

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19570054
 研究課題名（和文） 上皮組織の分枝形態形成能の活性化法に関する研究
 研究課題名（英文） Promotion of branching activity of epithelial tissues

研究代表者
 野川 宏幸（NOGAWA HIROYUKI）
 千葉大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号：40143250

研究成果の概要（和文）：

分枝形態形成は哺乳類動物の内臓諸器官の発生過程で共通に見られる基本的な形態形成パターンである。本研究では、マウス胚の唾液腺において、FGF 刺激により EGF 関連の受容体の発現が上皮に誘導され、そこに EGF が作用すると、上皮に分枝が誘導されることを明らかにした。また、エレクトロポレーション法により、これまで困難であった肺上皮組織への遺伝子導入にも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Branching is one of fundamental patterns of morphogenesis in developing organs of mammals. In the present study we revealed that the EGF family ligand-receptor system of embryonic mouse salivary glands becomes primed by the FGF ligand-receptor system to play an important role in the induction of branching morphogenesis. We also succeeded in introducing expression vectors into embryonic mouse lung epithelial tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：マウス胚／唾液腺／肺／分枝形態形成／成長因子

1. 研究開始当初の背景

分枝形態形成は哺乳類動物の内臓器官の発生過程で広く見られる形態形成パターン

であり、実際、唾液腺、肺、脾臓、腎臓、乳腺、前立腺などの多くの器官に認められる。これらの器官は、器官形成時に細胞分

化と同時に分枝形態形成をおこなうことによって、分泌・吸収などのその機能を発揮するために効率の良い構造を形づくっていく。この分枝形態形成のメカニズムの問題は動物形態構造学・発生生物学の重要課題の1つであり、その研究成果は基礎科学の基盤となることは言うまでもないが、応用面でも、分枝器官を再生させる方法を探索する際の基礎データを提供することで、今日急速に進展している再生医療に貢献できることが予想される。我々はこれまでにマウス胚の唾液腺と肺の原基を実験材料に用いて、上皮のみで、すなわち支持組織である間充織を除いた状態で、上皮を3次元的に分枝させる培養法を世界に先駆けて開発した (Nogawa & Takahashi, 1991; Nogawa & Ito, 1995)。この上皮単独培養の実験系は、培養液に加えた成長因子などの影響を容易に評価することができるという利点を備えている。その結果、上皮に分枝を誘導するシグナル分子は唾液腺の場合は Epidermal Growth Factor (EGF) ファミリーの分子、肺の場合は Fibroblast Growth Factor (FGF) ファミリーの分子であることを明らかにした。また、EGFと協調的に働く血清因子がリゾリン脂質のLPAであることも明らかにした (Noguchi et al., 2006)。これまでの我々の研究から、唾液腺上皮の分枝を誘導するシグナル分子の全容がほぼ明らかとなったと当初は思われたが、FGF10ノックアウトマウスでは唾液腺が形成されないなど、唾液腺でも肺と同様にFGFが分枝に関与することを示す報告が別な研究グループからいくつかなされた。EGFとFGFは共に下流でRTKシグナル経路を活性化するので、両方が同じ機能を共有している可能性も考えられるが、お互いに相補的なのか、役割分担があるのかは明らかにする必要がある課題と考えられる。

成長因子を受容した上皮細胞集団が分枝形態形成に至る過程を何段階かに分けると、次のようになる。「成長因子シグナルが上皮の受容体に結合」→「受容体の下流のシグナル経路の活性化・不活性化」→「分枝を支配している転写調節因子の発現」→「細胞骨格系タンパクや細胞外基質タンパクの発現の変化」→「上皮細胞が変形して分枝形態形成が起きる」。この過程を解明するための長期的な戦略を考えると、上皮での自己分泌型シグナル分子や転写調節因子の働きを人為的に抑制あるいは促進する技術の開発が急務である。抑制する方法については、ノックアウトマウスの作製や siRNA を利用することにより可能で、既に多くの研究室で実施されてきている。一方、促進する方法としては、目的の分子の遺伝子を細

胞内に導入する方法が考えられるが、分枝器官での成功例は少なく、この方法の確立が急務であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 唾液腺の分枝形態形成におけるEGFとFGFの役割

これまでの我々の研究から、EGFは唾液腺上皮に分枝を誘導し、FGFは伸長を誘導するという結果を得ている (Morita & Nogawa, 1999)。FGF10ノックアウトマウスで唾液腺が形成されないことと、上記のこととの矛盾のない説明として、原基形成初期の上皮組織の伸長にはFGF10が必須であり、その後の分枝はEGFによって誘導されることが考えられる。この仮説を実験的に証明し、直接的に分枝を誘導している因子はEGFであることを明らかにする。

