

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860610

研究課題名(和文) 上皮間葉連関を焦点とした肺発生での上皮Ptenの機能解析

研究課題名(英文) The role of Pten in the cell-fate determination of epithelial cells in lung development

研究代表者

三浦 綾子 (Miura, Ayako)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：70710903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺上皮細胞特異的Pten欠損マウスを用い、肺発生でのPtenの役割を解析した。PtenKOマウスでClub細胞、神経内分泌細胞、杯細胞、I型肺胞上皮細胞の増加、II型肺胞上皮細胞と線毛上皮細胞の減少を認めた。PtenKOマウス肺上皮では、Notchの発現の亢進、E18.5以降の細胞増殖停止、細胞老化の亢進、p53経路が活性化していた。以上より、肺上皮Ptenは肺発生時におけるNotchシグナルとp53経路を介し、上皮細胞分化方向と肺形態形成を制御し、正常な肺発生を調節するために重要である。

研究成果の概要(英文)：PTEN is a tumor suppressor that negatively regulates the PI3K/Akt pathway. We conducted histological and biochemical analyses of SOPtenflox/flox. Further mechanistic analyses were performed in vitro and in vivo. The lung epithelial cells isolated from SOPtenflox/flox mice showed increased Calca, Scgb1a1, Muc5AC, Aqp5, Podoplanin and Sox2 mRNA expressions and decreased Sftpa mRNA expression at E18.5. Ultrastructure analysis showed hyperplasia of club cells and goblet cells. The septa of SOPtenflox/flox mice comprised type 1 AECs and numerous cuboidal cells with glycogen vacuoles but no lamellar bodies (i.e., Unclassifiable cell); type 2 AECs were absent. SOPtenflox/flox showed increased CGRP- and podoplanin-positive cells but decreased SP-C-positive cells. Epithelial cells of SOPtenflox/flox lungs exhibited increased Mash1, Hes1 and Notch expressions. The induction of siRNA-induced knockdown Pten gene in lung epithelial cells led to augmented Notch signaling and Sox2 expression.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺発生 Pten Notch Senescence

## 1. 研究開始当初の背景

正常肺発生における肺上皮Ptenの生理学的意義を、上皮・間葉系細胞構築相互制御機構という新たな観点から解析し、正常肺発生での上皮Ptenの役割を多面的に解析することが本研究の目的である。肺胞上皮細胞(alveolar epithelial cell: AEC)でのPten発現は、肺腺癌発症制御、幹細胞恒常性維持、線維化制御、上皮間統合性制御に必須である。これまでに、我々はAEC特異的Pten欠損マウス(*SOPten<sup>flox/flox</sup>*マウス)を用いた解析で、AECでのPten発現が急性肺損傷と肺線維症の進展制御に必須であることを明らかにした。

本研究では、肺発生における上皮・間葉系細胞の分化・増殖に關与する遺伝子群と上皮Pten発現との連関を明らかにする。肺発生での機能的細胞の時間的空間的な配置と上皮内因性分子発現との関係を解明にすることで、発生学一般における臓器形成プログラムの解明に貢献することを目標とする。

## 2. 研究の目的

本研究では申請グループのPTENでの研究基盤を踏まえ、肺上皮特異的Pten欠損マウスを用いて、以下の7つの課題を明らかにすることを目標とする。

(1)肺発生における上皮細胞の分化方向制御機構の解析

(2)間葉系細胞の増殖メカニズム関連分子動態

(3)間葉系細胞の分化メカニズム関連分子動態

(4)気管支・肺胞形成機構の段階的評価

(5)肺発生細胞分裂時の紡錘体形成機構の解析

(6)Akt阻害剤による肺発生異常に対するレスキュー効果の検討

以上の研究課題を設定し、上皮Ptenと肺発生メカニズムの関連性を検証する。

肺発生におけるPtenの役割に関して、肺上皮Pten欠損マウスでの組織学的、形態学的報告はほとんどなく、肺発生におけるPtenの恒常性維持を解析することで様々な肺疾患の病態解明と治療薬開発に繋がる臨床応用への研究

展開も期待できる。本研究は、既に作成済みである細気管支肺胞上皮特異的Pten欠損マウス(*SOPten<sup>flox/flox</sup>*マウス)を用い、分子生物学、細胞生理学の手法にて肺発生におけるPtenの制御機構をシステム的に解明することにある。特に肺発生細胞分裂時の紡錘体形成機構の解明はこれまでにない独創的なアイデアである。このような研究は肺発生のみならず、各臓器内の機能的細胞を時間的空間的に適切に配置するメカニズムの理解、およびその崩壊による疾患の発症・悪化を理解するための重要な情報を寄与する。本研究を推進することは、これらの病態に対する新規分子治療薬の開発に新たな切り口から貢献できることが予想され、高いインパクトを与えると確信している。

