領域略称名：上皮管腔組織形成
領 域 番 号：３３０３

平成２５年度科学研究費補助金「新学術領域研究（研究領域提案型）」に係る中間評価報告書

「上皮管腔組織の形成・維持と破綻における極性シグナル制御の分子基盤の確立」

（領域設定期間）

平成２３年度～平成２７年度

平成２５年６月

領域代表者

大阪大学・医学系研究科/医学部・教授・菊池章

目　　次

１．研究領域の目的及び概要・・・3

２．研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

３．研究の進展状況・・・7

４．若手研究者の育成に関する取組状況・・10

５．研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11

６．総括班評価者による評価・・・12

７．主な研究成果（発明及び特許を含む）・・14

８．研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

９．今後の研究領域の推進方策・・22

１０.組織変更等の大幅な計画変更がある場合は当該計画・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24

１．　研究領域の目的及び概要（２ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を発展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

①概要（どのような点が「我が国の学術水準の向上強化につながる新たな研究領域」であるか）

生体は、上皮組織、支持組織（骨や軟骨、血管組織を含む）、筋組織、神経組織から成り立つ。上皮組織の中でも、上皮管腔組織は肺や肝臓、腎臓などの器官構築のための必須の構造である。組織幹細胞が上皮細胞へ分化し、上皮細胞から上皮シートや上皮組織原基を経て、上皮管腔組織は形成され、その構造が維持される（図１）。一方、上皮管腔組織の形成・維持過程が破綻すると、器官の無形成や低形成などの奇形や癌を含む種々の疾患に至ることが明らかになっている。しかし、個々の細胞の分子レベルでの理解が大きく進む一方で、上述した細胞集団からなる組織の形成と維持の分子・細胞レベルでの理解は大きく立ち遅れている。細胞と組織との間に横たわるこの未知の領域の解明は生体と疾患の理解に必須であり、そのためには新たな統合的な研究戦略が必要となる。本領域では、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の分子機構を解明するために、幹細胞生物学、生化学、細胞生物学、発生生物学、腫瘍生物学等の異なる分野の研究者が有機的連携を図ることによって、細胞と組織の間に存在する未解決の問題を明らかにすることを目指す。この分子機構を明らかにすることは、肺や胃腸管、内外分泌器官、乳房、肝臓、腎臓などの器官形成の理解に必須であるとともに、その破綻に伴う種々の病態の解明にも有用である。

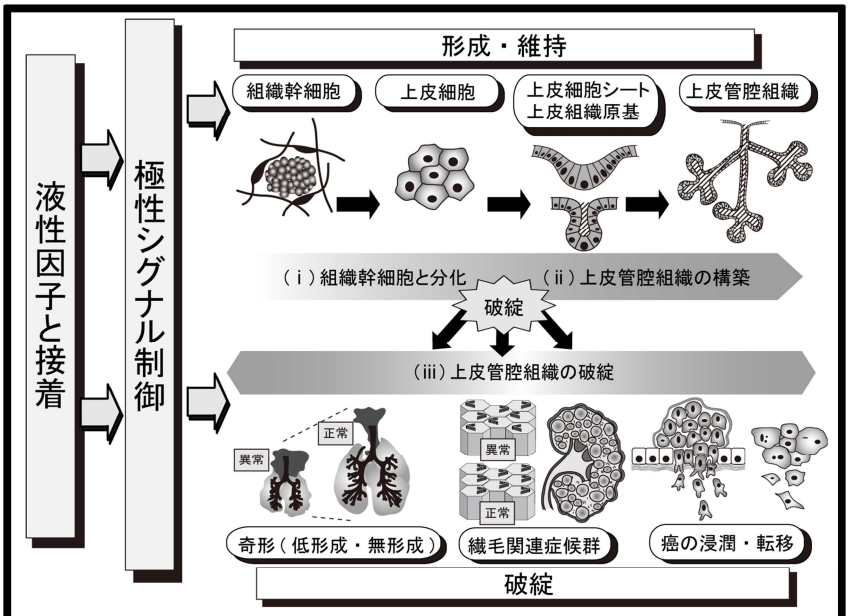

図１．新学術領域研究「上皮管腔組織形成」

本領域研究における計画研究代表者は、幹細胞分離法、幹細胞機能解析法、3 次元培養法、イメージング解析法などの優れた技術を有しており、組織幹細胞から上皮細胞への分化を経て、上皮細胞シートや上皮組織原基から分岐構造を伴った管腔組織を形成する過程を統合的に解析することが可能である。これらの研究グループに加えて、上皮管腔組織の破綻に伴う疾患を解析する計画研究者が参画することにより、形成・維持と破綻の両面から、上皮管腔組織を理解できる。さらに、公募研究者として、種々の器官の管腔組織形成に関する研究や上皮管腔形成における 3 次元培養下の可視化やオルガノイド培養の新技術を開発する研究を採択することで、領域研究を補強する体制を構築する。この種の連携研究グループを立ち上げることは世界的にも未だ例が見当たらず、我が国の学術研究の発展・強化のために必要不可欠である。

個別の細胞機能制御の分子機構の詳細が明らかになる中、細胞から如何にして組織が形成されるかを解明することは大きな課題である。神経組織や血管組織の構築を理解するための研究は既に始められているが、様々な器官において重要な上皮管腔組織に焦点をあてた連携研究は未だ認められない。上皮組織の普遍性を考えると、本領域の発展は他の組織形成の理解へ貢献すると期待される。将来の再生医療は、上皮管腔組織の形成・維持の分子機構の理解の上に行われることが望まれ、また、悪性腫瘍の発生母地の 80～90%が上皮組織であることを考えると、本領域を発展させることにより、我が国において広く生命科学・医学の関連領域研究を推進・強化することができる。

②研究の学術的背景と目的

上皮管腔構造は、物質を輸送するために、内腔面から物質が漏れないような壁で構築されることが基本的なデザインである。上皮管腔組織の形態は、器官ごとに壁の厚さ（細胞の形と層数）、直径や長さ、分岐の数が多様であり、その複雑さから解剖学的・組織学的解析の域を超えることが困難であった。しかし、最近の生命科学の諸領域の発展により、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の分子機構を細胞レベルで理解することがようやく可能となってきた。上皮管腔構造は器官ごとに大きさや形態が多様であるが、細胞内外のシグナルが細胞を時空間的に制御することにより、極性化した上皮細胞が連結し、内腔側と支持組織側を区画する共通の形状をとる。このことから、上皮管腔組織を細胞の極性化の視点から見据えることができる。これまで上皮管腔組織の形成については、唾液腺や気管支、乳腺、尿管などについて主として発生生物学的な視点から個別に研究が行われてきた。管腔を形成するということは個体において、組織幹細胞から分化した上皮シートや上皮組織原基を経て、内腔側と支持組織側を分けたチューブ状の構造を形作ることを意味する。そのために、上皮には頂側自由面（内腔側）と基底膜に接する基底面（支持組織側）が構築されるが、この極性形成が上皮細胞の際立った特徴である（図２）。極性形成には、基底膜タンパク質が基底面に存在するインテグリンを介してシグナルを送り、その反対側に頂側自由面を形成する。この際に頂側自由面と基底面を分ける極性分子が重要な役割を担っている。すなわち、細胞の極性化は、種々の液性因子や接着によるシグナルが極性タンパク質などを必要な場所に輸送することで決定される。また、上皮細胞は極性化しながら増殖することにより管腔を形成するものであり、その増殖因子の実態も明らかになってきた。一方、これらの形成過程において、極性化を伴った管腔構造が形成されない場合や、形成後に極性の破綻により管腔構造が維持されない場合には、種々の奇形や癌などの疾患がもたらされると考えられる。このような上皮管腔組織形成に関する研究は、細胞集団としての組織形成に関する研究として徐々に活発化してきている。

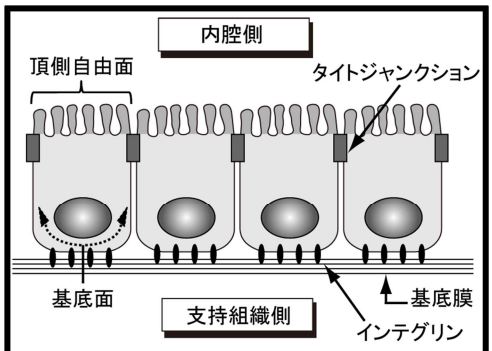

図２．上皮管腔組織の極性

このような状況下、シグナル伝達や細胞接着の分野における細胞生物学的、生化学的解析では、我が国に大きな蓄積がある。領域代表者の菊池はこれまで一貫して細胞内外のシグナル伝達機構による細胞の増殖、分化、運動の制御機構とその異常による細胞癌化の分子機構に関する研究を行ってきた。一つ一つの細胞の振る舞いを分子レベルで明らかにしていくことが生命（個体）の理解に貢献するが、細胞からの組織化を理解するためにこれだけでは不十分であることを認識していた。また、他の分野の考え方や新規の技術を導入することにより、細胞からの組織化の分子基盤の確立を具現化したいと考えていた。特に、学術の進歩には新規の実験技術の開発が不可欠であることから、新たな器官培養法やイメージング技術等の導入が必要であると感じていた。神経系、血管系とともに上皮系は管腔構造を形成する生体のネットワークシステムである。しかし、神経系と血管系の組織構築に関する研究に比較して、上皮管腔組織の構築に関する総合的な研究は我が国においてこれまでほとんどなされてこなかった。そこで、上皮管腔組織を構築する分子基盤を明らかにするための研究体制を作り、本研究領域を推進したいと考えるに至った。本領域では、これまでに個別の研究、あるいは器官別の研究で培ってきた実績を共有化し、有機的な連携を行うことにより、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の分子基盤を確立することを目的としている。

２．　研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（２ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、研究組織間の連携状況について図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

①研究組織と各研究項目との関係

本領域の基本的な戦略は、幹細胞生物学、生化学、細胞生物学、発生生物学、腫瘍生物学など様々な分野の研究者が集まり、新たな研究領域を築き、上皮管腔組織の形成･維持と破綻の分子機構を解明することである。計画研究では、液性因子と接着によるシグナルが細胞極性を制御するという視点で研究を行い、細胞からの上皮管腔組織形成の分子機構を明らかにすることを目指す。個体における組織構築の過程では、形成と維持が巧妙に制御され、その制御機構が破綻すれば正常組織は構築・維持できず、異常組織となり疾患に至ると考えられる。したがって、上皮管腔組織の「形成・維持」の機構の理解は、「破綻」の機構の理解に通じ、逆に「破綻」の機構の理解が「形成・維持」の機構の理解に通じるので、両者の視点からの解析を平行して進めることが上皮管腔組織形成の分子基盤を包括的に理解するために必要不可欠である。このような理由から、研究項目 A01「上皮管腔組織の形成・維持」と A02「上皮管腔組織の破綻」を設定した（図３）。A01 では、組織幹細胞の維持と前駆細胞からの上皮細胞への分化を経て、上皮シートや上皮組織原基が形成され、さらにそれらから上皮管腔組織が形成・維持される過程を対象とする。A02 では、上皮管腔組織の発生期における形成不全、または形成後の維持の破綻による異常の過程を対象として、上皮細胞の脱極性や接着異常により引き起こされる病態の分子機構の解明を目指す。また、研究項目 A01 との連携により、分岐形成などの正常上皮管腔組織形成に関与する上皮間葉転換(EMT)と癌の浸潤・転移に関与する病的 EMT の分子機構との共通点と相違点を明らかにする。公募研究では、それぞれの項目に該当する研究内容で、種々の器官を取り扱う研究者と新規技術の開発を目指す研究者が加わっている。具体的な計画研究班と公募研究班の内容は図３の通りである。

