
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

領域番号 3303

平成23年度～平成27年度
科学研究費助成事業
(新学術領域研究 (研究領域提案型))
研究成果報告書

平成29年6月

領域代表者 菊池章
(大阪大学医学系研究科 教授)

はしがき

新学術領域研究「上皮管腔組織形成」の研究成果とりまとめにあたって

平成 23 年 7 月に発足した本領域も平成 27 年度末をもって終了しました。そののち、一年間のとりまとめ期間を経て、研究成果報告書を提出することとなりました。思い出しますと、領域の計画調書を作成するために、大阪で計画研究者が集まり会議を開こうとした 2 日前に(平成 23 年 3 月 11 日)東日本大震災が起きました。東北大学に所属するメンバーもいたことから安否を気遣いながらも、連絡を取り合い計画調書を完成しました。締め切りやヒアリングの時期が例年より遅れる等混乱はありましたが、本新学術領域は採択され、研究活動がスタートすることになりました。2 回の公募研究班募集を行い、7 計画研究班と 42 公募研究班で、組織「幹」細胞が如何にして上皮細胞になり、集団として「管」腔構造を形成するのか、そして「管」腔構造が破綻すると如何にして疾「患」に至るのかを解明することが本領域の目的でした。すなわち、「幹」、「管」、「患」の 3 つのかんが私達のキーワードでした。

英語では「Tubulogenesis」という言葉があり、上皮による管腔構造形成は学術上の重要なテーマです。ただ、種を超えて、また臓器や器官を超えて、管腔構造の形成、維持、破綻の分子基盤の共通性と差異を理解する研究集団や学術集会是存在しませんでした。この意義につきましては、2 回開催しました国際会議において招待した多くの外国人研究者が異口同音にこのようなグループ研究の重要性を指摘していたことから、正しかったものと認識しています。

5 年間の研究成果につきましては、この研究成果報告とりまとめ他に、ホームページやニュースレターに掲載いたしました。設定した目標に向かって班員が共同研究を展開しながら、新たな知見を生み出している様子がお分かりいただけたと思いますが、勿論、本領域の研究で「上皮管腔組織形成」に関する研究が完成するわけではありません。また、私共が提案した「管腔生物学」が学術の世界に十分に浸透しているわけではありません。本来であれば、本領域を継続していきたいところですが、新学術領域研究という研究費制度の下では、5 年に一度更新して次世代に繋ぐ新たな研究を展開することが求められます。「幹細胞生物学」、「細胞生物学」、「遺伝学」、「数理生物学」、「材料科学」等の異分野の融合により、「上皮管腔」の形作りの理解は進んできました。一方、形ができ上がった後に、臓器や器官がどのようにして機能を獲得していくかについては未知な点が多数あります。本領域の成果を土台にして「形作り」から「機能獲得」へ生物が「完成」の道をたどる過程を理解するための研究集団を構築したいと考えています。

研究成果を挙げることに加えて、人材育成も新学術領域の重要な使命でした。5 年間の領域活動を通じて、計画研究代表者の鈴木淳史准教授と大橋一正准教授が教授に昇任しました。また、計画研究分担研究者の小根山千歳准教授が独立した部長職を得られました。さらに、公募研究代表者の中村哲也寄附講座講師、池ノ内順一准教授、永樂元次ユニットリーダーが教授になりました。これら以外でも、昇任または新規に研究職を獲得された方が多数おられます。これらの人事は、私共にとりまして大きな喜びであり、新たな環境で更に発展されることを祈念しています。

最後になりましたが、私共の「上皮管腔組織形成」を支援していただきました全ての方々に心からお礼を申し上げます。

平成 29 年 6 月
領域代表 菊池章

目次

はしがき	2
目次	3
研究組織（総括班、研究計画班、公募研究班）	4
交付決定額	11
研究領域の概要	12
主な研究発表（雑誌論文、学会発表、図書）	13
【論文発表】（計画研究）	13
【論文発表】（公募研究平成 24 年度～平成 25 年度）	20
【論文発表】（公募研究平成 26 年度～平成 27 年度）	27
【学会発表】（計画研究）	30
【学会発表】（公募研究平成 24 年度～平成 25 年度）	32
【学会発表】（公募研究平成 26 年度～平成 27 年度）	35
【図書】（計画研究）	37
【図書】（公募研究平成 24 年度～平成 25 年度）	39
【図書】（公募研究平成 26 年度～平成 27 年度）	39
研究成果による産業財産権の出願・取得状況	40
各研究班による研究成果	42
領域活動	99
技術講習会内容	101
子宮外発生法（exo utero development）を用いた実験手技マニュアル	102
フローサイトメーターマニュアル	107
質量分析によるプロテオーム解析マニュアル	111
イメージング技術マニュアル	115
評価	123
中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況	123
事後評価	124
総括班評価委員による事後評価	125

研究組織(総括班、計画研究班、公募研究班)

総括班

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名 研究分担者 連携研究者	所属機関 部局 職	構成員数
X00 総括	23112001 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	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	領域代表：菊池 章	大阪大学・医学系研究科・教授	10
			(連携研究者) 南 康博	神戸大学・医学研究科・教授	
			(連携研究者) 大野 茂男	横浜市立大学・医学研究科・教授	
			(連携研究者) 佐邊 壽孝	北海道大学・医学研究科・教授	
			(連携研究者) 大谷 浩	島根大学・医学部・教授	
			(連携研究者) 大橋 一正	東北大学・生命科学研究科・准教授 (現：東北大学生命科学研究科・教授)	
			(連携研究者) 鈴木 淳史	九州大学・生体防御医学研究所・准教授 (現：九州大学・生体防御医学研究所・教授)	
			(連携研究者) 竹縄 忠臣	神戸大学・医学研究科・特命教授	
			(連携研究者) 本多 久夫	兵庫大学・健康科学部・客員教授 (神戸大学・医学研究科・客員教授)	
(連携研究者) 宮島 篤	東京大学・分子細胞生物学研究所・教授				
総括班 計 1 班					

計画研究班

A01 計画	23112002 組織幹細胞の維持と分化の制御機構	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	鈴木 淳史	九州大学・生体防御医学研究所・准教授（現：九州大学・生体防御医学研究所・教授）	1
A01 計画	23112003 組織幹前駆細胞の極性制御と運命決定	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	大野 茂男	横浜市立大学・医学研究科・教授	3
			連携研究者 秋本 和憲	横浜市立大学・医学部・助教	
			連携研究者 廣瀬 智威	横浜市立大学・医学部・助教	
A01 計画	23112004 分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	菊池 章	大阪大学・医学系研究科・教授	3
			研究分担者 麓 勝己	大阪大学・医学系研究科・助教	
			連携研究者 松本 真司	大阪大学・医学系研究科・助教	
A01 計画	23112005 上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の 3 次元イメージング解析	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	大橋 一正	東北大学・生命科学研究所・准教授 （現：東北大学・生命科学研究所・教授）	1
A02 計画	23112006 器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	大谷 浩	島根大学・医学部・教授	3
			研究分担者 八田 稔久	金沢医科大学・医学部・教授	
			研究分担者 宇田川 潤	滋賀医科大学・医学部・教授	
A02 計画	23112007 平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	南 康博	神戸大学・医学研究科・教授	2
			研究分担者 真嶋 隆一 （平成 23～24 年度）	東京大学・医科学研究所・助教	
			研究分担者 手塚 徹 （平成 25～27 年度）	東京大学・医科学研究所・助教	
A02 計画	23112008 上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換	平成 23 年度 ～ 平成 27 年度	佐邊 壽孝	北海道大学・医学研究科・教授	2
			研究分担者 小根川 千歳	愛知県がんセンター・感染腫瘍学部・部長	
計画研究 計 7 班					

公募研究班（平成 24 年度～平成 25 年度）

A01 公募	24112502 新規 Wnt シグナル修飾因子 LGR4 による乳腺上皮細胞運命の決定と極性制御機構解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	西森 克彦	東北大学・農学研究科・教授	1
A01 公募	24112503 上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	山城 佐和子	東北大学・生命科学研究所・助教 (現：京都大学・生命科学研究所・助教)	1
A01 公募	24112508 独自の正常大腸上皮幹細胞培養技術を用いた管腔形成機構の解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	中村 哲也	東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座准教授 (現：東京医科歯科大学・消化管先端治療学・寄附講座教授)	1
A01 公募	24112510 管形成過程における紡錘体配向の変換機構	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	松本 邦弘	名古屋大学・理学(系)研究科・教授	1
A01 公募	24112511 細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	池ノ内 順一	九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授 (現：九州大学・理学研究院・教授)	1
A01 公募	24112512 管腔形成における細胞内極性輸送の機能の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	吉村 信一郎	大阪大学・医学系研究科・助教	1
A01 公募	24112513 リンパ管腔形成と維持における Aspp1 の役割と分子機構	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	平島 正則	神戸大学・医学研究科・准教授	1
A01 公募	24112519 胆管をモデルとした、管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	谷水 直樹	札幌医科大学・医学部・講師 (現 札幌医科大学・医学部・准教授)	3
			連携研究者 吉川 大和	東京薬科大学・薬学部	
			連携研究者 伊藤 暢	東京大学・分子細胞生物学研究所・助教 (現：東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授)	

