

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15111

研究課題名（和文）細胞間相互作用を介した気管間充織の細胞多様化獲得プロセスの解明

研究課題名（英文）The understanding of tracheal mesenchyme patterning at single-cell resolution

研究代表者

中山 彰吾（Nakayama, Shogo）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50917747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、気管間充織の多様性獲得機構を明らかにする目的で、発生過程における気管組織のscRNA-seq解析やLineage tracing実験を進めた。気管組織scRNA-seqの結果から、間充織を構成する細胞集団を同定し、気管軟骨・繊維芽前駆細胞に分化するSox9陽性未分化細胞を見出した。さらに細胞間相互作用を推定するCellChatを用いて、分化誘導に重要な候補因子を同定した。その中でHedgehogシグナルに着目し、SHHノックアウトマウスを解析したところ、気管軟骨細胞への分化の抑制を確認した。上記の結果から、気管間充織細胞集団の同定と多様性獲得機構に関する知見が得られたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管の管状構造は生命を維持に必要な呼吸を行うための空気の通り道として重要な役割を持つ。そのような重要性にもかかわらず、気管間充織の形態形成機構に関する知見は非常に乏しい。今回の研究成果において、我々は、気管を構成する間充織細胞集団を同定し、どのようなメカニズムで、多様性を生み出すのかに関する知見を得た。これらの知見は、今後、気管形成異常の先天性疾患の理解や治療法の確立に役立つのみならず、多数の臓器形態異常に関する理解を深めると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, we investigate the transcriptional dynamics of tracheal mesenchyme patterning at single-cell resolution. The single-cell transcriptome of trachea staged between 11.5 and 14.5 days of gestation provides a global view of tracheal developmental processes during the cartilaginous patterning. The network-based computational methods for single-cell sequencing analysis that predict lineage specification process, and lineage tracing experiments identify Sox9+ progenitor, which can be differentiated into tracheal chondrocyte and fibroblast before periodically patterned. These finding provides the knowledge regarding the lineage specification process of tracheal mesenchyme.

研究分野：細胞生物学

キーワード：気管 間充織 scRNA-seq 多様性 分化 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

私たちの体は37兆個という途方もなく多数の細胞から構成されている。発生過程において、これら多数の細胞の動態が厳密に制御され統合されることで、非常に複雑な“臓器のかたち”が出来上がる。しかしながら、生物が如何にして複雑な臓器のかたちを生み出すのかに関して、多くが謎に包まれている。我々が着目している気管間充織は非常に特徴的な縞状パターンを呈しており、このパターンは気管の形態を維持するために重要な役割を担っていることが知られているが、これらの形態パターンを生み出すメカニズムは他臓器のかたちを生み出すメカニズムと同様にいまだによくわかっていない。

2. 研究の目的

これまでに気管間充織の細胞分化異常により、これらの特徴的なパターンの消失が見受けられており、細胞多様性の獲得が組織のパターン形成に密接に関連していることが示唆されてきている(Kishimoto et al., *Nat Commun* 2020, Young et al., *Dev Cell* 2020)。しかしながら、気管上皮細胞における分化制御機構の研究に比べ、気管間充織の分化制御機構に関する研究は進展が遅れていた。

本研究では、マウス胎生11.5日～14.5日の気管の全組織を用いてシングルセルRNAシーケンス(scRNA-seq)による網羅的トランスクリプトーム解析を行うことで、気管間充織の多様性獲得プロセスの全貌に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

scRNA-seqのデータを元に細胞をクラスタリングすることで、これまで明らかにされていなかった気管間充織細胞の同定を図る。さらに、細胞系統樹を推定するようなSlingshotを行うことで、細胞の分化プロセスを推測するとともに、候補となる前駆細胞の特異的なマーカーに着目し、Lineage tracing実験を進める。以上の解析により、得られた知見を元に、対象となる細胞種で活性化されている可能性のあるシグナル伝達経路をCellChatにより推測したのち、それらシグナル伝達経路の阻害を実施することで、細胞多様性獲得に必要な細胞間相互作用を同定する。



図1 気管組織の軟骨、平滑筋、線維芽細胞が見出される

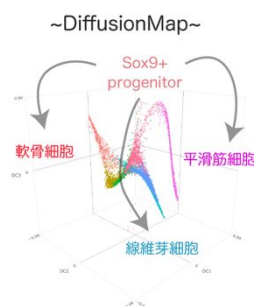


図2 Sox9+progenitor から派生する3つの細胞種の推定

4 . 研究成果

マウス胎生 11.5 日～14.5 日の気管の全組織を用いた scRNAseq による網羅的トランスクリプトーム解析の結果から、気管間充織を構成する気管軟骨細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などの様々な細胞種の同定に加え、それらの前駆細胞も見出された(図 1)。さらに、発生の初期にのみ現れる Sox9 陽性の間充織細胞も確認された。Sox9 は軟骨細胞の代表的なマーカーであるが

col2a1、Sox6 などの他の軟骨細胞マーカーの発現が見られないため、この Sox9 陽性の間充織細胞を Sox9+ progenitor と名付けた。さらに、細胞系譜を推定する解析(Slingshot)を行い、Sox9+ progenitor から軟骨、線維芽細胞、平滑筋の 3 つの系統に分化することが推定された(図 2)。そこで、Sox9creERT2 マウスを用いて

