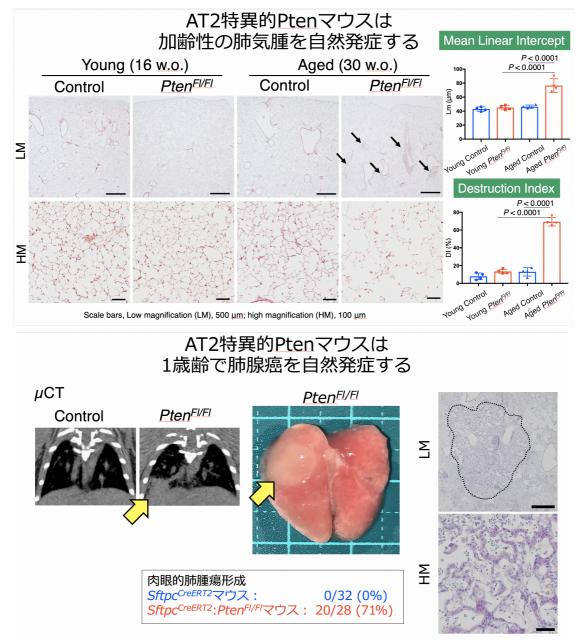
## 加齢性呼吸器疾患における内因性幹細胞ニッチ機構 宮崎大学医学部内科学講座呼吸器・膠原病・感染症・脳神経内科学分野 柳 重久

## 1. シングルセル RNA 解析による肺腺癌発癌責任間葉サブクラスター候補の同定

 $Sftpc^{CreERT2}$ マウスと PtenFloxマウスを交配し、2 型肺胞上皮特異的かつタモキシフェン誘導性に Pten を欠損するマウスを作製した。まず、Pten 不損による肺損傷後組織再生への影響を解析するために、エラステーゼ気管内投与モデルを作製した。Pten 不損の Pten 欠損マウスでは損傷後の肺胞壁破壊が亢進しており、Pten 欠損は、マウスを肺損傷に脆弱にすることが示唆された。

AT2 特異的 Pten 欠損マウスは 30 週齢において肺気腫を自然発症しました。末梢細気管支周辺の血管周囲には炎症細胞浸潤が著明であり、全身からの炎症細胞の動員に合致する所見であった。1 歳齢になると、70%以上の AT2 特異的 Pten 欠損マウスが肺腺癌を自然発症した。このことから、AT2 における Pten 発現は肺腺癌発がんの制御に必須であることが示唆された。

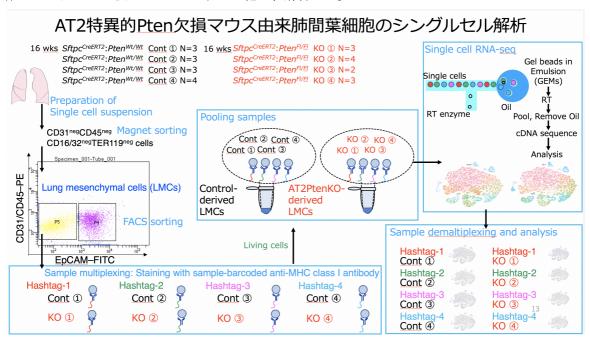


次に、AT2 での Pten 欠損が与える細胞間ニッチシグナルを解析するため、未発病期のマウスから AT2 と肺間葉細胞を単離した。それぞれの単離細胞群の効率ならびに AT2 での Pten 欠損効率を定量 PCR で確認した。コントロール、KO n=3 ずつから単離した AT2 の Population RNA シーケンス、Gene Ontology 解析の結果、PtenKO マウス由来 AT2 では、receptor ligand activity, receptor regulatory activity が著明に亢進しており、Pten 欠損により AT2 で細胞間クロストークが亢進している事が示唆された。同じマウス由来の単離肺間葉細胞の Population RNA シーケンス、Gene Ontology 解析で、AT2 で Pten を欠損させたマウスでは、T 細胞活性化、免疫細胞分化、細胞走化性など、肺間葉細胞での免疫反応活性化シグナルが著明に活性化していること

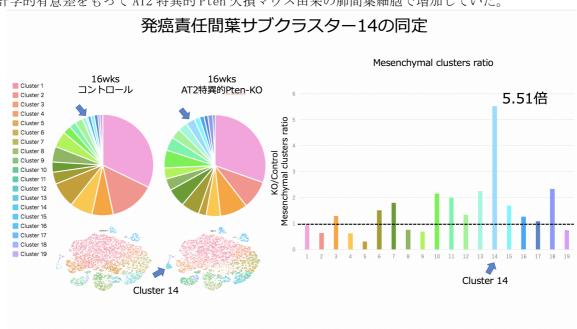
がわかった。肺胞上皮前駆細胞-ニッチ細胞間シグナルに関して、AT2 特異的 Pten 欠損マウスでは AT2 内の前駆細胞マーカーの発現亢進と、肺間葉細胞内でのニッチシグナル減少が生じていることが明らかになった。以上のことから、AT2 での Pten 欠損は肺胞上皮前駆細胞と肺間葉細胞間のクロストークを破綻させる事が示された。

癌の発生は、正常な成体幹細胞と遺伝子変異を生じた成体幹細胞との競合に依存する確率的プロセスにより生じると考えられている。すなわち、変異した成体幹細胞が癌化するには「周囲の手助け」が不可欠である。われわれは、変異した成体上皮幹細胞は間葉細胞群とのクロストークを破綻させ、発がんに不可欠となる間葉サブクラスターを創出させると仮説を立てた。また、発癌責任間葉サブクラスターから癌関連線維芽細胞、CAFが新生するという仮説を立てた。