A01 公募	24112520 腎尿細管構造の維持機構解析の基盤となる一次繊毛蛋白による細胞周期調節のしくみ	平成 24 年度 ～ 平成 24 年度	芝 大	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (現:宇宙航空研究開発機構・主任研究員)	2
			連携研究者 福井 一	京都府立医科大学・医学研究科・助教 (現:国立循環器病研究センター研究所・細胞生物学部・上級研究員)	
A01 公募	24112522 脳胞形成の4次元定量解析	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	堀田 耕司	慶應義塾大学・理工学部・講師	2
A01 公募	24112525 分泌経路のリモデリングが上皮管腔組織形成に果たす必須の役割	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	中村 暢宏	京都産業大学・総合生命科学部・教授	2
			連携研究者 石田 竜一	京都産業大学・総合生命科学部・プロジェクト・ポスドクター	
A01 公募	24112526 マウス精上皮管腔極性化機構の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	北舘 祐	基礎生物学研究所大学・生殖細胞研究部門・助教	1
A01 公募	24112527 神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	永樂 元次	独立行政法人理化学研究所発生・再生科学総合研究センター・ユニットリーダー (現:京都大学・ウイルス再生医科学研究所・教授)	1
A02 公募	24112501 上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合ー超初期発がんメカニズムの解明ー	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	加藤 洋人	北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員 (現:東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教)	1
A02 公募	24112504 光干渉断層画像化法を応用した肺組織構築イメージングシステムの開発	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	阿部 宏之	山形大学・理工学研究科・教授	3
			連携研究者 渡部 裕輝	山形大学・理工学研究科・准教授	
			連携研究者 黒谷 玲子	山形大学・理工学研究科・准教授	
A02 公募	24112505 多能性幹細胞由来肝幹・前駆細胞を用いた胆管疾患解析系の構築	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	紙谷 聡英	東海大学・創造科学技術研究機構・准教授	2
			連携研究者 柿沼 晴	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師	
A02 公募	24112506 癌抑制遺伝子産物 APC が関わる上皮管腔形成機構とその破綻による癌発症機構の解明	平成 24 年度 ～ 平成 25 年度	川崎 善博	東京大学・分子細胞生物学研究所・講師 (現:東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授)	1

A02 公募	24112507 新規可視化法を用いた、正常時と障害時における胆管3次元ダイナミクス解析	平成24年度 ～ 平成25年度	伊藤 暢	東京大学・分子細胞生物学研究所・助教 (現：東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授)	1
A02 公募	24112509 器官サイズ制御シグナルによる神経管・血管系上皮組織の3次元構築機構の解明	平成24年度 ～ 平成25年度	浅岡 洋一	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (現：山口大学・ゲノム機能分子解析学・講師)	4
			連携研究者 仁科 博史	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授	
			連携研究者 平山 順	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授	
			連携研究者 岩月 麻美子	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教	
A02 公募	24112515 上皮管腔組織形成におけるMob1の役割とその破綻	平成24年度 ～ 平成25年度	鈴木 聡	九州大学・生体防御医学研究所・教授	1
A02 公募	24112518 細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明	平成24年度 ～ 平成25年度	西中村 隆一	熊本大学・発生医学研究所・教授	1
A02 公募	24112521 非再生系成体組織における異常細胞の検出・排除システム	平成24年度 ～ 平成25年度	谷口 喜一郎	学習院大学・理学部・助教 (現：京都大学)	1
A02 公募	24112523 大腸上皮の癌化に伴う管腔形成異常メカニズムの解明	平成24年度 ～ 平成25年度	佐藤 俊朗	慶應義塾大学・医学部・特任准教授 (現：慶應義塾大学・医学部・准教授)	1
A02 公募	24112524 類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング	平成24年度 ～ 平成25年度	清川 悦子	金沢医科大学・医学部・教授	1
A02 公募	24112528 幹細胞老化の制御機構とその破綻による上皮管腔組織機能低下メカニズムの解明	平成24年度 ～ 平成25年度	山越 貴水	独立行政法人国立長寿医療研究センター・室長	1
公募研究班（平成24年度～平成25年度）計 25班					

公募研究班（平成26年度～平成27年度）

A01 公募	26112705 腸管上皮幹細胞3次元培養技術を利用した管腔形成機構解析	平成26年度 ～ 平成27年度	中村 哲也	東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授 (現:東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄付講座教授)	1
A01 公募	26112706 de novo 管腔形成の制御機構	平成26年度 ～ 平成27年度	松本 邦弘	名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授	1
A01 公募	26112707 細胞外マトリックスの硬さによる上皮管腔組織形成の制御	平成26年度 ～ 平成27年度	木岡 紀幸	京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授	2
			連携研究者 木村 泰久	京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教	
A01 公募	26112702 革新的イメージングによる上皮細胞間コミュニケーションの異常における力の役割	平成26年度 ～ 平成27年度	山城 佐和子	東北大学・生命科学研究所・助教 (現:京都大学・生命科学研究所・助教)	1
A01 公募	26112708 上皮管腔組織が内包する細胞間相互作用を介したがん抑制システムの遺伝的基盤	平成26年度 ～ 平成27年度	大澤 志津江	京都大学・生命科学研究所・講師 (現京都大学・生命科学研究所・准教授)	1
A01 公募	26112713 細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明	平成26年度 ～ 平成27年度	池ノ内 順一	九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授 (現:九州大学・理学研究所・教授)	1
A01 公募	26112714 分岐形成を生み出す細胞動態を実験-理論相互連動によって解明する	平成26年度 ～ 平成27年度	今村 寿子	九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教	2
			(連携研究者) 横川 隆司	京都大学・工学研究科・准教授	
A01 公募	26112715 上皮組織の細胞動態制御機構の解析	平成26年度 ～ 平成27年度	佐々木 洋	熊本大学・発生医学研究所・教授 (現:大阪大学・生命機能研究科・教授)	3
			連携研究者 佐藤 卓史 (平成26年度)	熊本大学・発生医学研究所・研究員	
			連携研究者 加村 啓一郎 (平成27年度)	大阪大学・生命機能研究科・特任助教	
			連携研究者 小林 徹也	東京大学・生産技術研究所・准教授	
A01 公募	26112721 気管の管腔成長メカニズムの解明	平成26年度 ～ 平成27年度	森本 充	国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー	1

A01 公募	26112723 上皮組織の分化パターンと形態形成をつなぐ力学制御メカニズムの解明	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	永樂 元次	国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー (現：京都大学・ウイルス再生医科学研究所・教授)	1
A02 公募	26112701 多段階発がん課程における細胞競合の関与	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	昆 俊亮	北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教	3
			連携研究者 藤田 恭之	北海道大学・遺伝子制御研究所・教授	
A02 公募	26112704 肝臓上皮組織の再生・維持機構の生体内多次元イメージング解析	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	連携研究者 北本 祥	Department of internal Medicine-Gastroenterology, University of Michigan Medical School・博士研究員	1
			廣田 泰	東京大学・医学部附属病院・講師	
A02 公募	26112703 妊娠における子宮内膜上皮形成の分子機構とその破綻	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	伊藤 暢	東京大学・分子細胞生物学研究所・助教 (現：東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授)	1
A02 公募	26112712 膵管癌細胞における一次繊毛消失機構の解明と癌治療への応用	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	小林 哲夫	奈良先端科学技術大学・院大学・バイオサイエンス研究科・助教	2
			連携研究者 伊東 広	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授	
A02 公募	26112716 マウス及びヒト発生期腎臓における管腔上皮形成機構と破綻	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	西中村 隆一	熊本大学・学内共同利用施設等・教授	1
A02 公募	26112718 上皮管腔組織における基底膜形成メカニズムの解明	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	吉川 大和	東京薬科大学・薬学部・准教授	4
			連携研究者 谷水 直樹	札幌医科大学・医学部・准教授	
			連携研究者 野水 基義	東京薬科大学・薬学部・教授	
			連携研究者 伊東 祐二	鹿児島大学・理学部・教授	
A02 公募	26112719 脈管内腺構造の回転と浸潤・転移	平成 26 年度 ～ 平成 27 年度	清川 悦子	金沢医科大学・医学部・教授	3
			連携研究者 湊 宏	金沢医科大学・医学部・教授	
			連携研究者 佐々木 成朗	電気通信大学・情報理工学(系)研究科教授	
公募研究（平成 26 年度～平成 27 年度）合計 17 班					

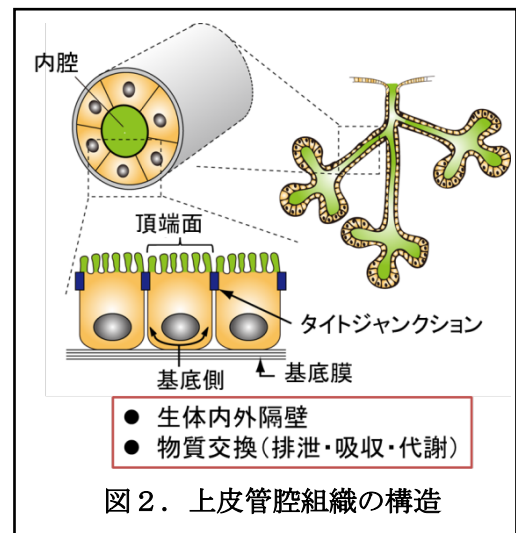
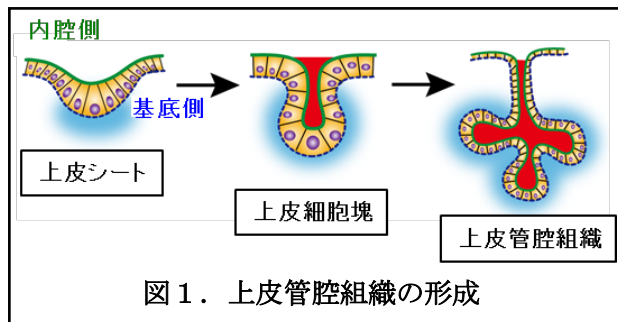
交付決定額

(単位： 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	200,100,000	60,030,000	260,130,000
平成 24 年度	249,700,000	74,910,000	324,610,000
平成 25 年度	279,700,000	83,910,000	363,610,000
平成 26 年度	205,500,000	61,650,000	267,150,000
平成 27 年度	209,100,000	62,730,000	271,830,000
総計	1,144,100,000	343,230,000	1,487,330,000

研究領域の概要

生体は、上皮組織、支持組織（骨、軟骨、血管組織を含む）、筋組織、神経組織から成り立っている。上皮組織の中でも、上皮管腔組織は生体の器官の必須構造である（図 1）。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細胞塊を経て上皮管腔組織は形成され、その構造が維持されると考えられている。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等の奇形や癌を含む種々の疾患に至る。しかし、細胞機能の分子レベルでの理解が進む一方で、細胞集団からなる組織・器官の形成と維持の分子・細胞レベルでの理解は立ち遅れている。細胞と組織・器官との間に横たわる未知の高次構造構築の基盤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である。



