

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790333

研究課題名（和文）Wnt シグナルによる空間的分枝管腔形成制御機構の解析

研究課題名（英文）Spatial regulation of branching tubulogenesis by Wnt signaling

研究代表者

松本 真司（MATSUMOTO SHINJI）

大阪大学 医学系研究科 助教

研究者番号：20572324

研究成果の概要（和文）：上皮細胞において Wnt3a と EGF によって協調的に発現亢進し、三次元基質内で分枝をともなった管腔形成を誘導する新規因子 X をマイクロアレイ法にて同定した。因子 X の発現は細胞骨格の制御因子である Rac と Rho の活性を調節することで上皮細胞の伸長形態変化と運動能亢進を誘導した。細胞骨格制御を介した上皮細胞の形態変化は三次元基質内での細胞増殖を活性化し、その結果、分枝管腔構造を形成した。以上の知見は Wnt と EGF シグナルの協調による新たな形態形成制御機構の一端を明らかにしたものである。

研究成果の概要（英文）：Novel factor X regulating epithelial branching tubulogenesis induced by Wnt3a and EGF was identified by microarray analysis. Factor X activated Rac and inhibited Rho respectively, resulting in cell extension and activation of cell motility. Cell morphological change induced cell proliferation in three dimensional matrix. These results indicate that Wnt and EGF signaling regulates epithelial branching tubulogenesis cooperatively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：分枝管腔形成、Wnt シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

肺や腎臓などの管腔臓器は内側に上皮組織が存在し、その周囲を間充織が取り囲んでいる構造をしており、上皮は間充織中で分枝を繰り返しながら、器官固有の機能を有した組織構造が構築される。この上皮が分枝する過程（上皮分枝管腔形成）では多くの増殖分化因子（液性因子）やその下流のシグナル伝達経路の関与が明らかになっているが、それらのシグナルが分枝管腔形成を空間的に制御する機構は不明である。Wnt シグナルは発生段階において細胞増殖、分化および細胞骨格や運動の制御を介して形態形成に関与するが、その詳細な分子機構は不明である。

管腔組織を構成する個々の上皮細胞は内腔側に頂端部（アピカル）、基底膜側に側底部（バソラテラル）を向けた頂底極性を形成している。ノックアウトマウスを用いた解析から複数の Wnt リガンドが肺や腎臓、乳腺等の多くの管腔臓器の形成に関与することは明らかであるが、Wnt が分枝管腔形成におけるどのようなプロセスを制御しているのかについては不明である。管腔臓器由来の上皮細胞を基底膜類似の細胞外基質ゲル（マトリゲル）内で三次元培養すると上皮細胞は頂底極性と内腔を有する小さな球状の嚢胞（シスト）を形成する。私共は最近、マトリゲル内のシストに対して Wnt/ $\beta$ -カテニン経路を活

性化する Wnt3a と EGF を同時協調的に作用させると劇的に分枝管腔形成が誘導されることを見出している。しかし、Wnt3a と EGF による協調的な分枝管腔形成の制御機構は明らかになっていない。

上皮細胞は上皮間葉転換 (EMT) と間葉上皮転換 (MET) を繰り返しながら分枝管腔構造を形成することが知られている。しかし、Wnt3a/ $\beta$ -カテニン経路が分枝管腔形成において EMT や MET に関与するか否かは明らかになっていない。上皮細胞の空間的な分枝形成の制御には、上皮細胞の足場として機能し、増殖分化因子と協調して働く細胞外基質の存在が必須である。Wnt 蛋白質は脂肪酸修飾を受けるため疎水性であり、細胞外基質中のヘパラン硫酸プロテオグリカンと高い親和性を有することが知られている。しかし、Wnt3a による空間的な分枝管腔形成の制御に Wnt と細胞外基質との相互作用が必要であるかどうかについては不明である。

## 2. 研究の目的

上皮分枝管腔形成は、肺、腎臓、乳腺、前立腺など多くの管腔臓器の発生過程で必須の形態形成パターンである。Wnt 蛋白質は形態形成因子として、多くの管腔臓器の発生に関与することが明らかになっているが、その詳細な制御機構は不明である。私共は、生理活性を有する 3 種類の Wnt 蛋白質の精製に成功しており、その生理活性を解析する過程で、Wnt3a と EGF が協調的に三次元細胞外基質中での上皮細胞に対して分枝管腔形成を誘導することを見出した。この結果は Wnt シグナルと他の液性因子シグナルの協調による新たな形態形成制御機構の存在を示唆するものである。そこで、本研究では、Wnt と EGF という独立した 2 種類の液性因子シグナルが協調的に三次元基質環境下での上皮分枝管腔形成を制御する機構について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、「Wnt と EGF シグナルが如何にして協調的に上皮分枝管腔形成を制御するのか」という点を明らかにする。この目的を達成するために、下記の方法で実験を行った。

