

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08179

研究課題名(和文) 上皮内因子が指揮する組織幹細胞ニッチ機構を焦点とした喫煙関連肺疾患の病態解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathomechanisms of smoking-related lung disease focusing on tissue stem cell niche

研究代表者

柳 重久 (Yanagi, Shigehisa)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60404422

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)：喫煙関連肺疾患におけるII型肺胞上皮(AT2)内分子の意義を、組織幹細胞ニッチを制御する細胞老化/細胞移動調節機構という独創的な観点から解明し、両疾患に対する治療戦略を創出することが本研究の目的である。AT2特異的Pten欠損マウスを新規に作製した。AT2特異的Pten欠損マウスは高齢期に肺気腫を自然発症した。RNAシーケンス解析の結果、単離AT2と単離肺間葉細胞で細胞相互作用が破綻していた。AT2でのPten欠損は、細胞老化を加速させ、不良ミトコンドリア蓄積をきたした。以上の結果から、AT2でのPtenは細胞老化とミトコンドリア機能を制御し肺気腫発症抑制に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患と特発性肺線維症は原因不明の線維性疾患であり、進行性の呼吸不全を来す。両疾患ともに有効な薬物療法がない。本研究は、組織幹細胞ニッチの恒常性を制御する分子メカニズムを解明するもので、難治性呼吸器疾患の病態機構の理解と新規治療法を樹立する上で極めて重要である。組織幹細胞ニッチ破綻に着目した慢性閉塞性肺疾患と特発性肺線維症の病態解明は新規のアイデアである。慢性閉塞性肺疾患と特発性肺線維症の病態解析と新規治療法の樹立を目指す本研究の達成は呼吸器医療に計り知れない貢献をもたらす。組織幹細胞ニッチ機構の理解は、多臓器のリモデリング疾患や発癌機構の理解を飛躍的に前進させる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of Pten, a tumor suppressor, in alveolar type 2 (AT2). AT2-specific Pten null mice spontaneously developed age-related emphysema. AT2-specific Pten null mice showed decreased numbers of AT2 and increased numbers of lung mesenchymal cells (LMSc) 8 weeks after tamoxifen treatment. RNA sequencing of isolated AT2 and LMSc identified the perturbation of epithelial-mesenchymal interaction signaling. Deletion of Pten in AT2 increased the number of senescent AT2. Lung epithelial cell-specific Pten deficiency provoked accumulation of dysmorphic and dysfunctional mitochondria with increased reactive oxygen species production. Moreover, lung epithelial cell-specific Pten deletion induced excessive senescence-associated secretory phenotype. Our results highlight that Pten in AT2 has an essential role in controlling age-related emphysema by regulating cellular senescence and epithelial-mesenchymal and mitochondrial homeostasis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺微小環境 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、末梢気道病変と肺気腫病変が混在し、進行性の気流制限を来す。特発性肺線維症 (IPF) は原因不明の線維性疾患であり、進行性の呼吸不全を来す。両疾患のほとんどが 60 歳以降の喫煙者に発症するが、有効な薬物療法がなく、禁煙後も肺構築破壊が進行する。肺胞上皮細胞の細胞傷害に対する脆弱性と修復不全が COPD と IPF の発症・進展機構に重要な役割を担うが、その分子機構は不明である。老化に伴う生物学的特徴の中で、不可逆的細胞増殖停止と老化関連分泌形質 (SASP) で定義される細胞老化が COPD と IPF の 2 型肺胞上皮 (AT2) で高頻度にみられる。最近、肺胞領域での組織幹細胞である AT2 を支持する肺胞間葉ニッチ細胞 (mesenchymal alveolar niche cell: MANC) と、筋線維芽細胞の前駆細胞 (Axin2+ myofibroblastic progenitor: AMP) が同定された (Cell 2017)。AT2 と MANC は互いに近接する適切な空間配置と適切なクロストークにより組織幹細胞ニッチとして初めて機能する。恒常性における組織幹細胞ニッチの重要性は広く認識されながら、その制御機構は未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、COPD と IPF における AT2 内分子の意義を、組織幹細胞ニッチを制御する細胞老化/細胞移動調節機構という新しい観点から解明し、両疾患に対する有効な治療戦略を創出することである。AT2 特異的 Pten/RhoA/Ror2 欠損マウスと AT2/MANC/AMP 標識マウスを用い、AT2 内の細胞老化/細胞移動シグナル不全が与える組織幹細胞ニッチ恒常性への影響を解析する。次に、同マウスで肺気腫と肺線維症疾患モデルを作製し、組織幹細胞ニッチ恒常性破綻が与える影響を解析する。COPD/IPF 組織を用い AT2 内分子発現と COPD/IPF の重症度との関連を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) AT2 特異的 RhoA/Ror2/Pten 欠損マウス作製による肺気腫、肺線維症自然発症の解析