上皮管腔構造は、物質を輸送するために、物質が内腔面から管腔外に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（図 2）。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互いに連結し、内腔側と支持組織側を区画する共通の形状をとる。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、分岐の数や様式が多様であるが、私共は上皮管腔組織を極性化した細胞集団として捉えることができると考えている。



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様々なタンパク質等を細胞の必要な領域に輸送・配置・再構築することで決定され、上皮細胞が脱極性化することは種々の奇形やがん等の疾患に関わる。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、様々な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・器官の間に存在する未解決の問題、すなわち「細胞が極性化・集団化してどのように高次の形態を有する上皮管腔組織を形成・維持するのか」「上皮管腔組織が破綻すると、どのようにして疾患に至るのか」を明らかにすることを目指す（図 3）。

主な研究発表(雑誌論文、学会発表、図書)

【論文発表】(計画研究) (すべて査読あり)

●鈴木淳史

1. Takashima Y, Terada M, Uono M, Miura S, Yamamoto J, Suzuki A: Suppression of lethal-7b and miR-125a/b Maturation by Lin28b Enables Maintenance of Stem Cell Properties in Hepatoblasts. **Hepatology** 64, 2016, 245-260.
2. Takashima Y, Terada M, Kawabata M, Suzuki A: Dynamic three-dimensional morphogenesis of intrahepatic bile ducts in mouse liver development. **Hepatology** 61. 2015, 1003-1011.
3. Miura S and Suzuki A: Rapid cell-fate conversion of mouse fibroblasts into hepatocyte-like cells. **Inflamm Regen** 34, 2014, 211-216.
4. Miura S. and Suzuki A: Acquisition of lipid metabolic capability in hepatocyte-like cells directly induced from mouse fibroblasts. **Front Cell Dev Biol** 2, 2014, 1-6.
5. Sekiya S and Suzuki A: Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. **Am J Pathol** 184, 2014, 1468-1478.
6. Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S: Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. **Proc Natl Acad Sci USA** 110, 2013, 6412-6417.
7. Sekiya S and Suzuki A: Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. **J Clin Invest** 122, 2012, 3914-3918.
8. Sekiya S and Suzuki A: Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. **Nature** 475, 2011, 390-393.
9. Sekiya S and Suzuki A: Glycogen synthase kinase 3 β -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 2011, 11175-11180.
10. Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama K I: Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. **J Clin Invest** 121, 2011, 342-354.

●大野茂男

1. Metz P J, Lopez J, Kim S H, Akimoto K, Ohno S, Chang J T: Regulation of Asymmetric Division by Atypical Protein Kinase C Influences Early Specification of CD8(+) T Lymphocyte Fates. **Sci Rep** 6, 2016, 19182.
2. Mizushima T, Asai-Sato M, Akimoto K, Nagashima Y, Taguri M, Sasaki K, Nakaya M A, Asano R, Tokinaga A, Kiyono T, Hirahara F, Ohno S, Miyagi E: Aberrant Expression of the Cell Polarity Regulator aPKC λ /iota is Associated With Disease Progression in Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN): A Possible Marker for Predicting CIN Prognosis. **Int J Gynecol Pathol** 35(2), 2016, 106-117.
3. Osada S, Minematsu N, Oda F, Akimoto K, Kawana S, Ohno S: Atypical Protein Kinase C Isoform, aPKC λ , Is Essential for Maintaining Hair Follicle Stem Cell Quiescence. **J Invest Dermatol** 135(11), 2015, 2584-2592.
4. Sasaki K, Kakuwa T, Akimoto K, Koga H, Ohno S: Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-Galphai3 signaling. **J Cell Sci** 128(13), 2015, 2244-2258.
5. Yamashita K, Ide M, Furukawa K. T, Suzuki A, Hirano H, Ohno S: Tumor suppressor protein Lgl mediates G1 cell cycle arrest at high cell density by forming an Lgl-VprBP-DDB1 complex. **Mol Biol Cell** 26(13), 2015, 2426-2438.
6. Ohno S, Goulas S, Hirose T: The PAR3-aPKC-PAR6 Complex. **Cell Polarity 1 Biological Role and Basic Mechanisms** 2015, 3-23.
7. Horikoshi Y, Kitatani K, Toriumi K, Fukunishi N, Itoh Y, Nakamura N, Ohno S, Matura T, Takekoshi S: Aberrant activation of atypical protein kinase C in carbon tetrachloride-induced oxidative stress provokes a disturbance of cell polarity and sealing of bile canalicular lumen. **Am J Pathol** 185(4), 2015, 958-968.
8. Metz P. J, Arsenio J, Kakaradov B, Kim S. H, Remedios K. A, Oakley K, Akimoto K, Ohno S, Yeo G. W, Chang J. T: Regulation of Asymmetric Division and CD8+ T Lymphocyte Fate Specification by Protein Kinase Czeta and Protein Kinase Clambda/iota. **J Immunol** 194(5), 2015, 2249-2259.
9. Sato Y, Hayashi K, Amano Y, Takahashi M, Yonemura S, Hayashi I, Hirose H, Ohno S, Suzuki A:

- MTCL1 crosslinks and stabilizes non-centrosomal microtubules on the Golgi membrane. **Nat Commun** 5, 2014, 5266.
10. Ichikawa Y, Nagashima Y, Morioka K, Akimoto K, Kojima Y, Ishikawa T, Goto A, Kobayashi N, Watanabe K, Ota M, Fujii S, Kawamata M, Takagawa R, Kunizaki C, Takahashi H, Nakajima A, Maeda S, Shimada H, Inayama Y, Ohno S, Endo I: Colorectal laterally spreading tumors show characteristic expression of cell polarity factors, including atypical protein kinase C lambda/iota, E-cadherin, beta-catenin and basement membrane component. **Oncol Lett** 8(3), 2014, 977-984.
 11. Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, Yamashita A, Ohno S: aPKClambda maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. **J Biochem** 156(2), 2014, 115-128.
 12. Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A: The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. **Retrovirology** 11, 2014, 9.
 13. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N: Loss of aPKClambda in differentiated neurons disrupts the polarity complex but does not induce obvious neuronal loss or disorientation in mouse brains. **PLoS One** 8(12), 2014, e84036.
 14. Sato Y, Akitsu M, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Shimada K, Yamashita A, Hirano H, Arakawa N, Maki T, Hayashi I, Ohno S, Suzuki A: The novel PAR-1-binding protein MTCL1 has crucial roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. **J Cell Sci** 126(Pt 20), 2013, 4671-4683.
 15. Kato S, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Kubota K, Kobayashi N, Hosono K, Watanabe S, Sekino Y, Sato T, Sasaki K, Nakaigawa N, Kubota Y, Inayama Y, Endo I, Ohno S, Maeda S, Nakajima A: aPKClambda/iota is a beneficial prognostic marker for pancreatic neoplasms. **Pancreatology** 13(4), 2013, 360-368.
 16. Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, Suzuki A, Alarcon V. B, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H: Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. **Curr Biol** 23(13), 2013, 1181-1194.
 17. Satake T, Otsuki K, Banba Y, Suenaga J, Hirano H, Yamanaka Y, Ohno S, Hirai S: The interaction of Kinesin-1 with its adaptor protein JIP1 can be regulated via proteins binding to the JIP1-PTB domain. **BMC Cell Biol** 14, 2013, 12.
 18. Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler H. C, Itoh N, Hirose T, Breier G, Vestweber D, Cooper J. A, Ohno S, Kaibuchi K, Adams R. H: Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. **Nat Cell Biol** 15(3), 2013, 249-260.
 19. Yoshihama Y, Izumisawa Y, Akimoto K, Satoh Y, Mizushima T, Satoh K, Chida K, Takagawa R, Akiyama H, Ichikawa Y, Kunisaki C, Inayama Y, Endo I, Nagashima Y, Ohno S: High expression of KIBRA in low atypical protein kinase C-expressing gastric cancer correlates with lymphatic invasion and poor prognosis. **Cancer Sci** 104(2), 2013, 259-265.
 20. Iden S, van Riel W. E, Schafer R, Song J. Y, Hirose T, Ohno S, Collard J. G: Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. **Cancer Cell** 22(3), 2012, 389-403.
 21. Yoshihama Y, Chida K, Ohno S: The KIBRA-aPKC connection: A potential regulator of membrane trafficking and cell polarity. **Commun Integr Biol** 5(2), 2012, 146-151.
 22. Hayashi K, Suzuki A, Ohno S: PAR-1/MARK: a kinase essential for maintaining the dynamic state of microtubules. **Cell Struct Funct** 37(1), 2012, 21-25.
 23. Hayashi K, Suzuki A, Hirai S, Kurihara Y, Hoogenraad C.C, Ohno S: Maintenance of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule growth. **J Neurosci** 31(34), 2011, 12094-12103.
 24. Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kagawa E, Sasaki T, Sano J. Y, Takagawa R, Fujinami K, Sasaki K, Aoki I, Ohno S, Kubota Y, Uemura H: Coexpression of aPKClambda/iota and IL-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence. **Cancer Sci** 102(8), 2011, 1576-1581.

25. Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S, Ohno S, Chida K: KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. **Curr Biol** 21(8), 2011, 705-711.