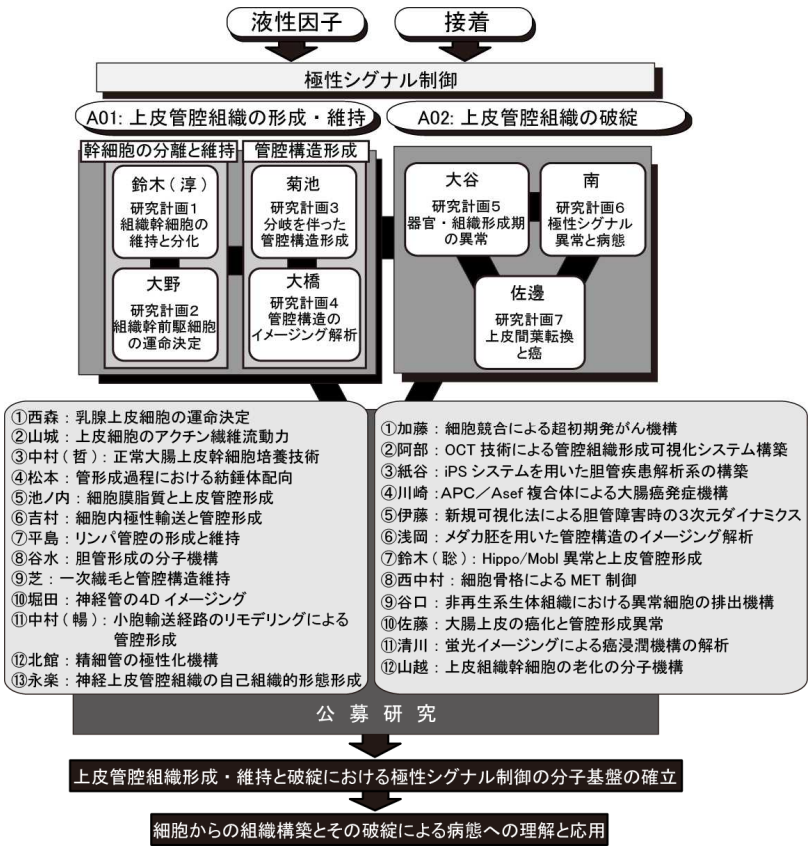

図3. 領域推進のための基本的研究戦略概念図

②研究組織間の連携状況

図４に示した如く、研究項目内、研究項目間で数多くの連携が、新学術領域の目的を達成するために行われている。ここでは、主として試料や実験手法を共有した具体的連携例を挙げる。

新規の手法の開発による上皮管腔組織形成の理解

菊池－大橋　菊池が確立したEGF と Wnt の協調的な作用によって管腔構造を高効率で作製できるラット腸上皮 IEC6 細胞を用いて、大橋が管腔形成誘導過程を可視化する技術を開発している。極性マーカー分子として YFP を付加した GP135 や､アクチン骨格を可視化する YFP-Lifeact を恒常的に発現させた IEC6 細胞株を樹立し、管腔形成誘導時の頂底極性やアクチン骨格の動態を、生細胞において三次元的に可視化することが可能となった。

大野－佐邊　佐邊はGEP100-Arf6-AMAP1経路が乳腺上皮細胞にEMTを引き起すことを培養細胞にて見出している。動物個体を用いて立証するために、大野が確立している乳腺上皮組織の器官培養と幹細胞からの再構成実験系に佐邊の GEP100-Arf6-AMAP1 経路の解析法を導入した。

加藤－山城　上皮管腔組織の形成過程･破綻過程における細胞骨格ダイナミクスをリアルタイムに観察す

ることを目的とし、MDCK 細胞における単分子アクチン観察手法を確立した。自家蛍光の影響が少ない近赤外領域で励起する新規アクチン蛍光プローブを開発するとともに、正常細胞と変異細胞の境界におけるアクチン挙動の観察プロトコールを確立した。

吉村－佐藤　吉村は、上皮極性輸送関連分子の機能解析のために、頂端面と側底面のマーカータンパク質を染色できる小腸の初代培養（佐藤が確立）を行うことが可能となった。今後 shRNA を用いて上皮極性輸送関連分子の遺伝子群をノックダウンし、頂端面と側底面のマーカータンパク質の局在変化を解析する予定である。

谷水－伊藤　伊藤が確立した成体肝臓における胆管構造可視化の技術を谷水に提供し、生後 2～4 週目の胆管の立体構造を可視化する実験系を確立中である。また、新生仔については臓器透明化の技術を用いて、免疫染色による立体構造可視化を試みている。

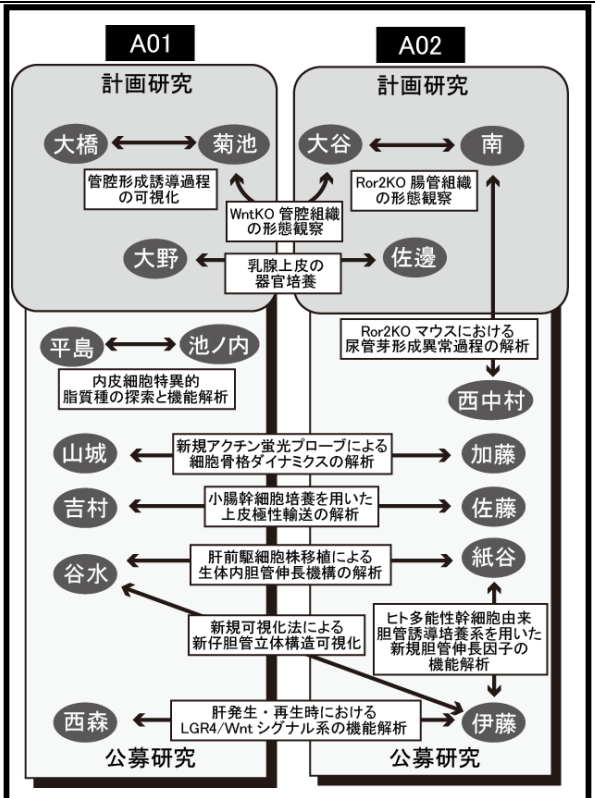

図 4. 研究組織間の連携状況

<u>遺伝子改変または疾患動物の解析による上皮管腔組織形成の理解</u>

菊池―大谷　菊池が作製した *Wnt11* KO マウスの種々の器官における発生異常を、大谷が免疫組織化学や電子顕微鏡観察、組織定量的手法を含めた詳細な形態学的解析を行なうことにより、消化管、腎臓などの各器官における内腔、ヒダ、絨毛、平滑筋層等における多面的な極性に関わる形成異常を明らかにした。

大谷―南　南が作成した *Ror2*（Wnt5a 受容体）KO マウスの中腸を、大谷が細胞核の分布変化の追跡とその多次元尺度法という統計学的手法を用いて解析することにより、Ror2 の異常が中腸における核移動 interkinetic nuclear migration（INM）の限局した異常をもたらし、部位特異的な奇形につながることを見出した。平面細胞極性制御因子である Wnt5a 及び Ror2 は発生過程の後腎間葉に発現すること、及びこれらの KO マウスでは、重複腎・尿管奇形やそれに伴う水尿管症が認められることと多様な先天性腎尿路奇形（CAKUT）に関わる尿管において、INM が中腸とは異なる様式で起こることを明らかにした。

南―西中村　*Wnt5a* 及び *Ror2* の KO マウスと *HoxB7-EGFP* トランスジェニックマウスとの交配により、ウォルフ管または尿管芽上皮細胞のトレース実験を行ったところ、正常または変異マウス胎児由来腎臓の器官培養において、重複尿管を反映する異所性尿管芽の形成を再現することに成功した。

平島―池ノ内　内皮細胞に特異的に発現する脂質分子種の探索や、そのような脂質分子が管腔形成に与える影響を明らかにすることを目的として、ES 細胞および平島が分化誘導して得た内皮細胞の脂質組成を池ノ内が解析した。未分化状態の ES 細胞においては、野生型と *Aspp1* 欠損型の間に脂質組成の相違は認めなかったが、ES 細胞は特徴的な脂質分子種を有する可能性が示唆された。

伊藤－紙谷　伊藤は、障害肝に発現する新規胆管伸長因子の探索を目的として、四塩化炭素の頻回投与により障害を誘導したマウス肝臓の中心静脈および門脈領域の細胞をレーザーマイクロダイセクション法により回収し、網羅的遺伝子発現解析により誘引因子の探索を行った。得られた候補因子の活性を、紙谷が構築したヒト多能性幹細胞由来の胆管構造培養系を用いて解析する予定である。

西森－伊藤　LGR4 に近縁の LGR5 を発現する細胞が肝臓損傷時に肝幹細胞として機能すると報告された。西森が樹立した *LGR4 flox* マウスの供与を受け、伊藤が成体の胆管あるいは胎児期の胆管前駆細胞で Cre を発現する種々のマウス系統との交配を行い、胆管系を中心に肝発生・再生時における LGR4/Wnt シグナル系の機能解析を進めていく予定である。

谷水－紙谷　谷水が確立したマウス胎仔肝由来の肝前駆細胞株の胆管系への培養誘導技術を用いて、紙谷とともに Wnt5a シグナルの肝前駆細胞の肝細胞・胆管細胞への分化運命決定のメカニズムを明らかにした（*Hepatology*, 2013 in press）。また、紙谷が作製した肝前駆細胞より派生する細胞（成熟肝細胞および胆管細胞）を選択的に障害できるマウスを用いて、谷水がマウス胎仔肝由来の肝前駆細胞株を移植することにより、生体内で胆管上皮細胞へと分化誘導する系を確立した。

３．　研究の進展状況［設定目的に照らし、研究項目又は計画研究毎に整理する］（３ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進展しているのか記述してください。また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したかについて研究項目又は計画研究毎に記述してください。

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進展しているのか

領域全体の目的は、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の分子機構を明らかにすることである。そのために、(i)組織幹細胞の維持と幹前駆細胞からの上皮細胞への分化の機構と(ii)上皮細胞から管腔組織形成・維持への機構を解明するとともに、(iii)上皮管腔組織の形成・維持の過程が破綻した場合に生じる種々の奇形や疾患発症の機構を解明することが必要であると考えている。すなわち、「幹」細胞と「管」腔、疾「患」の３つの「かん」を対象として捉え、A01 では(i)と(ii)を、A02 では(iii)を担当する。(i)については、**鈴木（淳）**が細胞外からのシグナルや転写調節機構の解析により、組織幹細胞の維持と分化の制御機構を解明する。**大野**は極性シグナルの視点により、組織幹前駆細胞から上皮細胞への運命決定の分子機構を解明する。(ii)については、**菊池**が液性因子と接着による分岐を伴った上皮細胞からの管腔組織形成の分子機構を解明する。**大橋**は 3 次元イメージング解析により上皮管腔形成における 3 次元組織構築機構を解明する。(iii)については、**大谷**が器官形成期と組織形成期における異常による奇形の形成機構を独自の数理解析法、発生工学的手法などで解明する。**南**は平面細胞極性シグナルや繊毛形成・維持シグナルの異常と繊毛関連症候群や癌の浸潤・転移などの病態との関連の分子機構を解明する。さらに、**佐邊**は上皮管腔構造の破綻をもたらす脱極性化のシグナル経路の変異やそれに関わるサイトカインを解明する。このような明確な目的のもと、各計画研究のこの 2 年間の進展状況は以下の通りである。

A01(i)　上皮管腔組織の形成や伸長を伴う器官発生や再生の過程では、組織幹細胞の秩序正しい増殖や分化によって、必要な時に必要なだけ上皮細胞が供給されるシステムが必要である。そのため、上皮管腔組織形成の分子機構を理解するには、組織幹細胞の維持や上皮細胞への分化決定を制御する分子機構の解明が必須である。**計画研究１（鈴木）**は、肝臓における細胞分化や増殖に着目して研究を進めており、これまでの解析結果から、肝臓において肝細胞の分化決定や増殖を制御する転写因子とその分子機構を明らかにし、肝臓の組織幹細胞の未分化性と分化を制御する転写因子ネットワークやシグナル分子、マイクロ RNA の役割を見出した。また、得られた成果を基盤として細胞の分化破綻による組織形成異常や発癌のメカニズム解析にも研究を発展させ、これまで胆管上皮細胞から発生すると考えられていた肝内胆管癌が、実際は肝細胞の分化転換によって生じることを明らかにした。さらに、肝臓の組織幹細胞の未分化性と分化を制御する転写因子について、それらの発現を制御するジェネティック/エピジェネティックな分子機構について研究を進めるとともに、細胞外シグナルによる肝発生制御機構との関係に着目して研究を行っている。また、同定したマイクロ RNA の制御機構を解析し、それらの機能障害による幹細胞の分化や増殖の異常についても研究を進めている。