*Sftpc<sup>CreERT2</sup>* マウスに *RhoA<sup>flox</sup>* マウスまたは *Ror2<sup>flox</sup>* マウスまたは *Pten<sup>flox</sup>* マウスを交配する。8 週齢より週 3 回タモキシフェン (TMX, 1mg/50  $\mu$ l) を腹腔内投与し、AT2 特異的に RhoA/Ror2/Pten を欠損するマウスを作製する。各遺伝子の欠失効率を単離 AT2 (CD31<sup>neg</sup> CD45<sup>neg</sup> EPCAM<sup>pos</sup>) の deletion PCR で確認する。

16 週齢と 30 週齢の各遺伝子欠損マウスを用い、肺気腫自然発症の有無を肺組織 HE 染色 (平均肺胞径 (MLE) と断片指数 (DI)) で、肺線維症自然発症の有無を M-T 染色、肺組織中コラーゲン値測定で解析する。

### (2) AT2 特異的 RhoA/Ror2/Pten 欠損による AT2/肺間葉細胞のセクレトーム: レセプトームの変化

上記実験 (1) のマウス肺組織を用い、AT2 と肺間葉細胞を FACS でソーティングする。各遺伝子型マウスの単離 AT2 と単離肺間葉細胞について RNA シークエンシング (RNA-seq) にて網羅的に解析する。AT2 のニッチサポートに重要なリガンドである Fgf7 と IL6 と Bmp の発現変化を解析する。

### (3) AT2 特異的 RhoA/Ror2/Pten 欠損マウスの細胞老化/ミトファジー解析

上記実験 (1) の AT2 特異的 RhoA/Ror2 欠損マウス各々の 16 週齢と 30 週齢の肺組織を用い、老化細胞を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性染色 ( $\beta$ -gal) で評価する。ミトコンドリア形態異常を電子顕微鏡で、ミトコンドリア機能を細胞外フラックスアナライザーで各々解析する。SASP について、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の総細胞数と細胞分類、肺組織での F4/80 と IL6 発現、単離 AT2 の核内 NF- $\kappa$ B/RELA, IL17, MIF, IL15 の mRNA にて評価する。AT2 内のミトファジーを LC3, ATP synthase, p62 発現で、シグナル分子動態を p27, p53, PINK1 発現で評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 細気管支肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウス (SPCrtTA/tetOCre/Pten<sup>flox</sup> マウス) の解析

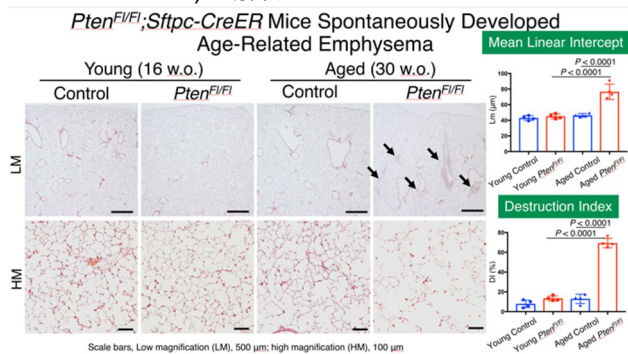
若年期 (16 週齢) において、Pten 欠損マウス肺はコントロールマウス肺と同等の形態であった。一方、高齢期 (1 歳齢) では、Pten 欠損マウスは肺胞腔の拡大と肺胞壁の断裂が生じ、肺気腫を自然発症していた。高齢の Pten 欠損マウスの気管支肺胞洗浄液ではマクロファージが有意に増加していた。肺上皮における Pten 欠損の肺自然炎症について解析した結果、興味深いことに、高齢マウスの単離 2 型肺胞上皮では CCL2, IL-6, TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカイン発現が亢進して

