

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01353

研究課題名(和文) 微絨毛形成を介する細胞の力学刺激応答と組織形成における役割の解明

研究課題名(英文) The mechano-response triggering microvilli formation and its roles in tissue formation

研究代表者

三浦 重徳 (MIURA, Shigenori)

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：70511244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト胎盤バリアを模倣した生体機能チップを用いて、胎盤絨毛上皮細胞は流体せん断力に反応してカルシウムイオンチャンネルTRPV6を活性化し、微絨毛を伸長することをこれまでに報告した。本研究では、胎盤絨毛上皮細胞以外にも、同様の力学刺激応答能を有する間葉系細胞が存在することを新たに見出した。また、ゲノム編集技術を用いてTRPV6にストップコドンを導入した変異体マウスを作製し、小腸をはじめとする生体組織において微絨毛形態とTRPV6との関連性について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微絨毛は小腸や腎臓、胎盤などの上皮細胞以外にも様々な細胞で発達しており、多様な細胞・組織機能の発現に関与している。本研究を通じて、胎盤絨毛上皮細胞以外にも、周囲の力学刺激に反応して微絨毛を伸長し、細胞機能を制御している可能性がある細胞種を特定することができた。これらの細胞における力学刺激受容機構を更に詳細に理解し、それらを制御することによって組織の再生や機能改善を促進する治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Using microfluidic device mimicking human placental barrier structure, we have previously reported that fluid shear stress (FSS) induced microvilli formation via the activation of transient receptor potential, vanilloid family type-6 (TRPV6) calcium ion channel in human placental trophoblastic cells. Here we found that certain type of mesenchymal cells also exhibited the similar mechanobiological responses observed in the placental trophoblastic cells. Furthermore, we established the mutant TRPV6 mouse lines harboring stop codon mutation in the coding sequence. Histological or ultrastructural analyses of TRPV6-expressing tissues will provide us with useful information to know the mechanobiological roles of TRPV6 in tissue formation and maintenance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：生体機能チップ 微絨毛 TRPV6 メカノバイオロジー マイクロ流路 胎盤 organ-on-chip

1. 研究開始当初の背景

近年、組織形成における力学刺激の役割が注目され、力学刺激に対する細胞応答やシグナル伝達機構の解明が盛んに進められている。なかでも、流体環境に直に接する上皮組織や伸展・圧縮などの機械刺激に恒常的に晒されている運動器においては、力学刺激が細胞機能の発現や組織形成において担う役割は大きいと考えられる。最近、Piezo, P2X4, TRPV2, TRPV4 など機械刺激やそれに応じて放出されるリガンドによって活性化するイオンチャネルが次々に同定され、ノックアウトマウスを用いた解析によってこれらメカノセンサの生理的な役割が明らかになってきた。例えば、血管内皮細胞の流体せん断力 (Fluid Shear Stress: FSS) センサとして知られる Piezo1 のノックアウトマウスでは、血管網のパターンが変化することが報告 (Li *et al*, Nature, 515: 279-282, 2014) され、組織形成と力学刺激の密接な繋がりが実証されている。

我々は、先行研究において、マイクロ流体デバイスを用いてヒト血液-胎盤関門 (ヒト胎盤バリア) の *in vitro* 再構築に取り組み、胎盤バリアに存在する微細構造の再構築には流体せん断力に対する細胞の力学刺激応答が必要であることを明らかにした。具体的には、マイクロ流路内に構築したヒト胎盤バリア様構造に FSS を負荷すると、胎盤絨毛上皮細胞 (BeWo 細胞) において上皮バリア特有の微絨毛の形成が顕著に誘導されることを見出した (図1)。また、微絨毛形成にともなって、グルコース輸送体タンパク質 GLUT1 が apical 膜に局在し、その輸送量が有意に増加することも明らかにした。これらの現象にはカルシウムイオンチャネル TRPV6 (transient receptor potential, vanilloid type VI) とその下流の細胞内シグナル伝達因子 Akt および Ezrin が FSS により活性化されることが重要であった (Miura *et al*, Nature Communications, 9871, 2015) (図2)。

