

研究領域名

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

研究期間

平成23年度～平成27年度

領域代表者

菊池 章（大阪大学・大学院医学系研究科・教授）

研究領域の概要

上皮管腔組織は、多細胞生物における多くの器官そのものであり、生体の生理と病理の根幹をなす。生命科学の諸分野の発展により、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の根底には、組織幹細胞や前駆細胞の自己複製と分化、細胞の極性化と脱極性化、管腔構造の形成と維持などの事象が複層的に潜んでいることが明らかになっている。これらの事象は各々異なった研究者グループによりこれまで研究されてきたが、本研究領域では我が国においてこれらの研究を先導してきた研究者が連携して、極性シグナルにより制御される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を目指す。上皮管腔組織形成を基軸とし連携研究を行うことは、生命科学の諸分野への大きな展開を通じて我が国の学術研究の強化に繋がる。

領域代表者からの報告

1. 研究領域の目的及び意義

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、

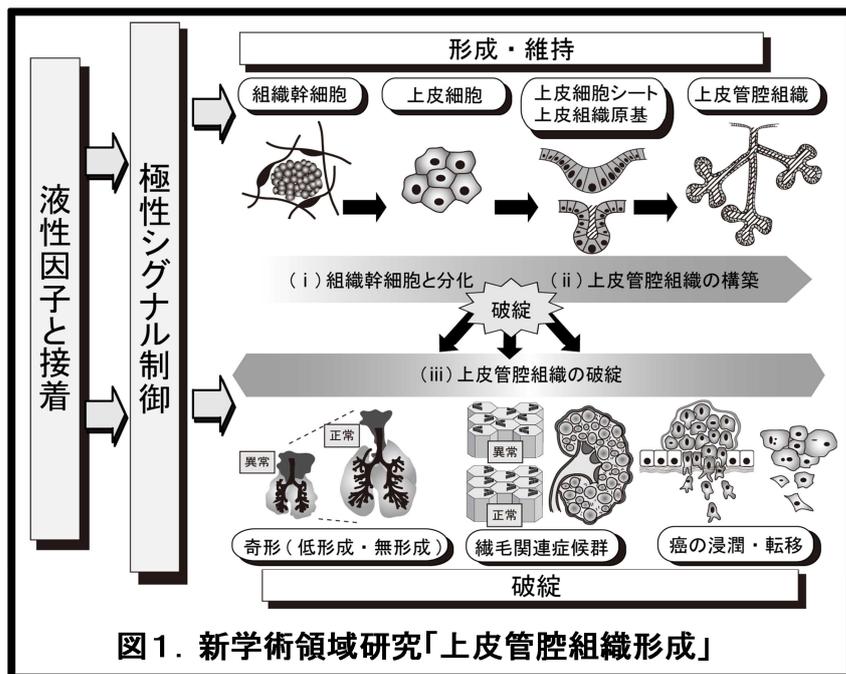


図1. 新学術領域研究「上皮管腔組織形成」

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。

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、悪性腫瘍の発生源の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。

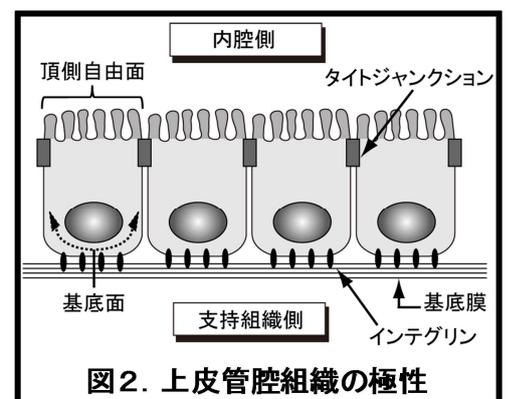


図2. 上皮管腔組織の極性

管腔を形成するという個体において、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。

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. 研究の進展状況及び成果の概要

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 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 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端側の細胞で認められ、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与す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、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 $\beta 1$ 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

菊池一大谷、南一大谷の共同研究は、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

菊池一大橋の共同研究は、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**加藤一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源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 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。

審査部会における所見

A (研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる)

1. 総合所見

本研究領域は、上皮細胞が3次元的に管腔構造を形成する過程及び維持機構の解明とその破綻による疾患の理解を深めることを目指すものである。「上皮管腔」というキーワードにより実績のある研究者が集結し、幹細胞誘導系の開発を世界に先駆け成功させるなど、研究は順調に進展している。領域内の連携も良好で、今後も成果が見込まれる。また、管腔組織の形成に結びつく分子（遺伝子）レベルの解明など新たな展開によるがん研究や発生・再生研究分野への波及効果も期待される。今後、公募研究で補うことにより、シミュレーションモデル分野の研究者の参画あるいはモデル生物による研究をさらに強化することが出来れば、本研究領域のさらなる飛躍が期待される。なお、管腔形成、上皮化、細胞極性という既存の概念の組合せからどのような新しい概念が生み出されるのか明確にする必要がある。

2. 評価に当たっての着目点ごとの所見

(a) 研究の進展状況

本研究領域内での異分野連携による共同研究から、上皮管腔組織の極性に焦点を当てた形態形成に関わる新知見が得られるなど着実に研究が進展している。また、共同研究により上皮管腔組織の形成過程の解析に関わる方法など新しい技術が開発されつつあり、他の研究領域への波及効果も期待される。さらに、本研究領域で明らかになってきた様々な研究成果は、がん研究分野、組織形成機構研究あるいは炎症領域へも大きな波及効果をもたらすと期待できる。今後、新分野への発展も視野に、領域内の複数の研究を結ぶ共通性を見出すための分子レベルでの解明が望まれる。

(b) 研究成果

本研究領域の目標に沿った共同研究が順調に進展しており、その中から新規アクチン蛍光プローブの開発など新たな手法の開発も進み、成果が生まれている。また、領域内の異分野の研究者間の交流から新たな方向性も見出されている。上皮組織を研究対象とした本研究領域では、特にがん研究や発生・再生研究分野において成果がみられ、また、腸管炎症を促進する新たなシグナル伝達経路の可能性が示されたことは、免疫・炎症領域への波及効果も期待される。一方で、上皮管腔を形成するための共通原理と個々の臓器特異的原理については未だ不明であり、今後の課題である。

(c) 研究組織

「上皮管腔」というキーワードにより個々の臓器の研究において実績のある研究者が集結し、領域内の共同研究が活発に行われている点は評価できる。今後、シミュレーションモデル分野の研究者の参画やモデル生物の利用の検討も望まれる。

(d) 研究費の使用

特に問題点はなかった。

(e) 今後の研究領域の推進方策

この分野の専門家が集結しており、領域内の連携による相乗効果は高く評価でき、引き続き推進することが期待される。今後は、シミュレーションモデルやモデル生物の専門家の参画を図り、上皮管腔形成の共通原理の解明などにより、本研究領域をより発展させることが望まれる。

(f) 各計画研究の継続に係る審査の必要性・経費の適切性

いずれの計画研究も順調に進行しており、経費も必要かつ妥当と思われ、継続に係る審査の必要はない。