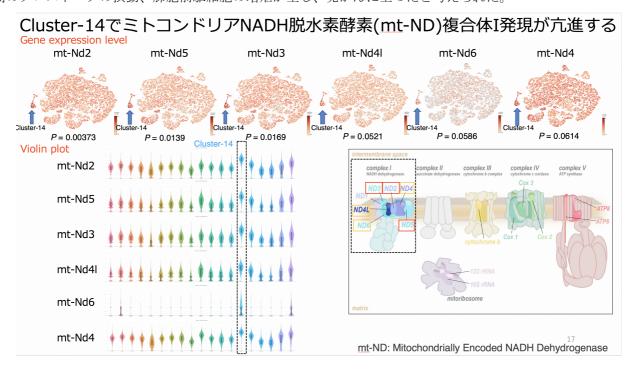
発癌責任間葉サブクラスター候補の有無を検証するために、未発病期の AT2 特異的 Pten 欠損マウスとコントロールマウスからそれぞれ肺間葉細胞を単離し、シングルセル解析を行った。統計学的有意差を検討するために、それぞれ 2 匹から 3 匹のマウス由来の肺間葉細胞を n=1 とし、n=4 ずつで解析した。具体的には、それぞれ hashtag 抗体で処理した後にサンプルをプーリングし、シングルセル解析を実施、その後 hashtag 抗体ごとにサンプルをデマルチプレックス化し、解析した。



未発病期 AT2 特異的 Pten 欠損マウス由来肺間葉細胞とコントロールマウス由来肺間葉細胞のクラスタリング結果を t-SNE plot で示す。それぞれ約 13,000 細胞からの分析結果である。矢印で示すように、クラスター14 が AT2 特異的 Pten 欠損マウス由来肺間葉細胞で出現していた。サブクラスター14 は、コントロールと比較し 5.51 倍と、Pten 欠損マウス由来肺間葉細胞で突出して増加していた。次に Hasghtag 抗体ごとのサンプルデマルチプレックス化解析を行った。コントロール、KO n=4 群ずつの解析の結果、サブクラスター14 は統計学的有意差をもって AT2 特異的 Pten 欠損マウス由来の肺間葉細胞で増加していた。



サブクラスター14 に特徴的に発現する遺伝子の発現量をバイオプリンプロットで図示します。大変興味深いことに、サブクラスター14 ではミトコンドリア NADH 脱水素酵素複合体 I の構成分子群が、軒並み発現が亢進していることがわかった。以上のことから、AT2 特異的 Pten 欠損により、肺胞間葉細胞クラスターの摂動、Mt-NDs 高発現間葉サブクラスター14 が出現し、ROS 蓄積、免疫反応亢進が生じ、前駆細胞ーニッチ細胞間のクロストークの摂動、肺胞前駆細胞の増殖が生じ、発がんに至ったと考えられた。



次に、AT2でのPten 欠損が発癌責任間葉サブクラスターを出現させたメカニズムについて解析した。単離 AT2を用いたFACS、老化関連酸性βガラクトシダーゼ染色の結果、未発病期から AT2での細胞老化が加速していることがわかった。高齢期、未発がんのマウス肺でもPten 欠損により AT2での老化細胞が増加し、肺への免疫細胞集簇が亢進していた。また、高齢期、未発がんの単離 AT2/肺間葉細胞で不良ミトコンドリア蓄積、酸素消費率の増加、内因性 ROS 蓄積が生じていた。電験像では、高齢期、未発がんのPten 欠損マウスで AT2内で、外膜の虚脱とクリステ構造の破綻を伴う異常形態のミトコンドリアが多数みられた。以上の結果から、肺胞間葉サブクラスターの摂動、発癌責任間葉サブクラスターの出現には AT2の細胞老化の加速、SASPが寄与していることが示唆された。また癌微小環境形成に寄与する ROS 産生には、AT2の不良ミトコンドリア蓄積と酸素消費率増加によるもの、肺間葉細胞 MtNDs 高発現クラスター由来によるもののいずれかあるいは両者の影響が示唆された。現在、今回同定した発癌責任間葉サブクラスター候補の発がんへの寄与、空間的トランスクリプトミクスによる CAF 起源の同定、肺腺癌手術検体を用いた発癌責任間葉サブクラスターの普遍性の確認を進捗中である。

## 2. AT2 特異的 Ror2 欠損による加齢性肥満の発症

 $Sftpc^{CreERT2}$ マウスと Ror2Flox マウスを交配し、2 型肺胞上皮特異的かつタモキシフェン誘導性に Ror2 を欠損するマウスを作製した。AT2 特異的 Ror2 欠損マウスは興味深いことに、加齢性の肥満、脂肪肝、内臓脂肪の蓄積を呈した。2 型肺胞上皮内因子が全身のエネルギー代謝を制御するという全く新しい知見である。

## 3. AT2 特異的 RhoA 欠損による加齢性肥満の発症

 $Sftpc^{CreERT2}$ マウスと RhoAF1oxマウスを交配し、2 型肺胞上皮特異的かつタモキシフェン誘導性に RhoA を欠損するマウスを作製した。AT2 特異的 RhoA 欠損マウスは興味深いことに、ヒト特発性肺線維症に病理組織像が類似した、加齢性の肺線維症を自然発症した。

本研究は、2019 年度アステラス病態代謝研究会 研究助成金のご支援で行うことが出来ました。貴重な援助を頂きました公益財団法人アステラス病態代謝研究会の関係者の皆様、ご寄付頂いた皆様に深く感謝申し上げます。