● 菊池章

1. Matsumoto S, Kurimoto T, Taketo M, Fujii S, and Kikuchi A: Wnt-Myb pathway suppresses KIT expression to control the timing of salivary proacinar differentiation and duct formation. **Development** 143(13), 2016, 2311-2324.
2. Kimura H, Fumoto K, Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, Eguchi H, Shintani Y, Endo E, Inoue M, Doki Y, Okumura M, Morii E, and Kikuchi A: CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. **J Clin Invest** 126(7), 2016, 2689-2705.
3. Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, Sato T, and Takagi J: Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ α -albumin. **eLife** 5, 2016, e11621.
4. Abedini A, Zamberlam G, Lapointe E, Tourigny C, Boyer A, Paquet M, Hayashi K, Honda H, Kikuchi A: Price C, and Boerboom D: WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. **FASEB J** 30(4), 2016, 1534-1547.
5. Sato A, Kayama H, Shojima K, Matsumoto S, Koyama H, Minami Y, Nojima S, Morii E, Honda H, Takeda K, Kikuchi A: The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. **Sci Rep** 5, 2015, 10536.
6. Ibuka S, Matsumoto S, Fujii S, Kikuchi A: The P2Y2 receptor promotes Wnt3a and EGF-induced epithelial tubular formation of IEC6 cells by binding to integrins. **J Cell Sci** 128(11), 2015, 2156-2168.
7. Shojima K, Sato A, Hanaki H, Tsujimoto I, Nakamura M, Hattori K, Sato Y, Dohi K, Hirata M, Yamamoto H, and Kikuchi A: Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. **Sci Rep** 27; 5, 2015, 8042.
8. Yamamoto H, Awada C, Matsumoto S, Kaneiwa T, Sugimoto T, Takao T, and Kikuchi A: Basolateral secretion of Wnt5a in polarized epithelial cells is required for apical lumen formation. **J Cell Sci** 128(5), 2015, 1051-1063.
9. Fujii S, Matsumoto S, Nojima S, Morii E, and Kikuchi A: Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and may represent a novel therapeutic target. **Oncogene** 34(37), 2015, 4834-4844.
10. Matsumoto S, Fujii S, Sato A, Ibuka S, Kagawa Y, Ishii M, and Kikuchi A: A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. **EMBO J** 33, 2014, 702-718.
11. Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori K, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, and Ishii M: Cell Cycle-Dependent Rho GTPase Activity Dynamically Regulates Cancer Cell Motility and Invasion In Vivo. **PLoS ONE** 8, 2013, e83629.
12. Gon H, Fumoto K, Ku Y, Matsumoto S, and Kikuchi A: Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. **Mol Biol Cell** 24, 2013, 3764-3774.
13. Yamamoto H, Awada C, Hanaki H, Sakane H, Tsujimoto I, Takahashi Y, Takao T, and Kikuchi A: Apicobasal secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by distinct mechanisms. **J Cell Sci** 126, 2013, 2931-2943.
14. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. **Hepatology** 57, 2013, 2502-2513.
15. Fumoto K, Kikuchi K, Gon H, and Kikuchi A: Wnt5a signaling controls cytokinesis by positioning ESCRT-III to the proper site at the midbody. **J Cell Sci** 125, 2012, 4822-4832.

16. Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, and Kikuchi A: An Wnt5a-antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. **Mol Cancer Ther** 11, 2012, 298-307.
17. 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, 2012, 449-460.
18. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S: Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. **Acta Physiol (Oxf)** 204, 2012, 17-33.
19. Matsumoto S, Kikuchi A: Regulation of focal adhesion dynamics by Wnt5a signaling. **Methods Mol Biol** 839, 2012, 215-27.
20. Ishida-Takagishi M, Enomoto A, Asai N, Ushida K, Watanabe T, Hasimoto T, Kato T, Weng L, Matsumoto S, Asai M, Murakumo Y, Kaibuchi K, Kikuchi A: and Takahashi, M.: The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. **Nature Communications** 3, 2012, 859.
21. Naito A, Sumida T, Nomura S, Liu M L, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee J K, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I: Complement c1q activates canonical wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. **Cell** 149, 2012, 1298-1313.
22. Hida T, Yamashita N, Usui H, Nakamura F, Sasaki Y, Kikuchi A, and Goshima: Y. GSK3 β /Axin-1/ β -catenin complex is involved in semaphorin3A signaling. **J Neurosci** 32, 2012, 11905-11918.
23. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S: New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. **Int Rev Cell Mol Biol** 291, 2011, 21-71.
24. Deraz E M, Kudo Y, Yoshida M, Obayashi M, Tsunematsu T, Tani H, Siriwardena S, Keikhaee M R , Qi G, Iizuka S, Ogawa I, Campisi G, Lo Muzio L, Abiko Y, Kikuchi A, Takata T: MMP-10/Stromelysin-2 Promotes Invasion of Head and Neck Cancer. **PLoS ONE** 6(10), 2011, e25438.
25. Kagermeier-Schenk B, Wehner D, Özhan-Kizil G, Yamamoto H, Jian Li Kirchner K, Hoffmann C, Stern P, Kikuchi A, Schambony A, and Weidinger G: The transmembrane protein Waif1/5T4 inhibits Wnt/ β -catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization. **Dev Cell** 21, 2011, 1129-1143.
26. Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, Borovina A, Ciruna B, Shimizu A, Kajii T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, and Matsuura S: Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes impaired ciliogenesis in vertebrates. **Hum Mol Genet** 20, 2011, 2058-2070.

●大橋一正

1. Fujiwara S, Ohashi K, Mashiko T, Kondo H, Mizuno K: Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement. **Mol Biol Cell** 27, 2016, 954-966.
2. Abiko H, Fujiwara S, Ohashi K, Hiataru R, Mashiko T, Sakamoto N, Sato M, Mizuno K: Rho-guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. **J Cell Sci** 128, 2015, 1683-1695.
3. Homma Y, Kanno S, Sasaki K, Nishita M, Yasui A, Asano T, Ohashi K, Mizuno K: Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation. **J Biol Chem** 289, 2014, 26302-26313.
4. Ohashi K, Sampei K, Nakagawa M, Uchiumi N, Amanuma T, Aiba S, Oikawa M, Mizuno K: Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion. **Mol Biol Cell** 25, 2014, 828-840.
5. Hou X, Katahira T, Ohashi K, Mizuno K, Sugiyama S, Nakamura H: Coactosin accelerates cell dynamism by promoting actin polymerization. **Dev Biol** 379, 2013, 53-63.
6. Saito A, Miyajima K, Akatsuka J, Kondo H, Mashiko T, Kiuchi T, Ohashi K, Mizuno K: CaMKII β -mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neuritogenesis. **Genes Cells** 18, 2013, 533-543.
7. Hayashi A, Hiataru R, Tsuji T, Ohashi K, Mizuno K: p63RhoGEF-mediated formation of a single polarized

lamellipodium is required for chemotactic migration in breast carcinoma cells. **FEBS Lett** 587, 2013, 698-705.

8. Ikeda M, Chiba S, Ohashi K, Mizuno K: Furry protein promotes aurora A-mediated polo-like kinase 1 activation. **J Biol Chem** 287, 2012, 27670-27681.
9. Shoji K, Ohashi K, Sampei K, Oikawa M, Mizuno K: Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction. **Biochem Biophys Res Commun** 424, 2012, 52-57.
10. Ohashi K, Kiuchi T, Shoji K, Sampei K, Mizuno K: Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. **Biotechniques** 52, 2012, 45-50.
11. Ohashi K, Fujiwara S, Watanabe T, Kondo H, Kiuchi T, Sato M, Mizuno K: LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. **J Biol Chem** 286, 2011, 36340-36351.
12. Kiuchi T, Nagai T, Ohashi K, Mizuno K: Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. **J Cell Biol** 193, 2011, 365-380.
13. Ohashi K: Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation. **Develop Growth Differ** 57(4), 2015, 275-290.
14. Ohashi K, Mizuno K: A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. **Methods in Mol Biol** 1174, 2014, 247-262.
15. Kiuchi T, Nagai T, Ohashi K, Watanabe N, Mizuno K: Live-cell imaging of G-actin dynamics using sequential FDAP. **BioArchitecture** 1, 2011, 240-244.

●大谷浩

1. Otani H, Udagawa J, Naito K: Statistical analyses in trials for the comprehensive understanding of organogenesis and histogenesis in humans and mice. **J Biochem** 159(6), 2016, 553-561.
2. Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H: Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Congenit Anom** 56, 2016, 127-134.
3. Jahan E, Rafiq AM, Otani H: *In utero and exo utero* fetal surgery on histogenesis of organs in animals. **World J Surg Proced** 5, 2015, 198-207.
4. Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. **Mol Cell boil** 34, 2014, 3096-3105.
5. Naito K, Notsu A, Udagawa J, Otani H: Statistical analysis with dilatation for development process of human fetuses. **Stat Methods Med Res** 26(1), 2017, 176-200.
6. Jahan E, Matsumoto A, Rafiq AM, Hashimoto R, Inoue T, Udagawa J, Sekine J, Otani H: Fetal jaw movement affects Ihh signaling in mandibular condylar cartilage development: The possible role of Ihh as mechanotransduction mediator. **Archives of Oral Biology** 59, 2014, 1108-1118.
7. Inoue T, Hashimoto R, Matsumoto A, Jahan E, Rafiq AM, Udagawa J, Hatta T, Otani H: *In vivo* analysis of Arg-Gly-Asp sequence/integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated signal involvement in embryonic enchondral ossification by *exo utero* development system. **J Bone Miner Res** 29, 2014, 1554-1563.
8. Liang S, Tanabe K, Niu Y, Otani H: Histological changes in the developing heart of human fetuses. **Shimane J Med Sci** 30, 2013, 1-10.
9. Yamada M, Udagawa J, Hashimoto R, Matsumoto A, Hatta T, Otani H: Interkinetic nuclear migration during early development of midgut and ureteric epithelia. **Anat Sci Int** 88, 2013, 31-37.
10. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Yamashiro C, Hata T, Takegami T, Mogami H, Yamaguchi K, Nakamura T, Otani H, Hatta T, Shoji H: Expression pattern of galectin 4 in rat placentation. **Placenta** 33, 2012, 885-887.
11. Rafiq AM, Udagawa J, Lundth T, Jahan E, Matsumoto A, Sekine J, Otani H: Mathematical analysis of mandibular morphogenesis by micro-CT-based mouse and alizarin red S-stained-based human studies

during development. **Anat Rec** 295, 2012, 313-327.

12. Matsumoto A, Hatta T, Ono A, Hashimoto R, Otani H: Stage-specific changes in the levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the biological fluid and organ of mouse fetuses. **Congenit Anom** 51, 2011, 183-186.
13. Zhang Q, Wang H, Udagawa J, Otani H: Morphological and morphometric study on sphenoid and basioccipital ossification in normal human fetuses. **Congenit Anom** 51, 2011, 138-148.
14. Lundh T, Udagawa J, Hänel SE, Otani H: Cross- and triple-ratios of human body parts during development. **Anat Rec** 294, 2011, 1360-1369.
15. Kawamoto M, Udagawa J, Hashimoto R, Matsumoto A, Yamada M, Nimura M, Otani H. : Adrenocorticotrophic tumor cells transplanted into mouse embryos affect pancreatic histogenesis. **Congenit Anom** 51(2), 2011, 62-69.
16. Simamura E, Shimada H, Shoji H, Otani H, Hatta T: Effects of melanocortins on fetal development. **Congenit Anom** 51, 2011, 47-54.