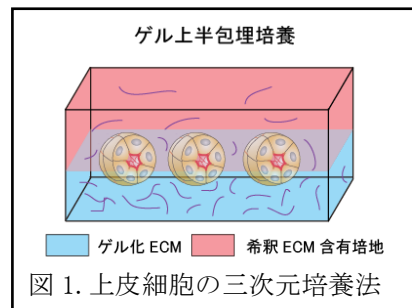
(1) Wnt3a および EGF (Wnt3a/EGF) シグナルの協調による細胞形態制御機構の解析

① Wnt3a/EGF の存在下で上皮細胞が分枝管腔構造を形成するために必要な細胞外基質の同定と三次元培養系の確立

管腔臓器由来の上皮細胞株を複数の細胞外基質上にて三次元的に半包埋培養する (図 1)。

② Wnt3a/EGF シグナルによる上皮細胞形態制御の解析

上皮細胞が三次元基質内で球状のシスト



構造から Wnt3a/EGF 刺激によってチューブ状の管腔構造へと変化する過程を詳細に観察する。個々の上皮細胞の形態変化と頂底極性の変化を免疫染色にて検討する。マトリゲルコートした二次元ディッシュ上での Wnt3a/EGF シグナルによる形態変化も免疫染色にて検討し、アクチンや微小管といった細胞骨格系に与える影響とその制御機構を明らかにする。変化が認められた細胞骨格系の変化について生化学的手法を用いた解析を行う。

③ Wnt3a/EGF シグナルの下流で発現する標的遺伝子の網羅的解析

Wnt3a と EGF で同時に細胞を刺激することで発現が誘導される標的遺伝子を DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析し、候補遺伝子を同定する。候補遺伝子に関して siRNA 法を用いた発現抑制実験を行い、Wnt3a/EGF 依存的な分枝管腔形成に与える影響を検討し、標的遺伝子を同定する。

④ 同定した標的遺伝子が上皮細胞形態や分枝管腔形成を制御する分子機構の解明

③にて同定した標的遺伝子が②で明らかにした細胞骨格制御に関与するか否かを明らかにする。標的遺伝子を上皮細胞に過剰発現し、細胞形態や細胞骨格系に与える影響を免疫染色と生化学的手法で解析する。また、標的遺伝子の発現抑制を行い、Wnt3a/EGF 依存的な細胞骨格系の変化に与える影響を検討する。

(2) 分枝管腔形成過程における細胞増殖制御機構の解析

① シストおよび分枝管腔構造の形成における細胞増殖制御の解析

マトリゲル内で形成されるシスト (非刺激下) および Wnt3a/EGF 依存的に形成される分枝管腔構造における増殖細胞の分布について Edu の取り込みを指標に解析する。

② 分枝管腔形成にともなう細胞増殖活性化の分子機構の解析

分枝管腔構造の形成過程における細胞形態の変化と細胞増殖に着目し、細胞骨格や細胞形態が細胞増殖を活性化する分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) Wnt3a および EGF (Wnt3a/EGF) シグナルの協調による分枝管腔形成制御機構の解析

①Wnt3a/EGF の存在下で上皮細胞が分枝管腔構造を形成するために必要な細胞外基質の同定と三次元培養系の確立

基底膜蛋白質複合体であるマトリゲルを細胞外基質として用いた場合、上皮細胞は非刺激下で頂底極性化して内腔を有するシストを形成した。また Wnt3a/EGF 刺激によって劇的にシストの形態は変化し、分枝を伴った管腔構造を形成した (図 2)。

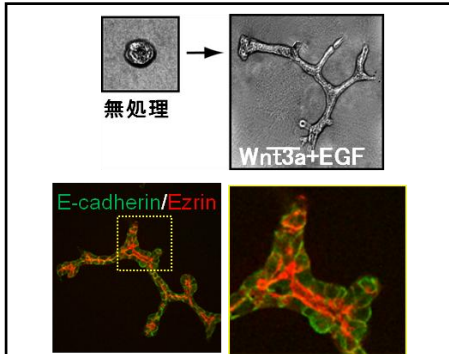


図 2. マトリゲル内での Wnt3a/EGF 依存的な上皮分枝管腔形成

細胞外基質として I 型コラーゲンを用いた場合、上皮細胞は非刺激下でのシスト構造、および Wnt3a/EGF 存在下での分枝管腔構造を形成することができなかった。マトリゲルの主要な構成蛋白質はラミニン 1、IV型コラーゲンおよびエンタクチンであるが、これらの精製蛋白質は単体では三次元的な基質ゲルを形成することが困難であった。

