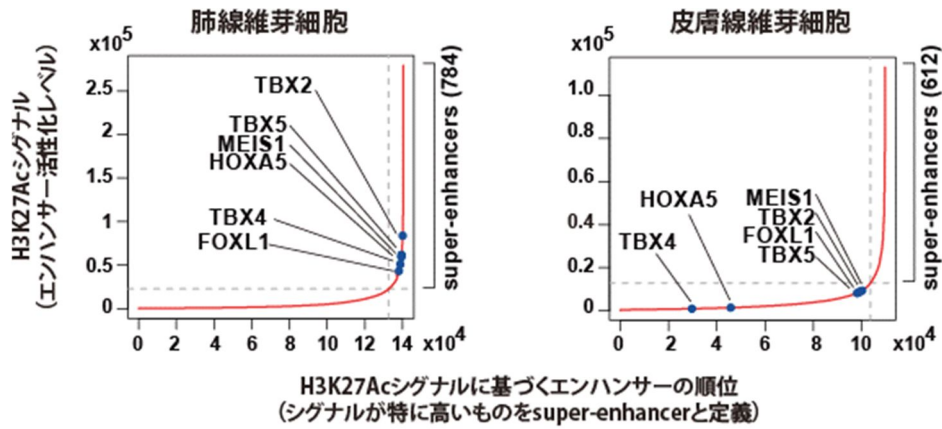
3. 研究の方法

理化学研究所 FANTOM5 プロジェクトにおける、様々な組織に由来する線維芽細胞の CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) データを活用し、肺線維芽細胞と他臓器の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した(文献)。さらに ENCODE データベースを活用し、ゲノム上の活性化領域を評価した。転写因子により制御される遺伝子群を同定するため、siRNA によるノックダウンを施し、さらに RNA-sequencing (RNA-seq) による遺伝子発現解析を行った。外科切除肺組織から初代培養肺線維芽細胞を樹立し、RT-PCR による発現解析や細胞培養実験による機能解析に利用した。肺線維芽細胞の機能として、増殖・遊走・コラーゲンゲル収縮を検証した。健常者や肺線維症患者の肺組織における発現解析には、*in situ* hybridization および免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

(1) 肺線維芽細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイル・転写因子の同定

理化学研究所 FANTOM5 プロジェクトの CAGE データを活用し、様々な組織由来の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルを横断的に比較し、各組織に特徴的な線維芽細胞サブタイプの存在を明らかにした。とくに肺線維芽細胞は他臓器由来の細胞と一線を画する独特な細胞群であることが判明した。3 サンプルの肺線維芽細胞と 42 サンプルの他臓器由来の線維芽細胞の比較解析により、肺線維芽細胞で発現が高い 88 個の遺伝子が同定され、このうち転写因子は 14 個だった。さらに 14 個の転写因子のうち 8 個は、(H3K27Ac のシグナルにより定義される)スーパーエンハンサー領域に重なっており(TBX2・TBX4・TBX5・HOXA5・FOXL1・FOXP1・MEIS1・TGIF1)、機能的な重要性が示唆された(下図)。



(2) TBX4 の機能的意義 (文献)