いた。これらの結果から、細気管支肺胞上皮 Pten 欠損は肺への炎症細胞浸潤を惹起し、加齢性の肺気腫を自然発症させることがわかった。次に、肺損傷後組織再生への影響を解析するために、エラステーゼ気管内投与モデルを作製した。肺上皮特異的 Pten 欠損マウスでは損傷後の肺胞壁破壊が亢進していた。これらの結果から、肺上皮での Pten 欠損は、マウスを肺損傷に脆弱にすることが示唆された。

次に電子顕微鏡で AT2 のミトコンドリア形態を解析した。高齢期の Pten 欠損マウスでは、AT2 内で、外膜の虚脱とクリステ構造の破綻を伴う異常形態のミトコンドリアがみられた。以上より、AT2 での Pten 欠損はミトコンドリア新生とミトファゴソーム数を低下させ、異常形態のミトコンドリアが蓄積することが明らかになった。

## (2) AT2 特異的 Pten 欠損マウス (*Sftpc<sup>CreERT2</sup>/Pten<sup>fl/fl</sup>* マウス) の解析

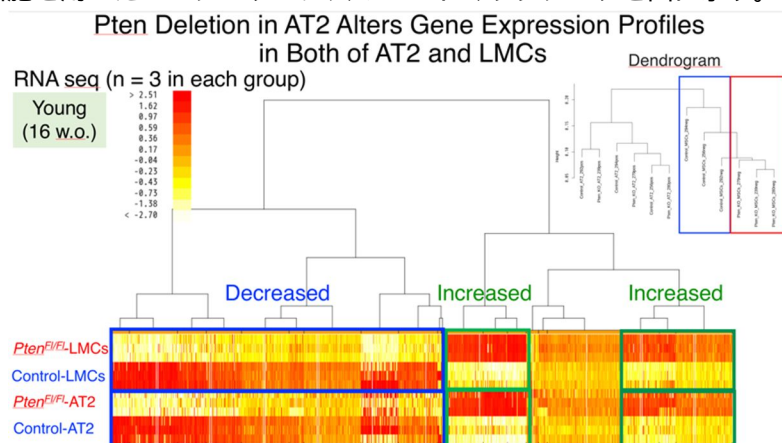
次にタモキシフェン誘導性コンディショナル遺伝子改変マウスを用い、AT2 特異的 Pten 欠損マウスを作製した。16 週齢マウスを若年マウスとして、30 週齢マウスを高年齢マウスとして解析した。AT2 特異的 Pten 欠損マウスは高齢期において肺気腫を自然発症した(図)。矢印で示すように、末梢細気管支周辺の血管周囲には炎症細胞浸潤が著明であり、全身からの炎症細胞の動員に合致する所見であった。



ここまで、AT2 特異的 Pten 欠損が加齢性の肺気腫を発症させ、損傷後の肺胞壁破壊を亢進させることを示した。これらの所見から、AT2 での Pten 欠損は、内因性前駆細胞である AT2 プールを減少させるのではないかと考えた。この仮説を検証するため、FACS を用い AT2 と肺間葉細胞の割合を測定した。その結果、コントロールマウス肺では、AT2 の割合は肺間葉細胞よりも上回っていた。対照的に、AT2 特異的 Pten 欠損マウスでは AT2 の割合は肺間葉細胞よりも下回っていた。これらの結果から、AT2 での Pten 欠損は AT2 プールを減少させ、肺間葉細胞数を増加させることが示唆された。