微絨毛は、小腸絨毛上皮細胞に見られる刷子縁 (brush border) のように、細胞外からの栄養因子の取り込みを促進することが知られているが、吸収以外にも細胞接着や分泌、細胞外環境のセンシングなど様々な組織において重要な役割を担っている。実際に、微絨毛は胎盤や小腸の絨毛上皮細胞をはじめとして、近位尿細管上皮細胞、嗅細胞、軟骨細胞、骨細胞などのように機械刺激に晒される種々の上皮および間葉系細胞で発達している。しかしながら、胎盤絨毛上皮細胞において見られるような FSS による微絨毛誘導現象が、他の上皮細胞または間葉系細胞においても共通してみられる現象であるのかは不明である。また、TRPV6 ノックアウトマウスは、小腸絨毛における吸収機能の低下だけでなく、破骨細胞の分化異常や関節軟骨の機能不全など力学的に大きな負荷を受ける運動器においても異常を呈し、骨粗しょう症や関節炎を発症することが近年報告されている。以上のような研究背景から、我々は、特定の細胞種においては、TRPV6 を介して周囲の生体力学場を感知して微絨毛を形成し、それによって細胞機能を制御する「動的な微絨毛形成機構」が存在し、組織形成や組織機能の発現・維持においても重要な役割を担っているのではないかと考え、本研究課題を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の通りである。

- 1) 胎盤絨毛上皮細胞に加え、種々の上皮・間葉系培養細胞に FSS または伸展・圧縮などの機械刺激を負荷し微絨毛形成が誘導される細胞種を探索することで、力学刺激に対して微絨毛形成能をもつ細胞の特徴を明らかにする。
- 2) 力学刺激による微絨毛形成が認められた細胞種において TRPV6 や既報のメカノセ

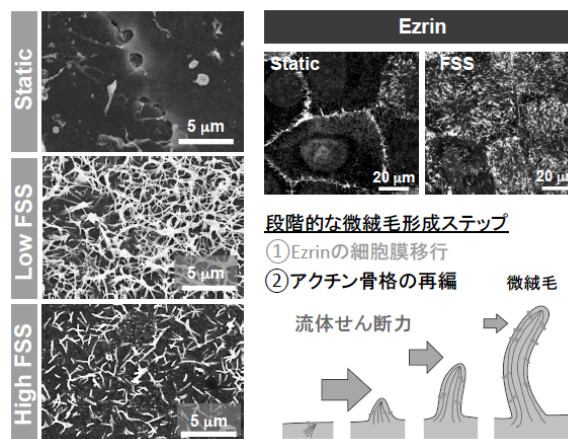


図1 流体せん断力 (FSS) による微絨毛形成の様子。胎盤上皮バリア細胞を流れ環境下で培養すると、微絨毛が誘起されるとともに、流体せん断力の強さに応じて微絨毛の長さが変化する。微絨毛形成は、流体せん断力負荷後 1 時間以内に認められる微絨毛形成因子 Ezrin の細胞膜への移行とアクチン細胞骨格の再編により進行する。

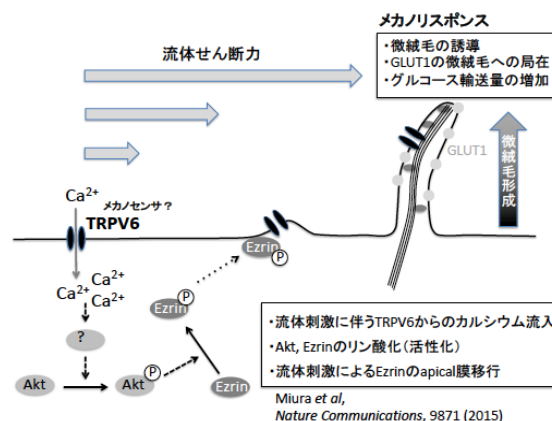


図2 胎盤上皮バリア細胞における流体せん断力誘導性微絨毛形成の概要。流体せん断力を負荷すると、TRPV6 を介して  $Ca^{2+}$  が流入し、細胞内シグナル伝達因子 Akt がリン酸化される。活性化された Akt はさらに微絨毛関連因子 Ezrin のリン酸化と細胞膜への移行を誘導し、微絨毛の形成が開始する。それに伴い、グルコーストランスポーター GLUT1 などの膜輸送体タンパク質も微絨毛へと局在し、バリアの物質輸送能が変化する。