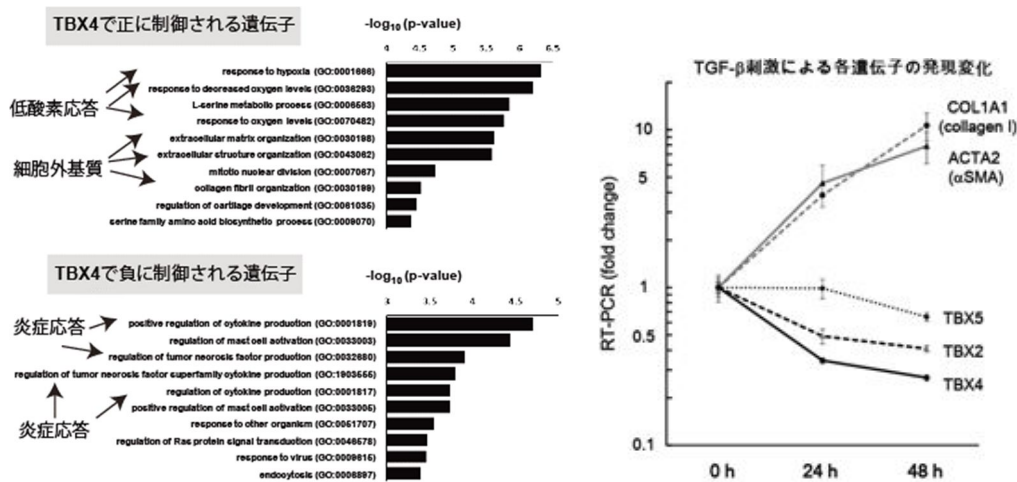
TBX2/TBX3 や TBX4/TBX5 は、発生過程の肺の間葉系組織に発現し、Wnt や FGF シグナルの調節を介して、肺の branching morphogenesis を制御している。TBX4 は後肢、TBX5 は心臓と前肢にも発現しており、肺・心臓・四肢の形態形成において必須である。魚類・両生類から爬虫類へと脊椎動物が進化する過程で、鰓呼吸から肺呼吸への移行・肺循環の発達、陸上移動に適した四肢の発達、など進化的に重要な機能の獲得過程において、TBX4/TBX5 が鍵となる分子であると考えられる。

前述の解析により、TBX4 が肺線維芽細胞において組織特異的な発現を示し、スーパーエンハンサー領域とも重なることが明らかになった。17 サンプルの培養した肺線維芽細胞における RT-PCR 解析でも、歯肉線維芽細胞や皮膚線維芽細胞と比較して発現が高いことが確認された。

肺線維芽細胞において TBX4 をノックダウンすると、細胞増殖やコラーゲン収縮が抑制された。TBX4 を発現抑制した肺線維芽細胞で RNA-seq 解析を行ったところ、TBX4 が低酸素応答・炎症応答・細胞外基質に關与する遺伝子を制御することが明らかになった (下左図)。また TBX4 の発現抑制によりスーパーエンハンサー関連遺伝子が広汎に抑制されることから、TBX4 が上位の遺伝子発現制御因子、すなわちマスター転写因子として機能することが示唆された。

肺線維芽細胞を TGF- β で刺激すると、TBX2・TBX4・TBX5 の発現が抑制された (下右図)。したがって TGF- β 刺激により、TBX4 などの T-box ファミリー転写因子により構成されていたスーパーエンハンサーが、全ゲノムレベルで変化すると想像される。さらに肺癌や肺線維症などの病態では、T-box ファミリー転写因子の発現低下が、線維芽細胞の活性化と表裏一体をなす可能性がある。

公共データの再解析では、肺癌組織に由来する線維芽細胞 (CAF : cancer-associated fibroblast) では、同一患者の肺の正常部位に由来する線維芽細胞 (NF) に比較して、組織特異的な遺伝子群の発現が広汎に抑制されていることが示唆された。独自に樹立した NF・CAF を用いた RT-PCR 解析でも、CAF において TBX2・TBX4・TBX5 の発現が低下していた。

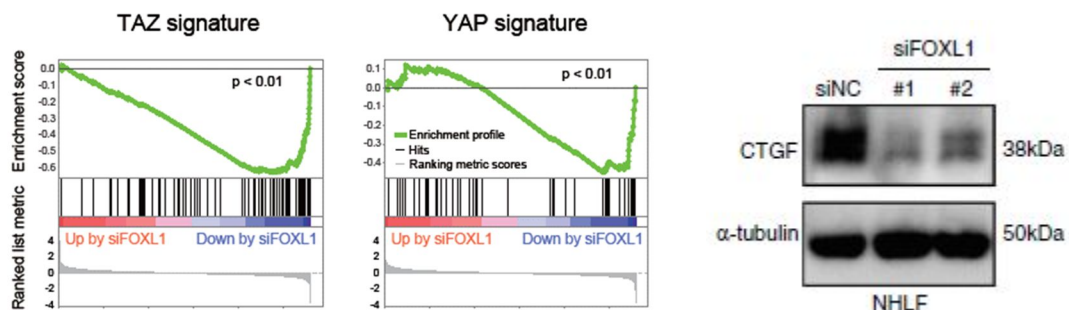


(3) FOXL1 の機能的意義 (文献)

