

「肺や浮袋が膨らむ仕組みの解明～オートファジーの新たな役割を発見」

1. 発表者：

森下 英晃（研究当時：東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 助教、現：同客員研究員、順天堂大学大学院医学研究科 講師）

水島 昇（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 教授）

2. 発表のポイント：

◆哺乳類の肺胞や魚の浮袋が膨らむために必要なサーファクタント（表面活性物質）の生成に細胞内分解系であるオートファジーが重要であることを明らかにしました。

◆サーファクタントを生成・貯蓄するラメラ体の成熟にオートファジーが必要であることがわかりました。

◆オートファジーを起こせなくした場合、マウスは出生直後に呼吸困難となり、ゼブラフィッシュは水中で浮いた姿勢を保てず、いずれも致死となることを見いだしました。

3. 発表概要：

哺乳類の肺や魚類の浮袋（注1）は、それぞれ呼吸や水中での浮力発生に必須な空気を含む臓器です。これらの臓器を空気で膨らませるためには、肺胞や浮袋の内側を覆っている水の表面張力を弱めることが重要です。この役割を担うのが、サーファクタント（表面活性物質）（注2）という脂質に富む物質で、空気との境界の水面に広がって水の表面張力を弱めます。このサーファクタントは肺胞や浮袋の上皮細胞の内部に存在するラメラ体（注3）と呼ばれるリソソーム関連の細胞小器官で生成・貯蓄された後に分泌されますが、ラメラ体が形成される仕組みについては十分に解明されていません。

今回、東京大学大学院医学系研究科の森下英晃助教（現：同客員研究員、順天堂大学大学院医学研究科 講師）、水島昇教授らの研究グループは、同研究科の村上誠教授、饗場篤教授、シンシナティ大学の Jun-Lin Guan 教授らと共同で、細胞内分解系であるオートファジー（注4）が肺や浮袋のサーファクタントの生成に必要であることを、マウスやゼブラフィッシュを用いた解析により明らかにしました。肺や浮袋の上皮細胞ではオートファゴソーム（注5）と未成熟なラメラ体の融合が起きており、オートファジーを抑制すると、ラメラ体への成熟が不十分となることがわかりました。このようなマウスは出生直後に呼吸困難となり、ゼブラフィッシュは水中で浮いた姿勢を保てず、いずれの場合も致死となることが明らかになりました。サーファクタント生成メカニズムを明らかにすることは、サーファクタントの不足や異常によって引き起こされる新生児呼吸窮迫症候群（注6）などの呼吸器疾患の理解につながることで期待されます。

本研究成果は、国際科学誌「*Cell Reports*」のオンライン版で公開されました。

本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）「水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト」（研究総括：水島昇）、などの支援を受けて行われました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

哺乳類の肺と魚類の浮袋は進化的および解剖学的に相同な臓器であり、空気を内部に満たすことで、それぞれ呼吸や浮力発生に必要です。しかし、肺胞や浮袋の内側は水分で覆われているため、そのままだと水の表面張力によって潰れてしまいます。肺や浮袋が空気を取り込んで膨らむためには、水の表面張力を弱める必要があります。この役割を担うのがサーファクタントと呼ばれる物質です。サーファクタントは主に脂質で構成されており、肺胞や浮袋の内側を覆う上皮細胞内のラメラ体で生成されます。ラメラ体の内部で生成されたサーファクタントはその後細胞外に分泌され、水と空気の境界面に広がって水の表面張力を弱めます(図1)。

サーファクタントの生成には小胞体で合成された特殊な脂質が必要です。しかし、小胞体で合成された脂質がどのようにしてラメラ体に輸送されるのかは十分に解明されていません。約20年前に培養したモデル細胞を用いて行われた研究で、オートファジーがラメラ体への脂質供給に参与する可能性が示唆されていましたが、実際に生体内においてオートファジーがサーファクタント生成に必要かどうかは不明なままでした。