AT2 での Pten 欠損が与える細胞間ニッチシグナルを解析するため、我々は AT2 と肺間葉細胞を単離した。それぞれの単離細胞群の効率ならびに AT2 での Pten 欠損効率を定量 PCR で確認した。単離 AT2 と単離肺間葉細胞を用いた RNA シークエンスのヒートマップデータを図に示す。

興味深い事に、AT2 での Pten 欠損は、AT2 のみならず、肺間葉細胞内での遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させていた。クラスターデンドログラムでは、コントロールマウス 3 匹から単離した肺間葉細胞と、KO マウス 3 匹から単離した肺間葉細胞がそれぞれ別個に近似した遺伝子発現プロファイルを示していた。



さらに、AEP-ニッチ細胞間シグナルに関して、AT2 特異的 Pten 欠損マウスでは AT2 内の AEP マーカーの発現変化と、肺間葉細胞内でのニッチシグナル減少が生じていることが明らかになった。以上のことから、AT2 での Pten 欠損は AEP と肺間葉細胞間のクロストークを破綻させる事が示された。また、老化関連酸性ガラクトシダーゼ染色と FACS の結果、高齢の Pten 欠損マウスでは AT2 の老化細胞数が増加していることが明らかになった。TMRM アッセイ、細胞外フラックスアナライザー、FACS の結果、Pten 欠損マウスの単離 AT2 でミトコンドリア膜電位が低下し、酸素消費率の増加し、内因性 ROS 蓄積が亢進していることが明らかになった。

以上の結果から、AT2でのPtenシグナル経路は有望なCOPD治療標的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayako Matsuo, Ryota Tanida, Shigehisa Yanagi, Hironobu Tsubouchi, Ayako Miura, Takafumi Shigekusa, Nobuhiro Matsumoto, Masamitsu Nakazato	4. 巻 892
2. 論文標題 Significance of nuclear L0XL2 inhibition in fibroblasts and myofibroblasts in the fibrotic process of acute respiratory distress syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173754.	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 Shigehisa Yanagi, Takahiro Sato, Kenji Kangawa, Masamitsu Nakazato	4. 巻 27
2. 論文標題 The Homeostatic Force of Ghrelin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 786-804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cmet.2018.02.008.	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 Nobuyuki Ishii, Hironobu Tsubouchi, Ayako Miura, Shigehisa Yanagi, Hiroaki Ueno, Kazutaka Shiomi, Masamitsu Nakazato	4. 巻 819
2. 論文標題 Ghrelin alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy by reducing oxidative stress and enhancing mitochondrial anti-oxidant functions in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 35-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2017.11.024.	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4件（うち招待講演 3件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳重久
2. 発表標題 喫煙関連肺疾患における組織幹細胞ニッチ機構
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳重久
2. 発表標題 PTEN Deficiency in Alveolar Type 2 Cells Accelerates Cellular Senescence, Disrupts Epithelial-Mesenchymal and Mitochondrial Homeostasis, and Induces Age-Related Emphysema
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳 重久
2. 発表標題 上皮内因子が制御する細胞老化プログラムからみた喫煙関連肺疾患の病態解明
3. 学会等名 第4回肺トランスレーショナルメディシン研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳 重久
2. 発表標題 現在とこれからの肺線維症治療を俯瞰する
3. 学会等名 第85回日本呼吸器学会九州支部秋季学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔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 分担 者	松尾 彩子  (Matsuo Ayako)  (40776332)	宮崎大学・医学部・医員    (17601)	

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
研究分担者	坪内 拡伸  (Tsubouchi Hironobu)  (60573988)	宮崎大学・医学部・助教    (17601)	
研究分担者	松元 信弘  (Matsumoto Nobuhiro)  (70418838)	宮崎大学・医学部・助教    (17601)	
研究分担者	三浦 綾子  (Miura Ayako)  (70710903)	宮崎大学・医学部・研究員    (17601)	

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