●南康博

1. Diaz-Horta O, Abad C, Sennaroglu L, Foster II J, DeSmidt A, Bademci G, Tokgoz-Yilmaz S, Duman D, Cengiz F B, Grati M, Fitoz S, Liu X-Z, Farooq A, Imtiaz F, Currall B B, Morton C C, Nishita M, Minami Y, Lu Z, Walz K, Tekin M: ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 113(21), 2016, 5993-5998.
2. Qi X, Okinaka Y, Nishita M, Minami Y: Essential role of Wnt5a-Ror1/Ror2 signaling in metanephric mesenchyme and ureteric bud formation. **Genes Cells** 21, 2016, 325-334.
3. Takiguchi G, Nishita M, Kurita K, Kakeji Y, Minami Y: Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis. **Cancer Sci** 107, 2016, 290-297.
4. Sato A, Kayama H, Shojima K, Matsumoto S, Koyama H, Minami Y, Nojima S, Morii E, Honda H, Takeda K, Kikuchi A: The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. **Scientific Rep** 5, 2015, 10536.
5. Endo M, Nishita M, Fujii M, Minami Y: Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. **Int Rev Cell Mol Biol** 314, 2015, 117-148.
6. Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. **Mol Cell Biol** 34, 2014, 3096-3105.
7. Fukuyo S, Yamaoka K, Sonomoto K, Oshita K, Okada Y, Saito K, Yoshida Y, Kanazawa T, Minami Y, Tanaka Y: IL-6-accelerated calcification by induction of Ror2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. **Rheumatology** 53, 2014, 1282-1290.
8. Li X, Yamagata K, Nishita M, Endo M, Arfian N, Rikitake Y, Emoto N, Hirata K, Tanaka Y, Minami Y: Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. **Genes Cells** 18, 2013, 608-619.
9. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin T J, Minami Y, Takahashi N: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblasts and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat Med** 18, 2012, 405-412.
10. Endo M, Doi R, Nishita M, Minami Y: Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. **J Cell Sci** 125, 2012, 2017-2029.
11. Yamagata K, Li X, Ikegaki S, Oneyama C, Okada M, Nishita M, Minami Y: Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to *matrix metalloproteinase (MMP)-13* expression. **J Biol Chem** 287, 2012, 1588-1599.
12. Endo M, Nishita M, Minami Y: Analysis of Wnt/Planar cell polarity pathway in cultured cells. **Methods Mol Biol** 839, 2012, 201-214.
13. Takahashi S, Watanabe T, Okada M, Inoue K, Ueda T, Takada I, Watabe T, Yamamoto Y, Fukuda T, Nakamura T, Akimoto C, Fujimura T, Hoshino M, Imai Y, Metzger D, Miyazono K, Minami Y, Chambon P, Kitamura T, Matsumoto T, Kato S: Non-canonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor

growth in a mouse model of prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 2011, 4938-4943.

14. Ren D, Minami Y, Nishita M: Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of epidermoid carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Genes Cells** 16, 2011, 304-315.
15. Gao B, Song H, Bishop K, Elliott G, Garrett L, English M A, Andre P, Robinson J, Sood R, Minami Y, Economedes A N, Yang Y: Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. **Dev Cell** 20, 2011, 163-176.

●佐邊壽孝

1. Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam J M, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H: P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. **J Cell Biol** 213, 2016, 81-95.
2. Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, Oya M, Sabe H: Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. **Nat Commun** 7, 2016, 10656.
3. Oneyama C, Yoshikawa Y, Ninomiya Y, Iino T, Tsukita S, Okada M: Fer tyrosine kinase oligomer mediates and amplifies Src-induced tumor progression. **Oncogene** 35, 2016, 501-512.
4. Matsuyama R, Okuzaki D, Okada M, Oneyama C: miR-27b suppresses tumor progression by regulating ARFGEF1 and the focal adhesion signaling. **Cancer Science** 107, 2016, 28-35.
5. Oneyama C, Okada M: MicroRNAs as the fine-tuners of Src oncogenic signaling. **J Biochem** 157, 2015, 431-438.
6. Kakumoto K, Ikeda J, Okada M, Morii E, Oneyama C: mLST8 promotes mTOR-mediated tumor progression. **PLoS One** 10, 2015, e0119015.
7. Tien D N, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N: AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions. **Sci Rep** 4, 2014, 5094.
8. Sato H, Hatanaka K C, Hatanaka Y, Hatakeyama H, Hashimoto A, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H: High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. **Cell Comm Sig** 12, 2014, 17.
9. Kinoshita R, Nam J M, Ito Y M, Hatanaka K C, Hashimoto A, Handa H, Otsuka Y, Hashimoto S, Onodera Y, Hosoda M, Onodera S, Shimizu S, Tanaka S, Shirato H, Tanino M, Sabe H: Co-Overexpression of GEP100 and AMAP1 Proteins Correlates with Rapid Local Recurrence after Breast Conservative Therapy. **PLoS One** 8, 2013, e76791.
10. Nam J M, Ahmed K M, Costes S, Zhang H, Onodera Y, Olshen A B, Hatanaka K C, Kinoshita R, Ishikawa M, Sabe H, Shirato H, Park C C: Beta1-integrin via NF-kappaB signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. **Breast Cancer Res** 15, 2013, R60.
11. Onodera Y, Nam J M, Sabe H: Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. **Pharmacol Ther** 140, 2013, 1-9.
12. Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H, Mochizuki N: Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. **Oncogene** 32, 2013, 5292-5301.
13. Tanaka H, Akagi K, Oneyama C, Tanaka M, Sasaki Y, Kanou T, Lee Y H, Yokogawa D, Dobenecker M W, Nakagawa A, Okada M, Ikegami T: Identification of a new interaction mode between the Src homology 2 (SH2) domain of C-terminal Src kinase (Csk) and Csk-binding protein (Cbp)/phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains (PAG). **J Biol Chem** 288, 2013, 15240-15254.
14. Onodera Y, Nam J M, Hashimoto A, Norman J C, Shirato H, Hashimoto S, Sabe H: Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. **J Cell Biol** 197, 2012, 983-996.
15. Mazaki Y, Nishimura Y, Sabe H: GBF1 bears a novel phosphatidylinositol-phosphate binding module, BP3K, to link PI3K activity with Arf1 activation involved in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis and superoxide production. **Mol Biol Cell** 23, 2012, 2457-2467.
16. Sekino-Suzuki N, Yuyama K, Miki T, Kaneda M, Suzuki H, Yamamoto N, Yamamoto T, Oneyama C, Okada M, Kasahara K: Involvement of gangliosides in the process of Cbp/PAG phosphorylation by Lyn in developing cerebellar growth cones. **J Neurochem** 124, 2012, 514-522.
17. Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, Okada M: MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase is crucial for

- Src-induced tumor progression. **Oncogene** 31, 2012, 1623-1635.
18. Takahashi Y, Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Oneyama C, Okada M: The late endosome/lysosome-anchored p18-mTORC1 pathway controls terminal maturation of lysosomes. **Biochem Biophys Res Commun** 417, 2012, 1151-1157.
 19. Yamagata K, Li X, Ikegaki S, Oneyama C, Okada M, Nishita M, Minami Y: Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP-13) expression. **J Biol Chem** 287, 2012, 1588-1599.
 20. Li J, Malaby A W, Famulok M, Sabe H, Lambright D G, Hsu V W: Grp1 plays a key role in linking insulin signaling to glut4 recycling. **Dev Cell** 22, 2012, 1286-1298.
 21. Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, Okada M: MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase is crucial for Src-induced tumor progression. **Oncogene** 31, 2012, 1623-1635.
 22. Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, Morii E, Okumura M, Aozasa K, Okada M: MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. **Oncogene** 30, 2011, 3489-3501.
 23. Kuroiwa M, Oneyama C, Nada S, Okada M: The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. **J Cell Sci** 124, 2011, 1726-1738.
 24. Suzuki K, Oneyama C, Kimura H, Tajima S, Okada M: Downregulation of the tumor suppressor Cbp/PAG1 is mediated by epigenetic histone modifications via the MAPK/PI3K pathway. **J Biol Chem** 286, 2011, 15698-15706.
 25. Kanou T, Oneyama C, Kawahara K, Okimura A, Ohta M, Ikeda N, Shintani Y, Okumura M, Okada M: The transmembrane adaptor Cbp/PAG1 controls the malignant potential of human non-small cell lung cancers that have c-src upregulation. **Mol Cancer Res** 9, 2011, 103-114.
 26. Wakayama Y, Miura K, Sabe H, Mochizuki N: EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of Madin-Darby canine kidney cells by inactivating ezrin through negative regulation of RhoA. **J Biol Chem** 286, 2011, 44243-44253.
 27. Menju T, Hashimoto S, Hashimoto A, Otsuka Y, Handa H, Ogawa E, Toda Y, Wada H, Date H, Sabe H: Engagement of Overexpressed Her2 with GEP100 Induces Autonomous Invasive Activities and Provides a Biomarker for Metastases of Lung Adenocarcinoma. **PLoS One** 6, 2011, e25301.
 28. Hashimoto A, Hashimoto S, Ando R, Noda K, Ogawa E, Kotani H, Hirose M, Menju T, Morishige M, Manabe T, Toda Y, Ishida S, Sabe H: GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. **PLoS One** 6, 2011, e23359.
 29. Sabe H: Cancer early dissemination: cancerous epithelial-mesenchymal transdifferentiation and transforming growth factor β signalling. **J Biochem** 149, 2011, 633-639.