## 3. 研究の方法

(1)肺発生における上皮細胞の分化方向制御機構の解析

AEC特異的Pten欠損マウス(*SOPten<sup>flox/flox</sup>*マウス)とコントロールマウス(*SOPten<sup>wt/wt</sup>*マウス)の胎生肺組織を用いたDNA microarray解析により、神経内分泌細胞(Calca)や、Clara細胞(Scgb1a1)、杯細胞(Agr2)の発現上昇、型肺胞上皮細胞(Sftpa)の発現減少を既に見いだしている。予備実験にて得られたこれらの上皮分化に關与する遺伝子の発現を定量PCRとin situハイブリダイゼーションにより解析する。さらに、肺上皮分化を誘導する因子(Wnt/ $\beta$ -catenin、Hes1、Mash1、Notch)の発現を定量PCRにより解析する。

また、型肺胞上皮(Sftpa、Abca)、型肺胞上皮(Aqp5、T1)、神経内分泌細胞(CGRP)、Clara細胞(CC10)、線毛上皮細胞(Foxj1)、杯細胞(Muc5AC、Agr2)の発現時期を、E12.5、E14.5、E18.5各発生段階における*SOPten<sup>flox/flox</sup>*マウスと*SOPten<sup>wt/wt</sup>*マウスの肺組織を用いて免疫染色を行う。

## (2)間葉系細胞の増殖メカニズム関連分子動態

線維芽細胞成長因子9 (Fgf9) が間葉系細胞の増殖に重要であることがマウスの不活化研究によって実証されている。 *SOPten*<sup>flox/flox</sup> マウスと *SOPten*<sup>wt/wt</sup> マウス胎児 (E12.5、E14.5、E18.5) における増殖シグナル伝達関連分子 (Shh、FGF9、FGFR1・2、 $\beta$ -catenin、Wnt2a・7a、Lef1、CyclinD1) の発現動態をRNAレベルにて定量、及び肺組織の免疫染色を行う。増殖能について、Ki67、pHH3 陽性細胞数ならびにBrdU 取り込み能を比較検討する。さらに、アポトーシスシグナルについてTUNEL Assay とCleaved caspase-3 の免疫染色にて評価を行う。

## (3)間葉系細胞の分化メカニズム関連分子動態

*SOPten*<sup>flox/flox</sup> マウスと *SOPten*<sup>wt/wt</sup> マウス胎児 (E12.5、E14.5、E18.5) における間葉系細胞マーカー ( $\alpha$ -SMA、FSP-1、vimentin、collagen-1、MMP-1) の発現動態を定量RT-PCR にて解析する。さらに、間葉系細胞の分化誘導因子 (Shh、TTF1、 $\beta$ -catenin、FGF10、FGFR1・2、Spry2) の発現動態を定量RT-PCRにて解析する。

## (4)気管支・肺胞形成機構の段階的評価

これまでに、線維芽細胞増殖因子10 (FGF10) とその受容体FGF2 が肺発達後期における肺胞形成や分岐に関与するという報告がある。時間的・空間的な肺形成過程を検討するために、E12.5、E14.5、E18.5、P0の *SOPten*<sup>flox/flox</sup> マウスと *SOPten*<sup>wt/wt</sup> マウス胎児胚を摘出し、HE染色により気管支・肺胞形成の組織学的評価を行う。また、肺間葉の成長に関与するFGF9、FGF10、FGFR2、Spry2 の発現動態を免疫染色にて評価する。

## (5)肺発生細胞分裂時の紡錘体形成機構の解析

予備実験での *SOPten*<sup>flox/flox</sup> マウスと *SOPten*<sup>wt/wt</sup> マウスの肺組織を用いたDNA microarrayにより、細胞分裂に關与するCdkn1b、Cdkn3、及び紡錘体チェックポイントに關与するBub1、Pttg1、Sgo11、Sgo12、Cenpeの発現減少を確認した。染色体の安定な維持には、細胞分裂期における染色体の均等な分配が必須であり、これを制御する分子ネットワークの代表的な機構として、紡錘体チェックポイントが存在する。紡錘体チェックポイントは、すべての染色体で双方向性結合が成立するまで分裂後期への移行を抑える機構である。これはMad1、Mad2、Bub1、Bub3、BubR1といった分子が協同して、分裂後期への移行に重要であるAPC/C(anaphase promoting complex/cyclosome)の活性化を抑制することにより制御されている。DNA Microarray により確認された遺伝子群と細胞分裂中期における紡錘体チェックポイントMad1、Mad2やBub1、Bub3、BubR1の発現動態をRNAレベルにて定量する。さらに、星状体と紡錘体形成の形態学的評価を電子顕微鏡を用いて行う。