Lineage tracing 実験を行ったところ、Sox9+ lineage cells は軟骨、線維芽細胞のマーカーのどちらかを発現していたことから、Sox9+progenitor は軟骨、線維芽細胞に分化することが明らかとなった(図 3)。これら細胞分化に重要なシグナル伝達経路を推定するために、scRNA-seq データから、細胞間相互作用を推定することができる CellChat を用いて、Sox9+progenitor や軟骨細胞、線維芽細胞で活性化されている可能性のある候補因子を割り出した。結果として、Bmp, Wnt, Tgfb, Hedgehog など様々なシグナル伝達経路が活性化されていることが明らかとなったが、軟骨細胞の分化が上皮組織の近傍から起ることを鑑みて、上皮細胞がリガンドを発現している Hedgehog シグナルに着目した(図 4)。胎生 11.5

日の気管組織を取り出し培養することで、Sox6 や Col2a1 などの軟骨細胞マーカーを発現する細胞へと分化させる Ex vivo 培養系を確立させたのち、Hedgehog シグナルの阻害剤である cyclopamine を添加したところ、軟骨細胞分化のマーカーの発現減少が確認された。さらに、呼吸器上皮組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nkx2.1creERT2 マウスと SHH flox マウスを掛け合わせることで、時期特異的に呼吸器上皮細胞の SHH をノックアウトすることができるマウスを作製したのち、マウス胎生 11.5 日でタモキシフェンを腹腔内投与し、SHH のノックアウトを行ったところ、Sox9+progenitor は確認されるのに対し、Sox6 陽性の軟骨細胞の消失が見られた(図 5)。これらの結果から、Hedgehog シグナルが Sox9progenitor を軟骨細胞へと分化するために必須であることが明らかとなった。

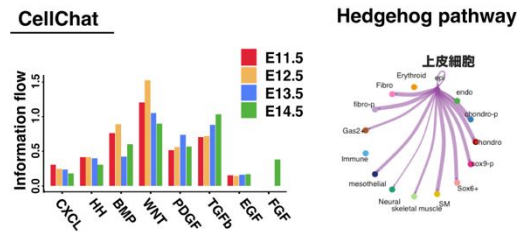


図 4 細胞間相互作用の推定による候補因子の探索

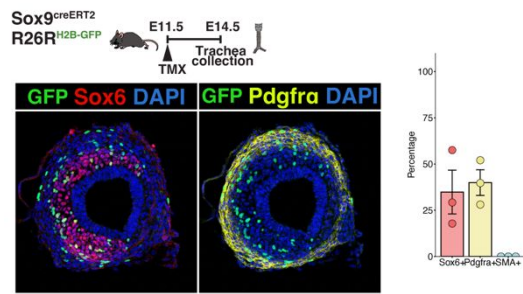


図 3 Sox9+lineage cells は軟骨・線維芽マーカーを発現する

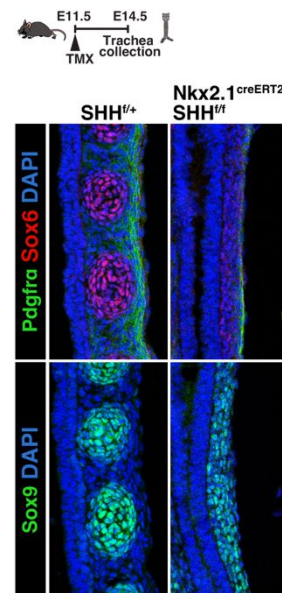


図 5 Hedgehog シグナルは軟骨分化に必須である

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 中山 彰吾, 岸本 圭史, 山本 尚貴, 馬場 小織, 川口 喬吾, 森本 充
2．発表標題 確率論的Wnt応答軟骨芽細胞の発生を起点とした縞状形態パターンニング機構の解明
3．学会等名 細胞生物学会
4．発表年 2023年

1．発表者名 中山彰吾
2．発表標題 確率論的Wnt応答軟骨芽細胞の発生を起点とした縞状形態パターンニング機構の解明
3．学会等名 Wnt研究会
4．発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------