(2) 遺伝子導入法の確立

シャーレ表面に接着して増殖しているような培養細胞の場合、リポフェクション法により比較的容易に目的に遺伝子を導入することが可能である。しかし、インビボの状態に近い上皮組織の場合、リポフェクション法は有効でないことが確かめられている。肺に関して、ウイルスを使ったトランスフェクション法による遺伝子導入実績が1例報億されているが、その後普及していないことから、この方法も欠点をかかえているものと思われる。文献を検索したところ、エレクトロポレーション法によるインビボの組織への遺伝子導入の成功例が数多く報告されているので、この方法を試みることにした。まずは単層上皮からなる肺の上皮組織に適した実験プロトコルを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 上皮単独培養法

12, 13日胚唾液腺原基および12日胚肺原基を単離し、ディスペーゼ処理した後に間充織を除き、上皮だけとした。この上皮をマトリゲルで包み、成長因子を加えた培養液中で培養した。12日胚唾液腺上皮については、途中で培養液中の成長因子を別な成長因子に切り替える操作をおこない、それぞれの成長因子の役割を探った。

(2) RT-PCR法による遺伝子発現調査

12日胚と13日胚の唾液腺原基をディスペーゼ処理した後に上皮と間充織に分け、それぞれについて、EGFリガンド、EGFレセプター、LPAレセプターの発現を半定量的RT-PCRで調査した。また、培養上皮につい

ても、EGFレセプター、LPAレセプターの発現を調査した。

(3) エレクトロポレーション法による遺伝子導入

CMVプロモーターを持つプラスミドの下流にGFP遺伝子を組み込み、これを大腸菌中で増やし、精製し、GFP発現ベクターを得た。ディスペラーゼ処理して単離した肺上皮を、発現ベクターDNA溶液中でエレクトロポレーターにより電気刺激し、ベクターを細胞内に導入した。回収した上皮をマトリゲルで包み、上皮単独培養をおこない、培養2日後に蛍光観察した。

4. 研究成果

(1) 唾液腺上皮の分枝形態形成におけるEGFとFGFの役割

① FGF10によって促進されるEGFに対する反応能

13日胚唾液腺上皮をEGF+LPA添加培地で上皮単独培養すると盛んに分枝し、FGF10添加培地では分枝より伸長が顕著であった(図1)。一方、12日胚唾液腺上皮をEGF+LPA添加培地で上皮単独培養すると、成長も分枝も示さななかったが、FGF10添加培地では伸長が認められた(図1)。

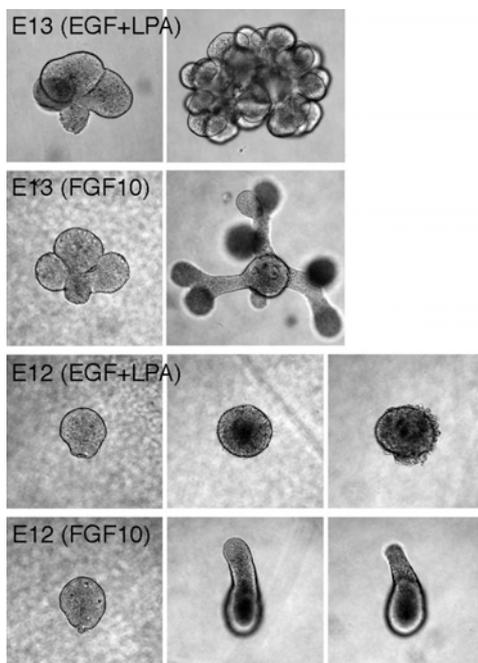


図1 13日胚唾液腺上皮と12日胚唾液腺上皮の間で、EGF+LPAへの反応性に大きな違いが認められる。左から培養0日、1日、2日。

この結果から、12日胚上皮にはEGF+LPAへの反応能はなく、12日と13日の間で反応能を獲得すること、FGF10は分枝を直接的

に誘導しないことが示唆された。FGF10の働きとして、12日胚上皮にEGF+LPAへの反応能を賦与することが考えられるので、これを確かめるべく、12日胚上皮をFGF10添加培地で1日培養した後、EGF+LPA添加培地に交換する培養実験をおこなった。対照実験では、再度FGF10添加培地に交換して、培養した。その結果、FGF10存在下で1日経過した12日胚上皮は正常の13日胚上皮と同様にEGF+LPAに対する反応能を獲得していることが、分枝の観察から支持された(図2)。