(2) 研究内容

本研究では、生体内におけるオートファジーの新しい役割を見つけることを目的としました。オートファジーとは、細胞質の一部をオートファゴソームで囲み、それを分解酵素を含むリソソームと融合させることで分解する細胞機能です(図2)。これまでは、飢餓に対する適応や細胞内品質管理としての役割が注目されてきました。そこで、オートファジーのさらなる役割を調べるために、遺伝子改変や全発生過程の観察が容易なゼブラフィッシュを用いました。生体内でオートファジーを抑制するため、オートファジーに必要な11種類のオートファジー関連遺伝子を欠損させた魚をCRISPR/Cas9(クリスパー)法を用いて作製し、表現型を解析しました。その結果、これらのオートファジー関連遺伝子欠損体はいずれも受精後2週間以内に致死となり、オートファジーは魚の生存に必須であることがわかりました。さらに、これらの魚の多くに共通する表現型として、浮袋の拡張が起こらないことを見出しました(図3A、B)。これらの魚は水中で浮いた状態を維持できませんでした(図3C)。正常な魚の浮袋上皮細胞では、オートファゴソームが多数形成されており、それらはラメラ体と高頻度に融合していました。ラメラ体はリソソームと似た細胞小器官であるため、それがオートファゴソームと融合することは理にかなっています。一方、オートファジー遺伝子を欠損した魚では、ラメラ体の大きさと数が減少していたことから、ラメラ体の成熟にオートファジーが必要であることが示唆されました。

この機能が哺乳類でも保存されているかどうかを調べるため、浮袋の進化的・解剖学的相同臓器であるマウスの肺を用いた研究も行いました。その結果、サーファクタントを産生するII型肺胞上皮細胞においても、オートファゴソームとラメラ体の融合が高頻度に認められました(図4A)。

さらにオートファジー遺伝子をII型肺胞上皮細胞でのみ欠損させたマウスは出生直後に呼吸不全を起こし、致死となることがわかりました(図4B)。これらのマウスのII型肺胞上皮細胞では、ラメラ体の大きさと内部の脂質の減少を認め、オートファジーがラメラ体の成熟に必要であることがマウスでも確認できました(図4C)。一方、これらのマウスの肺でもサーファクタント脂質の組成や量は正常マウスと変わらず、肺のその他の細胞の分化も正常でした。これらのことから、ラメラ体の成熟不全は脂質の合成不全や肺そのものの発生異常によるものではないと考えられました。

これまでオートファジーは細胞内分解としての役割が注目されてきましたが、以上の結果は、オートファジーにはサーファクタント脂質をラメラ体へ輸送することでラメラ体を成熟させるという役割もあることが示唆されました。具体的な機序としては、オートファゴソーム内部の膜成分（膜系の細胞小器官やオートファゴソーム内膜）をラメラ体内部に供給する可能性や、オートファゴソーム外膜をラメラ体膜として供給して拡張させる可能性が考えられます。

(3) 社会的意義・今後の予定

哺乳類の出生時には、液体で満たされていた胎児の肺が空気呼吸へと切り替わります。これは一生で最も重要なイベントの一つです。ヒトの場合、未熟児ではサーファクタントが不足するために呼吸が十分にできず、新生児呼吸窮迫症候群を発症します。人工サーファクタントの投与なしでは死に至る場合があります。また、ラメラ体は出生時だけでなく、ウィルス感染症、腫瘍、リソソーム蓄積病などのさまざまな疾患にも関与することが報告されていますが、ラメラ体の形成機構については未解明な点も多いというのが現状です。本研究が端緒となり、今後サーファクタントの生成メカニズムやラメラ体の形成機構についての理解がさらに進むことが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Cell Reports*」（オンライン版の場合：2020年12月8日）

論文タイトル：Autophagy is required for maturation of surfactant-containing lamellar bodies in the lung and swim bladder

著者：Hideaki Morishita, Yuki Kanda, Takeshi Kaizuka, Haruka Chino, Kazuki Nakao, Yoshimi Miki, Yoshitaka Taketomi, Jun-Lin Guan, Makoto Murakami, Atsu Aiba, Noboru Mizushima* (corresponding author)

DOI 番号：https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108477

アブストラクト URL：https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(20)31466-2

6. 問い合わせ先：

<本研究に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野

教授 水島 昇 (みずしま のぼる)

Tel：03-5841-3440、Fax：03-3815-1490

E-mail：nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

<JST 事業に関するお問い合わせ>

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

内田 信裕 (うちだ のぶひろ)

Tel：03-3512-3528、Fax：03-3222-2068

E-mail：eratowww@jst.go.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 総務係

Tel：03-5841-3304、Fax：03-5841-8585

E-mail：ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel : 03-5214-8404、Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho@jst.go.jp

