

平成22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007年度～2009年度

課題番号：19570062

研究課題名（和文）間充織による上皮の分化決定メカニズムの解析

研究課題名（英文）Mechanisms determining epithelial cell fate decisions by mesenchyme

研究代表者

友岡 康弘 (TOMOOKA YASUHIRO)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授

研究者番号：10197949

研究成果の概要（和文）：器官形成における上皮と間充織の相互作用では、間充織が主導的に上皮の運命を決定する。しかしその決定メカニズムは不明であった。我々は簡便な株細胞（不死化細胞）の樹立法と、その株細胞を用いて上皮の運命決定を再現できる実験系の開発に成功した。そして間充織由来の液性因子Follistatin-like 1が運命決定因子であることを世界に先駆けて初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mesenchyme plays critical roles in “fate-determination of undetermined epithelial cell” during organogenesis. Because of the complexity of tissue interactions in the process, however, little is known about the precise mechanisms. We have established a model for studying the process by establishing epithelial and mesenchymal cell lines, and then identified Follistatin-like 1 as one of the mesenchymal factors determining epithelial cell fate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,000,000	300,000	1,300,000
20年度	800,000	240,000	1,040,000
21年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：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：上皮・間充織相互作用、形態形成、間充織因子、クローン株細胞、p53欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 歴史的背景

シュペーマンは脊索による神経管誘導を“一次誘導”と呼び、引き続き起こる器官形成を“二次誘導”と呼んだ。脊索因子の探索およびその作用メカニズムの解析研究は、近年急速に進展し、その全容が明らかにされつ

つある。一方二次誘導の研究は1950年代から始まり、多くの興味深い現象を明らかにした。その数例を挙げると、① 歯形成：ニワトリ胚の咽頭上皮とマウス胚の臼歯原基間充織を組み合わせると、“ニワトリの歯”を形成する(Kollar & Fisher, 1980)、② 乳腺：マウス胚の乳腺原基上皮と唾液腺原基間充

織を組み合わせると、“乳タンパクを産生する唾液腺構造物”を形成する(Sakakura et al. 1976)、③ 胃腸形成: ニワトリ胚の前胃と砂嚢の原基間で上皮をヘテロに組み合わせると、上皮は原基間充織の指示に従って分化する(Mizuno et al. 1986)、④ 子宮と膈の原基間で上皮をヘテロに組み合わせると、上皮は原基間充織の指示に従って分化する(Cunha, 1976)。同様な現象は他の多くの器官形成においても報告されており、「間充織が上皮細胞の運命決定を行う」ことを明らかにしているが、その間充織由来の上皮運命決定因子(または誘導因子)は未だに明らかにされていない。

(2) 因子探索の障害

我々はなぜ未だに上皮運命決定因子の探索が不成功なのかを検証し、次のように推測した。①発生途上にある細胞・組織は刻々と分化し、産生されている決定因子は捉えにくい。②原基自体が微小で、因子探索は困難である。③候補因子を決定因子と判定する系の確立が困難である。これらが要因となり、探索が困難であると考えられた。

2. 研究の目的

間充織による上皮の運命決定機構には、“一過的・立体的・微視的”といった特徴があり、それが分子レベルの解析を困難とさせている。我々はp53欠損マウスの多種多様な成獣組織から特異性を維持したクローン性(不死化)株細胞を、また発生期の組織からは時期特有の性質(機能未決定・幹細胞・前駆細胞)を維持した株細胞の樹立に成功している。そこで我々は、上皮運命決定誘導に付随する上記問題点を克服するため、形態形成期のp53欠損マウスより上皮・間充織由来の株細胞を樹立し、その株細胞を用いて上皮の運命決定を再現できる実験系の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 株細胞の樹立と特性化

p53欠損マウスの様々な器官より、発生運命が未決定時期より上皮株細胞を、運命決定誘導期より間充織株細胞を樹立する。その後、特異的な中間フィラメントマーカ(上皮: cytokeratin、間充織: vimentin)の発現解析によって、樹立した株細胞の特性化を行った。各器官において時期・領域特異的な遺伝子マーカが存在するものについては、それら遺伝子マーカの発現解析も行った。

