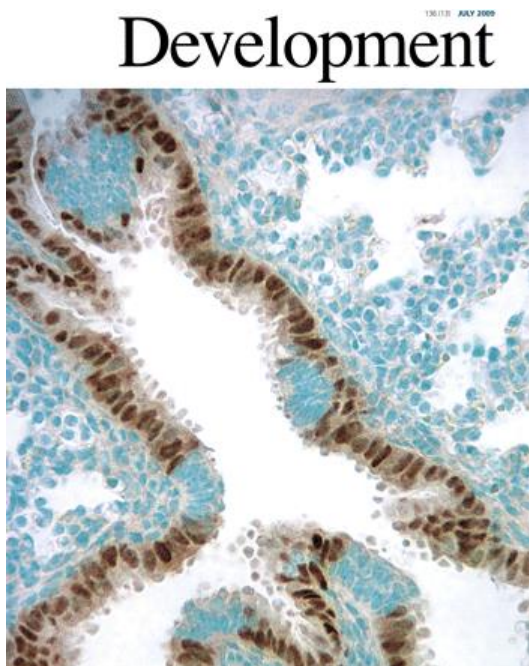


Notch 訊息-調控肺臟發育的重要訊息

呼吸道上皮均勻的佈滿分泌型細胞與纖毛細胞，但這些細胞是如何分化與受到調控的呢？還有肺泡發育與呼吸道上皮是如何維持恆定的？是什麼在調控這些細胞命運的並不是很清楚，由文獻上的回顧我們猜想可能和 Notch 訊息有關。

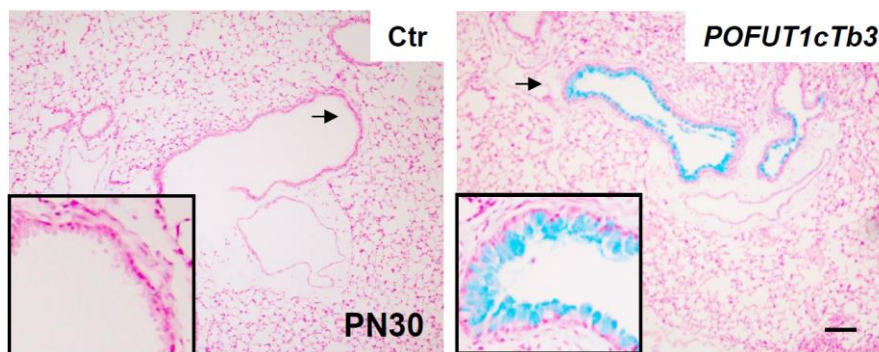
為了釐清這些問題，首先我們主要的目的是要去看 Notch 的成員在肺臟幹細胞的表現以及 Notch 訊息是否參與幹細胞的再生及分化。利用組織特異性的 Shh-Cre 老鼠，成功的製造出一隻肺臟上皮特異性的 *pofutl* 基因剔除鼠，亦即只在肺臟上皮細胞剔除所有 Notch 訊息的基因剔除鼠，並發現這種 *pofutl* 基因剔除鼠在出生後會逐漸喪失正常呼吸道的上皮組織，變成由許多鱗狀上皮細胞所取代，這情形和一些因氣喘或慢性阻塞性肺疾病導致呼吸道上皮病變很相像。再進一步去分析肺臟的各種上皮細胞組成，發現這種 *pofutl* 基因剔除鼠的呼吸道中，從胎兒到成鼠時期，完全找不到分泌性的上皮細胞 – Clara cells。取而代之的是幾乎佈滿整個大小呼吸道的纖毛細胞



(ciliated cells)及過度增生的神經內分泌細胞(neuroendocrine cells)。同時，這種特殊的肺臟表現型也可以在離體胎鼠肺臟培養系統及另一種肺臟上皮細胞特異性 Notch 訊息基因剔除鼠(*Rbpjk* 基因剔除鼠)身上完全重現。這個有趣的發現讓我們了解到，在肺臟的發育過程，Notch 訊息是用來調控呼吸道纖毛細胞及分泌性上皮的平衡 (Tsao et al. Development 2009;

136, 2297-2307)。

接著我們想問出生後肺臟上皮的 Notch 訊息到底扮演什麼角色?所以我們利用 Tgfb3-Cre 小鼠來製造條件式破壞肺臟上皮 Notch 訊息的基因剔除鼠。最近我們利用 RosaLacZ 小鼠來偵測 Tgfb3-Cre 的組織獨特性，我們發現 Tgfb3-cre 的 Cre 蛋白表現在胚胎早期(E14.5,此時 Clara cell 及纖毛細胞的分化正在進行)的肺臟上皮是呈現 mosaic 的型式，只有少數的肺臟上皮有表現 cre，但是在成鼠大部份的呼道上皮都有表現 cre。因此，我們可以利用 Tgfb3-cre 小鼠製造出肺臟呼吸道上皮(含 Clara cell)形成之才去破壞 Notch 訊息的基因剔除鼠。利用 Tgfb3-Cre 小鼠來條件式剔除 Notch 訊息相關基因 Pofut1，會造成明顯的出生後呼吸道的表現型，特點是明顯的杯狀細胞增生、減少 Clara 細胞、及增加纖毛細胞的數目。相同的呼吸道表現型也同樣可以再條件式 Rpbjk 基因剔除鼠身上。活體上的細胞追蹤結果顯示這些過多的杯狀細胞是來自 Clara cell 的一個次族群，他們主要存在於近端呼吸道而且是失去 Notch 訊息的一群細胞。這個表現型也被證實和增加許多和杯狀細胞分化相關基因，而沒有增加細胞增生，沒有增加發炎反應，而且合併減少 Hes5 的表現量。Luciferase reporter 分析顯示 Notch 會直接調控肺臟上皮細胞中 Muc5ac 的表現。這些結果讓我們認為在出生後，Notch 訊息是需要被用來預防 Clara 細胞分化為杯狀細胞。而這種分泌黏液細胞