## (6)Akt阻害剤による肺発生異常に対するレスキュー効果の検討

Ptenの機能としては、イノシトールリン脂質であるホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸はPI3Kにより細胞内で合成され、PKB/Aktの活性化を引き起こすことにより多彩な生物活性の発現に寄与している。PTEN が阻害されることにより細胞内にはホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸が蓄積し、発がんに関与するシグナルが伝達される。実際、癌細胞においてはPTEN遺伝子に変異などの異常が見つかっている。妊娠 *SOPten*<sup>flox/flox</sup> マウスと *SOPten*<sup>wt/wt</sup> マウスにAkt-inhibitor II (20  $\mu$ g/匹)をE9.5より1日1回連続腹腔内投与する。予備的検討により、 *SOPten*<sup>flox/flox</sup> マウスは出生後に死亡率が上昇している。Akt阻害剤による肺発生に対するレスキュー効果

を生存率、動脈血ガス分析、HE 染色、各上皮分化シグナルマーカー(細気管支前駆体Sox2、肺泡前駆体Sox9、神経内分泌細胞Calca、Clara細胞Scgb1a1、杯細胞Muc5AC、Agr2、線毛上皮細胞Foxj1、型肺泡上皮細胞Sftpc、Sftpa、Abca、型肺泡上皮細胞Aqp5、T1)の発現を免疫染色にて評価する。

#### 4. 研究成果

E18.5 の段階の *SOPten<sup>flox/flox</sup>* マウスと *SOPten<sup>wt/wt</sup>* マウス肺上皮細胞を単離し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、*SOPten<sup>flox/flox</sup>* マウスの肺上皮では、細気管支前駆細胞、肺泡前駆細胞、神経内分泌細胞、Club細胞、杯細胞、型AECのマーカー遺伝子発現が亢進し、型AECの発現が減少すること、Notchシグナルの発現が亢進し、紡錘体形成に参与するCenpE、Shugoshin、Bub1の発現が減少することを見出した(図1)。

E18.5 マウス肺組織の免疫染色では、DNA マイクロアレイの結果と一致し、*SOPten<sup>flox/flox</sup>* マウス肺で神経内分泌細胞、Club細胞、杯細胞、型AECが増加し、型AECと線毛上皮細胞が減少していた(図2)。さらに、*SOPten<sup>flox/flox</sup>* マウスは低酸素血症により出生直後に致死となることを確認した。

哺乳類の正常な胚発生のためには、1.適切な細胞運命決定(Development, 2014)、2.「プログラムされた細胞老化」(Cell, 2013)が重要である。肺発生時の上皮幹細胞・前駆細胞の分化におけるPtenの機能解析の報告はない。一方、「プログラムされた細胞老化」とは、細胞傷害やストレスに非依存性に、制御下に特定領域の細胞老化が生じ、免疫細胞浸潤によって老化細胞が取り除かれ、正常胚発生過程において組織リモデリングが生じるものである。大変興味深いことに、E18.5 *SOPten<sup>flox/flox</sup>* マウスの肺泡領域ではアポトーシス細胞数は対照群と差がない一方、細胞増殖マーカー陽性細胞数は著明に減少していた(図3)。

以上より、上皮でのPten発現が、1.細胞運命決定の制御、2.紡錘体形成を調節することによる「プログラムされた細胞老化」の制御、の2つの機序により、肺発生に決定的な役割を有すると考えた。

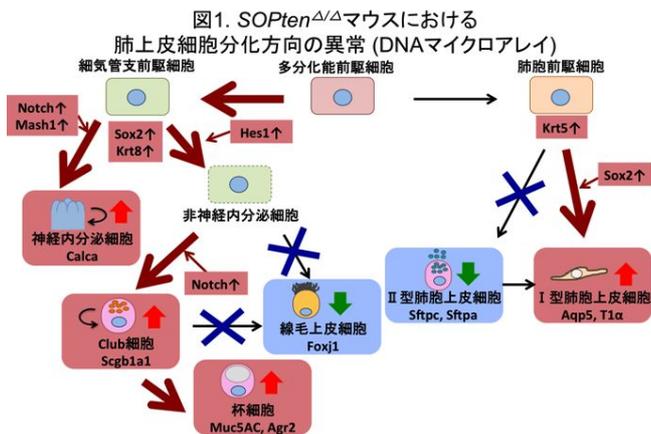


図1. *SOPten<sup>Δ/Δ</sup>*マウスにおける肺上皮細胞分化方向の異常(DNAマイクロアレイ)

