

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 H31

受付番号 201960752

氏名

小林芳彦

(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: ダーラム (国名: アメリカ合衆国)

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。

Reserve stem cells による気管再生における細胞運命転換メカニズム3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 6 月 15 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: Duke University School of Medicine部局名: Department of Cell Biology5. 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。

■**研究の背景:** 生体組織の多くは各々が組織幹細胞を持ち、組織の恒常性維持および傷害後の再生に重要な役割を果たす。皮膚・気管・食道などの重層または偽重層上皮組織において、基底細胞が組織幹細胞として働き、傷害後に基底細胞の自己増殖および分化が活性化されることで組織を再生する。しかしながら重度の障害を誘導した場合、通常とは異なる様式の組織再生を観察する場合がある。例えば皮膚の場合、重度の障害を誘導すると毛包や皮脂腺内の細胞が皮膚表面へ遊走し、皮膚表面上皮細胞の再生へ寄与することが細胞系譜追跡によって示されている。また小腸陰窩では、resident-stem cells の Lgr5 陽性細胞を、+4 細胞が再生できることが示されている。これらの細胞は、重度障害を受け resident-stem cells を失ったときにその機能を発揮する特性から “**reserve stem cells**” と呼ばれている。

感染防御のための障壁という側面を持つ気管上皮組織において、傷害の再生は、バリア機能の維持や副次的ダメージの防止という観点から速やかな再生が求められる。本研究者のグループは近年、粘膜下腺筋上皮細胞に発現する α -smooth muscle actin (α SMA) をコードする遺伝子である Acta2、並びに粘膜下腺の上皮細胞全てに発現する

Sox9 をドライバーとして細胞系譜追跡を実施し、気管粘膜下腺の筋上皮細胞が、気管腔の基底細胞に取って代わることのできる **reserve stem cells** であり、重度の障害で気管腔の広範囲がダメージを受けた場合にも、遊走によって気管腔をカバーし、繊毛細胞および分泌細胞に分化できることを示していた。しかしながら、同細胞が粘膜下腺組織内の分化細胞に対して、どのように寄与するのかについては不明な点が多く残る。本研究においては、粘膜下腺内での細胞運命転換機構に着目し、以下の実験を遂行した。

1) Single-cell RNA-seq による傷害後粘膜下腺組織における細胞の **heterogeneity** 検出

野生型マウスに Naphthalene を投与し、投与 3 日後の粘膜下腺細胞を single-cell RNA-seq により解析した。なお、Naphthalene 投与は気管腔上皮細胞のほぼすべてに加え、粘膜下腺内の mucous cells を死滅させることができる。また、Single-cell RNA-seq 解析には、microfluidics 技術を応用した方法である Drop-seq が用いられた。Naphthalene 投与 3 日群において、mucous cell marker である Muc5b および serous cells marker である Ltf の両方の mRNA が陽性である細胞群 (Sero-mucous cells) を検出した。なおこの細胞群は Naphthalene を投与しないコントロール群には認められなかった。同様の細胞は、免疫組織化学による両マーカーの染色でも確認された。Spliced RNA と unspliced RNA の比をもとに細胞の分化経路を推定することのできる RNA velocity 技術を用い解析したところ、Sero-mucous cells は Serous cells および Ductal secretory cells を起点に分化した細胞であることが示唆された。また、気管腔上皮の reserve stem cells である筋上皮細胞は、投与 3 日では粘膜下腺のいかなる細胞にも分化しないことが推定された。

2) 気管粘膜下腺細胞の系譜追跡

Acta2-CreER; Rosa26-lsl-tdTomato (筋上皮細胞)、Mist1-CreER; Rosa26-lsl-tdTomato (Serous cells), Krt19-CreER; Rosa26-lsl-tdTomato (Ductal secretory cells) または Tff1-CreER; Rosa26-lsl-tdTomato (Mucous cells) マウスモデルを用い、Naphthalene 投与に先立ち Tamoxifen を投与することで粘膜下腺を構成する細胞をそれぞれ標識した。Naphthalene 投与 3 日後の粘膜下腺において、Mist1-CreER; Rosa26-lsl-tdtomato ならびに Krt19-CreER; Rosa26-lsl-tdtomato マウスモデルにおいて標識細胞が Sero-mucous cells に分化することが確認され、1) の RNA velocity 技術において推定された分化経路が証明された。Sero-mucous cells の細胞数は投与 3 日後がピークであり、その後は Sero-mucous cells の数が減る一方で Muc5b 単一陽性である mucous cells の割合が増えることから、Sero-mucous cells は mucous cells の前駆細胞である

ことが示唆された。その一方で、投与 3 日においては Acta2-CreER;Rosa26-lsl-tdTomato モデルを用いて標識した筋上皮細胞が、他の粘膜下腺細胞への分化をしないことが証明された。興味深いことに、投与 3 日のような短期間の粘膜下腺組織修復において寄与の認められなかった筋上皮細胞は、投与 30 日や 90 日のような長期間を置いたあとの組織において mucous cells や serous cells への分化が認められた。この組織再生は、筋上皮細胞が Naphthalene 投与 5 日で気管腔上皮細胞を再生し始めることと対照的であり、何らかのメカニズムによって、筋上皮細胞の組織再生への寄与が、気管腔から粘膜下腺に切り替わる可能性が考えられる。

3) 呼吸器疾患患者における気管粘膜下腺の細胞 population の変化

喘息や気管支炎患者の気道においては粘液の分泌動態が通常と異なることが知られている。実際に気道サンプルを Alcian Blue-Periodic acid-schiff 染色に供し、陽性部位の面積を計測したところ、喘息および気管支炎患者において肥大が認められた。より詳細な解析を行うため、Control および喘息患者の気管粘膜下腺を micro-dissect し dissociation した後に single-cell RNA-seq に供した。ヒトの気管粘膜下腺においてもマウスと同様に Mucous, Serous, Myo-epithelial, Ductal, Basal cells 等の細胞群が認められた。さらに Sero-mucous cells も同様にヒトにおいても認められ、その細胞数は control と比較し喘息患者サンプルにおいて多かった。さらに Mucous cell に認められる sub population (Mucous-1 および Mucous-2) のうち一群はより多く喘息患者サンプルにおいて認められ、さらに Sero-mucous cells により近い遺伝子発現プロファイルを持っていた。

■**考察:** 本研究において、通常状態では quiescent な組織である粘膜下腺は、マウスにおける傷害モデルならびに呼吸器疾患患者において active 状態となり、細胞 population に変化が起こり組織がリモデリングされることが明らかとなった。リモデリングの代表的細胞群として Sero-mucous cells が挙げられ、同細胞は通常組織にほとんど存在しない細胞種であることから、疾患特異的細胞群であり、これの機能を解明することは疾患治療法を考えていく上で重要になり得る。

なお、本研究の成果は、幹細胞生物学のトップ研究者が一堂に会する会議である Cold Spring Harbor Laboratory – Stem Cell Biology (2019 年 9 月) において口頭発表に選出され、本研究者が発表した。さらに本研究者が所属する Duke University School of Medicine の internal meeting である Regeneration Next Initiative Retreat においてもポスターとして発表された。本研究をとりまとめた論文は現在 Nature Medicine 誌の査読下にある。