(2) 上皮の運命決定誘導系の開発

①雌性生殖器官、舌に由来する株細胞
コラーゲングルを用いた3次元培養を行った。組織学的解析により上皮株細胞の特性化を行った。この方法とは別にカルチャーイン

サートを用いた上皮・間充織の共培養を行った後、RT-PCR解析により上皮株細胞の特性化を行った。さらに上皮株細胞を用いた組織張替え実験を行い、上皮の特性について詳細な解析を行った。

②口腔組織に由来する株細胞

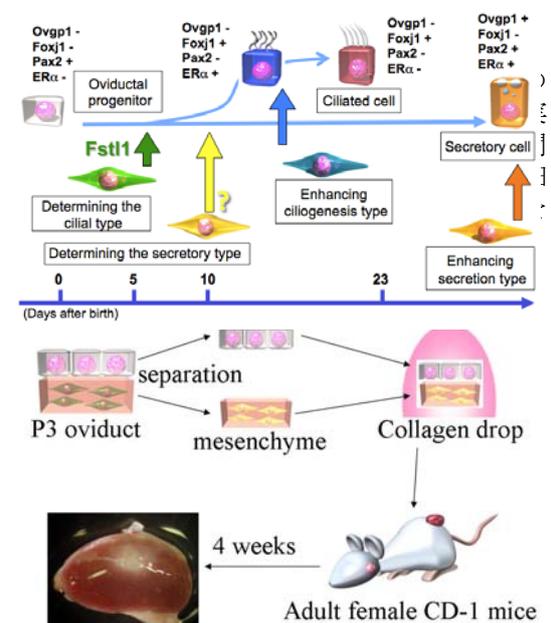
器官培養法(Nakao et al., 2007)に樹立した株細胞を用い、組織学的解析により器官形成の進行について検証した。

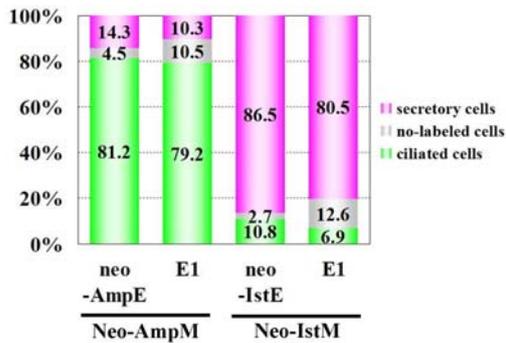
(3) 運命決定因子の探索と同定

非接触型共培養によって、卵管上皮の運命決定誘導が確認されたこと、運命決定因子が液性因子と推測された。そこで運命決定能をもつ間充織株細胞を対象にシグナルシークエンストラップ法を用いて、運命決定因子の探索・同定を行った。

4. 研究成果

(1) p53欠損マウス卵管由来の上皮・間充織細胞株の共培養実験から、運命未決定型上皮細胞株を卵管繊毛型上皮細胞へと運命決定誘導能をもつ間充織細胞株を選別した。さらにシグナルシークエンストラップ法を用いて、その運命決定誘導に関与する間充織由来分泌性因子Follistatin-like 1(Fstl-1)を単離した(Umezu et al., 2010)。





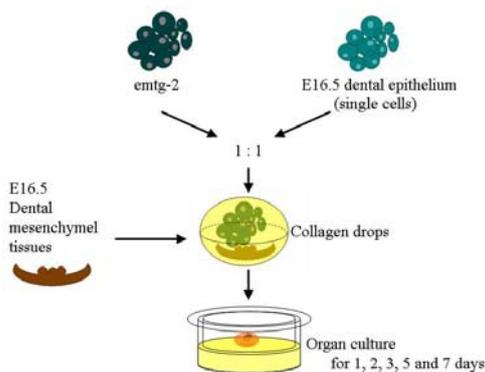
(3) p53欠損マウス臍由来の上皮・間充織細胞株の共培養実験から、臍上皮の多層化誘導能を有する、および有しない間充織細胞株を選別した。マイクロアレイ解析により、臍多層化誘導に關与する遺伝子の網羅的探索を行った結果、間充織に特異的な発現をする2つの候補遺伝子を同定した。

(4) p53欠損マウス新生仔より卵管、子宮、臍由来の間充織細胞株を多数樹立した。上皮・間充織細胞株の共培養実験から、卵管分泌型上皮、子宮上皮、臍上皮への運命決定能力をもつ候補間充織細胞株を選別した。現在、運命決定能について組織の張替え実験系を用いてさらに検証している。

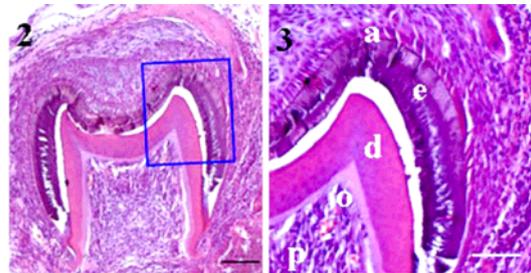
(5) マウス組織の異所移植実験から、ごく数例ながら胎仔マウス舌上皮細胞を成体の舌上皮と同様な形態に分化させることに成功した。今後この実験系を改変して舌上皮の分化メカニズムの解明を行っていく。

(6) Caイメージング解析から樹立したp53欠損マウス舌由来の上皮・味蕾細胞株に成体マウスの味蕾細胞と同等な味覚刺激応答性があることを明らかとした。

(7) p53欠損マウス胎仔歯胚由来上皮細胞株を用いて、高効率で歯胚再形成を可能にする実験系の開発に成功した。現在、その実験系を用いて歯胚形成のメカニズムの解析を進めている。



(8) p53欠損マウス胎仔の口腔粘膜上皮細胞株を用いた組織張替え実験において、口腔粘膜上皮細胞が歯胚上皮へ転分化しうることを明らかとした(Takahashi et al., in press)。



(9) p53欠損マウス胎仔の歯胚間葉から多数のクローン性株細胞樹立を樹立した。その中から、血管内皮細胞株(30%)を除外し、残りの70%の細胞株について歯小嚢マーカー遺伝子発現の有無により2グループに分類した。現在、それら細胞株に識別マーカーを導入した亜株を作製して、歯根膜細胞株、セメント芽細胞株、歯槽骨細胞株なのかどうかについて歯胚再形成実験を行い検証している。

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3件)

- ① Umez T., Yamanouchi H., Iida Y., Miura M., and Tomooka Y. Follistatin-like-1, a diffusible mesenchymal factor determines the fate of epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 査読有、107(10)、2010、4601-4606
- ② Yamanouchi H., Umez T., and Tomooka Y. Reconstruction of oviduct and demonstration of epithelial fate determination in mice. Biol. Reprod. 査読有、82(3)、2010、528-533
- ③ Takahashi C., Yoshida H., Komine A., Nakao K., Tsuji T., and Tomooka Y. Newly established cell lines from mouse oral epithelium regenerate teeth when combined with dental mesenchyme. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 査読有、46、2010、457-468

[学会発表] (計23件)

1. 岡田淳雅、梅津知宏、友岡康弘：An analysis of molecular mechanisms determining oviductal epithelial cell fate decision：第32回日本分子生物学会年会：2009年12月10日：横浜

2. 西山美也子、佐子秀之、橋爪佳代子、宮本武典、友岡康弘：Analysis of taste reception capability of clonal cell lines derived from murine taste buds with imaging system of intracellular calcium. : The 7th international symposium on molecular and neural mechanism of taste and olfactory perception : 2009年11月4日：福岡
3. 西山美也子、佐子秀之、橋爪佳代子、宮本武典、友岡康弘：Analysis of taste reception capability of clonal cell lines derived from murine taste buds with imaging system of intracellular calcium. : The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society : 2009年9月18日：名古屋
4. 清水達哉、坂倉照よ、友岡康弘：マウス乳腺原基株細胞の樹立と解析：日本動物学会第42大会：2009年9月17日：静岡
5. 吉田博行、高橋千穂、友岡康弘：口腔上皮細胞株のエナメル芽細胞への分化誘導と解析、歯再構築能を持つ成体マウス歯肉上皮細胞の解析：日本分子生物学会第31大会：2008年12月11日：神戸
6. 大坪綾乃、友岡康弘：マウス臼歯歯胚上皮由来株細胞を用いた歯の再構築：日本分子生物学会第31大会：2008年12月11日：神戸
7. 小峰陽比古、末永桃子、辻 孝、友岡康弘：歯再構築能を持つ成体マウス歯肉上皮細胞の解析：日本分子生物学会第31大会：2008年12月11日：神戸
8. 高野加奈、望月裕司、大坪綾乃、友岡康弘：歯胚間葉細胞株における象牙芽細胞株の探索：日本分子生物学会第31大会：2008年12月11日：神戸
9. 西山美也子、佐子秀之、宮本武典、友岡康弘：マウス味蕾由来株細胞による味蕾再構築の試み：日本味と匂学会第42大会：2008年9月17-19日：富山
10. 梅津知宏、金田浩平、辻本高弘、友岡康弘：卵管上皮の運命決定メカニズムの解析：日本動物学会第79大会：2008年9月5-7日：福岡
11. 浅田太一、梅津知宏、大瀬賢介、村上康文、友岡康弘：膈上皮における多層化メカニズムの解析：日本動物学会第79大会：2008年9月5-7日：福岡
12. 山野内裕美、梅津知宏、友岡康弘：マウス胎仔卵管由来株細胞を用いた繊毛形成モデルの確立：日本動物学会第79大会：2008年9月5-7日：福岡
13. 梅津知宏、山野内裕美、金田浩平、辻本高弘、友岡康弘：Identification of a novel stromal diffusible factor determining epithelial cell fate decision: 第41大会日本発生生物学会：2008年5月28-30日：徳島
14. 梅津知宏、浅沼帆高、河西優美、友岡康弘：マウス卵管上皮種の決定メカニズムの解析：BMB2007（第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会）：2007年12月11-15日：横浜
15. 高野加奈、大坪綾乃、辻 孝、友岡康弘：歯胚間葉細胞株の樹立と解析：第6回日本再生歯科医学会学術大会：2007年9月12-13日：東京
16. 吉田博行、高橋千穂、辻 孝、友岡康弘：マウス口腔上皮細胞の歯胚上皮細胞への分化誘導の試み：第6回日本再生歯科医学会学術大会：2007年9月12-13日：東京
17. 小峰陽比古、末永桃子、辻 孝、友岡康弘：歯再生能を有する歯胚上皮細胞の増殖・分化に関する解析：第6回日本再生歯科医学会学術大会：2007年9月12-13日：東京
18. 深野千陽、今井泰三、辻 孝、友岡康弘：マウス舌上皮細胞の特性解析とエナメル芽細胞への分化：第6回日本再生歯科医学会学術大会：2007年9月12-13日：東京
19. 大坪綾乃、辻 孝、友岡康弘：成体マウス歯肉上皮細胞より歯再生：第6回日本再生歯科医学会学術大会：2007年9月12-13日：東京
20. 山野内裕美、梅津知宏、友岡康弘：胎仔マウス卵管上皮由来株細胞を用いた繊毛形成モデルの確立：日本動物学会第78大会：2007年9月20-22日：弘前
21. 梅津知宏、浅沼帆高、河西優美、友岡康弘：マウス卵管上皮の運命決定を担う間質由来因子の同定：日本動物学会第78大会：2007年9月20-22日：弘前
22. 西山美也子、佐子秀之、宮本武典、友岡康弘：マウス味蕾由来株細胞の三次元培養：日本味と匂学会第41大会：2007年7月26-28日：東京
23. 佐子秀之、友岡康弘：p53欠損マウス味覚乳頭由来株細胞の解析：2007年7月26-28日：東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/TOMO/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友岡 康弘 (TOMOOKA YASUHIRO)
東京理科大学・基礎工学部生物工学科
・教授
研究者番号：10197949

(2) 研究分担者

梅津 知宏 (UMEZU TOMOHIRO)
東京理科大学・基礎工学部生物工学科
・助教
研究者番号：40385547
(H19-H20)
坂倉 照好 (SAKAKURA TERUYO)
三重大学・医学研究科・名誉教授
研究者番号：40385547
(H19→H20 連携研究者)
岡田 淳雅 (OKADA ATSUMASA)
東京理科大学・基礎工学部生物工学科
・助教
研究者番号：40385547
(H21)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