【論文発表】(公募研究 24 年度～平成 25 年度) (すべて査読あり)

●西森克彦

1. Koizumi M, Oyama K, Yamakami Y, Kida T, Satoh R, Kato S, Hidema S, Oe T, Goto T, Clevers H, Nawa A, Nishimori K: Lgr4 Controls Specialization of Female Gonads in Mice. **Biol Reprod** 93(4), 2015, 90.
2. Ihara K, Asanuma K, Fukuda T, Ohwada S, Yoshida M, Nishimori K: MAGI-2 is Critical for the Formation and Maintenance of the Glomerular Filtration Barrier in Mouse Kidney. **American Journal of Pathology** 184, 2014, 2699-2708.
3. Kida T, Oyama K, Sone M, Koizumi M, Hidema S, Nishimori K: Lgr4 is required for endometrial receptivity acquired through ovarian hormone signaling. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 78, 2014, 1813-1816.
4. Donai K, Kuroda K, Guo Y, So K-H, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K and Fukuda T: Establishment of a Reporter System to Monitor Silencing Status in induced Pluripotent Stem Cell Lines. **Anal Biochem** 443, 2013, 104-112.
5. Sone M, Oyama K, Mohri Y, Hayashi R, Clevers H Nishimori K: LGR4 expressed in uterine epithelium is necessary for uterine gland development and contributes to decidualization in mice. **The FASEB Journal** 27, 2013, 1-12.
6. Ihara K, Nishimura T, Fukuda T, Ookura T, Nishimori K: Generation of Venus reporter knock-in mice revealed MAGI-2 expression patterns in adult mice. **Gene Expr Patterns** 12, 2012, 95-101.
7. Mohri Y, Oyama K, Sone M, Akamatsu A, Nishimori K: LGR4 is required for the cell survival of the peripheral mesenchyme at the embryonic stages of nephrogenesis. **Biosci Biotechnol Biochem** 76, 2012, 888-891.

●山城佐和子

1. Watanabe N, Yamashiro S, Vavylonis D, Kiuchi T: Molecular viewing of actin polymerizing actions and beyond: Combination analysis of single-molecule speckle microscopy with modeling, FRAP and s-FDAP (sequential fluorescence decay after photoactivation). **Dev Growth Differ** 55, 2013, 508-514.
2. Yamashiro S, Gokhin D S, Kimura S, Nowak R B, Fowler V M: Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. **Cytoskeleton** 69, 2012, 337-370.
3. Cox-Paulson E A, Walck-Shannon E, Lynch A M, Yamashiro S, Zaidel-Bar R, Eno C C, Ono S, Hardin J: Tropomodulin protects α -catenin-dependent junctional-actin networks under stress during epithelial morphogenesis. **Curr Biol** 22, 2012, 1500-1505.

●中村哲也

1. Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Søndergaard C, Madgwick A, Schweiger P J, Nielsen O H, Vallier L, Pedersen R A, Nakamura T, Watanabe M, Jensen K B: Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. **Cell Stem Cell** 13(6), 2013, 734-744.
2. Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. **Biochem Biophys Res Commun** 419(2), 2012, 238-243.
3. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. **Nat Med** 18(4), 2012, 618-623.

●松本邦弘

1. Kedashiro S, Pastuhov SI, Nishioka T, Watanabe T, Kaibuchi K, Matsumoto K, and Hanafusa H. LRRK1-phosphorylated CLIP-170 regulates EGFR trafficking by recruiting p150Glued to microtubule plus ends. **J Cell Sci** 128, 2015, 385-396.

●池ノ内順一

1. Ikenouchi J, Hirata M, Yonemura S, Umeda M: Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. **J Cell Sci** 126(Pt 16), 2013, 3585-3592.
2. Area-Gomez E, Lara Castillo M, Tambini M, Guardia-Laguarta C, Ad J C de Groof, Madra M, Ikenouchi J, Umeda M, Bird T, Sturley S, and Schon E: Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. **EMBO J** 31(21), 2012, 4106-4123.

●吉村信一郎

1. Nakajo A, Yoshimura S, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A: EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. **J Cell Biol** 212(3), 2016, 297-306.
2. Gerondopoulos A, Bastos R N, Yoshimura S, Anderson R, Carpanini S, Aligianis I, Handley M T, Barr F A: Rab18 and a Rab18 GEF complex are required for normal ER structure. **J Cell Biol** 205(5), 2014, 707-720.
3. Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A: Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine. **Biol Open** 4(1), 2014, 86-94.
4. Linford A, Yoshimura S, Bastos R N, Langemeyer L, Gerondopoulos A, Rigden D J, Barr F A: Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. **Dev Cell** 22(5), 2012, 952-966.
5. Longatti A, Lamb C A, Razi M, Yoshimura S, Barr F A, Tooze S A: TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. **J Cell Biol** 197(5), 2012, 659-675.

●平島正則

1. Majima T, Takeuchi K, Sano K, Hirashima M, Okamoto M T, Ishizaki H, Miyoshi J, Ogita H: An adaptor molecule Afadin regulates lymphangiogenesis by modulating RhoA activity in the developing mouse embryo. **PLoS One** 8(6), 2013, e68134.
2. Katsuta H, Fukushima Y, Maruyama K, Hirashima M, Nishida K, Nishikawa S I, Uemura A: EphrinB2-EphB4 signals regulate formation and maintenance of funnel-shaped valves in corneal lymphatic capillaries. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 54(6), 2013, 4102-4108.
3. Ikushima Y M, Arai F, Nakamura Y, Hosokawa K, Kubota Y, Hirashima M, Toyama H, Suda T: Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun** 430(1), 2013, 20-25.

4. Kusuhara S, Fukushima Y, Fukuhara S, Jakt L M, Okada M, Shimizu Y, Hata M, Nishida K, Negi A, Hirashima M, Mochizuki N, Nishikawa S, Uemura A: Arhgef15 Promotes Retinal Angiogenesis by Mediating VEGF-Induced Cdc42 Activation and Potentiating RhoJ Inactivation in Endothelial Cells. **PLoS One** (9), 2012, e45858.
5. Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y: Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. **J Biol Chem** 287(26), 2012, 22241-22252.
6. Sano K, Katsuta O, Shirae S, Kubota Y, Ema M, Suda T, Nakamura M, Hirashima M: Flt1 and Flk1 mediate regulation of intraocular pressure and their double heterozygosity causes the buphthalmia in mice. **Biochem Biophys Res Commun** 420(2), 2012, 422-427.

●谷水直樹

1. Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T: Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. **J Cell Sci** 126, 2013, 5239-5246.
2. Kiyohashi K, Kaminuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kasuno-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. **Hepatology** 57, 2013, 2502-2513.
3. Tanimizu N, Mitaka T: Role of Grainyhead-like 2 in the formation of functional tight junctions. **Tissue Barriers Commentaries** 1(1), 2013, e23495.
4. Senga K, Mitaka T, Mostov K E, Miyajima A, Tanimizu N: Grhl2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through upregulation of Cldn3, Cldn4, and Rab25. **Mol Cell Biol** 23, 2012, 2845-2855.
5. Tanimizu N, Kikkawa Y, Mitaka T, and Miyajima A: α 1- and α 5-containing Laminins Regulate the Development of Bile Ducts via β 1 Integrin Signals. **J Biol Chem** 287, 2012, 28586-28597.

●芝大

1. Fukui H, Shiba D, Asakawa K, Kawakami K, Yokoyama T: The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. **FEBS Lett** 586(16), 2012, 2273-2279.
2. Shiba D, Yokoyama, T: The ciliary transitional zone and nephrocystins. **Differentiation** 83, 2012, S91-S96.

●堀田耕司

1. Yokoyama T D, Hotta K, Oka K: Comprehensive Morphological Analysis of Individual Peripheral Neuron Dendritic Arbors in Ascidian Larvae using the Photoconvertible Protein Kaede. **Dev Dyn** 243(10), 2014, 1362-1373.
2. Nakamura M J, Hotta K, Oka K: Raman spectroscopic imaging of the whole *Ciona intestinalis* embryo during development. **PLoS One** 8(8), 2013, e71739.
3. Nakamura M J, Terai J, Okubo R, Hotta K, Oka K: Three-dimensional anatomy of the *Ciona intestinalis* tailbud embryo at single-cell resolution. **Dev Biol** 372(2), 2012, 274-284.

●中村暢宏

1. Ishida R, Yamamoto A, Nakayama K, Sohda M, Misumi Y, Yasunaga T Nakamura N: GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. **FEBS J** 282, 2015, 2232–2244.
2. Soonthornsit J, Yamaguchi Y, Tamura D, Ishida R, Nakakoji Y, Osako S, Yamamoto A and Nakamura N: Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. **Exp Cell Res** 328, 2014, 325–339.

●北舘祐

1. Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo M M, Sugiyama F, Ogawa T, Kobayashi S, Ueno N, Takahashi S, Takada S, Yoshida, S: SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/beta-catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. **Stem Cell Reports** 8, 2017, 561-575.

●永樂元次

1. Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M, Sasai Y: Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. **Proc Natl Acad Sci USA** 110(50), 2013, 20284-20289.

2. Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Sasai Y, Adachi T: Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance. **J Biomech** 46(10), 2013, 1705-1713.
3. Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Sasai Y, Adachi T: Modeling cell proliferation for simulating three-dimensional tissue morphogenesis based on a reversible network reconnection framework. **Biomech Model Mechanobiol** 12(5), 2013, 987-996.
4. Sasai Y, Eiraku M, Suga H: In vitro organogenesis in three dimensions: self-organising stem cells. **Development**. 139(22), 2012, 4111-4121.
5. Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Sasai Y, Adachi T: Reversible network reconnection model for simulating large deformation in dynamic tissue morphogenesis. **Biomech Model Mechanobiol** 12(4), 2012, 627-644.
6. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, Eiraku M, Sasai Y: Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. **Cell Stem Cell** 10(6), 2012, 771-785.
7. Eiraku M, Sasai Y: Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. **Curr Opin Neurobiol** 22(5), 2012, 768-777.
8. Eiraku M, Sasai Y: Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. **Nat Protoc** 7(1), 2011, 69-79.