②Wnt3a/EGF シグナルによる上皮細胞形態制御の解析

Wnt3a/EGF 刺激を行うと、シストを構成する一部の上皮細胞が細胞外基質側へ向けて「伸長」する形態変化が認められた。次いで伸長した細胞に連なる形で細胞移動が起こり「鎖状」の構造を形成し、細胞が増殖して多層化し、頂底極性を形成して内腔を有する「管腔」構造を形成した (図 3)。

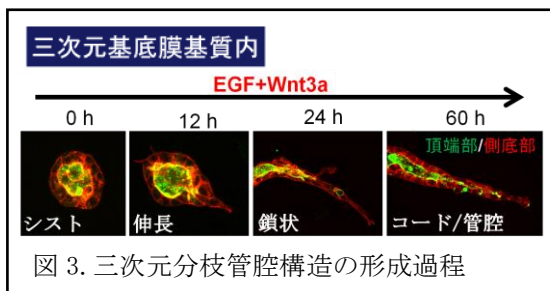


図 3. 三次元分枝管腔構造の形成過程

Wnt3a/EGF シグナルが細胞骨格に与える影響を詳細に観察するためにマトリゲルコートしたディッシュ上で二次元的に細胞を培養し、Wnt3a/EGF で刺激したところ、三次元基質内と同様に細胞の伸長変化が観察され、また免疫染色でミオシン軽鎖のリン酸化が細胞先端部周囲で抑制されていたことから Rho-Rho キナーゼ-ミオシン経路の抑制が

考えられた。さらに複数のラメリポディア (葉状仮足) が形成されていたことから局所的な Rac の活性化が示唆された。そこで、Rac と Rho の活性化を解析したところ、Wnt3a/EGF によって Rac が活性化し、Rho の活性が抑制されていることが確認された。これらの結果から、局所的な Rac の活性化と Rho-ミオシン経路の抑制によって上皮細胞が伸長し、三次元基質内で細胞が移動することができると考えられた。また、細胞が細胞外基質側へ伸長、移動する際に一過的に上皮細胞の頂底極性が消失する「脱極性」が認められた。

③Wnt3a/EGF シグナルの下流で発現する標的遺伝子の網羅的解析

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、Wnt3a および EGF 単独よりも Wnt3a と EGF で同時に刺激を加えたときに遺伝子発現が強く誘導される遺伝子として因子 X を同定した (投稿中)。X は機能未知のタンパク質であるが、上皮細胞においてノックダウンするとマトリゲル内での Wnt3a/EGF 依存的な管腔形成が抑制され、過剰発現すると EGF の存在下で管腔形成を誘導した。

④同定した標的遺伝子が上皮細胞形態や分枝管腔形成を制御する分子機構の解明

因子 X の過剰発現は Rac を活性化し、Rho の活性を抑制した。興味深いことに上皮細胞において因子 X はとくにラメリポディア部細胞膜に強く局在するため、局所的に Rac や Rho の活性を制御できる可能性が示唆された (図 4)。

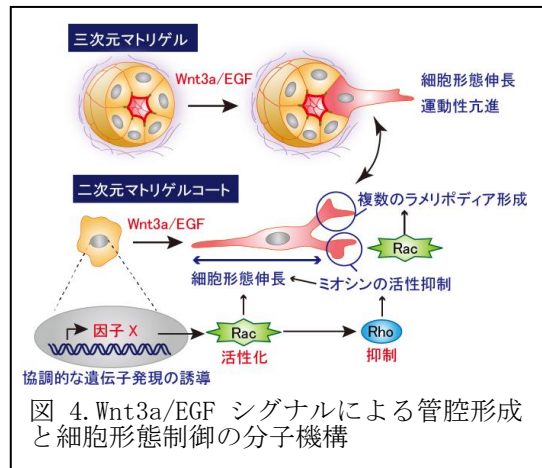


図 4. Wnt3a/EGF シグナルによる管腔形成と細胞形態制御の分子機構

(2)分枝管腔形成過程における細胞増殖制御機構の解析

①シストおよび分枝管腔構造の形成における細胞増殖制御の解析

非刺激下のシストにおいて、上皮細胞への EdU の取り込みはほとんど認められなかった。一方、Wnt3a/EGF 依存的な分枝管腔形成過程においては伸長部の上皮細胞への局所的な EdU の取り込みが認められた (図 5)。これらの結果から三次元基質内でシストは増殖活性が低く抑えられているが、Wnt3a/EGF シグ