ンサ分子の発現を解析し、それらと微絨毛形成との関連性を分子レベルで明らかにする。

- TRPV6 ノックアウトマウスを作成し、微絨毛が発達している胎盤や小腸、軟骨、骨組織などの組織学的解析および微絨毛形態の電子顕微鏡解析を行い、TRPV6 を介した力学刺激応答と組織形成との関連性を検証する。

以上により、微絨毛を介した力学刺激の感受・応答機構が、どのような特徴を持つ細胞種および力学場において働き、細胞機能・組織構築においてどのように関与しているのか明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 力学刺激負荷デバイスを用いた培養

各種細胞を力学刺激負荷デバイスに播種し、流体せん断力または伸展刺激を負荷しながら培養を行なった。流体せん断力の負荷に用いたデバイスは、2015 年に我々が開発・報告したマイクロ流体デバイス (図3: デバイス1) のデザインを基本とするが、下部流路は使用せず、上部マイクロ流路を直接ガラス基板結合した単層流路デバイスとした。5  $\mu$ l/ml (0.001-0.1 dyn/cm<sup>2</sup>) にて24時間灌流培養を行なって流体せん断力を負荷した。伸展刺激の負荷には、初年度開発した伸展培養装置を用い、伸展率5または10%で24時間伸展刺激を負荷した。

#### (2) 微絨毛形成の評価

力学刺激を負荷した細胞は、4% PFA/PBS を用いて固定し、微絨毛マーカーの1つである抗 Ezrin 抗体およびファロイジンを用いて F-アクチンを染色した。共焦点レーザー顕微鏡により細胞縦断面 (x-z 面) を観察し、Ezrin および F-アクチンが共局在する領域を微絨毛形成領域として評価した。

#### (3) TRPV6 ノックアウトマウスの作製および解析

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により、TRPV6 のノックアウトマウスを作製し、TRPV6 と微絨毛形成・組織形成との関連性を個体レベルで検証した。TRPV6 は、胎盤、近位尿細管上皮、小腸上皮、関節軟骨などで発現していることが報告されているため、主にこれらの組織サンプルを採取し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析による微絨毛形態の観察、組織形態学的解析、微絨毛関連因子の発現解析などを行った。得られた founder マウスは C57BL/6N と交配し、F1 系統を取得したのち解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 流体せん断力による微絨毛形成能の解析

力学刺激に応答して微絨毛を形成する細胞を探索するため、まず上皮・間葉系細胞を各種収集した。腎上皮、腸管上皮、乳線・前立腺上皮、肺胞上皮など上皮系細胞8種、間葉系細胞は、ラットより採取した骨、軟骨、椎間板、腱細胞等を含め計12種を収集した。これらを流体せん断力負荷デバイスに播種し、5  $\mu$ l/ml (0.001-0.1 dyn/cm<sup>2</sup>) にて24時間灌流培養を行った。その後、抗 Ezrin 抗体およびファロイジンを用いて細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、肋軟骨より採取したラット初代軟骨細胞は、灌流培養後、細胞表面に微絨毛と思われる微小な突起構造が多く認められた。一方、ヒト近位尿細管上皮細胞は、TRPV6 を発現し刷子縁と呼ばれる微絨毛を有するが、今回検討した流体せん断力の範囲内においては微絨毛の伸長は認められなかった。総じて、多くの細胞は、流体せん断力に対して細胞骨格の再編、細胞の厚み変化などの応答を示したが、微絨毛形成が誘導された細胞は極めて限定的であった。

#### (2) 伸展刺激負荷デバイスの開発

3D プリンタで作製したクランク機構とステッピングモーター、およびシリコンゴムからなる培養基板を組み合わせることで、細胞への伸展刺激が可能なデバイスを開発した。本デバイスでは、モーターのマイコン制御ならびにクランク機構のアーム長変更により、伸展刺激の頻度と伸展量を容易に変更できるようにした (図3: デバイス2)。

#### (3) TRPV6 ノックアウトマウスの作製および解析

生体内における微絨毛形成と TRPV6 との関連性を評価するために、CRISPR/Cas9 を用いた TRPV6 ノックアウトマウスの作製に取り組んだ。哺乳類では稀であるが、TRPV6 は配