計画研究２（大野）は、幹細胞の性質を維持しつつ分化した子孫細胞を生じる仕組みと、その前駆細胞や終末分化細胞への分化及びその制御機構について、線虫受精卵の非対称分裂の制御因子である極性タンパク質に着目して研究を進めた。乳癌の幹細胞のマーカーである ALDH が、乳腺幹細胞ではなく前駆細胞の優れたマーカーであること、乳腺上皮細胞における aPKC の conditional KO マウスにおいて、乳腺の形成時ではなく性成熟後に乳腺管腔組織の前癌病変が起き、この異常が乳腺前駆細胞の異常増殖に起因することを明らかにした。これを踏まえて分子機構の解析を行ない、aPKC が *ErbB2* の転写抑制を介して前駆細胞の増殖を制御する新規のシグナル経路（aPKC-ErbB2 枢軸）の存在を見出した。さらに、150 例以上のヒト乳癌検体の解析で、$aPKC^{-}$;$ErbB2^{+}$, $ALDH^{+}$の症例が存在することも確認した。現在、aPKC-ErbB2 枢軸の詳細の解析を進めると同時に、乳腺幹細胞における PAR-aPKC 極性因子の役割の解析を進めている。

A01(ii)　上皮細胞からの管腔構造形成の理解のためには、3 次元培養下での *in vitro* 実験系と器官培養系または類器官（オルガノイド）培養系を確立し、新規のイメージング技術等を用いて解析することが求められる。**計画研究 3（菊池）**は、三次元培養（マトリゲル）下においてラット腸管上皮 IEC6 細胞が、Wnt3a と EGF または HGF の組み合わせで、効率よく管状の構造を形成する実験系を確立した。Wnt3a と EGF のシグナルの相乗的な活性化により管腔構造が形成される過程で発現する遺伝子（因子 X）を見出した。因子 X の発現により細胞骨格の再構築が起こり、細胞伸長は管状構造の先導端の細胞で認められ、そこでは、転写活性化因子 YAP により細胞増殖が引き起こされていた。したがって、Wnt3a と EGF の相乗的シグナルにより発現する因子 X が上皮管腔形成に重要であることが示唆された（投稿中）。また、マウス胎生 12 日目の唾液腺と腎臓の原基の上皮細胞のみでオルガノイド培養すると、管状構造が誘導される実験系を確立した。その過程で因子 X は発現し、Wnt3a または EGF のシグナルを薬剤で阻害すると因子 X の発現が抑制され、唾液腺と腎臓の上皮管状構造の形成も阻害された。一方、因子 X は大腸癌組織の非腫瘍部では発現は認められなかったが、腫瘍部で 47%の症例で検出された。大腸癌細胞株 HCT116 細胞の因子 X をノックダウンすると、細胞の増殖能、運動能が抑制された。したがって、因子 X は極性化上皮細胞の管腔構造形成に重要であるばかりでなく、その発現異常は癌の発症に関わることが示唆された（投稿中）。現在、因子 X の他の上皮管腔器官における機能と種々のがんにおける発現の解析を行っている。さらに、**南と連携する**ことにより、Wnt5a/Ror2 シグナルが腸管炎症に関与することを明らかにしつつある。

計画研究 4（大橋）は、細胞接着、細胞骨格、細胞極性を可視化する蛍光標識マーカー分子を恒常的に発現させた MDCK と IEC6 細胞株を樹立し、シスト形成、管腔伸長過程における頂底極性形成過程やアクチン骨格の再構築を三次元的に可視化する方法を確立した。また、細胞に作用する機械的刺激を可視化する高感度な FRET プローブの開発を行った。細胞骨格制御の視点では、乳腺上皮細胞と MDCK 細胞のシスト・管腔形成過程における細胞外基質の硬さ依存的な形質転換過程に Farp-1 を含む５種類の Rho-GEF が関与することを見出した。特に、Farp1 はシストを構成する細胞の極性や細胞-基質間接着の制御に関与していることを明らかにした。さらに、Farp1 に対する結合蛋白質をプロテオミクス解析によって探索し、インテグリンなどの細胞-基質間接着に関与する因子や極性形成に関与する因子を同定し、Farp1 はインテグリンの下流でストレスファイバー形成を誘導することを明らかとしている。現在、**菊池と連携し**、IEC6 細胞の管腔形成誘導における Farp1 の機能解析を進めている。

A02(iii)　上皮管腔構造の「破綻」により引き起こされる疾患の病態を明らかにするために、腸管、腎尿管、乳腺などを対象として、細胞極性と形成異常の関連につき解析し、また細胞極性とEMTの視点で、癌の浸潤転移能や尿管異常、腎線維症について解析した。

計画研究 5（大谷）は、全身の上皮管腔組織において、発生異常を正確かつ効率よく解析するための形態学的な正常組織発生基準を確立するため、ヒト胎児およびマウス胎仔の消化器系、泌尿器系、中枢神経系、循環器系、胎盤などの細胞の極性に基づく形態・配列、総細胞数の局所的データを蓄積し、経時的変化や部位間の関係等について数理解析を含めた解析を行った。その結果、尿管の伸長に Convergent extension movement(CE;収斂伸長運動)機構が関わること、腸管、尿管の上皮において Interkinetic nuclear migration (INM)が異なる様式で存在すること、腸管上皮細胞の極性形成に関わる可能性が示唆されている galectin が胎盤においても極性を持った組織形成に関わる可能性があることが明らかになった。これらの成果をもとに、**菊池、南と連携し**、細胞極性に関与するとされている Wnt11, Wnt5a, Ror2 が消化管上皮細胞の部位特異的な極性や頂底極性に沿った核移動を介して形態形成に関与していることを見出した。現在、同様の手法を用いて呼吸器系や泌尿器系について解析を進めている。

計画研究 6（南）は、平面細胞極性（PCP: planar cell polarity）シグナル制御因子、繊毛シグナル制御因子及びアダプター分子群に焦点を当て、片側尿管結紮による腎線維症モデルの解析から、尿管上皮

細胞の EMT に伴い Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化され MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)が誘導されることにより尿管上皮基底膜が破壊されること、及び EMT を起こした上皮細胞が腎線維化に関与することを明らかにした。また、上皮様癌細胞の EMT に伴い Wnt/PCP シグナルが恒常的に活性化される結果、MMP-2 の発現が誘導され、癌細胞の浸潤能が顕著に亢進することを見出した。さらに、Dok ファミリー分子群の多重遺伝子改変マウスの解析から、Dok ファミリーアダプター分子が病的な気道リモデリングや気道過敏性の亢進による気流障害の抑制に必須の役割を担い、これらの分子群の異常が病的な気道リモデリングや気道過敏症の一因となることを示した。

計画研究７（佐邊）は、上皮細胞の癌的 EMT 進行に着目して、主に乳腺上皮細胞と腎尿細管上皮細胞を対象とし、その癌的 EMT 進行に関わる根幹的経路が GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路であること、この経路は E-カドヘリンのエンドサイトーシスとβ1 インテグリンのリサイクリングとを担うことを明らかにした。その過程で、p53 変異やそれに伴う epigenetic 変異が、本経路の活性化に必須であることも明らかにした。また、gain-of-function 型の p53 変異による特定の細胞内代謝経路の変化が、Arf6 活性に関与しており、EMT 進行に必要であり、代謝経路阻害によって乳癌の浸潤活性を抑制できる可能性を見出した。**大野と連携して**乳腺再構成実験系を用いて、この成果をマウスにて確認している。

応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したか

本領域では、申請時に２．「異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。」、３．「多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの。」、４．「当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの。」を研究対象とした。

研究対象２

菊池－大谷、南―大谷の共同研究は、同一分子(Wnt11 や Wnt5a, Ror2)を細胞生物学的手法と形態学的数理学的手法を用いて解析することにより、個々の細胞の極性異常が個体における器官形成（腸管、腎臓等）の形態形成にどのように関わるかを明らかにしたことで、２．に該当する。形態形成に重要な Wnt5a や Wnt11 の KO マウスの表現型に関する報告は存在するが、上皮管腔組織の極性に焦点をあてた大谷の新規の解析手法によりこれまでにない知見が集積しており、本取り組みは３．にも通じるものである。

研究対象３

菊池－大橋の共同研究は、上皮管腔組織の形成過程を解析する多様なツールを開発するとともに、細胞生物学とメカノバイオロジーを融合することにより、上皮管腔構造形成の分子機構の理解に貢献し、３に該当する。公募研究班の**加藤－山城による共同研究**は、自家蛍光の影響が少ない近赤外領域で励起する新規アクチン蛍光プローブを開発して、MDCK 細胞における単分子アクチン観察手法を確立し、細胞競合に関するアプローチも行っており、４．の他の研究領域にも波及効果が及ぶことが期待される。

研究対象４

鈴木、大野、菊池、南、佐邊が対象としている分子は、いずれも発癌や癌の悪性化と関連することが示唆されており、これらの研究を推進することが癌研究の進展に寄与すると期待され、４．に該当する。例えば、鈴木は、肝内胆管癌が胆管上皮細胞から発生するのではなく、肝細胞の分化転換によって生じることを見出したが、この知見は癌の発生母地に関する新たな考え方を示す。大野の成果は aPKC が乳腺前駆細胞の増殖制御を通じて、乳腺組織の維持の過程に関わることを意味しており、今回見出した aPKC-ErbB2 枢軸は、ヒト乳癌の一群(aPKC$^-$, ErbB2$^+$, ALDH$^+$)における異常を説明する。菊池が同定した上皮管腔形成を制御する因子 X の過剰発現が、ヒト大腸癌の 47%に認められたという知見も、新たな発癌遺伝子の同定に繋がる可能性がある。また、**菊池と南**による Wnt5a/Ror2 シグナルが腸管炎症に促進的に作用するという知見は、免疫・炎症領域における新たなシグナル伝達機構の存在を示すものである。

４．　若手研究者の育成に係る取組状況（１ページ程度）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

総括班に若手担当（大野）を設けて、若手研究者の育成については下記の取組を行った。

1. 平成 23 度第 2 回領域会議（川崎市）

若手研究者が中心となり立案し、約 60 名が参加し、若手研究者による発表（口頭発表 17 題；ポスター発表 13 題）と活発な質疑応答が行われた。また、発表会後のテーブルセッションでは、若手研究者と総括班員をはじめとするシニア研究者の間で、将来の管腔生物学の創設を見据えた意見交換がなされた。

2. 平成24年度第3回領域会議（仙台市）

計画研究班の若手研究者が企画立案を行った。公募研究者も加わり約100名が参加し、特別講演1題、公募研究班口頭発表25題について、十分な時間をかけて活発な質疑応答が行われた。

3. 平成 24 年度「若手共同研究助成」

45 歳以下の公募研究代表者を対象として、本領域内での若手研究者間（原則 2 人）での共同研究の提案を募集した。計画研究代表者による評価で、2 件の共同研究提案が採択され、それぞれに予算 100 万円ずつ（50 万円/1 研究者）を支給した。採択課題は下記の通りであった。

課題１（代表者）平島正則、神戸大学大学院医学研究科・准教授（共同研究者）池ノ内順一、京都大学工学研究科・准教授　研究課題名：細胞膜脂質がリンパ管腔形成において果たす役割

課題２（代表者）加藤洋人、北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野・助教（共同研究者）山城佐和子、東北大学大学院生命科学研究科単分子動態生物学分野・研究員　研究課題名：上皮細胞競合における細胞骨格・細胞接着ダイナミクスの可視化解析

これらの研究課題の進捗状況を把握し適切な助言を行うために、第 4 回代表者会議（平成 25 年 1 月 31 日、吹田市）において、研究進捗報告会を行った。若手研究者の研究意欲を助長するためにも、平成 25 年度も「若手共同研究助成」を行う予定である。

4. 平成 25 年度若手研究者によるワークショップ企画

45 歳以下の公募研究代表者を対象として、本領域内での若手研究者によるワークショップ企画の提案を募集した。計画研究代表者による評価が行われ下記の企画が選出された。