●加藤洋人

1. Katoh H, Fujita Y: Epithelial homeostasis: elimination by live cell extrusion. **Curr Biol** 22(11), 2012, R453-445.

●阿部宏之

1. Watanabe Y, Takakura K, Kurotani R, Abe H: Optical coherence tomography imaging for analysis of follicular development in ovarian tissue. **Applied Optics** 54(19), 2015, 6111-6115.
2. Cai Y, Yoneda M, Tomita T, Kurotani R, Okamoto M, Kido T, Abe H, Mitzner W, Guha A, Kimura S: Transgenically-expressed secretoglobin 3A2 accelerates resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **BMC Pulmonary Medicine** 15, 2015, 72-84.
3. Kurotani R, Shima R, Miyano Y, Sakahara S, Matsumoto Y, Shibata Y, Abe H, Kimura S: SCGB3A2 inhibits acrolein-induced apoptosis through decreased p53 phosphorylation. **Acta Histochemica et Cytochemica** 48(2), 2015, 61-68.
4. Sakagami N, Nishida K, Akiyama K, Abe H, Hoshi H, Suzuki C, Yoshioka K: Relationships between oxygen consumption rate, viability and subsequent development of in vivo-derived porcine embryos. **Theriogenology** 83, 2015, 14-20.
5. Miyano Y, Tahara S, Sakata I, Sakai T, Abe H, Kimura S, Kurotani R: Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland. **Cell Tiss Res** 356, 2014, 253-260.
6. Hirobe T, Ito S, Wakamatsu K, Kawa Y, Abe H: Mouse brown (b/Tyrp1^b) allele inhibits eumelanin but not pheomelanin synthesis. **Zool Sci** 31, 2014, 53-63.
7. Hoshino S, Kurotani R, Koike K, Maruyama M, Ishikawa F, Abe H, Sakai T: Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in a paracrine manner in the pituitary gland. **Zool Sci** 31, 2014, 390-397.
8. Yoshida H, Abe H, Arima T: Quality evaluation of IVM embryo and imprinting genes of IVM babies. **J Assit Reprod Genet** 30(2), 2013, 221-225.
9. Kumasako Y, Goto K, Koike M, Araki Y, Abe H, Utsunomiya T: Respiration activity of single blastocysts measured by scanning electrochemical microscopy: The relationship between pre-freezing and post-warming. **J Mamm Ova Res** 30(1), 2013, 30-35.

●紙谷聡英

1. Yanagida A, Mizuno N, Yamazaki Y, Kato-Itoh M, Umino A, Sato H, Ito K, Yamaguchi T, Nakauchi H, Kamiya A: Investigation of bipotent differentiation of hepatoblasts using inducible diphtheria toxin receptor-transgenic mice. **Hepato Res** 46 (8), 2016, 816-826.
2. Chikada H, Ito K, Yanagida A, Nakauchi H, Kamiya A: The basic helix-loop-helix transcription factor, *Mist1*, induces maturation of mouse fetal hepatoblasts. **Sci Rep** 12, 2015, 14989.
3. Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Chikada H, Iwama A, Nakauchi H: MEK-ERK activity regulates the proliferative activity of fetal hepatoblasts through accumulation of p16/19cdkn2a. **Stem Cells Dev** 24, 2015, 2525-2535.
4. Yanagida A, Chikada H, Ito K, Umino A, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Sato H, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nakayama KI, Nakauchi H, Kamiya A: Liver maturation deficiency in p57Kip2^{-/-} mice occurs in a hepatocytic p57Kip2 expression-independent manner. **Dev Biol** 407, 2015, 331-343.

5. Tsuruya K, Chikada H, Ida K, Anzai K, Kagawa Y, Inagaki Y, Mine T, and Kamiya A: A paracrine mechanism accelerating expansion of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells. **Stem Cell Dev** 24, 2015, 1691-1702.
 6. Ito K, Yamazaki S, Yamamoto R, Tajima Y, Yanagida A, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Kakuta S, Iwakura Y, Nakauchi H, Kamiya A: Gene Targeting Study Reveals Unexpected Expression of Brain expressed X-linked 2 in Endocrine and Tissue Stem/progenitor Cells in Mice. **J Biol Chem** 2289, 2014, 29892-29911.
 7. Ito K, Yanagida A, Okada K, Yamazaki Y, Nakauchi H, Kamiya A: Mesenchymal progenitor cells in mouse fetal liver regulate differentiation and proliferation of hepatoblasts. **Liver Int** 34, 2014. 1378-1390.
 8. Yanagida A, Ito K, Chikada H, Nakauchi H, Kamiya A: An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. **PLoS One** 8, 2013, e67541.
 9. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. **Hepatology** 57, 2013, 2502-2513.
 10. Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, Chikada H, Hyuck A D, Yamazaki Y, Wauthier E, Tajiri H, Miller LD, Wang XW, Reid LM, Nakauchi H: Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. **Hepatology** 57, 2013, 1469-1483.
 11. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. **Hepatology** 57, 2013, 2502-2513.
 12. Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee Y S, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H: Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming. **PLoS One** 7, 2012, e41007.
 13. Okada K, Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Ito H, Kondou H, Nishina H, Nakauchi H: Prospective Isolation and Characterization of Bipotent Progenitor Cells in Early Mouse Liver Development. **Stem Cells Dev** 21, 2012, 1124-1133.
 14. Ito H, Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Okada K, Nakauchi H: In vitro expansion and functional recovery of mature hepatocytes from mouse adult livers. **Liver Int** 32, 2012, 592-601.
- 川崎善博
1. Furukawa S, Kawasaki Y, Miyamoto M, Hiyoshi M, Kitayama J, Akiyama T: The miR-1-Notch3-Asef pathway is important for colorectal tumor cell migration. **PLoS One** 8, 2013, e80609.
 2. Kawasaki Y, Furukawa S, Sato R, Akiyama T: Differences in the localization of the adenomatous polyposis coli-Asef/Asef2 complex between adenomatous polyposis coli wild-type and mutant cells. **Cancer Sci** 104, 2013, 1135-1138.
- 伊藤暢
1. Takase H M, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, Miyajima A: FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. **Genes Dev** 27(2), 2013, 169-181.
- 浅岡洋一
1. Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens S F, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld J B, Link B A, Senga T, Castillo-Morales A, Urrutia A O, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, Heisenberg C P, Furutani-Seiki M: YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. **Nature** 521, 2015, 217-221.
 2. Asaoka Y, Hata S, Namae M, Furutani-Seiki M, Nishina H: The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. **PLoS ONE** 9, 2014, e97365.
 3. Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H: The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. **Dis Model Mech** 6, 2013, 905-914.
- 鈴木聡
1. Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki S O, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-ya K, Mimori K, Suzuki A: Dysregulated YAP1/TAZ and TGF-beta signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 113(1), 2016, E71-80.
 2. Hikasa H, Sekido Y, Suzuki A: Merlin/NF2-Lin28B-let-7 is a novel tumor-suppressive pathway that is cell

density-dependent and Hippo-independent **Cell Rep** 14(12), 2016, 2950-2961.

3. Murata Y, Kotani T, Supriatna Y, Kitamura Y, Imada S, Kawahara K, Nishio M, Daniwijaya E W, Sadakata H, Kusakari S, Mori M, Kanazawa Y, Saito Y, Okawa K, Takeda-Morishita M, Okazawa H, Ohnishi H, Azuma T, Suzuki A, Matozaki T: Protein tyrosine phosphatase SAP-1 protects against colitis through regulation of CEACAM20 in the intestinal epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A** 112(31), 2015, E4264-E4271.
4. Takahashi Y, Sheridan P, Niida A, Sawada G, Uchi R, Mizuno H, Kurashige J, Sugimachi K, Sasaki S, Shimada Y, Hase K, Kusunoki M, Kudo S, Watanabe M, Yamada K, Sugihara K, Yamamoto H, Suzuki A, Doki Y, Miyano S, Mori M, Mimori K: The AURKA/TPX2 axis drives colon tumorigenesis cooperatively with MYC. **Ann Oncol** 26(5), 2015, 935-942.
5. Nagahama Y, Sone M, Chen X, Okada Y, Yamamoto M, Xin B, Matsuo Y, Komatsu M, Suzuki A, Enomoto K, Nishikawa Y: Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injury. **Am J Pathol** 184(11), 2014, 3001-3012.
6. Maehama T, Kawahara K, Nishio M, Suzuki A, Hanada K: Nucleolar Stress Induces Ubiquitination-Independent Proteasomal Degradation of PICT1. **J Biol Chem** 289(30), 2014, 20802-20812.
7. Okamura K, Takayama K, Kawahara K, Harada T, Nishio M, Otsubo K, Ichijo K, Kohno M, Iwama E, Fujii A, Ota K, Koga T, Okamoto T, Suzuki A, Nakanishi Y: PICT1 expression is a good prognostic factor in non-small cell lung cancer. **Oncoscience** 1(5), 2014, 375-382.
8. Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Uchiwa H, Aoki Y, Yasuoka S, Anegawa T, Mishina Y, Suzuki A, Fukumoto Y, Imaizumi T: BMP type I Receptor Inhibition Attenuates Endothelial Dysfunction in Mice with Chronic Kidney Disease. **Kidney Int** 87(1), 2014, 128-136.
9. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, Yamamoto M: Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. **Mol Cell Biol** 34(5), 2014, 900-913.
10. Sugimachi K, Yokobori T, Iinuma H, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Suzuki A, Maehara Y, Mori M, Mimori K: Aberrant Expression of Plastin-3 Via Copy Number Gain Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Circulating Colorectal Cancer Cells. **Ann Surg Oncol** 21(11), 2014, 3680-3690.
11. Dong Y, Sui L, Yamaguchi F, Kamitori K, Hirata Y, Hossain M A, Noguchi C, Katagi A, Nishio M, Suzuki A, Tokuda M: The expression of PTEN in the development of mouse cochlear lateral wall. **Neuroscience** 258(1), 2014, 263-269.
12. Uchi R, Kogo R, Kawahara K, Sudo T, Yokobori T, Eguchi H, Sugimachi K, Maehama T, Mori M, Suzuki A, Komune S, Mimori K: PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression. **Br J Cancer** 109(8), 2013, 2199-2206.
13. Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, Ueo H, Uchi R, Matsumura T, Takano Y, Sawada G, Takahashi Y, Mima K, Kurashige J, Akiyoshi S, Iwaya T, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Suzuki A, Wakabayashi G, Mori M, Mimori K: Clinical Significance of PICT1 in Patients of Hepatocellular Carcinoma with Wild-Type TP53. **Ann Surg Oncol Suppl** 3, 2013, S537-544.
14. Takasuga S, Horie Y, Sasaki J, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Sato Y, Chida S, Kotani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T: Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 110(5), 2013, 1726-1731.
15. Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki SO, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, Suzuki A: Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice. **J Clin Invest** 122(12), 2012, 4505-4518.
16. Miyoshi K, Yanagi S, Kawahara K, Nishio M, Tsubouchi H, Imazu Y, Koshida R, Matsumoto N, Taguchi A, Yamashita S, Suzuki A, Nakazato M: Epithelial Pten controls acute lung Injury and fibrosis by regulating alveolar epithelial cell integrity. **Am J Respir Crit Care Med** 187(3), 2012, 262-275.