7. 用語解説 :

(注1) 浮袋

進化的・解剖学的に哺乳類の肺と相同な、内部に空気を含む魚類の臓器。消化管や血液から空気が供給される。ゼブラフィッシュでは受精後5日頃に浮袋が拡張する。水中で浮いた状態で姿勢を維持するために重要である。

(注2) サーファクタント

肺のⅡ型肺胞上皮細胞や浮袋上皮細胞より生成・分泌される界面活性物質。別名「表面活性物質」。肺胞や浮袋の内側を覆う水と空気の境界面に広がり、水の表面張力を弱める。肺サーファクタントの90%は脂質、10%はたんぱく質から構成されている。

(注3) ラメラ体

リソソームに関連する細胞小器官の一種。肺のⅡ型肺胞上皮細胞や浮袋上皮細胞などに存在し、内部にサーファクタントを含む。ラメラ体の内部は酸性化されており、リソソームと同様に加水分解酵素などを有する。ラメラ体は細胞膜と融合し、肺胞や浮袋の内腔へサーファクタントを分泌する。

(注4) オートファジー

細胞の主要な分解機能の一つ。オートファゴソームが細胞質基質やミトコンドリアなどの細胞小器官を取り囲み、リソソーム（分解酵素を格納している細胞小器官）と融合する。その生理的機能としては、飢餓への適応や細胞内の恒常性維持などが知られており、近年では特に神経変性疾患や腫瘍形成などとの関連が注目されている。

(注5) オートファゴソーム

オートファジー分解を仲介する細胞小器官で、細胞質に存在するたんぱく質やミトコンドリアなどを包み込む。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の分解酵素によって内容物が消化される。大隅良典博士のグループなどによるこれまでの研究で、ATGたんぱく質群と呼ばれる数多くのオートファジー関連因子がオートファゴソームの形成に関わっていることが明らかにされてきた。

(注6) 新生児呼吸窮迫症候群

新生児期に引き起こされる呼吸障害。早産児によく見られ、肺サーファクタントが足りないため、必要な酸素を十分に取り入れられなくなる疾患。治療は人工肺サーファクタントの補充（気管内へ注入）により行われる。

