

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 221

氏 名

野口雅文

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: パドヴァ大学 (国名: イタリア)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

メカノトランスドューサーYap/Taz の多形成膠芽腫における役割

3. 派遣期間: 平成 29 年 6 月 6 日 ~ 平成 31 年 6 月 5 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Biology, University of Padova

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入)

も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

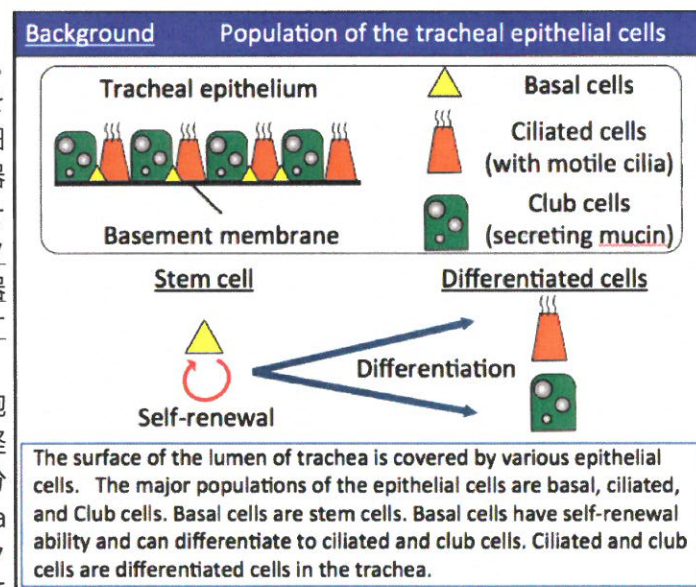
(テーマ) 気管幹細胞におけるミトコンドリアダイナミクスの役割の解明

(研究の目標)

組織幹細胞はそれぞれの組織内で未分化性を維持し、損傷など緊急時に一過的に増殖、分化細胞を供給する。組織の恒常性維持のためには組織幹細胞がその機能を適切に発揮することが必要である。しかし、組織幹細胞において多くの機能を担うと想定される細胞内小器官の役割については未踏領域が多く残されている。そこで本研究では、近年、細胞内シグナルネットワークのハブ機能を持つことが報告されつつある細胞内小器官、ミトコンドリアの気管幹細胞の増殖と分化に対する役割を解明する。

ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返す動的な細胞内小器官である。その形態変化は古典的なシグナル経路(Notch シグナル等)を介し、組織の発生や細胞分化を制御する(Kasahara et al. Science 2013 and Mitra et al. J. Cell Biol. 2012)。ミトコンドリアの内膜構造(クリステ)に局在する GTPase MSP1 (研究結果について未発表のため仮称)は、外膜の融合及び内膜のクリステ構造を調節する。MSP1 はクリステ構造の調節により呼吸鎖酵素複合体を安定化し、酸化的リン酸化を効率化する。しかし、組織幹細胞の維持や分化、組織幹細胞恒常性の破綻による癌化過程へのミトコンドリア動態の関与については未解明な点が多い。

呼吸器近位の気管上皮は外気に曝され頻繁に損傷を受けるが、迅速な修復機構により再生される。気管上皮幹細胞である基底細胞は低頻度の自己複製による自身の数量維持と粘液(クラブ)細胞、線毛細胞への分化により気管上皮細胞の数的バランスを維持する。損傷時に基底細胞は急速に増殖し露出した



基底膜を被覆、速やかに分化し上皮を再生する。一方、喫煙による慢性閉塞性肺疾患（COPD）では、基底細胞が異常増殖また異常分化することで扁平上皮が形成され、最終的には肺扁平上皮がん（squamous cell carcinoma; SQCC）が誘導される。

前年度、下記 2 点を調査した結果、ミトコンドリア形態と基底細胞機能の相関が示唆された。

#### ① SQCC 患者組織におけるミトコンドリア形態形成因子の発現プロファイル解析

Oncomine データベースによると、驚くべきことに、SQCC 等固形がんにおいて発現亢進がみられる遺伝子群の中で上位 5% に MSP1 が入っていた（約 2 倍、 $p < 1 \times 10^{-4}$ ）。また cBioPortal において、TCDA データセットを参照すると、約 40 % の SQCC 患者において MSP1 ゲノムのコピー数変化が生じていた（Fig. 1）。

#### ② 透過型電子顕微鏡（TEM）による基底細胞のクリステ構造の観察

4 ヶ月と 13 ヶ月齢マウス定常時の基底細胞のクリステ形態について TEM 画像を比較した結果、13 ヶ月（Fig. 2）は 4 ヶ月に比べて異常なクリステ構造を有していた。同様のクリステ構造欠損は MSP1 knockout マウス繊維芽細胞においてみられる（Del Dott et al. Cell Reports 2017）。また、加齢マウス気管の基底細胞は繰り返しの傷害により再生時の細胞増殖効率が低下する（Haller et al. cell stem cell 2017）。以上から基底細胞の増殖能の低下と MSP1 の発現低下の相関の可能性が想起された。

①、②から、MSP1 がミトコンドリア形態とそれに続く細胞内シグナルを制御し、基底細胞の増殖、分化能に影響を与える可能性が高いと推察した。さらに MSP1 発現量の異常は、基底細胞の恒常性を破綻させ、異常増殖、異常分化に続く、COPD また SQCC 様の上皮を誘導する可能性が考えられた。

#### 気管幹細胞におけるミトコンドリア形態制御の役割の解明

##### 気管幹細胞増殖、分化に対するMSP1の関与を検証

- ①-1、② 初代培養系（オルガノイド、mTEC）  
及び扁平上皮化生様上皮誘導モデル
- ③-1 MSP1変異マウスモデルの解析

##### MSP1による形態制御が影響するシグナル経路の同定

- ①-2、③-2 RNA seq data、  
Wnt, Notch, Yap, Smad活性の解析

##### 形態制御のシグナル経路に対する作用点の解明

- ④ ミトコンドリア依存性のCa<sup>2+</sup>シグナリング  
及びメタボローム解析

#### 気管幹細胞の恒常性維持及びその破綻による 肺扁平上皮がん発癌メカニズムの解明

\* 番号は下記の研究計画に対応

そこでさらに以下の 3 点を目的として①-④について研究を行なった。

- 1) 基底細胞の増殖及び分化における MSP1 の役割の解明
- 2) 基底細胞におけるミトコンドリア形態依存的なシグナル経路の同定
- 3) ミトコンドリア形態制御がどのように細胞内シグナルに影響するか、その作用点の解明

以上は、気管幹細胞の恒常性維持とその破綻による肺扁平上皮がん発癌メカニズムの解明につながると期待される

特に現研究室が所有する MSP1<sup>flox</sup> マウスを用いて MSP1 の基底細胞における機能を解析する。

#### ① 気道上皮細胞の初代培養法を用いた MSP1 の基底細胞における機能解析

本年度は前年度に立ち上げた 2 次元初代培養系（mouse tracheal epithelial cell culture; mTEC）および基底細胞のオルガノイド（tracheosphere）培養法を用いて、MSP1 基底細胞における機能を検証した。

mTEC では基底細胞を増殖させ、気相液相培養により線毛細胞への分化を誘導できる。MSP1<sup>fl/fl</sup> マウス気管より単離した基底細胞に対し、Retro-Cre-GFP を感染させ作成した MSP1 欠損基底細胞（MSP1KO BCs）を分化誘導したところ、線毛細胞への分化効率が著しく低下することを見出した（Fig. 3）。以上により MSP1 が基底細胞から線毛細胞への分化過程に必要であることが示された。本データは、ミトコンドリア形態制御因子が、肺における組織幹細胞の分化に必要であることを初めて示したものであり、重要な発見であると考えている。現在、Dr. Kimura (NIH) よりクラブ細胞マーカーである Scgb3a2 のポリクローナル抗体を供与頂き、MSP1 欠損が基底細胞からクラブ細胞分化に影響するか検証中である。

Tracheosphere assay では 基底細胞の自己複製能について sphere の成長を計測し検証できる。2 回の試行では、MSP1KO BCs 由来の Tracheosphere は成長しなかった（Fig. 4A）。以上は、MSP1 が基底細胞の自己複製に必要である可能性が示されている。現在、MSP1KO BCs をマトリゲルより回収し、細胞分裂マーカーを用いて詳細を解析している。また相補実験として逆に MSP1 を過剰発現させた

Tracheosphere を作出した。MSCV/ IRES-MSP1 vector を用いて産生した Retro virus を基底細胞に感染させ (OP1 OE)、マトリゲル内に播種すると、通常の球形とは異なる、異常な形態の Tracheosphere が複数観察された (Fig. 4B)。同形態の Tracheosphere はこれまでに報告例がなく、現在 Tracheosphere 切片を作成し、基底細胞の増殖異常や極性異常が生じていないか詳細を解析中である。特に近年報告された、基底細胞の分化を極性依存的に制御する、Crbm3 (Szymaniak et al., Dev Cell, 2016) とミトコンドリア形態依存的に制御される極性制御因子 aPKC (Wu et al., Cell Metabolism, 2019) に注目し、発現や局在を検証する。

また、クリステ構造の形態制御機能のみが特異的に欠損し、ミトコンドリア融合は正常な変異 MSP1 (研究室未発表) を MSP1KO BCs に発現させ、クリステと融合のどちらの制御が基底細胞分化に重要であるか検証する。さらにミトコンドリア分裂因子 Drp1 の欠損基底細胞を作出し、自己複製と分化能について MSP1 欠損と逆の影響がみられるか検証する。

## ② 扁平上皮化生 (squamous metaplasia; SQM) 様気管上皮誘導系を用いた MSP1 機能解析

肺培養細胞への SOX2 の過剰発言により、SQM 様気管上皮が誘導されることが報告されている (Kim et al. Plos Biol 2016)。本年度は、レンチウイルスにより mTEC へ SOX2 を過剰発現させることを目的として、mTEC へのレンチウイルス導入系を最適化した。結果、80%以上の基底細胞にレンチウイルスを感染させる系を樹立することに成功した。さらに、同系に適合するプラスミドを作成 (pLJM1-hSOX2) した。今後、MSP1KO と MSP1OE BCs に Lenti-SOX2 を感染させ、MSP1 が SQM 誘導を助長するか検証する。SQM 誘導は基底細胞重層化と扁平上皮マーカー (Invoculin) 陽性細胞の出現で評価する。

## ③ MSP1 の基底細胞における *in vivo* 機能解析と活性化シグナル経路の同定

MSP1 欠損マウスは胎生致死であるが、MSP1flox マウスに Krt5-Cre-ERT2 マウスを交配する (MSP1cKO) ことで、基底細胞特異的、また時期特異的に MSP1 を欠損させ解析することが可能となる。さらに、Cre-ERT2 発現基底細胞に由来する細胞をラベル (lineage tracing) するため、mito-YFP flox マウスを掛け合わせている (Krt-Cre-ERT2; MSP1<sup>fl/fl</sup>; mito-YFP<sup>fl/+</sup>)。現在までに、Krt-Cre-ERT2; MSP1<sup>fl/+</sup> 及び MSP1<sup>fl/+</sup>; mito-YFP<sup>fl/fl</sup> マウスの作成を完了している。充分数のマウスを確保次第、定常時もしくは naphthalene 傷害再生時の基底細胞と線毛、クラブ細胞の数量、分布に変化がみられるか免疫組織染色法にて検証する。

MSP1 による形態制御が影響するシグナル経路の同定。近年、p53 family protein の一つである p73 が線毛細胞分化に関わる転写因子群を制御することが報告された (Clayton et al., Cell reports, 2016、Nemajero et al., GENES & DEVELOPMENT, 2016)。p73 には TAp73、DNp73 等の複数のアイソフォームが報告されており、DNp73 は TAp73 に阻害的に働くことが知られている。①で MSP1 KO の線毛細胞分化に強い影響がみられることから、p73 経路の関与が想定され、現在 TAp73 と DNp73 の発現量について qPCR や Western Blotting で検証している。

p73 に関しては、Prof. Gerry Melino laboratory (MRC Toxicology Unit, Cambridge, UK) と共同して研究を行うことが決まり、プラスミドやマウス等の供与を受けることが可能となった。また、Prof. Melino 研究室の解析により、p73 が MSP1 の転写活性を約 40 倍上昇させることが明らかとなった。同研究室より供与頂いた TAp73 及び DNp73 発現用プラスミドを用いて、mTEC に TAp73、DNp73 を過剰発現させることで MSP1 の発現量に変化がみられるか検証する。

p73 経路に加えて MSP1 によってどのシグナル経路に影響があるか、また線毛細胞分化が滞ることにより、基底細胞がどのように異常分化するのかを包括的に解析するため single cell RNA seq を行う予定である。Single cell RNA seq は①の Drp1KO の解析が済み次第、Prof. Iannis Aifantis (NYU School of Medicine, USA) と共同で行うことになっている。

また、上記の Krt-Cre-ERT2; MSP1<sup>fl/fl</sup>; mito-YFP<sup>fl/+</sup> で上皮細胞の数量バランスに影響がみられた場合、自己複製、分化を制御する、Yap, Smad, Notch シグナルにより、各々の活性化を活性化抗体での免疫組織染色で評価する。

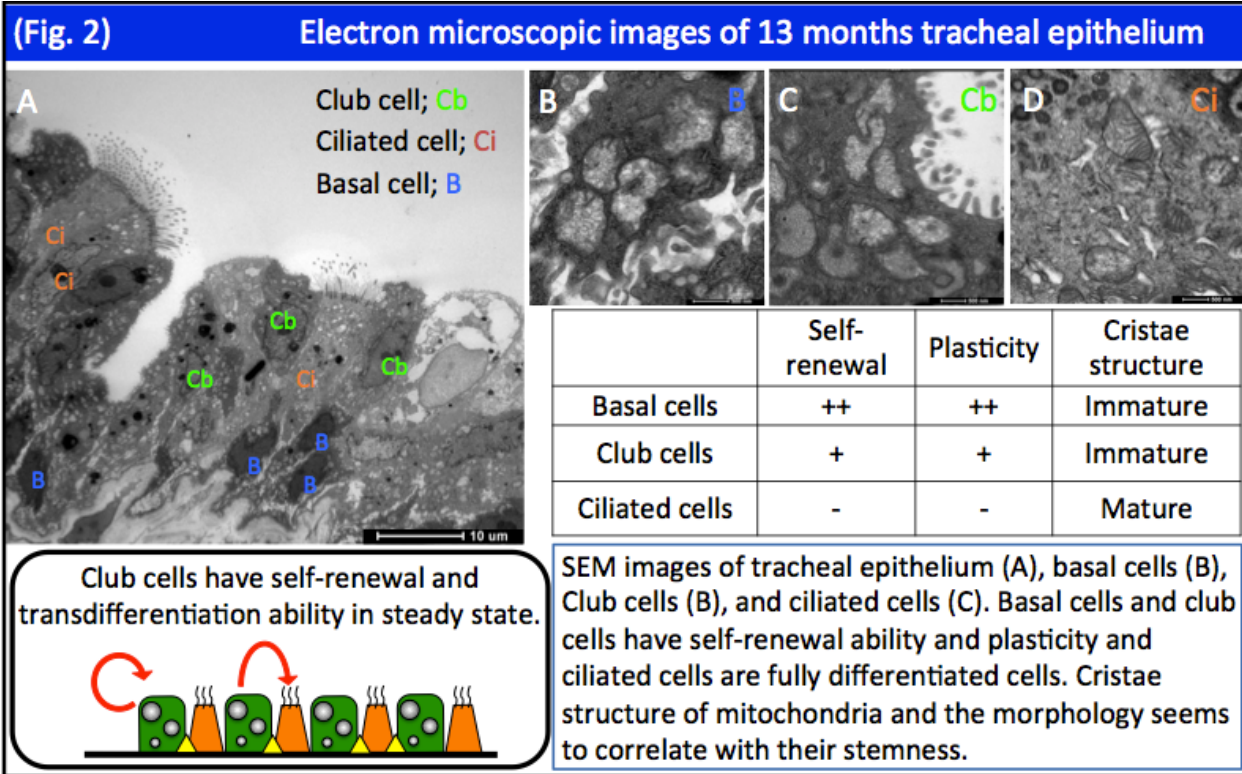
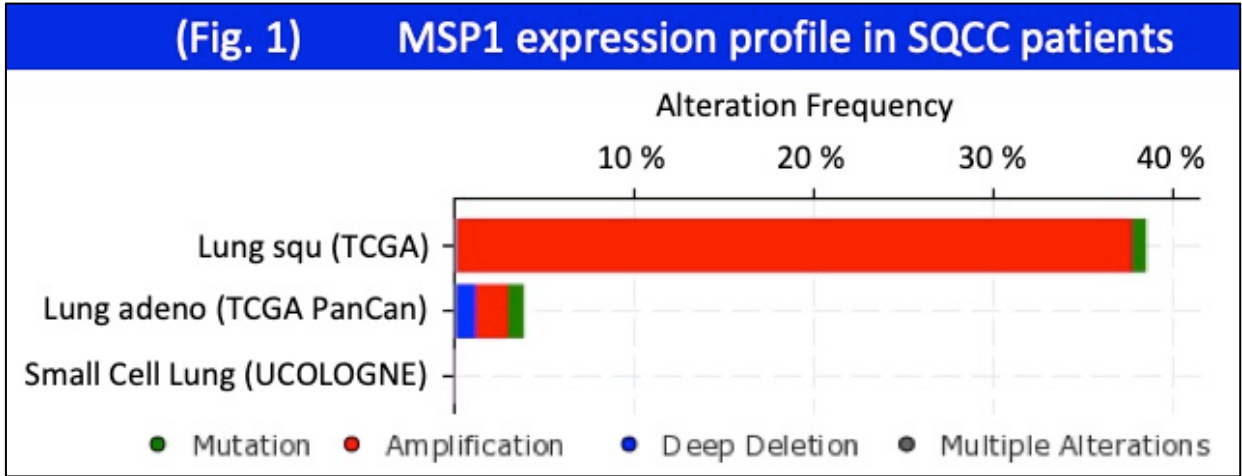
Notch シグナルは基底細胞の線毛細胞への分化を抑制するが、①の予備実験で Notch 阻害剤の添加による分化誘導の亢進に成功しており、本系を MSP1 の Notch を介した分化の関与への検証に使用する予定である。気管上皮再生時に活性化される Wnt シグナルであるが、予備実験で Wnt 阻害剤による自己複製能の低下と活性化剤での亢進を発見した。また複数のがん細胞株で、MSP1 ノックダウンによる Wnt シグナルの構成因子  $\beta$ -catenin の発現量変化を発見しており、基底細胞でも同様に検証中である。MSP1

が Wnt を介して自己複製能を制御するか同系を用いて検証する。

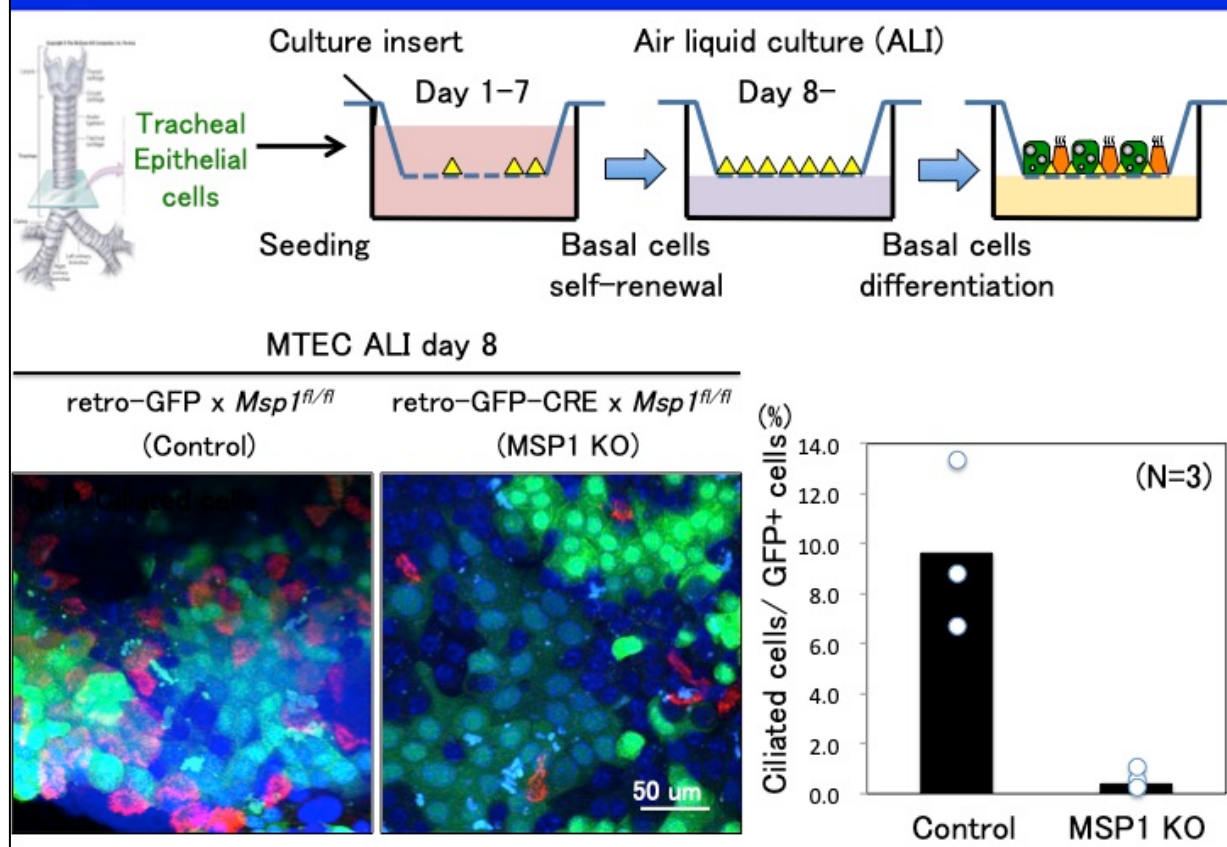
④ ミトコンドリア形態制御のシグナル経路に対する作用点の解明

ミトコンドリア形態の制御がどのようにシグナル経路に作用するのであろうか。心筋において MSP1 はストア感受性  $\text{Ca}^{2+}$  流入に続く、カルシニューリン依存的な Notch シグナルを制御する (Kasahara et al. Science 2013)。そこで①③で変化がみられたシグナル経路の制御についてミトコンドリア依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  制御が必要か検証する予定である。本年度は①の *in vitro* 系のサイトゾル、ミトコンドリア、ER の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を蛍光で定量するため、系に適合する lenti virus 用コンストラクトの作成を行った (pLJM1-Kai2/ GCaMP6、pLJM1-Kai2/ mito-GCaMP6、pLJM1-Kai2/ ER-GCaMP6-150)。以上を mTEC、Tracheosphere の系に導入し、MSP1 が基底細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  をどのように制御するか検証する。

また MSP1 欠損によりミトコンドリア代謝異常が生じると推察される。そこで LC-MS/MS で MSP1 変異基底細胞のメタボローム解析を行い、代謝物変化を検証する。さらに代謝変化に続くエピジェネティック状態の変化を解析することで、シグナル経路変化の原因を追究する。現研究室では他臓器の MSP1 欠損細胞におけるメタボローム解析系を Camilla Bean と Prof. Nico Mitro (University of Milan) が立ち上げており、協同で検証を行う。



(Fig. 3) MSP1 knockout basal cells less differentiate into ciliated cells.



(Fig. 4) Alteration of MSP1 expression level affects the growth and morphology of tracheospheres.