企画者　伊藤　暢東、京大学分子細胞生物学研究所・講師、紙谷聡英　東海大学創造科学技術研究機構・准教授　テーマ「肝臓における管腔構造と実質細胞の相互作用」、日時　平成 25 年 8 月 25 日（日）13：00～18：00　場所　東京大学弥生キャンパス・中島董一郎記念ホール

4. その他

計画研究の若手研究代表者である**鈴木淳史**が本領域での研究成果が認められ、**准教授から教授（九州大学）に昇任**した。

第 2 回、第 3 回領域会議および第 1 回、第 2 回技術講習会（次項に記載）の終了後には、若手研究者を中心にアンケート調査を行い、若手研究者育成の観点から有用と判断される提案については、その都度積極的に取り入れ、改善を図った。

平成 25 年 1 月 29 日、30 日に開催された平成 24 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウムに、本領域の若手研究者が積極的に参加し、30 日のポスター発表では若手公募研究代表者 5 名が発表し、活発な議論を行った。

計画研究代表者の教室に在籍する助教、ポスドク、大学院生のメーリングリストを作成し、若手研究者間での解析技術や研究資源の共有化や意見交換を行いやすい環境を整え、計画研究間での連携・共同研究を促進した。

５．　研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（１ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

本領域における高度技術について、その技術を領域内の研究者が利用できるための仕組みとして、技術講習会を開催して、そのために必要な実験試料、装置、参加者の旅費等を総括班が負担することにより、効率的な技術習得に寄与した。

第１回技術講習会 （平成 24 年 2 月 22 日～24 日、島根大学医学部、担当大谷浩）「*Exo-utero* 法による胚操作法」

購入機材　全体・細部手技撮影用カメラおよび比較動画ソフトをインストールしたパソコン

本機器は、子宮外発生法の技術講習会の開催後、同様に修練を必要とする各種技術の領域内共有を促進する目的で、熟練実験者の手技と初心者や修練中実験者の手技の動画を並置して詳細に比較することにより、正確かつ迅速に技術を習得・改善できる技術習得支援ツールである。これを用いてまず子宮外発生法について、教室内の熟練者による一連の実験を標準手技動画として撮影し、新入大学院生による試行の動画と比較することにより本ツールの有効性を確認した。さらに標準用動画を種々の撮影条件を検討して改訂しつつ、これに基づく簡易版手技マニュアルを作成し、同法の概要および同ツールの概要と利点について大谷の教室 HP に掲載した。今後、領域内の各種会議などでデモを行い、子宮外発生法導入のため修練を希望する研究室で活用すると同時に、本ツールを領域内で共有すべき他の技術についても同様に展開する。

第 2 回技術講習会（平成 24 年 10 月 10 日、発生・再生科学総合研究センター（神戸研究所）、担当鈴木淳史）「細胞分離技術」

現在、細胞分離に用いる機器（フローサイトメトリーなど）については多くの機種が存在し、使用方法も異なっている。また、それらは一般的に大型で高額な機器であることから、各研究機関で所有する機器の機種やグレードはまちまちであり、使用者はそれぞれに応じた使用方法を学ばなくてはならない。それゆえ、一機種を用いた使用方法の講習では受講者が所属機関で実際に使用する機種に対応できず、講習そのものが無駄になってしまう恐れがある。そこで本講習では、細胞分離用の機器全般に共通する基本原理や操作方法を日本 BD サイエンス社が説明するとともに、実際の機器を用いながら詳しく実習を行った。また、実際に上皮細胞の分離技術を実験に取り入れている領域内の研究者が講師となり、細胞分離技術の利点や実験の組み立て方、トラブルシューティングなどについて詳しく説明した。以上の講習にて配布した資料は、数多くの機種が存在する細胞分離用機器に共通した基盤情報となっており、受講者がそれぞれの研究機関で所有する細胞分離用機器を使用する際に参考となる共有資料として活用されている。

また、P10、p28、p29に記述したように、総括班が領域会議を開催する際の会議費や旅費、若手共同研究助成経費、若手研究者によるワークショップ企画経費を支出することにより運営を円滑に行っている。

計画研究で、大野が平成23年度に購入した培養装置一体型蛍光顕微鏡（ニコン社製バイオステーション）は、96穴プレート数十枚を長期に培養しつつ、タイムラプスで蛍光2波長と位相差で経時的に観察することができる。単離した一個の幹細胞から細胞塊が生じる過程や、細胞集団が３次元組織構造を形成する過程を、長期（２週間）に渡って記録することができるために、細胞の増殖や分化のデータ取得の効率化にも力を発揮するが、系を確立すれば薬剤や遺伝子導入の効果を判定するスクリーニング系として利用できる可能性があり、新規分子の同定への新たな方法となり、領域内での連携研究に適している。

６． 総括班評価者による評価（２ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

竹縄忠臣（神戸大学医学系研究科・特命教授）

（１）研究目的の達成

領域全体の目的は形態形成の基本とも言える「上皮管腔形成機序の解明」と様々な疾病の基となる「上皮管腔組織の破綻の分子機構」を明らかにすることを行なおうとするものである。その目的のため「幹細胞から上皮細胞への分化」「上皮細胞から管腔形成、維持への機序」「管腔形成、維持が破綻した場合の疾患」の３つに大きく分けて研究を行なって来た。

a 研究の成果進展状況

２年半の成果としては概ね順調に成果を挙げている。またこれらの成果の中には管腔形成を制御する遺伝子（因子 X）の発見など、大きく発展するであろう成果も含まれ将来が楽しみである。

計画研究

A01 では肝臓の組織幹細胞の未分化性と分化を制御する転写因子ネットワークやシグナル分子、miRNA の役割を明らかにしている。更に乳腺上皮細胞での aPKC の役割を調べ、aPKC が ErbB2 の転写抑制を介して前駆細胞の増殖を制御している新規のシグナル経路を見つけるなど研究は順調に進んでいる。管腔形成機序を解明するために重要なモデル系として、ラット腸管上皮細胞が Wnt3a と EGF 又は HGF との組み合わせで効率よく管腔を形成する 3D 培養での実験系を確立している。更に Wnt3a と EGF により管腔形成が起こっている時に発現する遺伝子(Factor X)を見いだすなどの成果を挙げている

A02 では上皮管腔構造の破綻により引き起こされる現象として腎線維症モデルの解析により、尿管上皮細胞の EMT に伴い、Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化され MMP-2 が誘導されることにより尿管上皮基底膜が破壊されることや、EMT を起こした上皮細胞が腎線維化に関与すること、癌的 EMT 進行に関わる根幹的経路が GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路であることが明らかにされるなど順調に成果が出ている。

以上計画班員による研究の進捗状況としては概ね順調に進んでいると言える。

公募研究

各々進展状況は異なるが、概ね計画通り順調に進んでいる。新たな培養技術により正常な大腸上皮細胞が管腔形成に至る *in vitro* 培養系を確立した事は，今後の研究に大いに役立つ。また正常細胞と変異細胞を共培養した系では変異細胞が上皮シートから排除されることを基に細胞競合モデルマウスを作製するなどの画期的成果もあがっている。

b 領域内での連携

領域内での連携、共同研究は非常に活発に行なわれ、単独ではなし得ない成果が続々と出つつある。

（２）若手研究者育成および研究支援

若手研究者育成のため若手共同研究助成を行ったり、若手研究者によるシンポジウムが予定されるなど若手研究者育成に務めている。

技術支援

高度な技術を領域内の研究者が利用できるようにするための講習会が行なわれ、一回目の講習会として「*Exo-utero* 法による胚操作法」が開かれ、2 回目として「細胞分離技術」が行なわれるなど研究支援が行なわれている。

（３）総括班の企画、運営、活動状況

総括班では各々が役割分担をして、班員の研究のサポートやその一貫としての技術講習会の開催や若手研究者の育成に向けて積極的に取り組んでいる。また、国際会議を行うことにより、海外研究者との交流にも務めているなど研究を進展させ，若手を育てる方策を充分取り入れている。

（４）総評

全体的に研究は計画通りに順調に進展している。また発足して２年という短い期間にもかかわらず、すでに興味深い結果が出始めており、これからの発展が期待される。また若手研究者の育成に力を入れ、次の時代を担う「管腔形成機序の解明」を目指す研究者を育てている事も評価される。従来の計画通りに進めて行けば良い成果が期待される。

本多久夫（神戸大学医学系研究科・客員教授）

（１）本領域の研究目的の達成状況について

(a) 計画研究・公募研究の研究成果・進展状況について−
本領域の研究の進展はめざましい。たとえば、肝内胆管癌が胆管上皮からでなく肝細胞から生じる事実、上皮細胞が嚢胞構造をつくるが、これが管腔形成に向かう時に発現する遺伝子を明らかにしたこと、腸管や腎臓の異常に細胞極性とくに平面内細胞極性がかかわる事実など多くのことが明らかになりつつある。(b) 領域内での連携状況について−領域は上皮管腔についてその形成・維持(A10)と破綻(A02)の 2 項目に分けられ、分野が理学と医学に大きく二分されている。しかしその分子的基盤は共通なため、参加研究者間の連携は非常にうまく行っている。全体会議でのどの発表も参加者は共通の関心事項として受けとめている。また技術的な面でも、特殊な細胞株や組織を持つ研究者と特別な分子のマーカーの作成や対象を透明化する技術などをもつ研究者との連携が数多く行われている。新学術領域研究の目指していたことが自然に実現できている。

（２）本領域における若手研究者育成および研究支援（技術支援）等について

(a) 若手研究者研究活動等の支援について−平成 24 年度に 2 名の若手共同研究助成が決まった。また、若手研究者間の交流については、全体会議が宿泊を伴って行われ、夜遅くまでポスター発表の前で議論が行われるなど貴重な交流の場となっている。(b) 本領域の研究者全体に対しての技術支援などの研究支援活動について−技術講習会が２回行われた（胚操作法および細胞分離技術)。分野を横断する新学術領域でこそできた価値ある技術支援である。アンケート結果からも好評であったことがわかる。

（３）本領域における総括班の企画・運営・活動状況について

(a) 代表者会議、領域会議、国際会議（開催予定）について−よく準備され内容は全体として過不足なく行われている。(b) 若手研究者支援活動について−若手研究者が中心となり立案した研究発表会（第 2 回領域会議)が行われ、若手への共同研究助成がなされるなど若手の活動を支援する環境がつくられている。(c) 研究支援や広報活動について−News Letter (Vols.1-2)はよくできていて本領域の全貌がわかる。

（４）総評

上記（１）～（３）を念頭に入れた全体的な評価。今後に向けた改善点について等−上皮管腔の領域研究は優れた企画である。上皮管腔を意識することで複雑で込み入った人体という対象をわかりよく専門家でなくても把握できるようになる。上皮管腔の形成は自然科学の第一級のテーマであり、分子生物学の進歩により研究の期が熟している。さらに、上皮管腔の解明が人体の疾患の理解と治療にそのままつながる。総じてこの新学術領域研究のスタートは好調である。これまで不思議で解明には遠いと思われていたことが、いまの知識・技術をあとひと押し進めれば解けるようなことが山積している。新学術の研究者間の提携や経済的な面でのサポートを行うよいタイミングである。

宮島篤（東京大学分子細胞生物学研究所・教授）

上皮管腔組織は肺や肝臓、腎臓などの器官構築のための必須の構造である。本研究領域は、器官の正常な形成およびその破綻を管腔構造という切り口で解析している。すなわち、組織幹細胞が上皮細胞へ分化し、上皮細胞から上皮シートや上皮組織原基を経て、上皮管腔組織は形成されその構造が維持される機構およびその破綻による器官の無形成や低形成などの奇形や癌を含む種々の疾患に至るメカニズムを解析している。そのために、計画班員には、組織幹細胞の分離、3 次元培養法、機能解析法、イメージング解析法などの優れた技術を有する研究者に加えて、上皮管腔組織の破綻に伴う疾患を扱う研究者を集めている。さらに、公募班員として２５名の上皮管腔形成のみならず、神経や血管系、3 次元培養やイメージングなど管腔形成に関与する研究者を幅広く採用しており、バランスのよい配置になっている。領域代表の優れたリーダーシップの下に、技術講習会の開催など技術や情報の共有化を図るなど交流を積極的に行い、領域内での共同研究は盛んである。各班員の研究は概ね順調に進展しており、共同研究による成果も出始めているので、今後の発展が期待される。領域会議では活発な議論が行われており、若手研究者を中心とした領域会議も開催されている。さらに若手の共同研究に対して助成を行うなど、若手育成の取り組みも行われている。以上のように、本領域は順調に進展しているが、より積極的な広報活動があってもよい。とりわけ後半の活動においては、器官発生や病態における管腔形成の重要性と本領域の成果を関連学会のシンポジウムなどで強力にアピールして、この領域が今回だけで終わらず、さらに次に続いて発展することを期待したい。