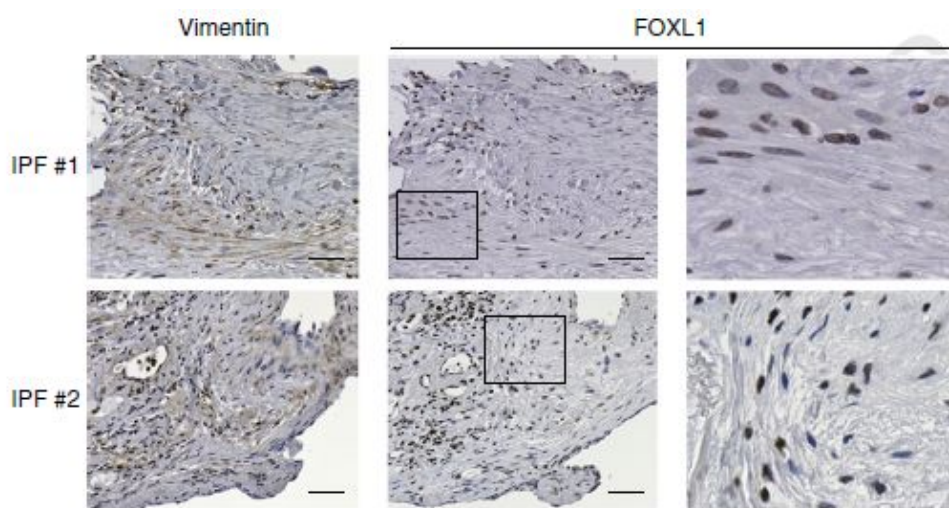
フォークヘッド型転写因子 FOXL1 および FOXC2・FOXF1・FENDRR は、ゲノム上の近接した領域に遺伝子座を有している。Foxl1 ノックアウトマウスは消化管の発生異常を呈することが知られ、Foxl1 および Pdgfra を発現する線維芽細胞が、腸上皮幹細胞を維持する stem cell niche を形成することが示されている。肺組織では、Pdgfra を発現する間葉系細胞が、肺胞の形成・II 型肺胞上皮細胞の分化・肺胞上皮細胞の再生に関与することが示唆されている。FOXL1 は肺線維芽細胞において発現しているが、その機能的意義についてはこれまで未解明であった。

上述の CAGE データ解析によって、肺線維芽細胞では、他臓器由来の線維芽細胞と比較して、FOXL1 の異なる転写開始点からの転写産物が豊富であり、特徴的な転写パターンを示していた。ENCODE データベースの解析では、肺線維芽細胞で FOXL1 遺伝子座の DNA 低メチル化が認められた。様々な細胞・組織 (86 サンプル) のエンハンサー領域を比較すると、FOXL1 および FOXC2・FOXF1・FENDRR がスーパーエンハンサーと関連しているのは肺線維芽細胞のみであり、FOX 遺伝子クラスターの広汎な活性化が、肺線維芽細胞の特徴を示していると考えられた。

肺線維芽細胞において FOXL1 をノックダウンすると、細胞増殖やコラーゲン収縮が抑制された。FOXL1 を発現抑制した肺線維芽細胞で RNA-seq 解析を行ったところ、TAZ/YAP シグナルの標的遺伝子が広汎に抑制された (下図左・Gene Set Enrichment Analysis)。代表的な TAZ/YAP 標的遺伝子である CTGF の発現抑制はウエスタンブロットで確認した (下図右)。さらに FOXL1 は BMP リガンド (BMP2・BMP4) や BMP アンタゴニスト (GREM1・FSTL1) の発現制御にも関与していることが示唆された。



健常者と肺線維症患者の肺線維芽細胞における FOXL1 の発現を RT-PCR で定量したところ、肺線維症において FOXL1 の発現が上昇している傾向がみられた。さらに肺線維症の肺組織で免疫組織染色を行ったところ、Vimentin 陽性の線維芽細胞において FOXL1 の発現が認められた。したがって、肺線維症の病態形成において FOXL1 が関与している可能性が示唆された (下図)。