8. 添付資料：

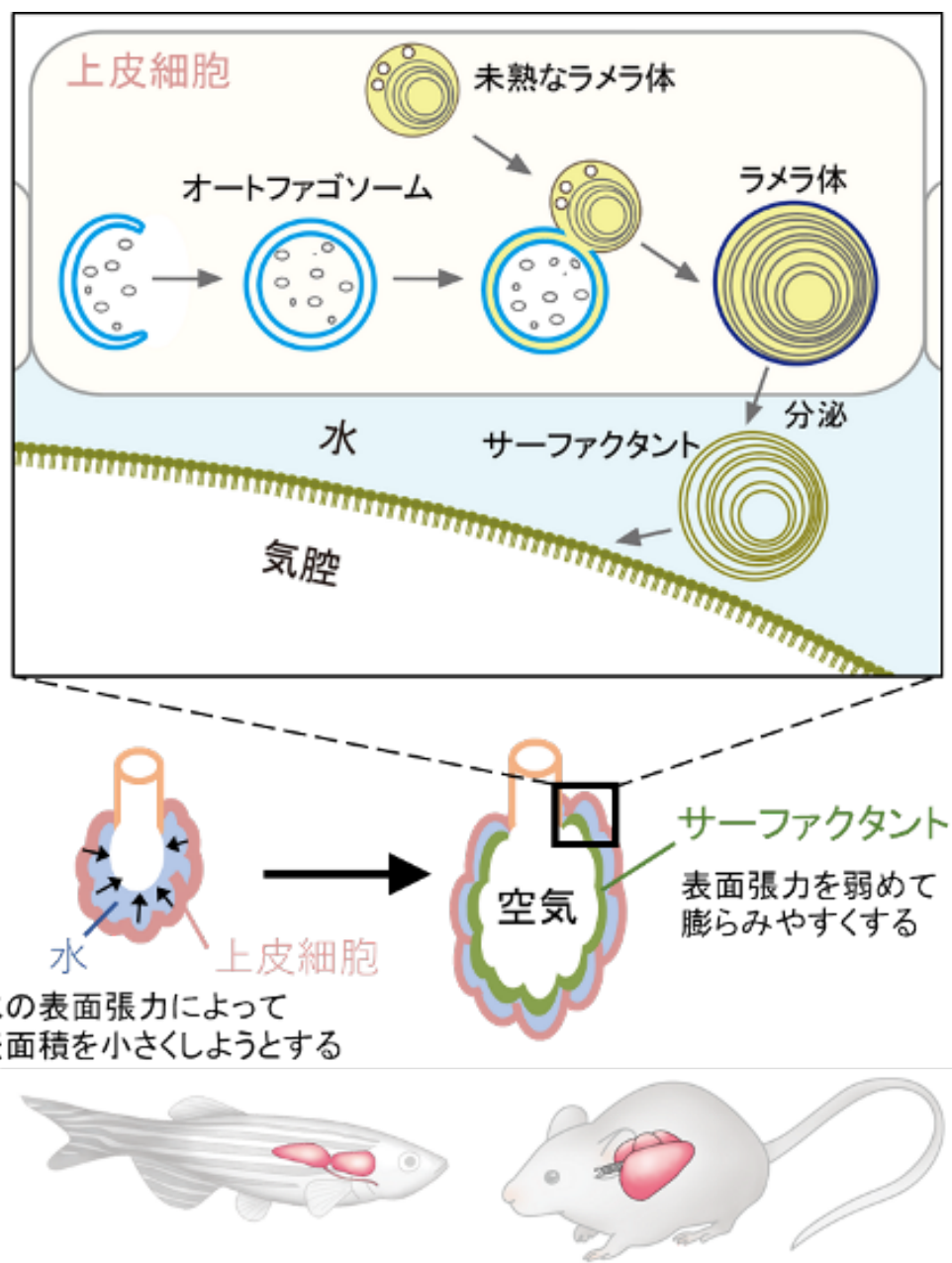


図1 本研究によって解明された、浮袋・肺のラメラ体の成熟におけるオートファジーの新たな役割のモデル図

魚類の浮袋（肺の進化的・解剖学的相同臓器）や哺乳類の肺が拡張するためには、サーファクタントと呼ばれる脂質に富む成分が、空気と水の界面に脂質一重層を形成し、水の表面張力を弱める必要がある。このサーファクタントは、浮袋上皮細胞やⅡ型肺胞上皮細胞のラメラ体と呼ばれるリソソーム関連小器官で生成・貯蓄され、分泌される。本研究の結果、ラメラ体はオートファゴソームと融合し成熟していることが明らかになった。