７．主な研究成果（発明及び特許を含む）［研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理する］

（３ページ程度）

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

本研究領域は平成２３年７月に発足し、計画研究班は実質約２年を経たことになる。公募研究は平成２４年４月に発足し、２年目を迎えた。各研究課題は領域の目的に沿って、順調に進展している（図５）。

A01 計画研究班

鈴木は、肝細胞分化に着目して研究を行った結果、肝細胞への分化決定が 2 種類の転写因子によって支配的に制御されていることを発見し、線維芽細胞にこれら 2 種類の転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞（iHep 細胞）へと直接変化させることに成功した（*Nature*, 2011）。また、部分肝切除等の障害後に生じる肝幹細胞が関与しない肝再生において、分裂を停止した肝細胞が再び増殖を開始するための分子機構を発見し、肝臓に対する再生療法や肝再生不全の原因究明と治療法の開発につながる研究成果を発表した（*PNAS*, 2011）。さらに、これまで胆管上皮細胞から発生すると考えられていた肝内胆管癌が、実際は Notch シグナルを介した肝細胞の分化転換から生じることを明らかにした（*J Clin Invest*, 2012）。これらの研究成果は、組織幹細胞を用いた再生医療の進展や新しい癌医療技術の開発に貢献することが期待される。

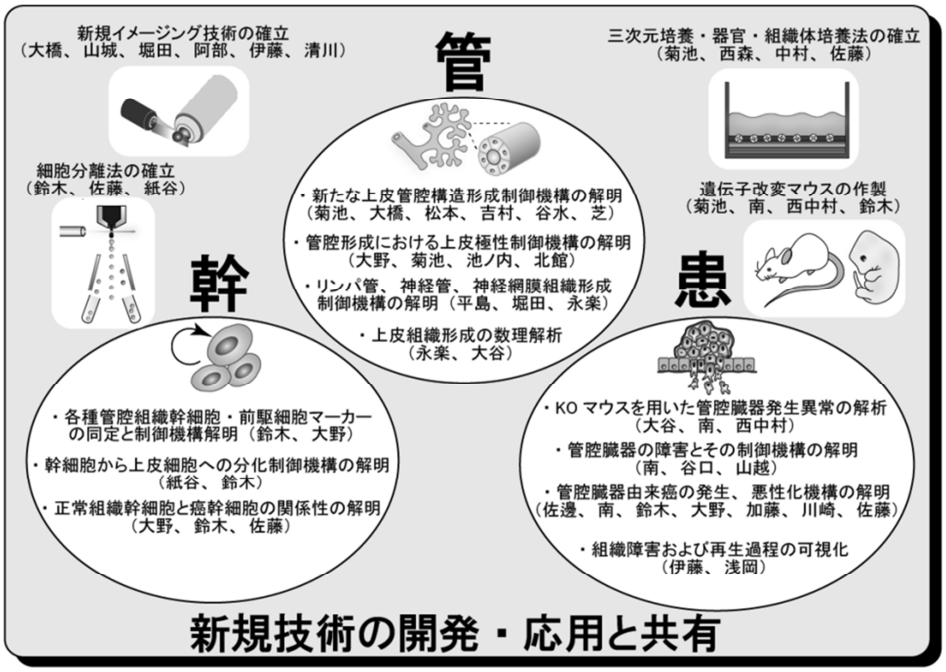

図 5.研究領域での主な研究成果

大野は、乳癌の幹細胞のマーカーである ALDH が、乳腺幹細胞ではなく、前駆細胞のマーカーであることを見出し、組織染色レベルで前駆細胞の動態を解析することを可能とした。また、極性分子 aPKC の結合タンパク質 KIBRA が aPKC のキナーゼ活性を抑制することを通じて、上皮細胞のアピカルドメインの形成を負に制御することを明らかとした（KIBRA-aPKC 枢軸）（*Curr.Biol.*, 2011）。さらに胃癌では、aPKC の発現が低くても KIBRA の発現が高いと予後が悪く、KIBRA-aPKC 枢軸が胃癌の悪性化に関わることを示した（*Cancer Sci.*, 2012）。PAR3 の結合タンパク質 ASPP2 は、aPKC/PAR6/PAR3 複合体の局在を制御することを見出し、E-カドヘリンを介した細胞接着装置と ASPP2/PAR3/aPKC/PAR6 系を結ぶ分子の同定に成功した。これらの新規分子を含めた aPKC-PAR 系について、乳腺幹前駆細胞における役割が明らかになりつつある。**菊池**は、三次元培養環境下において、Wnt3a と EGF または HGF の細胞増殖因子の組合せにより IEC６細胞が管状の構造を形成することを見出した。Wnt3a と EGF の相乗的シグナルの活性化により発現する因子 X を同定し、その発現制御機構も明らかとした。さらに、唾液腺と尿管の器官培養においても因子 X の発現が重要であることを確認した。また、三次元培養下の極性化 MDCK 細胞において、Wnt の種類により輸送される方向が異なることを見出した。Wnt11 の頂上側へ分泌は Wnt11 の複合型糖鎖修飾により決定されることが判明し、初めて Wnt の糖鎖修飾の意義を明らかにした（*J. Cell Sci.*, 2013）。上皮管腔組織が形成されるためには、細胞分裂方向の制御が重要であるが、細胞質分裂する際に Wnt5a/Dvl シグナルがミッドボディに集積し、ESCRT タンパクの機能に必須であることを明らかにした（*J. Cell Sci.*, 2012）。Wnt5a の発現異常により癌が悪性化するが、その作用機構に Dvl-associating protein (Daple)が関与すること（*Nat. Commun.*, 2012）が明らかとなり、Wnt5a 抗体ががん細胞の転移を抑制することを個体レベルで確認した（*Mol Can Ther.*, 2012）。**大橋**は、上皮管腔組織形成における個々の細胞内の多様な分子の時空間的な変化を可

視化するため、管腔形成過程におけるこれらの分子の動態を三次元タイムラプス解析する方法を確立した（**菊池との共同研究**）。また、三次元培養下の乳腺上皮細胞の細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に必要な 5 種類の Rho-GEF を同定し、それに結合するタンパク質を見出した。Rho-GEF と乳腺上皮細胞の運動性との関係を解析し、細胞の極性を持った移動に p63RhoGEF が必要であること、管腔組織の極性維持に重要な分裂極性において、Furry が双極性紡錘体の形成に必要であることを解明した(*FEBS Lett.*, 2013; *J. Biol. Chem.* 2013)。イメージング解析については、細胞内の単量体アクチンの動的変化を測定する新しいイメージング技術である s-FDAP 法を開発し、アクチン脱重合因子コフィリンの細胞運動、形態形成における機能を明らかにした(*J. Biol. Chem.* 2011; *J. Cell Biol.* 2011)。さらに、タンパク質間の結合を高感度に検出する新規 BiFC プローブを開発し、この手法をタンパク質間の結合を阻害する薬剤の探索に応用して、アクチンとコフィリンの結合を阻害する化合物の同定に成功した(*Biotechniques* 2012; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012)。

A01 公募研究

西森は、乳腺上皮細胞の３次元オルガノイド培養を用い、無血清条件で EGF, FGF, Wnt3A, R-spondin1 を加えることにより、分岐を伴ったオルガノイド形成が促進されることを見出した。**山城**は、蛍光標識試薬 DyLight-549 で標識したアクチンを用いた新しいアクチン単分子スペックル顕微鏡法を開発した(**加藤との共同研究**)。また、培養上皮 A6 細胞の細胞−細胞間接着（アドヘレンスジャンクション）において、アクチン分子がアドヘレンスジャンクションに沿って移動する様子が観察できるようになった。**中村**は、自身が開発した培養技術（*Nat. Med.*, 2012）をさらに発展させ、正常な大腸上皮細胞が *in vitro* で管腔形成に至る実験系を構築した。また、微小な内視鏡検体からヒト大腸上皮細胞を純化し培養する技術を確立した。**松本**は、ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 が M 期中心体において活性化し、紡錘体の配向を制御することで、細胞分裂面の方向をコントロールし、LRRK1 をノックダウンした MDCK 細胞は３次元培養下で嚢胞形成が異常になることを明らかにした。**池ノ内**は、上皮細胞のアピカル膜において、スフィンゴミエリンが高度に集積することが、アピカル膜の形成に必須であることを見出した(*J. Cell Sci.*, in press)。**吉村**は、上皮細胞の極性輸送に重要な Rab8 に結合する新規分子 EHBP1L1 が細胞内のチューブ構造に共局在することを見出し、初代小腸培養系を用いて実際にそれらの分子が頂端面方向への輸送に関与するかを解析した(**佐藤との共同研究**)。**平島**は、リンパ管形成をモデルとして、内皮細胞特異的に発現する分子 *Aspp1* の欠損マウス胎仔では小リンパ嚢同士の融合に異常があることを明らかにした。また、ES 細胞分化培養系において野生型内皮細胞ではシート状から網状へとコロニー形態が変化するが、Aspp1 欠損内皮細胞ではシート状構造が維持される傾向を見出した。**谷水**は、肝臓の前駆細胞から胆管上皮細胞に分化する際に発現上昇する転写因子として同定した grainyhead like 2 (Grhl2)は、密着結合の成熟化を介して嚢胞構造からの管腔構造を成長させることを明らかにする(Mol. Biol. Cell 2012)とともに、Grhl2 が胆管上皮細胞の分化能を制御する可能性を見出した。**芝**は、尿細管上皮細胞に存在する一次繊毛の形成に関与する分子である Inv/NPHP2 と BBS5 が結合し、両者が繊毛基部および核に共局在することを明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュで Inv/NPHP2 と BBS5 の発現を抑制すると、嚢胞腎と内臓逆位が生じることを明らかにした。**堀田**は、ホヤの神経管形成をモデルとして用いて共焦点顕微鏡で４Ｄ撮影を行い、神経管前方領域では神経板期に３列を成していた細胞が２列に編成を変え、その２列のうち、内側の列の細胞は背側から腹側に移動することを見出した。さらに、ラマン顕微鏡を用い、発生過程の組織分化を非ラベル・非染色で検出するための実験系を開発した。**北館**は、管腔構造の一つである精上皮の極性化機構を解明するために、血管に沿って精上皮表面を局所的に覆う細胞では CXCL12 および FGF5 が発現し、精子幹細胞に受容体 CXCR4 が発現し、このシグナルが精上皮の極性化に関与することを明らかとした。**永楽**は、これまでに確立したマウス ES 細胞からの立体的な眼杯組織の試験管内構築法をヒト ES 細胞に適用し、*in vitro* でヒトの眼杯および神経網膜組織を構築することに成功した（*Cell Stem Cell*, 2012)。さらに、増殖を伴う立体的な上皮組織の力学特性を検証するための数値シミュレーションモデル（Reversivle Network Reconnection model）を構築した（*Biomech. Model Mechanobiol*, 2012)。

A02 計画研究

大谷は、*Wnt11*KO マウスの腸管において横断面および長軸に沿った平面極性に関わる形態形成異常が部位特異的に起こることを見出した（**菊池との共同研究**)。また、*Ror2* KO マウスで、中腸と尿管において、INM が起こることが奇形の発生につながることを明らかにした(**南との共同研究**)（*Anat. Sci. Int.*, 2012)。発生異常を全身の上皮管腔組織において正確に解析するために、ヒト胎児およびマウス胎仔について全身臓器の発生異常を解析する基準となる形態学的な所見および臓器間の位置関係情報を明らかにした(*Congenit. Anom.*, 2011; *Placenta*,