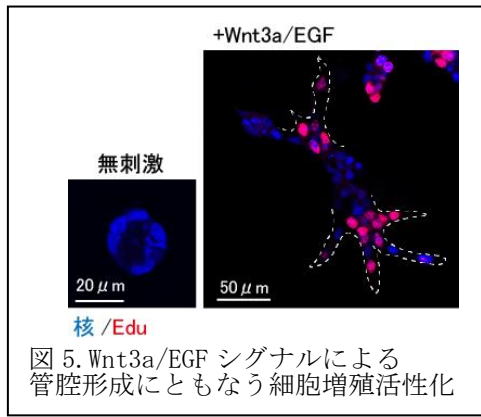


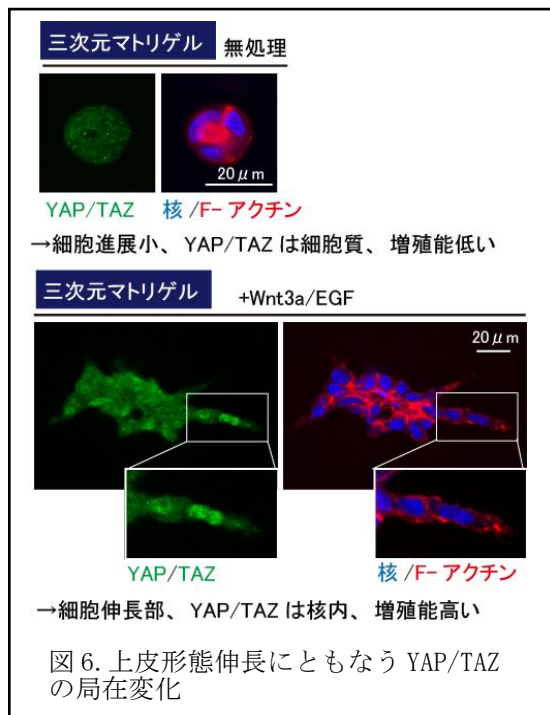
図 5. Wnt3a/EGF シグナルによる管腔形成にともなう細胞増殖活性化

ナルは管腔形成にともなって細胞増殖を局所的に活性化することが示唆された。

②分枝管腔形成にともなう細胞増殖活性化の分子機構の解析

①の結果から分枝管腔形成にともなう細胞増殖の活性化が細胞形態変化（伸長）の起こる領域と一致して認められることが明らかになった。そこで、細胞形態や密度を感知して細胞増殖を制御する転写活性化因子である YAP/TAZ に着目し、その細胞内局在を検討した。YAP/TAZ はシストにおいては細胞質に局在するのに対して、Wnt3a/EGF 依存的な管腔形成においては細胞骨格・細胞形態が変化する伸長部領域で核内に局在した（図 6）。これらの結果から、Wnt3a/EGF の刺激によって細胞骨格と細胞形態が変化することにより、YAP/TAZ が核内に移行し、局所的に増殖シグナルを活性化する可能性が示唆された。

本研究により、Wnt と EGF のような液性因子シグナルの協調による細胞形態と増殖制御を介する新たな形態形成機構の一端が明らかになった。本研究成果は種々の管腔臓器



の発生や再生の仕組みを理解するための新たな分子基盤を提供するものであると考えられる。また Wnt および EGF シグナルの異常活性化は種々のヒトがんの悪性化にも密接に関与していることから、本研究で明らかになったシグナル機構のがんの病態解明への貢献も期待される。

## 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 5 件）

- ① 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（査読有り）
- ② Matsumoto S, Kikuchi A. Regulation of focal adhesion dynamics by Wnt5a signaling. *Methods Mol Biol*, 839, 215-27, 2012（査読有り）
- ③ Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, and Kikuchi A. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther*, 11, 298-307, 2012（査読有り）
- ④ Sakane H, Yamamoto H, Matsumoto S, Sato A, and Kikuchi A. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. *J Cell Sci*, 125, 449-60, 2012（査読有り）
- ⑤ 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 (査読有り)

[学会発表] (計2件)

- ① 松本 真司: Wnt3a and Wnt5a regulate  
epithelial polarity and tubulogenesis  
cooperatively : 第34回分子生物学会年  
会 横浜 2011年12月16日
- ② 松本 真司: Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルと  
EGF シグナルの協調による三次元基質内  
での上皮分枝管腔形成制御機構の解析  
第35回分子生物学会年会 横浜 2012  
年12月11日~14日

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 真司 (Shinji Matsumoto)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 20572324

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :