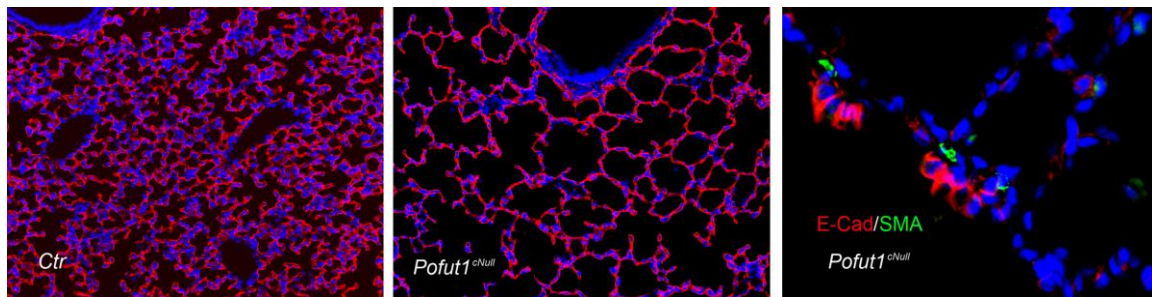


過度增生 (goblet cell metaplasia) 的現象，十分類似慢性阻塞性肺疾病及氣喘病人的病理變化。這個有趣的發

現，不只可以提供一個新的類似慢性阻塞性肺疾病及氣喘的動物模式，更可已利用研究此條件型 *Pofut1* 基因剔除鼠，來了解其致病機轉，並進而尋求新的治療方式。這個成果已刊登於 2011 *Development* 的雜誌上 (Tsao et al. *Development* 2011 Aug;138(16):3533-3543.)。

再來，我們主要是繼續分析 *Pofut1^{F/-};ShhCre/+* mutants (*Pofut1^{cnul}*) 出生後肺臟的發育。我們發現這些肺臟上皮細胞缺乏 Notch 訊息的條件型基因剔除鼠出生後會有生長遲緩的情形，同時出生後兩週內死亡率高達 80%。存活的 *Pofut1^{cnul}* 突變成鼠其呼吸上皮會開始出現鱗狀上皮化(squamous metaplasia)及局部纖毛細胞過度增生的情況。小鼠的肺泡發育是出生後 3 天開始直到 14 天才發育完全，而 3 天大的 *Pofut1^{cnul}* 突變鼠其初始肺泡的壁比較薄、很少二級肺泡隔間(secondary crest)而且肺泡的肌肉纖維母細胞(myofibroblast)的分化也很差。在成鼠階段，其肺臟出現典型的肺氣腫表現型，這種肺臟表現型和成人的慢性阻塞性肺疾病以及早產兒的慢性肺疾病很像。我們發現 Notch2 而非 Notch1 確實會表現在第二型肺泡上皮細胞(type II pneumocyte)，這可能可以部份解釋為何失去肺臟上皮的 Notch 訊息和肺泡發育相關。接著，我們和日本 Morimoto Mitsuru 博士合作，分析他製造的三種基因剔除鼠，包括：Notch1 單獨、Notch2 單獨基因剔除鼠，發現 Notch1 基因剔除鼠沒有明顯肺臟的表現型，包括呼吸道上皮的分化及肺泡發育階和正常鼠相似；但是 Notch2 基因剔除鼠則和 *Pofut1^{cnul}* 突變鼠一樣，有明顯的肺泡發育不良的情況。因此，這個結果顯示 Notch2 才是主要影響肺泡發育的一個重要 Notch receptor。另外，我們也發現這個肺泡發育不良可能是因為在 *Pofut1^{cnul}* 突變鼠肺臟中 PDGF-A 的表現量下降有關 (Tsao et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jul 19;113(29):8242-7.)。因此，這些結果顯示肺臟上皮細胞上的 Notch 訊息，對維持呼吸道上皮的恆定以及

肺泡的發育是很重要的。此外，失去 Notch 訊息的肺臟上皮在支氣管的末端會導致上皮的不完整性以及影響之呼吸道周邊平滑肌的發育。原因是因為這些小鼠缺乏呼吸道上皮的原始母細胞(progenitor)-分泌型細胞(Clara cell)，所以在呼吸道生長時無法進行完整的複製，導致上皮的缺損，而呼吸道上皮會分泌平滑肌細胞分化生長的 Wnt 7b 就跟著減少，進而導致呼吸道周邊平滑肌的發育不良。



總結，我們發現 Notch 的成員在肺臟幹細胞中是有表現，而且 Notch 訊息是被活化的，這個時候 Notch 訊息參與了肺臟幹細胞的增生。在出生前於發育中的肺臟呼吸道，Notch 訊息是用來調控分泌性上皮和纖毛細胞之間的平衡。而出生後，Notch 訊息是需要被用來預防分泌性上皮分化為病態的杯狀細胞，同時失去肺臟上皮的 Notch 訊息，尤其是 Notch2，會導致肺泡發育不良與遠端呼吸道上皮的完整性。因此，這些結果顯示肺臟上皮細胞上的 Notch 訊息，對維持呼吸道上皮的恆定以及肺泡的發育是很重要的。