2012; *Anat.Rec.*, 2012)。また、子宮外発生法の応用により、動物個体において着目するシグナル系を撹乱して組織形成に影響を与え、その調節機構を解析する実験系の有用性を、膵臓において立証した（*Congenit. Anom.*, 2011)。**南**は、片側尿管結紮による腎線維症モデルの解析から、尿管上皮細胞の EMT に伴い Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化され MMP-2(matrix metalloproteinase-2)が誘導され尿管上皮基底膜が破壊されること、及び EMT を起こした上皮細胞は腎線維化に関与することを明らかにした(*Genes Cells*, 2013)。また、上皮様癌細胞の EMT に伴う Wnt/PCP シグナルの恒常的な活性化により、癌細胞の浸潤能が顕著に亢進することも見出した。(*Genes Cells*, 2011)。さらに、Wnt5a/Ror2 シグナルの異常が重複腎・尿管の形成に関与することを見出した**(西中村との共同研究)**。Dok ファミリーアダプター分子が病的な気道リモデリングや気道過敏性の亢進による気流障害の抑制に必須の役割を担い、これらの分子群の異常が病的な気道リモデリングや気道過敏症の一因となることを示した。（*Genes Cells*, 2013)。**佐邊**は、乳癌の癌的 EMT 進行に関わる根幹的経路は GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路であり、本経路において、AMAP1 は PRKD2 と結合し、β1 インテグリンのリサイクリングを担うことを明らかにした（*J.Cell Biol.*, 2012; *Pharma. Therapy*, 2012)。

A02 公募研究

加藤は、正常細胞と変異細胞を共培養した系では、変異細胞が上皮シートから物理的に排除されることを示した成果（*Curr. Biol.*, 2012）をもとに、「世界初の細胞競合マウスモデル」を作成し、正常管腔オルガノイドに発生させた Ras 変異細胞が、管腔側へ積極的に排除されることを示した(第二回細胞競合コロキウム、2013 年 札幌)。**阿部**は、高分解能光干渉断層画像化法（OCT）プローブを開発し、マウス卵巣内の前胞状卵胞の非侵襲イメージングに初めて成功するとともに、肺組織においては気管支から細気管支の分岐状態と上皮細胞の繊毛運動の画像化に成功した（日本卵子学会, 2013：優秀発表賞)。OCT システムは、肺の管腔構造の非侵襲的イメージングを可能とし、肺組織の「正常」と「異常（病変・破綻)」を非侵襲的に検出できる有用な技術であることが示された。**紙谷**は、ヒト iPS 細胞を肝分化誘導した後に、細胞表面抗原マーカーによって $CD13^{+}CD133^{+}$細胞を純化した。この細胞を三次元培養すると、胆管細胞マーカーCK7 陽性で極性化した上皮細胞のシストが形成されることから、ヒト iPS 細胞から *in vitro* 培養系で胆管様構造を誘導できたことを示した。**川崎**は、APC 結合新規蛋白質 Asef が大腸癌で発現亢進していること、及びその発現亢進は Notch3 経路の活性化に依存していることを明らかにした。さらに、miR-1 が Notch3/Asef の上流因子として機能し、miR-1/Notch3/Asef 経路は大腸癌細胞の運動能亢進に重要であることを見出した(*Cancer Sci.*, 2013)。**伊藤**は、マウス胆管系の新規三次元可視化手法を用いて、障害部位（門脈域、中心静脈域、および実質域全体）に応じて、胆管系がそれぞれ異なる形態変化を示すことを見出した。疾患・障害の種類に応じて胆管の三次元的構築は動的かつ柔軟に変化するものであり、これが肝臓の持つ高い再生能力に寄与していることを示唆した。**浅岡**は、張力可視化用センサープローブ（VinTS）を用いて、メダカ YAP 変異体における神経管腔組織の破綻を細胞張力の観点から解析した。**鈴木(聡)**は、Hippo 経路のコアコンポーネントの１つである MOB1 KO マウスを作製して、上皮管腔組織の１つである毛嚢の悪性腫瘍(外毛根鞘がん）の発症に関わることを明らかにして、さらに、ヒト外毛根鞘がん症例においても高頻度に MOB1 の発現が著減していることを見出した(*J. Clin. Inv.*, 2012; 読売・朝日・共同通信などの新聞報道)。**西中村**は、後腎間葉に発現する新規キネシン Kif26b に non muscle myosin heavy chain II（Myh9/10)が結合する知見をもとに、後腎間葉特異的なミオシン欠失マウスを作製し、Myh9 の欠失により尿細管の拡張と腎機能不全が生じることを見出した。**谷口**は、ショウジョウバエ附属腺は、加齢に伴い分化状態に破綻を生じるが、その際に Notch・JAK-STAT シグナルは細胞排除を促進することを見出した。**佐藤**は、ヒト大腸がん検体を用いて、大腸がんのオルガノイド培養の樹立に成功し、大腸がんオルガノイドは正常腸管上皮および腺腫上皮細胞とは全く異なる組織管腔構造を示すことを明らかにした(*Science*, 2013)。さらに、ヒト正常腸管上皮オルガノイドに対するレンチウィルスを用いた腫瘍関連遺伝子の導入に成功し，遺伝子変異導入による管腔形成異常の *in vitro* での再現に成功した。**清川**は、オルガノイドをライブでイメージングすることで、オルガノイドの形成初期では回転するが、後期では回転しなくなることを発見し、オルガノイドの回転には細胞・基質間の接着の解除が必要である可能性を見出した。**山越**は、加齢による口腔乾燥症状の原因である唾液分泌量減少の分子基盤を解析して、加齢により顎下腺組織の実質細胞数が減少するだけでなく、唾液を産生する腺房細胞内に含まれる唾液成分の割合が変化し、粘液性物質が増えることを見出した(Keystone Symposia, 2012; Gordon Research Conferences, 2013)。

８．研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（５ページ程度）

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に＊印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

論文業績

2011 年 8 月～2013 年 6 月までに発表された計画研究班 7 班の総原著論文数は 63 編、総説 14 編で、公募研究班 25 班の総原著論文数は 78 編、総説 13 編である。Narure, Science, Nature Medicine, Cancer Cell, Developmental Cell など国際的に評価の高い雑誌に着実に採択されている。全てを記述することはできないので、代表的論文を掲載した。（　　）内は英文原著論文と英文総説の総数を示す。「　　」内は研究課題を示す。

計画研究

鈴木　淳史 (5)「組織幹細胞の維持と分化の制御機構」

Hikichi, T., Matoba, R., Ikeda, T., Watanabe, A., Yamamoto, T., Yoshitake, S., Tamura-Nakano, M., Kimura, T., Kamon, M., Shimura, M., Kawakami, K., Okuda, A., Okochi, H., Inoue, T., Suzuki, A., ＊Masui, S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110: 6412-6417, 2013.

Sekiya, S., ＊Suzuki, A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. **J. Clin. Invest.** 122: 3914-3918, 2012.

Sekiya, S., ＊Suzuki, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. **Nature** 475: 390-393, 2011.

Sekiya, S., ＊Suzuki, A. Glycogen synthase kinase 3β-dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108: 11175-11180, 2011.

Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K., ＊Nakayama, K.I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. **J. Clin. Invest.** 121: 342-354, 2011.

大野　茂男 (17)「組織幹前駆細胞の極性制御と運命決定」

Nakayama, M., Nakayama, A., van Lessen, M., Yamamoto, H., Hoffmann, S., Drexler, HC., Itoh, N., Hirose, T., Breier, G., Vestweber, D., Cooper, JA., Ohno, S., Kaibuchi, K., ＊Adams, RH. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. **Nat Cell Biol.** 15: 249-260, 2013.

Yoshihama, Y., Izumisawa, Y., Akimoto, K., Satoh, Y., Mizushima, T., Satoh, K., Chida, K., Takagawa, R., Akiyama, H., Ichikawa, Y., Kunisaki, C., Inayama, Y., Endo, I., Nagashima, Y., ＊Ohno, S. High expression of KIBRA in low atypical protein kinase C-expressing gastric cancer correlates with lymphatic invasion and poor prognosis. **Cancer Sci.** 104(2): 259-265, 2013.

Iden, S., van Riel, WE., Schäfer, R., Song, JY., Hirose, T., Ohno, S., ＊Collard, JG. Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. **Cancer Cell.** 22(3):389-403, 2012.

Hayashi, K., Suzuki, A., Hirai, S., Kurihara, Y., Hoogenraad, CC., ＊Ohno, S. Maintenance of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule growth. **J Neurosci**, 31(34):12094-12103, 2011.

Yoshihama, Y., Sasaki, K., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Ohtsuka, T., Hakuno, F., Takahashi, S-I., ＊ Ohno, S., Chida, K. KIBRA Suppresses Apical Exocytosis through Inhibition of aPKC Kinase Activity in Epithelial Cells. **Curr. Biol**, 21, 705-711, 2011.

Hirai, S., Banba, Y., Satake, T., ＊Ohno, S. Axon Formation in Neocortical Neurons Depends on Stage-Specific Regulation of Microtubule Stability by the Dual Leucine Zipper Kinase-c-Jun N-terminal Kinase Pathway. **J Neuroscience**, 31(17), 6468-6480, 2011.

菊池　章 (14)「分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構」

Yamamoto, H., Awada, C., Hanaki, H., Sakane, H., Tsujimoto, I., Takahashi, Y., Takao, T., ＊Kikuchi, A. Apicobasal secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by distinct mechanisms. **J. Cell Sci.** in press 2013.

Fumoto, K., Kikuchi, K., Gon, H., ＊Kikuchi, A. Wnt5a signaling controls cytokinesis by positioning ESCRT-III to the proper site at the midbody. **J Cell Sci.** 125: 4822-4832, 2012.

Hanaki, H., Yamamoto, H., Sakane, H., Matsumoto, S., Ohdan, H., Sato, A., ＊Kikuchi, A. An Wnt5a-antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. **Mol. Cancer Ther.** 11: 298-307, 2012.

Sakane, H., Yamamoto, H., Matsumoto, S., Sato, A., ＊Kikuchi, A. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. **J. Cell Sci.** 125: 449-460, 2012.

Ishida-Takagishi, M., Enomoto, A., Asai, N., Ushida, K., Watanabe, T., Hashimoto, T., Kato, T., Weng, L., Matsumoto, S., Asai, M., Murakumo, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., ＊Takahashi M. The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. **Nat Commun.** 3: 859, 2012.

Naito, A., Sumida, T., Nomura, S., Liu, M.L., Higo, T., Nakagawa, A., Okada, K., Sakai, T., Hashimoto, A., Hara, Y., Shimizu, I., Zhu, W., Toko, H., Katada, A., Akazawa, H., Oka, T., Lee, J.K., Minamino, T., Nagai, T., Walsh, K., Kikuchi, A., Matsumoto, M., Botto, M., Shiojima, I., ＊Komuro, I. Complement c1q activates canonical wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. **Cell** 149: 1298-1313, 2012.

Kagermeier-Schenk, B., Wehner, D., Özhan-Kizil, G., Yamamoto, H., Jian Li, Kirchner, K., Hoffmann, C., Stern,P., Kikuchi, A., Schambony, A., ＊Weidinger, G. The transmembrane protein Waif1/5T4 inhibits Wnt/β-catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization. **Dev. Cell** 21: 1129-1143, 2011.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., Matsumoto, S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. **Int. Rev. Cell. Mol. Biol.** 291: 21-71, 2011.

大橋　一正 (9)「上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の３次元イメージング解析」

Saito, A., Miyajima, K., Akatsuka, J., Kondo, H., Mashiko, T., Kiuchi, T., ＊Ohashi, K., ＊Mizuno, K. CaMKII□-mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neuritogenesis. **Genes Cells.** 18:533-543, 2013.

Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., ＊Mizuno K. Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. **Biotechniques** 52: 45-50, 2012.

Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M., ＊Mizuno, K. LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. **J. Biol. Chem.** 286: 36340-36351, 2011.

Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., ＊Mizuno, K. Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. **J. Cell Biol.** 193: 365-380, 2011.