< 引用文献 >

- Horie et al. Sci Rep. 2016;6:33666.
- Horie et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2018;314(1):L177-L191.
- Miyashita et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2020;63(6):831-842.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito A, Hakamata Y, Yamada Y, Sunohara M, Tarui M, Murano Y, Mitani A, Tanaka K, Nagase T, Yanagimoto S.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Pleural thickening on screening chest X-rays: a single institutional study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-019-1116-9	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 -
1. 著者名 Horie M, Miyashita N, Mattsson JSM, Mikami Y, Sandelin M, Brunnstrom H, Micke P, Nagase T, Saito A.	4. 巻 246(2)
2. 論文標題 An integrative transcriptome analysis reveals a functional role for thyroid transcription factor-1 in small cell lung cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 154-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyashita N, Horie M, Suzuki HI, Yoshihara M, Djureinovic D, Persson J, Brunnstrom H, Lindskog C, Elfving H, Micke P, Saito A, Nagase T.	4. 巻 13(11)
2. 論文標題 An Integrative Analysis of Transcriptome and Epigenome Features of ASCL1-Positive Lung Adenocarcinomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 1676-1691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtho.2018.07.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki HI, Horie M, Mihira H, Saito A.	4. 巻 Aug 3
2. 論文標題 Molecular Analysis of Endothelial-mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor-Signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Antonio VAA, Ono N, Saito A, Sato T, Altaf-Ul-Amin M, Kanaya S.	4. 巻 13(12)
2. 論文標題 Classification of lung adenocarcinoma transcriptome subtypes from pathological images using deep convolutional networks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery	6. 最初と最後の頁 1905-1913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11548-018-1835-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito A, Horie M, Nagase T.	4. 巻 19(8)
2. 論文標題 TGF- Signaling in Lung Health and Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19082460	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 -

1. 著者名 Saito A, Horie M, Micke P, Nagase T.	4. 巻 19(11)
2. 論文標題 The Role of TGF- Signaling in Lung Cancer Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19113611	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 該当する

1. 著者名 Noguchi S, Saito A, Nagase T.	4. 巻 19(11)
2. 論文標題 YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19113674	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 -

1. 著者名 Miyashita N, Horie M, Suzuki HI, Saito M, Mikami Y, Okuda K, Boucher RC, Suzukawa M, Hebisawa A, Saito A, Nagase T.	4. 巻 63(6)
2. 論文標題 FOX11 Regulates Lung Fibroblast Function via Multiple Mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 831-842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2019-03960C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda K, Matsuzaki H, Mikami Y, Makita K, Miyakawa K, Miyashita N, Hosoki K, Ishii T, Noguchi S, Urushiyama H, Horie M, Mitani A, Yamauchi Y, Shimura E, Nakae S, Saito A, Nagase T, Hiraishi Y.	4. 巻 76(1)
2. 論文標題 A mouse model of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap induced by intratracheal papain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 390-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita N, Horie M, Mikami Y, Urushiyama H, Fukuda K, Miyakawa K, Matsuzaki H, Makita K, Morishita Y, Harada H, Backman M, Lindskog C, Brunnstrom H, Mücke P, Nagase T, Saito A.	4. 巻 489
2. 論文標題 ASCL1 promotes tumor progression through cell-autonomous signaling and immune modulation in a subset of lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 121-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okunishi K, Wang H, Suzukawa M, Ishizaki R, Kobayashi E, Kihara M, Abe T, Miyazaki JI, Horie M, Saito A, Saito H, Nakae S, Izumi T.	4. 巻 130(7)
2. 論文標題 Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3919-3935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI127839	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 -

1. 著者名 Taniya H, Mitani A, Saito A, Ishimori T, Saito M, Isago H, Jo T, Yamauchi Y, Tanaka G, Nagase T.	4. 巻 38(12)
2. 論文標題 Exosomal MicroRNA Expression Profiling in Patients with Lung Adenocarcinoma-associated Malignant Pleural Effusion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6707-6714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	鈴川 真穂 (Suzukawa Maho) (20453699)		
研究協力者	三上 優 (Mikami Yu) (50732806)		
研究協力者	大島 光宏 (Ohshima Mitsuhiro) (30194145)		
研究協力者	山口 洋子 (Yamaguchi Yoko) (00239922)		
連携研究者	堀江 真史 (Horie Masafumi) (60732659)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 洋 (Suzuki Hiroshi) (00587793)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Massachusetts Institute of Technology			
米国	University of North Carolina			
スウェーデン	Uppsala University			
スウェーデン	Lund University			
カナダ	McGill University			