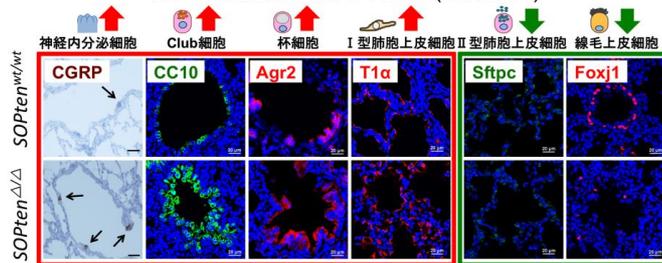
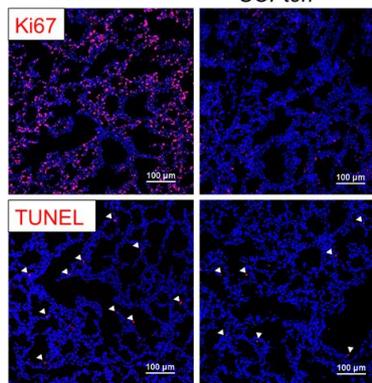


図2. *SOPten<sup>Δ/Δ</sup>*マウスにおける肺上皮細胞分化方向の異常(免疫染色)

図3. *SOPten<sup>Δ/Δ</sup>*マウスにおけるKi67陽性細胞の減少(E18.5)



#### 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5件)

Shigehisa Yanagi, Hironobu Tsubouchi, Ayako Miura, Ayako Matsuo, Nobuhiko Matsumoto, Masamitsu Nakazato: The Impacts of Cellular Senescence in Elderly Pneumonia and in Age-Related Lung Diseases That Increase the Risk of Respiratory Infections.

Int J Mol Sci. 2017 Feb 25;18(3). pii: E503. doi:10.3390/ijms18030503. (査読有り)

Shigehisa Yanagi, Hironobu Tsubouchi, Ayako Miura, Nobuhiro Matsumoto, Masamitsu Nakazato: Breakdown of Epithelial Barrier Integrity and Overdrive Activation of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome and Lung Fibrosis.

Biomed Res Int. 2015;2015:573210. doi: 10.1155/2015/573210. (査読有り)

Hironobu Tsubouchi, Shigehisa Yanagi, Ayako Miura, Sachiko Mogami, Chihiro Yamada, Seiichi Iizuka, Tomohisa Hattori, Masamitsu Nakazato: Rikkunshito ameliorates cachexia associated with bleomycin-induced lung fibrosis in mice by stimulating ghrelin secretion.

Nutr Res. 2014 Oct;34(10):876-85. doi: 10.1016/j.nutres.2014.08.014. (査読有り)

Hironobu Tsubouchi, Shigehisa Yanagi, Ayako Miura, Nobuhiro Matsumoto, Kenji Kangawa, Masamitsu Nakazato: Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice.

Eur J Pharmacol. 2014 Nov 15;743:1-10. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.09.025. (査読有り)

Hironobu Tsubouchi, Shigehisa Yanagi, Ayako Miura, Seiichi Iizuka, Sachiko Mogami, Chihiro Yamada, Tomohisa Hattori, Masamitsu Nakazato: Rikkunshito ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in a ghrelin-independent manner.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 Feb;306(3):L233-45. doi:10.1152/ajplung.00096.2013. (査読有り)

[学会発表](計4件)

三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、中里雅光：  
肺発生時の上皮細胞分化と肺形態形成  
におけるPTENの役割

第57回日本呼吸器学会学術講演会

2017年4月21-23日、東京国際フォーラム、  
東京都千代田区

Ayako Miura, Hironobu Tsubouchi, Shigehisa Yanagi, Nobuhiro Matsumoto, Masamitsu Nakazato: The role of Pten in the cell-fate determination of epithelial cells in lung development.

26th European Respiratory Society international congress, London

2016年9月3-7日, London, United Kingdom

三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、中里雅光：  
肺発生時の上皮細胞の細胞運命決定にお  
ける PTEN の役割

第2回呼吸器基礎研究を加速するための  
若手研究会議

2016年4月8日、国立京都国際会館、京  
都府京都市

三浦綾子、坪内拡伸、柳重久、松元信弘、  
中里雅光:肺上皮 Pten は Notch シグナル  
により肺上皮細胞の形態形成と正常な分  
化方向をコントロールする

第89回日本薬理学会年会、2016年3月  
9-11日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜  
市

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

三浦 綾子 (AYAKO MIURA)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：70710903

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )