

平成 31 年 6 月 30 日

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 203

氏 名

津久井 達哉

(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: サンフランシスコ (国名: 米国)

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。

肺線維症における新規病的線維芽細胞サブセットの役割

3. 派遣期間: 平成 29 年 6 月 1 日 ~ 平成 31 年 5 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学サンフランシスコ校

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。

1. 1細胞RNAシーケンスを用いた、肺線維症における新規線維芽細胞亜集団の同定

特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)に代表される肺線維症は、有効な治療法に乏しく、病態のメカニズムに基づいた新規治療標的の同定が急務である。線維症においては、慢性的な炎症下で傷害部位に活性化した病的線維芽細胞が集積し、それらが組織に過剰なコラーゲン沈着をもたらすことで不可逆的な線維化が進行する。一方で、活性化した線維芽細胞の特徴やその起源については、未だにはっきりとした知見が得られていない。線維化の進行を効果的に抑制する治療法を開発するためには、活性化線維芽細胞を詳細に特徴づけることが不可欠である。

私は肺における線維芽細胞を包括的に特徴づけるため、1細胞RNAシーケンスを用いた解析を行った。線維芽細胞の多様性を明らかにするため、線維芽細胞が高発現する1型コラーゲンのGFPレポーターマウス(Col1-GFP) (Yata et al., 2003)を使用した。未処理のマウスとブレオマイシンによって肺線維症を誘導したマウスの肺を分散した後に、GFP⁺陽性細胞とGFP⁻細胞を純化し、それぞれを10x Genomics Chromium システムを用いて1細胞RNAライブラリーを作製した。次世代シーケンサーでライブラリーをシーケンシングし、アライメントを行った後に、Seurat Rパッケージを用いて解析した。検出遺伝子が少ない細胞や、ミトコンドリア遺伝子の割合が高い細胞を除いた後、CCA subspace alignment 法で各サンプル由来の細胞を合わせたところ、およそ26,000個の細胞遺伝子発現プロファイルが得られた(図1)

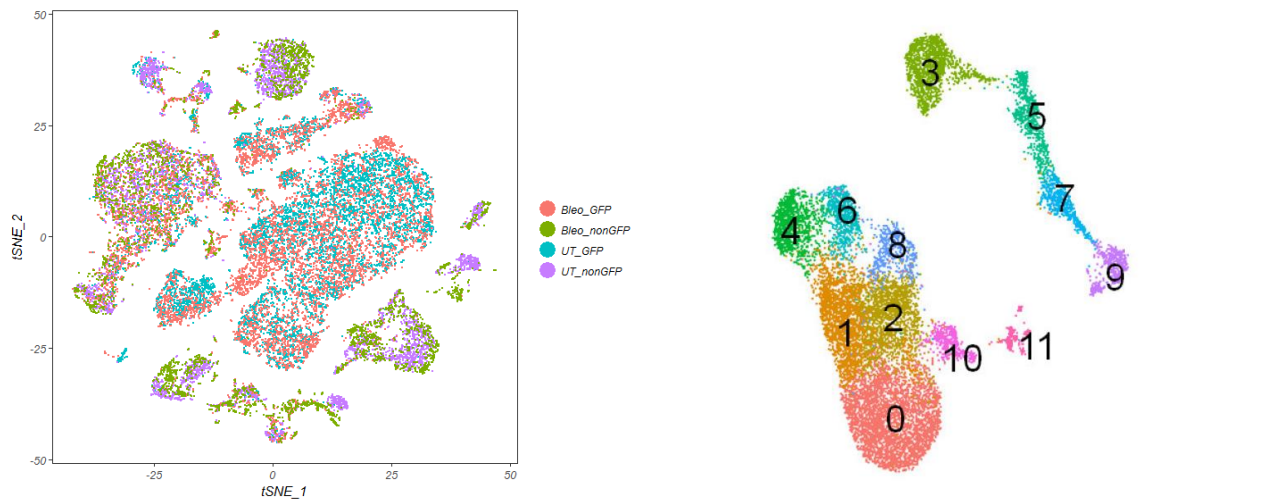


図1 取得した全細胞（左）と1型コラーゲン陽性細胞（右）のクラスタリング

線維芽細胞の多様性をより高い解像度で明らかにするため、得られた細胞群の中から1型コラーゲン陽性細胞を抽出し、再クラスタリングを行ったところ12個のクラスターを得た。

得られたクラスターのマーカー解析を行ったところ、一部は既知のマーカーを発現する平滑筋細胞（クラスター5, 7）やペリサイト（pericyte, クラスター9）であることが明らかになった。クラスター11はMki67を高発現する増殖細胞だった。しかしながらその他のクラスターマーカーについてはこれまで詳細に分類されていないものだった。

クラスタリングにより明らかになった線維芽細胞亜集団の局在を明らかにするため、最近報告された in situ ハイブリダイゼーション技術である PLISH (proximity ligation in situ hybridization) を用い (Nagendran et al., 2018)、クラスターマーカーの局在を調べた。クラスター0, 1, 2, 10は似通った遺伝子発現プロファイルを持っており、さらにそれらのマーカーは肺胞壁に存在する Col1-GFP 陽性細胞が高発現していた (alveolar fibroblast)。クラスター4, 6のマーカーは気道と動脈の束である bronchovascular bundle 内の空間の Col1-GFP 陽性細胞に高発現していた (adventitial fibroblast)。クラスター4は Il1-33 や Ccl11 等のサイトカイン遺伝子を発現しており、免疫細胞とのクロストークが示唆された。クラスター6は Adh7 等のマーカー発現によって特徴づけられた。クラスター3のマーカーは気道上皮細胞の直下で、平滑筋細胞と近接する Col1-GFP 陽性細胞に高発現していた (peribronchial fibroblast) (図2)

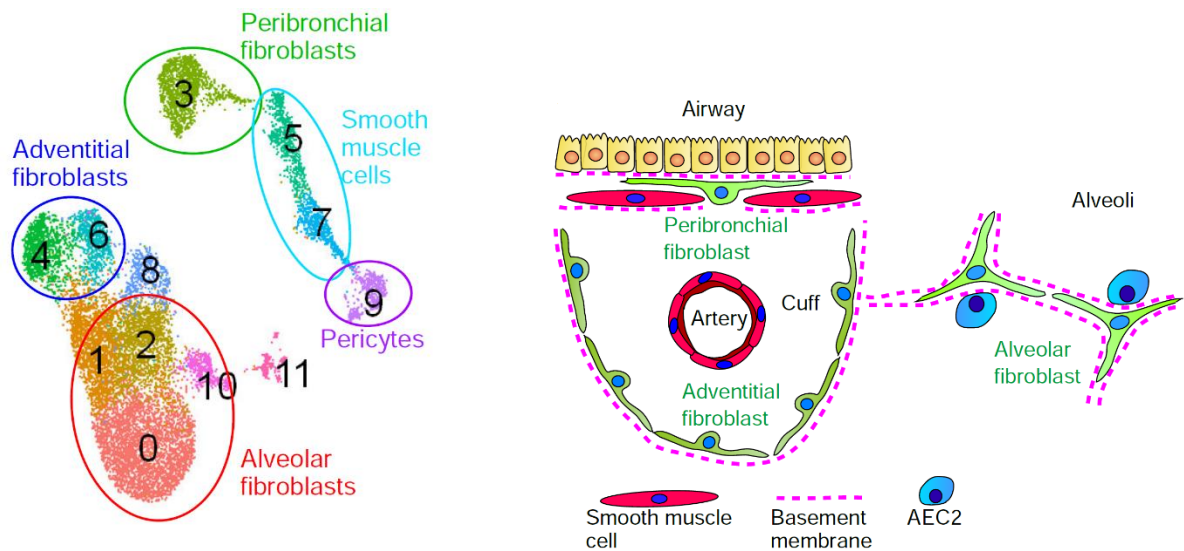


図2 各クラスターの局在（左）とその模式図（右）

2. 線維化肺に特異的なクラスターの同定とその特徴

明らかになったクラスターの多くは通常肺と線維化肺両方のサンプルに共通したものであったが、クラスター8はその多くが線維化肺由来細胞であった。クラスター8のマーカを解析したところ、1型コラーゲンをはじめとするコラーゲン遺伝子を最も高く発現しており、さらに tenascin c や osteopontin、periostin 等の細胞外マトリックスを高発現していた。PLISH を用い、線維化を誘導した肺でその局在を調べたところ、肺胞における線維化領域の一部の Col1-GFP 陽性細胞であることが分かった（図3）。これらの特徴から、クラスター8が線維化において細胞外マトリックスを放出する病的線維芽細胞であることが示唆された。

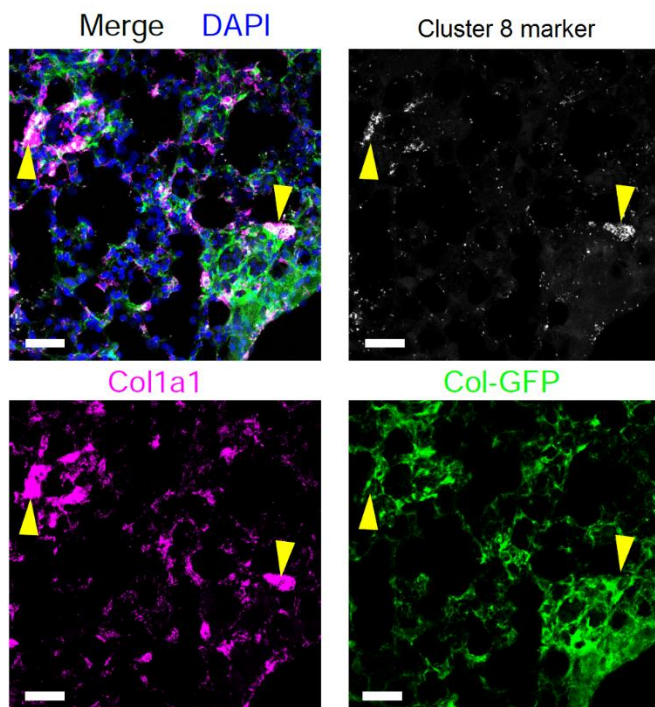


図3 PLISH を用いた Cluster8 細胞の局在同定

3. ヒトの線維症患者由来のサンプルを用いた 1 細胞 RNA シークエンス解析

次にヒトのサンプルを用い、マウスで明らかにした亜集団に保存性があるかを検討した。通常肺のサンプルは3名の臓器移植ドナーより得た。線維化肺は、肺移植の際に摘出された肺を用い、3名の IPF 患者と2名の scleroderma 患者からサンプルを得た。線維芽細胞を純化するため、lineage (CD31, CD45, CD235a, EpCAM) 陰性細胞をセルソーターにより純化した。さらに、比較のために全肺細胞 (CD235a 陰性) も同時に純化した。マウスと同様に 10x Genomics Chromium システムを用いて 1 細胞 RNA ライブラリーを作製し、1 細胞遺伝子発現プロファイルを取得した（図4）。

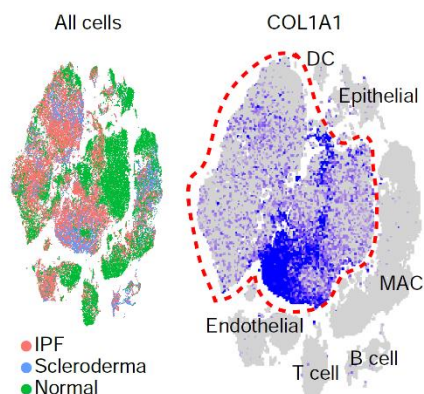


図4 ヒトの通常肺と線維化肺の 1 細胞 RNA シークエンス解析

1型コラーゲン産生細胞を抽出し、再クラスタリングしたところ、マウスにおける alveolar fibroblast, adventitial fibroblast, peribronchial fibroblast, smooth muscle cell, pericyte に相当するクラスターが見つかり、1型コラーゲン産生細胞の多様性がマウスとヒトで保存されていることが明らかになった。さらに、マウスで病的線維芽細胞として同定された cluster8 に相当するクラスターも存在した。そのクラスターはマウスのクラスター8 と共通のマーカーを発現しており、マウスと同様に病的線維芽細胞であることが示唆された。

4. 各種線維芽細胞亜集団の単離方法の確立

1細胞 RNA シーケンス解析により明らかになった線維芽細胞亜集団の細胞表面マーカーを調べたところ、特定の分子を用いることでそれぞれが単離可能であることが示唆された。Col-GFP マウスの肺を分散し、各マーカーで染色してセルソーターで集団を純化し、定量的リアルタイム PCR によって各集団のマーカー遺伝子発現を調べたところ、alveolar fibroblast, adventitial fibroblast, peribronchial fibroblast それぞれが当該表面マーカーで単離可能であることが明らかになった。さらに、ブレオマイシンによって肺線維症を誘導した肺を分散し、クラスター8 の表面マーカーを発現する細胞を純化したところ、クラスター8 が発現するその他のマーカー遺伝子を高発現していた。このセルソーティング手法を用い、クラスター8 細胞を単離して、細胞遊走アッセイを行ったところ、クラスター8 は alveolar fibroblast, adventitial fibroblast と比較して高い遊走能を持っていることが明らかになった (図5)。さらに、線維化を誘導した野生型マウスに、Col-GFP マウスから単離したクラスター8 細胞を経気道細胞移植法で養子移植したところ (Tsukui et al., 2015)、alveolar fibroblast, adventitial fibroblast と比較して高い生着能を有していることが分かった (図6)。これらの結果は、クラスター8 細胞が高度に活性化した病的線維芽細胞であることを示している。

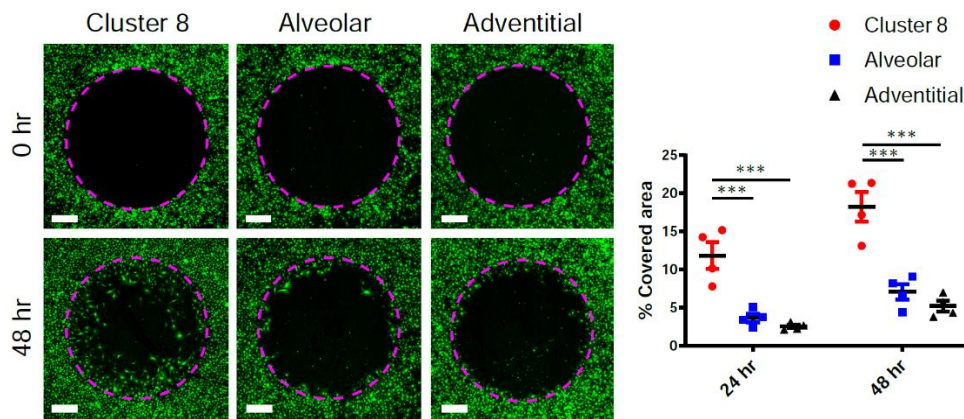


図5 クラスター8 細胞が示す高い遊走能

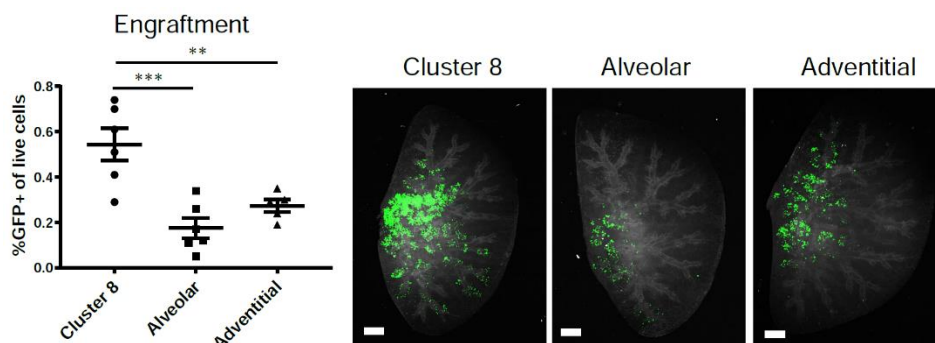


図6 クラスター8 細胞が示す養子移植後の高い生着能

本研究はこれまで知識に乏しかった肺の線維芽細胞亜集団を包括的に明らかにし、それぞれのマーカーや単離方法を明らかにした。さらに、線維化肺に特異的な病的線維芽細胞を明らかにし、それらが線維化に促進的な表現系を有していることを明らかにした。今後は病的線維芽細胞の役割を更に詳しく解析し、新規治療標的の同定を目指す。

Reference

- Nagendran, M., Riordan, D.P., Harbury, P.B., and Desai, T.J. (2018). Automated cell-type classification in intact tissues by single-cell molecular profiling. *Elife* 7.
- Tsukui, T., Ueha, S., Shichino, S., Inagaki, Y., and Matsushima, K. (2015). Intratracheal Cell Transfer Demonstrates the Profibrotic Potential of Resident Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 185, 2939-2948.
- Yata, Y., Scanga, A., Gillan, A., Yang, L., Reif, S., Breindl, M., Brenner, D.A., and Rippe, R.A. (2003). DNase I-hypersensitive sites enhance alpha1(I) collagen gene expression in hepatic stellate cells. *Hepatology* 37, 267-276.