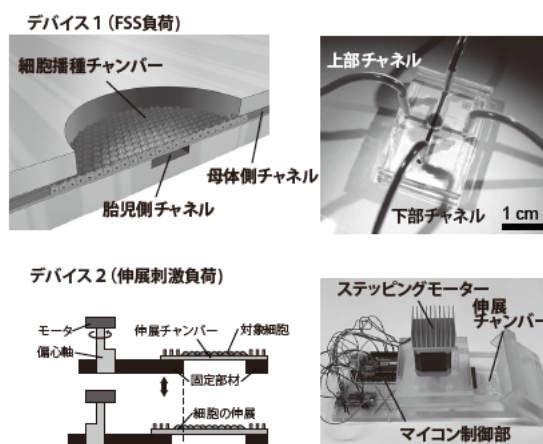


図3 力学刺激負荷デバイス

列上アノテーションされる翻訳開始コドン AUG (+1) よりも 120 塩基上流の non-AUG 配列 (ACG) から翻訳されることが知られており (Fecher-Trost *et al*, JBC, 288:16629-16644, 2013)、データベース上も non-AUG 配列 (ACG) が翻訳開始点として登録されている。そこで、ACG 翻訳開始点 (-120) のすぐ下流に存在する 2 つの CRISPR/Cas9 ターゲット配列を選定し、それぞれインジェクションを実施した。その結果、ACG 翻訳開始点 (-120) 直後にストップコドンが挿入された F1 マウス系統合計 9 系統を取得した。このうち 2 系統についてホモ接合体マウスを取得し、TRPV6 タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより解析したが、予想に反していずれの系統においても野生型 TRPV6 の発現が明瞭に検出され、既知の表現型も認められなかった。この原因として、データベース記載の翻訳開始点 (-120) だけでなく、canonical な AUG 翻訳開始点 (+1) も同時に機能している、または補完的に働いていると推察された。そこで、+110 付近にある CRISPR/Cas9 ターゲット配列を選定してインジェクションを再度実施した。その結果、TRPV6 の機能ドメインを欠失するような indel 変異が導入されたマウスを 3 系統取得し、そのうち 1 系統について交配によりホモ接合体を得た。生後 2 週齢のホモ接合体および野生型マウス胎仔より、膝関節、小腸、腎臓などの組織サンプルを採取した。小腸サンプルについては SEM による電顕観察を行ったが、小腸絨毛および微絨毛の形態に顕著な異常は認められなかった。引き続き、他の組織についても SEM による微絨毛形態の解析を行い、TRPV6 と微絨毛との関連性を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① 三浦重徳, 佐藤幸治, 根岸みどり, 手島哲彦, 竹内昌治: マイクロ流体システムを用いたヒト胎盤バリアモデルの構築. シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来 (2018. 1. 19 つくば)
- ② 三浦重徳, 佐藤幸治, 根岸みどり, 手島哲彦, 竹内昌治: 流体せん断力によるヒト胎盤バリア極性構造の形成. 第 16 回日本再生医療学会 (2017. 3. 7-9 仙台)
- ③ 三浦重徳, 佐藤幸治, 根岸みどり, 手島哲彦, 竹内昌治: 微絨毛形成を伴う細胞の力学刺激応答とその分子メカニズム. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016. 11. 30-12. 2 横浜)
- ④ 三浦重徳, 佐藤幸治, 根岸みどり, 手島哲彦, 竹内昌治: マイクロ流体システムを用いたヒト胎盤バリア極性構造の再構築. 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 33 回研究会 (2016. 4. 25-26 東京)

[図書] (計 1 件)

三浦重徳, 竹内昌治: 流体せん断力はカルシウムイオンチャネル TRPV6 の活性化を介して微絨毛形成を誘導する. 実験医学/羊土社 Vol. 34 No. 8 (5月号) カレントトピックス p. 1293-1296 (2016)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 森本 雄矢

ローマ字氏名: (MORIMOTO, Yuya)

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 生産技術研究所

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 60739233

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名: 根岸 みどり

ローマ字氏名: (NEGISHI, Midori)

所属研究機関名: 武蔵野大学

部局名: 薬学研究所

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 30300750

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：滝本 晶

ローマ字氏名：(TAKIMOTO, Aki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。