大谷　浩 (10)「器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害」

Hashimoto, R., Matsumoto, A., Udagawa, J., Hioki, K., ＊Otani, H. Effect of leptin administration on myelination in *ob/ob* mouse cerebrum after birth. **NeuroReport**, 24: 22-29, 2013.

Yamada, M., Udagawa, J., Hashimoto, R., Matsumoto, A., Hatta, T., ＊Otani, H. Interkinetic nuclear migration during early development of midgut and ureteric epithelia. **Anat. Sci. Int.**, 88: 31-37, 2013.

Rafiq, A.M., Udagawa, J., Lundth, T., Jahan, E., Matsumoto, A., Sekine, J., ＊Otani, H. Mathematical analysis of mandibular morphogenesis by micro-CT-based mouse and alizarin red S-stained-based human studies during development. **Anat. Rec.** 295:313-327, 2012.

Hashimoto, R., Udagawa, J., Kagohashi, Y., Matsumoto, A., Hatta, T., ＊Otani, H. Direct and indirect effects of neuropeptide Y and neurotrophin 3 on myelination in the neonatal brains. **Brain Res.** 1373:55-66, 2011.

Matsumoto, A., Hatta, T., Ono, A., Hashimoto, R., ＊ Otani, H. Stage-specific changes in the levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the biological fluid and organ of mouse fetuses. **Congenit. Anom.** 51:183-186, 2011.

南　康博 (10)「平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移」

Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., ＊Takahashi, N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblasts and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat. Med.** 18: 405-412, 2012.

Endo, M., Doi, R., Nishita, M., ＊Minami, Y. Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. **J. Cell Sci.** 125: 2017-2029, 2012.

Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., ＊Minami, Y. Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to *matrix metalloproteinase (MMP)-13* expression. **J. Biol. Chem.** 287: 1588-1599, 2012.

Endo, M., Nishita, M., ＊Minami, Y. Analysis of Wnt/Planar cell polarity pathway in cultured cells. **Methods Mol. Biol.** 839: 201-214, 2012.

Gao, B., Song, H., Bishop, K., Eliott, G., Garrett, L., English, M. A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., Economedes, A. N., ＊Yang, Y. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. **Dev. Cell** 20: 163-176, 2011.

佐邊　壽孝 (11)「上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換」

Onodera, Y., Nam, J.M., Hashimoto, A., Norman, J.C., Shirato, H., Hashimoto, S. ＊Sabe, H. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. **J. Cell Biol.** 197: 983-996, 2012.

Mazaki, Y., Nishimura, Y. ＊Sabe, H. GBF1 bears a novel phosphatidylinositol-phosphate binding module, BP3K, to link PI3Kg activity with Arf1 activation involved in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis and superoxide production. **Mol. Biol. Cell** 23: 2457-2467, 2012.

Li, J., Malaby, A.W., Famulok, M., Sabe, H., Lambright, D.G. ＊Hsu, V.W. Grp1 plays a key role in linking insulin signaling to glut4 recycling. **Dev. Cell** 22: 1286-1298, 2012.

Wakayama, Y., Miura, K., Sabe, H. ＊Mochizuki, N. EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of Madin-Darby canine kidney cells by inactivating ezrin through negative regulation of RhoA. **J. Biol. Chem.** 286: 44243-44253, 2011.

Hashimoto, A., Hashimoto, S., Ando, R., Noda, K., Ogawa, E., Kotani, H., Hirose, M., Menju, T., Morishige, M., Manabe, T., Toda, Y., Ishida, S. ＊Sabe, H. GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. **PLoS One** 6: e23359, 2011.

Sabe, H. Cancer early dissemination: cancerous epithelial-mesenchymal transdifferentiation and transforming growth factor β signalling. **J. Biochem.** 149: 633-639, 2011.

公募研究

西森 克彦 (2)「新規Ｗｎｔシグナル修飾因子ＬＧＲ４による乳腺上皮細胞運命の決定と極性制御機構解明」

Mohri, Y., Sone, M., Oyama, K,. Akamatsu, A., ＊Nishimori, K. LGR4 is required for the cell survival pf the peripheral mesenchyme at the embryonic stage of nephrogenesis. **Biosci.Biotech.Biochem.** 76: 888-891, 2012.

山城 佐和子 (3)「上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明」

Yamashiro S., Gokhin D.S., Kimura S., Nowak R.B. ＊Fowler V. M. Tropomodulins: pointed-end capping protens that regulate actin filament architecture in diverse cell types. **Cytoskeleton** 69: 337-370, 2012.

中村 哲也 (4)「独自の正常大腸上皮幹細胞培養技術を用いた管腔形成機構の解析」

Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., ＊Clevers, H., ＊Watanabe, M. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. **Nat. Med**. 18(4): 618-623, 2012.

Mizutani, T., ＊Nakamura, T., Morikawa, R., Fukuda, M., Mochizuki, W., Yamauchi, Y., Nozaki, K., Yui, S., Nemoto, Y., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Watanabe, M. Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. **Biochem Biophys Res Commun.** 419(2): 238-243, 2012.

松本 邦弘 (6)「管形成過程における紡錘体配向の変換機構」

Li, C., Hisamoto, N., Nix, P., Kanao, S., Mizuno, T., Bastiani, M., ＊Matsumoto, K. The growth factor SVH-1 regulates axon regeneration in C. elegans via the JNK MAPK cascade. **Nature Neurosci.** 15: 551-557, 2012.

Pastuhov, S. Iv., Fujiki, K., Nix, P., Kanao, S., Bastiani, M., ＊Matsumoto, K., Hisamoto, N. Endocannabinoid-Goα signalling inhibits axon regeneration in Caenorhabditis elegans by antagonizing the Gqα-PKC-JNK cascade.**Nature Commun.** 3: e1136, 2012.

池ノ内 順一 (2)「細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明」

＊Ikenouchi, J., Hirata, M., Yonemura, S., ＊Umeda, M. Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. **J. Cell Sci**. in press, 2013.

Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, MD., Guardia-Laguarta, C., de Groof, AJ., Madra, M., Ikenouchi, J., Umeda, M., Bird, TD., Sturley, SL., ＊Schon, EA. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. **EMBO J.** 31:4106-23, 2012

吉村 信一郎 (3)「管腔形成における細胞内極性輸送の機能の解明」

Linford, A., Yoshimura, S., Nunes Bastos, R., Langemeyer, L., Gerondopoulos, A., Rigden, DJ., ＊Barr, FA. Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells. **Dev Cell.**22(5):952-66, 2012.

平島 正則 (4)「リンパ管腔形成と維持における Aspp1 の役割と分子機構」

Sano, K., Katsuta, O., Shirae, S., Kubota, Y., Ema, M., Suda, T., Nakamura, M., ＊Hirashima, M. Flt1 and Flk1 mediate regulation of intraocular pressure and their double heterozygosity causes the buphthalmia in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 420(2): 422-427, 2012.

谷水 直樹 (6)「胆管をモデルとした、管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解明」

＊Tanimizu, N., Kikkawa, Y., Mitaka, T., Miyajima, A. α1- and α5-containing Laminins Regulate the Development of Bile Ducts via β1 Integrin Signals. **J. Biol. Chem.** 287: 28586-28597, 2012.

Senga, K., Mitaka, T., Mostov. KE,, Miyajima, A., ＊Tanimizu, N. Grhl2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through upregulation of Cldn3, Cldn4, and Rab25. **Mol. Biol. Cell** 23: 2845-2855, 2012.

芝　大 (3)「腎尿細管構造の維持機構解析の基盤となる一次繊毛蛋白による細胞周期調節のしくみ」

Shiba, D., ＊Yokoyama, T. The ciliary transitional zone and nephrocystins. **Differentiation.** 83(2):S91-6, 2012.

堀田 耕司 (1)「脳胞形成の４次元定量解析」

Nakamura, MJ., Terai, J., Okubo, R., ＊Hotta, K., Oka, K. Three-dimensional anatomy of the Ciona intestinalis tailbud embryo at single-cell resolution. **Dev. Biol.** 372(2):274-84, 2012.

中村 暢宏 (2)「分泌経路のリモデリングが上皮管腔組織形成に果たす必須の役割」

Nakamura, N., Wei, J-H., ＊Seemann, J. Modular organization of the mammalian Golgi apparatus. **Curr. Opin. Cell Biol.** 24: 467-474 2012.

永樂 元次 (6)「神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明」

Nakano, T., Ando, S., Takata, N, Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., ＊Sasai, Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. **Cell Stem Cell.** 10(6):771-785, 2012.

Eiraku, M., ＊Sasai, Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. **Nat. Protoc.** 7(1):69-79, 2011

加藤 洋人 (1)「上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合 －超初期発がんメカニズムの解明－」
Katoh, H., ＊Fujita, Y. Epithelial homeostasis: elimination by live cell extrusion. **Curr. Biol.** 22(11):R453-45, 2012. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.036.
阿部 宏之 (7)「光干渉断層画像化法を応用した肺組織構築イメージングシステムの開発」
Abe, H., ＊Utsunomiya, T. A novel method of quality evaluation of embryos with highly sensitive and non-invasive technique for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy. **Reprod. Med. Biol.**, in press, 2013.
紙谷 聡英 (5)「多能性幹細胞由来肝幹・前駆細胞を用いた胆管疾患解析系の構築」
Yanagida, A., Ito, K., Chikada, H., Nakauchi, H., ＊Kamiya, A. An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. **PLoS One**, in press, 2013.
Oikawa, T., ＊Kamiya, A., Zeniya, M., Chikada, H., Hyuck, AD., Yamazaki, Y., Wauthier, E., Tajiri, H., Miller, LD., Wang, XW., ＊Reid, LM., ＊Nakauchi, H. SALL4, a stem cell biomarker in liver cancers. **Hepatology**, in press, 2013.
川崎 善博 (1)「癌抑制遺伝子産物ＡＰＣが関わる上皮管腔形成機構とその破綻による癌発症機構の解明」
Kawasaki, Y., Furukawa, S., Sato, R., ＊Akiyama, T. Differences in the localization of the APC-Asef/Asef2 complex between APC wild-type and mutant cells. **Cancer Sci.** in press, 2013.
伊藤 暢 (2)「新規可視化法を用いた、正常時と障害時における胆管３次元ダイナミクス解析」
Takase, H.M.,＊Itoh, T., Ino, S., Wang, T., Koji, T., Akira, S., Takikawa, Y., Miyajima, A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. **Genes Dev.**, 27: 169-181, 2013.
＊Itoh, T., Takase, H., Tanaka, M., Miyajima, A. Liver stem cells. **Regenerative Medicine: From Protocol to Patient**, 2nd edition, in press.
浅岡 洋一 (11)「器官サイズ制御シグナルによる神経管・血管系上皮組織の３次元構築機構の解明」
Asaoka, Y., Terai, S., Sakaida, I., ＊Nishina, H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. **Disease Models & Mechanisms.** in press, 2013.
鈴木 聡 (7)「上皮管腔組織形成におけるＭｏｂ１の役割とその破綻」
Nishio, M., Hamada, K., Kawahara, K., Sasaki, M., Noguchi, F., Chiba, S., Mizuno, K., Suzuki, SO., Dong, Y., Tokuda, M., Morikawa, T., Hikasa, H., Eggenschwiler, J., Yabuta, N., Nojima, H., Nakagawa, K., Hata, Y., Nishina, H., Mimori, K., Mori, M., Sasaki, T., Mak, TW., Nakano, T., Itami, S., ＊Suzuki, A. Cancer susceptibility and embryonic lethality in *Mob1a/1b* double-mutant mice. **J. Clin. Invest.** 122(12): 4505-18, 2012.
＊Suzuki, A., Kogo, R., Kawahara, K., Sasaki, M., Nishio, M., Maehama, T., Sasaki, T., Mimori, K., Mori, M. A new PICTure of the nucleolar stress. **Cancer Sci.** 103(4): 632-637, 2012.
西中村 隆一 (2)「細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明」
Sakaguchi, M., Sharmin, S., Taguchi, A., Ohmori, T., Fujimura, S., Abe, T., Kiyonari, H., Komatsu, Y., Mishina, Y., Asashima, M., Araki, E., ＊ Nishinakamura, R. The phosphatase Dullard negatively regulates BMP signalling and is essential for nephron maintenance after birth. **Nat. Commun.** 4: 1398, 2013.
Terabayashi, T., Sakaguchi, M., Shinmyozu, K., Ohshima, T., Johjima, A., Ogura, T., Miki, H., ＊Nishinakamura, R. Phosphorylation of Kif26b promotes its polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation during kidney development. **PLoS One** 7(6):e39714, 2012.
谷口 喜一郎 (3)「非再生系成体組織における異常細胞の検出・排除システム」
Nakamura, M., Matsumoto, K., Iwamoto, Y., Muguruma, T., Nakazawa, N., Hatori, R., Taniguchi, K., Maeda, R., ＊Matsuno, K. Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of pebble, encoding a RhoGEF, in Drosophila embryos. **Mech. Dev.** in press, 2013.
佐藤 俊朗 (8)「大腸上皮の癌化に伴う管腔形成異常メカニズムの解明」
＊Sato, T., ＊Clevers, H. Growing self-organizing Mini-Guts from a single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. **Science** in press, 2013.
Huch, M., Dorrell, C., Boj, SF., van Es, JH., Li, VSW., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, MJ., Haft, A., Vries, R., Grompe, M., ＊Clevers, H. *In vitro* expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. **Nature** in press 2013.
＊van Es, JH., ＊Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, AN., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., Martens, AC., Barker, N., van Oudenaarden, A., Clevers, H. Dll1(+) secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. **Nat Cell Biol.** 14:1099-104, 2012.
清川 悦子 (2)「類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング」
Yag,i S., Matsuda, M., ＊Kiyokawa, E . Chimaerin suppresses Rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. **PLOS One** in press, 2013.