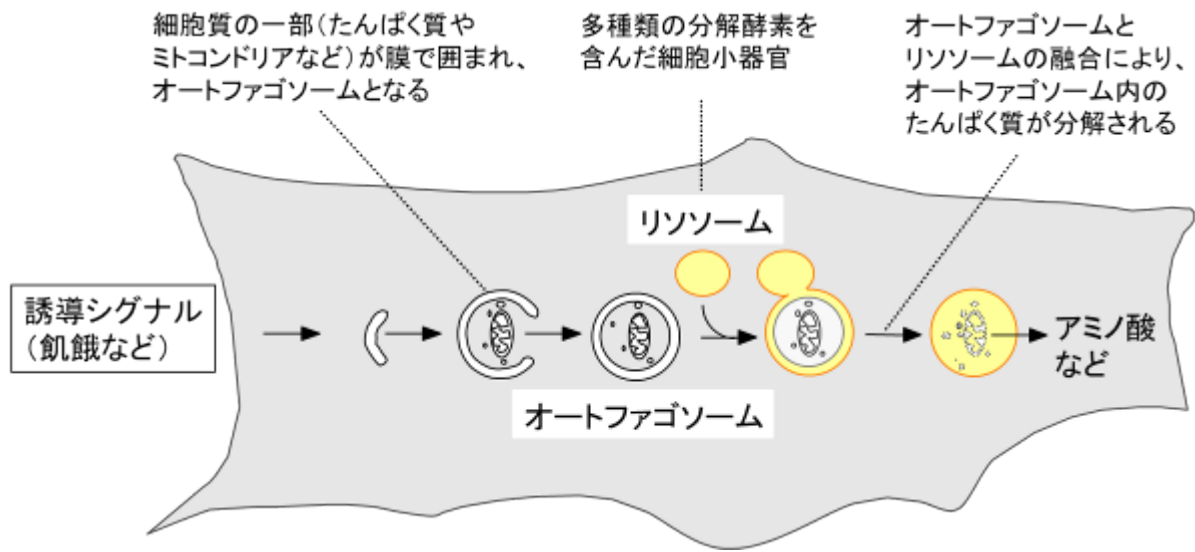


図2 オートファジーの仕組み

オートファジーが誘導されると、オートファゴソームが細胞質成分を取り囲みながら形成される。続いてオートファゴソームはリソソームと融合し、オートファゴソームで囲んだ細胞質成分が分解される。細胞質成分の分解により生じたアミノ酸などの分解産物は再利用される。

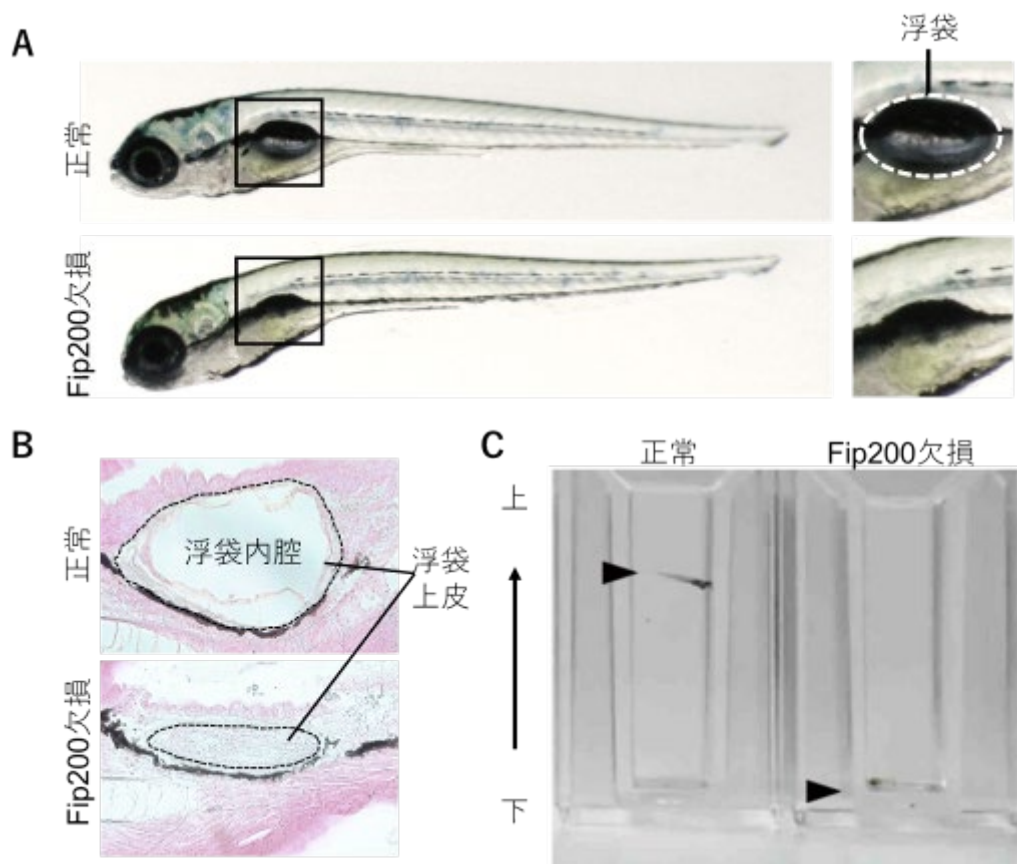


図3 オートファジーはゼブラフィッシュの浮袋の拡張に必要である

- A.** 各オートファジー関連因子欠損ゼブラフィッシュの外観（受精後9日目）。スケールバーは1 mm。
- B.** ゼブラフィッシュ（受精後9日目）の浮袋の組織像（ヘマトキシリン・エオジン染色）。点線は浮袋を示す。
- C.** 水中でのゼブラフィッシュ（受精後6日目）の行動解析。矢頭は正常（野生型）ゼブラフィッシュ（浮いた状態を維持）と *fip200* 欠損ゼブラフィッシュ（底に沈んでいる）の位置を示す。

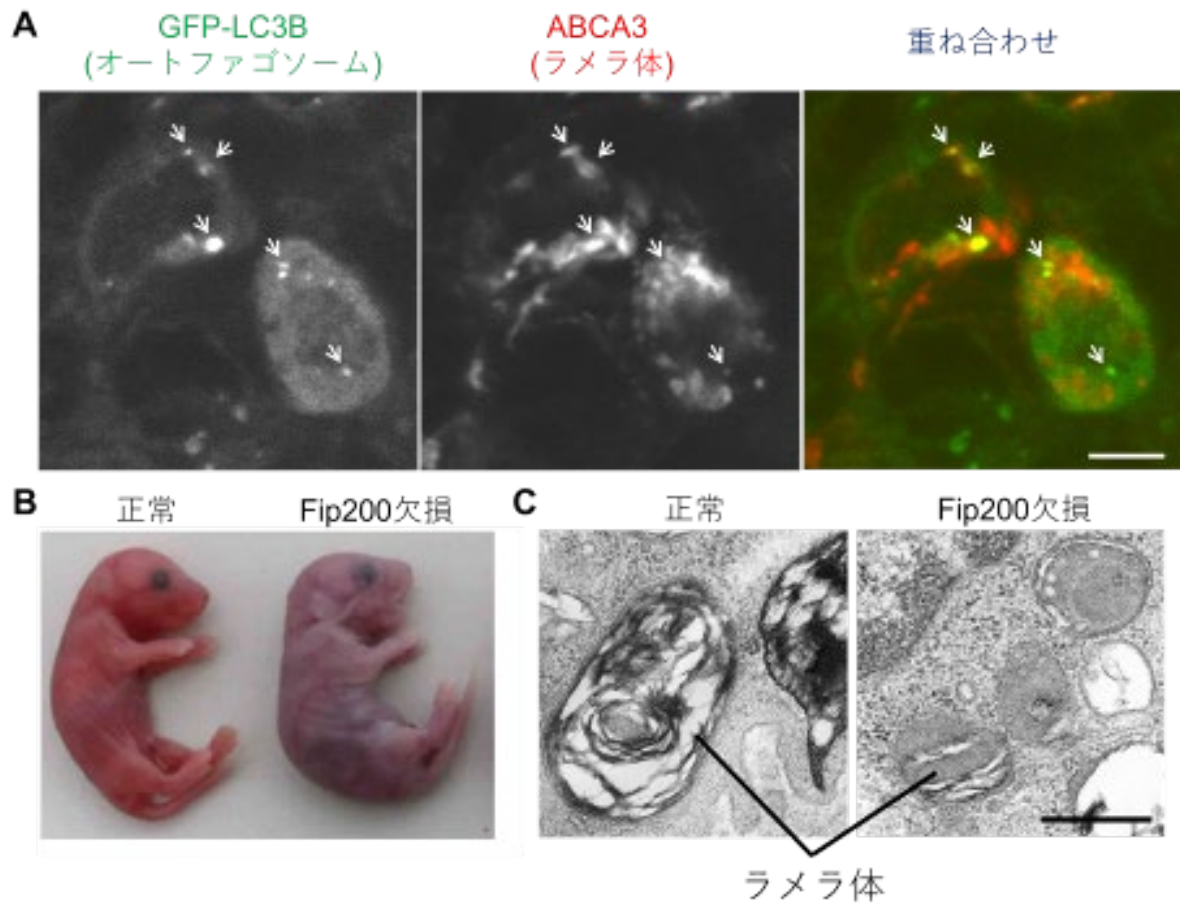


図4 マウスの肺のⅡ型肺胞上皮細胞においてオートファジーはラメラ体の成熟および出生時の正常な呼吸に必要である

A. オートファゴソームマーカーGFP-LC3を発現させたマウス（出生後1.5日）における、ラメラ体マーカーABCA3の染色像。矢印はGFP-LC3陽性オートファゴソームとABCA3陽性ラメラ体の重なりを示す。スケールバーは5 μm 。

B. Ⅱ型肺胞上皮細胞特異的 *Fip200*欠損マウス（出生後1時間、右側）は、呼吸不全とチアノーゼを認める。

C. Ⅱ型肺胞上皮細胞特異的 *Fip200*欠損マウス（出生後1時間、右側）の肺胞Ⅱ型上皮細胞の電子顕微鏡像。スケールバーは400 nm。