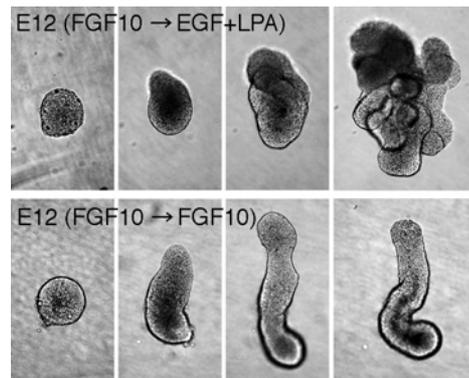


図2 12日胚唾液腺上皮をFGF10添加培地で1日培養した後、EGF+LPAもしくはFGF10添加培地に交換し、さらに2日間培養した。EGF+LPAに反応した分枝が認められる。左から培養0日、1日、2日、3日。

② FGF10によって促進されるEGFレセプター、LPAレセプターの発現

正常唾液腺組織について、EGFレセプター4種、LPAレセプター3種の発現を半定量的RT-PCR法により調査した。その結果、12日胚上皮は13日胚上皮と比較してEGFレセプター1 (*ErbB1*)とLPAレセプター3 (*Lpa3*)の発現が低いことが判明した。また、FGF10添加培地で1日培養した12日胚上皮では、*ErbB1*と*Lpa3*の発現が上昇することも判明した。12日胚上皮がEGF+LPAに反応しないのはそのレセプターの発現が低いことが理由であり、13日胚唾液腺上皮がEGF+LPAに反応するのはFGF10刺激によってその発現が上昇することが理由であると考えられる。

①と②の結果から、FGF10は器官形成に必須であるが、分枝を直接的に誘導しているのではなく、EGFレセプターとLPAレセプターの発現を上昇させることにより、分枝の活性化に関与すると結論づけた。

(2) エレクトロポレーション法による肺上皮組織への遺伝子導入

エレクトロポレーションの条件として、

電気パルスの電圧，長さ，回数 of 3 つの変数がある。過大だと組織は死に，過小だと生きているが導入効率が落ちる。また，DNA溶液の濃度を上げると致死率も下がることがわかった。そこで，DNA溶液濃度を10mg/mlとし，2mmギャップのキュベットを用いて最適条件を探った。その結果，電気パルスの条件が35V，50msec，4回の時に最も高い導入結果が得られた（図3）。

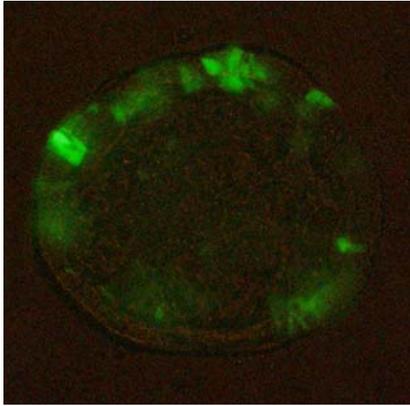


図3 肺上皮に導入されたGFP遺伝子から翻訳されたGFPタンパク質の蛍光像。

現時点での導入効率は，導入された例数で見ると100%となるが，1例あたりの「導入細胞数/全細胞数」の割合は最高で20%程度である。エレクトロポレーション法の場合，プラスミドがマイナス極からプラス極の方向に流れるため，マイナス極に面した側に片寄って導入されるという問題点がある。この点を改善するためには，組織の内腔と外側の両方をDNA溶液で満たして電気パルスをかけるか，極性を反転させながらパルスをかけるなどの改良が必要かもしれない。しかしながら，マイナス極に面していた組織での導入細胞率は約50%なので，この領域に限れば研究を進めていくことは可能である。今後は，自己分泌型シグナル分子や転写調節因子のcDNAを上皮組織に導入し，その影響を検討し，分枝形態形成のメカニズムの解明につなげる予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Nitta M, Kume T, Nogawa H. FGF alters epithelial competence for EGF at the initiation of branching morphogenesis of mouse submandibular gland. *Developmental Dynamics*, Vol. 238, pp. 315-323, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 松野紘子, 野川宏幸. マウス胚気管上皮の発生に伴う分枝形態形成能の低下. 日本動物学会第78回大会, 弘前, 2007.
- ② 新田真理, 久米俊彰, 野川宏幸. マウス胚唾液腺の分枝形態形成におけるEGF/FGFシグナリングの役割. 日本動物学会第78回大会, 弘前, 2007.

6. 研究組織

(1)研究代表者

野川 宏幸 (NOGAWA HIROYUKI)
千葉大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：40143250

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：