ホームページ
領域ホームページ　http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/tubulology/index.html
本ホームページに班員の研究成果や業績を掲載すると主に、各班員のホームページにリンクされている。

主催シンポジウム（全９件）
企画　鈴木(淳)；発表　鈴木（淳）　第 35 回日本分子生物学会年会「転写因子による細胞運命の直接転換」2012 年 12 月 13 日

企画　鈴木（淳）；発表　鈴木（淳）　第33回日本炎症・再生医学会（International Symposium）「iPS cells and regulation of stem cells function」2012年7月5日
企画　大野、菊池；　発表　菊池、佐邊　第34回日本分子生物学会年会「Plasticity of cell polarity and the signaling pathways driving its transition」2011年12月15日
企画　菊池、佐邊；発表　菊池　第85回日本生化学会大会「Tissue Morphogenesis by Co-operative Regulation of Cellular Proliferation and Migration and Diseases Due to its Breakdown」2012年12月15日
企画　鈴木(聡)；発表　鈴木(聡)　第35回日本分子生物学会大会「腫瘍抑制シグナルの新局面」2012年12月12日

国際学会招待講演（全17件）
Atsushi Suzuki　ISSCR-Roddenberry International Symposium on Cellular Reprogramming　「Directed cell fate reprogramming of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells」　2012年10月25日、San Francisco, CA
Shigeo Ohno　International Symposium on Molecular Cell Dynamics: Cell and tissue polarity　「The regulators and the effectors of the aPKC-PAR」　2012年5月31-6月2日　Münster, Germany.
Akira Kikuchi　The EMBO Conference　「Formation of epithelial branched tubules by Wnt and EGF in three-dimensional culture」　2012年6月28日、Egmond aan Zee, Netherlands
Kazumasa Ohashi　International Symposium on Biomedical Engineering Interface「Identification of Rho-GEFs involved in mechano-biological responses of vascular endothelial cells」2013年3月14日、Sendai, Japan

一般向けアウトリーチ活動（全6件）
鈴木（淳）　第10回国際幹細胞学会年次大会記念コラボレーション授業　「細胞運命の直接転換 ～皮膚から肝臓をつくる～」　横浜、横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校、2012年3月24日
鈴木（聡）　市民公開講座　がんはどうしておこるのか？　九大伊都キャンパス　2012年5月13.日
阿部宏之　山形大学工学部公開セミナー「細胞の呼吸を測って医療に貢献する」　米沢市、山形大学工学部　2013年1月26日
浅岡　「東京医科歯科大学難治疾患研究所市民公開講座 ―最先端生命科学講座シリーズ第４回―」演題名：メダカを用いた肝臓疾患研究　東京、2012年11月16日

特許
発明者：渡辺守（WATANABE Mamoru）、中村哲也（NAKAMURA Tetsuya）発明の名称：大腸上皮幹細胞の単離・培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術　国際出願番号：PCT/JP2012/006897 国際出願日：2012/10/26 国際公開日：2013/05/02（公開番号；WO2013/061608）出願人：国立大学法人東京医科歯科大学

９． 今後の研究領域の推進方策（２ページ程度）

今後どのように領域研究を推進していく予定であるか、研究領域の推進方策について記述してください。また、領域研究を推進する上での問題点がある場合は、その問題点と今後の対応策についても記述してください。また、目標達成に向け、不足していると考えているスキルを有する研究者の公募班での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化についても記述してください。

研究領域の推進方策

上皮管腔組織形成には、非極性化上皮細胞集団が間質へ肥厚し伸長と分岐を繰り返した後、極性化して管腔構造を構築する形式（唾液腺や乳腺、膵臓の発生時等）と、極性化上皮細胞が内腔を有したまま伸長し分岐する形式（尿管や気管支、総胆管の発生時等）が存在すると考えられる（図６）。本領域の目的として、この二種類の上皮管腔形成における共通の分子基盤を解明するとともに、その相違を明らかにすることを掲げている。このために、唾液腺型と腎尿管型の両方の系で、ライン化された細胞で再現性よく高効率で管腔形成を誘導できるモデル系をさらに開発する必要がある。

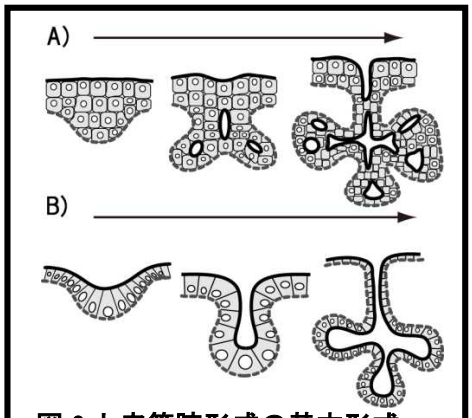

図 6.上皮管腔形成の基本形式
A）非極性化細胞からの管腔形成
B）極性化細胞からの管腔形成

菊池は、唾液腺と尿管、気管支の上皮組織のみでオルガノイド培養を行い、少なくとも前２者は因子 X の発現が管腔形成に関与することを見出している。また、Wnt/β-カテニンシグナル経路を活性化すると、尿管は伸長分岐するが、唾液腺は成長が抑制され、唾液腺と尿管には管腔形成の際に共通な機構と異なる機構が存在すると考えられる。これらの結果を、大野の乳腺の培養や、伊藤・紙谷の胆管培養の実験系に応用することが、目標達成に繋がると期待される。大野が見出している KIBRA や松本の LRRK1、吉村の EHBP1L1 等の上皮細胞の極性化や極性輸送に関与する分子を領域内の研究者が確立しているオルガノイド培養系に導入することによっても、新たな知見を得ることが可能である。さらに、培養系で得られた知見に基づいて、大谷がエコーガイド *exo utero* 注入法により、*in vivo* でも実証実験を行うことにより、分子から個体までを領域内の共同研究によりシームレスにつなぐことができる。

異なる研究分野や異なる研究手法を融合することにより、領域の推進を図ることは領域発足時から目指していたことである。この２年間に、各研究班で領域の目的に沿った結果が出始めているので、これからも連携する体制を強化する必要がある。上皮管腔形成の様々なレベルのモデル系と共に様々なイメージング技術を有する研究者が参加した領域であることから、これらの技術交流を盛んに行うことで各研究者が対象とする生体分子の機能解析に新たな展開を生み出すことを促進する。このために、領域内でのメーリングリストや領域会議での成果報告会をさらに活用することにより、各研究者が所有している情報、技術や研究資材（プラスミド、細胞株、遺伝子改変マウスなど）を共有できると考えている。

領域研究を推進する上での問題点と対応策

総括班の活動について

本領域のこれまでの研究成果を総括するとともに、最終目標である「管腔生物学」の創設に向けた具体的な取り組みが必要と考えられる。このために、第１回国際会議（平成 25 年 6 月 22 日、23 日開催）において、明確な目的意識にもとづくより活発な議論を行った。また、本領域内の計画研究代表者、公募研究代表者による学会でのシンポジウム・ワークショップをより積極的に企画・実施する。

将来の管腔生物学を担う若手研究者の育成のために、現在も行っている本領域内の若手研究者間の連携をさらに強化した上で、若手研究者の立案によるワークショップや研究会を開催するなど、実体験を積む機会をより積極的に提供する。これまでに開催された２回の技術講習会は大変有用であったので、今後さ

らに活発かつ発展的な技術・方法論の共有化を目指す。すでに技術習得支援ツール（比較動画ソフト）を総括班費用で購入しているので、本機材を用いて領域内で技術を共有するとともに、領域外にも公開できる技術を各計画研究から提案し、標準動画の撮影とそれに基づくマニュアルを作成する。また、今後の予定として、公募研究代表者をはじめとする若手研究者の発案による技術講習会（例：オルガノイド培養法、iPS 細胞の作製法や利用法など）や勉強会（例：数理的アプローチなど）等を開催するとともに、本領域と質量分析総合センター（神戸大学）との共催で、「メタボローム研究」についての講習会を開催する。

本領域をより発展させる上で、本領域に関連する他の研究分野のノウハウや情報を積極的に取り入れることが必要と思われるので、関連する他の新学術領域研究との交流の機会を積極的に持つようにする。

不足していると考えているスキルを有する研究者の公募班での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化

In vitro での細胞株やオルガノイド培養を行う研究者は多く存在するので、動物（特にほ乳類）を使った生体内での解析を得意とする研究者を平成 26 年度からの公募班に積極的に加える。上皮組織の形態形成におけるメカノシグナルの重要性が注目されているので、細胞内平面極性や Hippo 経路とメカノシグナルの関連を研究する研究者を公募班として加えていくことが望ましいと考えている。

また、本新学術領域の国際会議で招聘した Marius Sudol 教授は、YAP KO マウスにおいて尿管の内腔の閉塞を見出しており、本研究グループの体制に興味を持ち、今後 YAP と管腔形成の関連ついて連携できる素地が整った。

数理生物学的アプローチによる研究や再生医療や創薬に向けた研究がまだ十分ではないので、数理生物学的解析やモデル化・シミュレーションに秀でた研究者、及び癌や炎症（気管・肺や腸上皮炎症など）についての創薬研究者や再生医療研究者との共同研究を行う。

10.　組織変更等の大幅な計画変更がある場合は当該計画（研究代表者の変更は真にやむを得ない場合に限る）（２～５ページ程度）【非公開】※本欄に記載の計画研究については、全て 3 年度目の審査の対象となります。

領域内の計画研究の研究代表者の交替や組織体制に大幅な変更がある場合（新しく計画研究を追加する場合や既存の計画研究を廃止する場合、領域全体の交付予定額の範囲内で各計画研究の研究経費を変更する場合（計画研究に係る経費を減額し、公募研究に係る経費を増額する場合等））には必ず記入してください。その際、以下の点を含めてください。

・計画研究を追加する場合は、追加の必要性、その計画研究が領域内で果たす役割、他の計画研究への影響等
・計画研究を廃止する場合は、廃止の理由、当該計画研究を廃止しても領域として支障がないことの説明等
・研究代表者の交替の場合は、交替の必要性、新旧の研究組織の異なる点（組織構成、領域内で果たす役割等）、新たに研究代表者になろうとする者が、旧研究代表者に替わって研究を実施できることの根拠、妥当性及びその者の研究業績等
・計画研究に係る経費と公募研究に係る経費の額の変更については、その必要性、1 回目の公募研究の応募・採択状況等（公募研究に係る経費を減額して計画研究に係る経費を増額する変更は真にやむを得ない場合に限る。また、公募研究の規模に係る最低基準を下回らないこと。）
・以上の各変更に伴う他の計画研究の研究経費の変更及びその妥当性等

該当なし