●西中村隆一

1. Terabayashi T, Sakaguchi M, Shinmyozu K, Ohshima T, Johjima A, Ogura T, Miki H, Nishinakamura R: Phosphorylation of Kif26b promotes its polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation during kidney development. **PLoS One** 7(6), 2012, e39714.

●谷口喜一郎

1. Okumura T, Takeda K, Kuchiki M, Akaishi M, Taniguchi K, Adachi-Yamada T: GATAe regulates intestinal stem cell maintenance and differentiation in Drosophila adult midgut. **Dev Biol** 410(1), 2016,

24-35.

2. Taniguchi K, Kokuryo A, Imano T, Minami R, Nakagoshi H, Adachi-Yamada T: Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of Drosophila male accessory gland cells. **BMC Dev Biol** 14(1), 2014, 46.
3. Okumura T, Takeda K, Taniguchi K, Adachi-Yamada T: β v integrin inhibits chronic and high level activation of JNK to repress senescence phenotypes in Drosophila adult midgut. **PLoS One** 9(2), 2014, e89387.
4. Nakamura M, Matsumoto K, Iwamoto Y, Muguruma T, Nakazawa N, Hatori R, Taniguchi K, Maeda R, Matsuno K: Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of pebble, encoding a RhoGEF, in Drosophila embryos. **Mech Dev** 130(2-3), 2013, 169-180.
5. Nakazawa N, Taniguchi K, Okumura T, Maeda R, Matsuno K, A novel Cre/loxP system for mosaic gene expression in the Drosophila embryo. **Dev Dyn** 241(5), 2012, 965-974.
6. Minami R, Wakabayashi M, Sugimori S, Taniguchi K, Kokuryo A, Imano T, Adachi-Yamada T, Watanabe N, Nakagoshi H: The homeodomain protein defective proventriculus is essential for male accessory gland development to enhance fecundity in Drosophila. **PLoS One** 7(3), 2012, e32302.
7. Kuroda J, Nakamura M, Yoshida M, Yamamoto H, Maeda T, Taniguchi K, Nakazawa N, Hatori R, Ishio A, Ozaki A, Shimaoka S, Ito T, Iida H, Okumura T, Maeda R, Matsuno K, Canonical Wnt signaling in the visceral muscle is required for left-right asymmetric development of the Drosophila midgut. **Mech Dev** 128(11-12), 2012, 625-639.

●佐藤俊朗

1. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Ohta Y, Nanki K, Kawasaki K, Nakazato Y, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T: A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements. **Cell Stem Cell** 18(6), 2016, 827-838.
2. Saito Y, Nakaoka T, Sakai K, Muramatsu T, Toshimitsu K, Kimura M, Kanai T, Sato T, Saito H: Inhibition of DNA Methylation Suppresses Intestinal Tumor Organoids by Inducing an Anti-Viral Response. **Sci Rep** 6, 2016, 25311.
3. Oudhoff M J, Braam M J S, Freeman S A, Wong D, Rattray D G, Want J, Antignano F, Snyder K, Refaeli I, Hughes M R, McNagny K M, Gold M R, Arrowsmith CH, Sato T, Rossi F M V, Tatlock J T, Owen D, Brown PJ, Zaph C: SETD7 controls intestinal regeneration and tumorigenesis by regulating Wnt/beta-catenin and Hippo/YAP signaling. **Developmental Cell** 37, 2016, 47-57.
4. Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, Sato T, Takagi J: Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ α -albumin. **eLife** 5, 2016, e11621.
5. Nakajo A, Yoshimura SI, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A: EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. **J Cell Biol** 212, 2016, 297-306.
6. Fujii M, Matano M, Nanki K, Sato T. Efficient gene engineering of human intestinal organoid using electroporation. **Nature protocol** 10, 2015, 1474-1485.
7. Seishima R, Wada T, Tsuchihashi K, Okazaki S, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Sato T, Hasegawa H, Kitagawa Y, Goldenring JR, Saya H, Nagano O: Ink4a/Arf-dependent Loss of Parietal Cells Induced by Oxidative Stress Promotes CD44-dependent Gastric Tumorigenesis. **Cancer Prev Res** 8. 2015, 492-501.
8. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T: Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. **Nature Medicine** 21, 2015, 256-262.
9. Oshima H, Nakayama M, Han T S, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo M M, Oshima M: Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. **Cancer Res** 75, 2015, 766-776.
10. Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T: An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. **Integr Biol (Camb)** 7(2), 2015, 213-228.
11. Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J: Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. **Nat Commun** 11(5), 2014, 5727.

●清川悦子

1. Hirata E, Kiyokawa E: Future Perspective of Single-Molecule FRET Biosensors and Intravital FRET Microscopy. **Biophys J** 111(6), 2016, 1103-1111.

- Mori Y, Yagi S, Sakurai A, Matsuda M., Kiyokawa E: Insufficient ability of Rac1b to perturb cystogenesis. **Small GTPases** 4(1), 2013, 9-15.
- Yagi S, Matsuda M, Kiyokawa E: Chimaerin suppresses Rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. **PLOS ONE** 7(12), 2012, e52258.
- Sakurai A, Matsuda M, Kiyokawa E: Activated ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby canine kidney cystogenesis. **J Biol Chem** 287(38), 2012, 31703-31711.

●山越貴水

- Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, Ohtani N, Hara E, Maruyama M: Dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. **Aging Cell** 14(4), 2015, 616-624.

【論文発表】(公募研究 26 年度～平成 27 年度) (すべて査読あり)

●中村哲也

- Nozaki K, Mochizuki W, Matsumoto Y, Matsumoto T, Fukuda M, Mizutani T, Watanabe M, Nakamura T: Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. **J Gastroenterol** 51, 2016, 206-213.
- Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, Nakamura T: Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. **Genes Dev** 28, 2014. 1752-1757.
- Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Søndergaard C, Madgwick A, Schweiger PJ, Nielsen OH, Vallier L, Pedersen RA, Nakamura T, Watanabe M, Jensen KB: Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. **Cell Stem Cell** 13, 2013, 734-744.

●松本邦弘

- Hanafusa H, Matsumoto K: LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. **Cell Cycle** 14, 2015, 3349-3350.
- Hanafusa H, Kedashiro S, Tezuka M, Funatsu M, Usami S, Toyoshima F, Matsumoto K: PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. **Nat Cell Biol** 17, 2015, 1024-1035.

●木岡紀幸

- Tomiyama L, T Sezaki, M Matsuo, K Ueda, N Kioka: Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation. **Oncogene** 34, 2015, 1141-1149.
- Chiba T, Sakurada T, Watanabe R, Yamaguchi K, Kimura Y, Kioka N, Kawagishi H, Matsuo M, Ueda K: Fomiroid A, a Novel Compound from the Mushroom *Fomitopsis nigra*, Inhibits NPC1L1-Mediated Cholesterol Uptake via a Mode of Action Distinct from That of Ezetimibe. **PLOS One** 9, 2014, e116162.

●山城佐和子

- Yamashiro S, Watanabe N: An easy-to-use single-molecule speckle microscopy enabling nanometer-scale flow and wide-range lifetime measurement of cellular actin filaments. **Methods Cell Biol** 125, 2015, 43-59.
- Yamashiro S, Mizuno H, Smith M B, Ryan G L, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N: New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. **Mol Biol Cell** 25, 2014, 1010-1024.
- Yamashiro S, Gokhin D S, Sui Z, Bergeron S E, Rubenstein P A, Fowler V M: Differential actin-regulatory activities of tropomodulin1 and tropomodulin3 with diverse tropomyosin and actin isoforms. **J Biol Chem** 289, 2014, 11616-11629.
- Yamashiro S, Watanabe N: A new link between the retrograde actin flow and focal adhesions. **J Biochem** 156, 2014, 239-248.
- Lewis R A, Yamashiro S, Gokhin D S, Fowler V M: Functional effects of mutations in the tropomyosin-binding sites of tropomodulin1 and tropomodulin3. **Cytoskeleton** 71, 2014, 395-411.

●大澤志津江

- Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T: JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity. **Dev Biol** 403, 2015, 162-171.
- Nakamura M, Ohsawa S (equal contribution), Igaki T: Mitochondrial defects trigger proliferation of neighboring cells via senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. **Nat Commun** 5, 2014, 5264.
- Takino K, Ohsawa S (equal contribution), Igaki T: Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*. **Dev Biol** 395, 2014, 19-28.

4. Ohsawa S, Takemoto D, Igaki T: Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic cooperation. **J Biochem** 156, 2014.129-136.

●池ノ内順一

1. Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, and Ikenouchi J: A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 113(13), 2016, E1863-1871.
2. Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J: CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. **Sci Rep** 5, 2015, 13262.
3. Arita Y, Nishimura S, Ishitsuka R, Kishimoto T, Ikenouchi J, Ishii K, Umeda M, Matsunaga S, Kobayashi T, Yoshida M: Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by theonellamides modulates cell membrane order and cell shape. **Chem Biol** 22(5), 2015, 604-610.
4. Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J, Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa S, Fujita Y. EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells. **J Cell Sci** 128(4), 2015, 781-789.
5. Oda Y, Otani T, Ikenouchi J, Furuse M. Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42. **J Cell Sci** 127(Pt 19), 2014, 4201-4212.

●今村寿子

1. Fumoto K, Takigawa-Imamura H, Sumiyama K, Kaneiwa T, Kikuchi A: Modulation of apical constriction by Wnt signal is required for the lung epithelial shape transition. **Development** 144(1), 2017, 151-162.
2. Takumi H, Takigawa-Imamura H, Akita K, Kutsuna N, Kobayashi R, Hasezawa S, Miura T. Exogenous cellulase switches cell interdigitation to cell elongation in a RIC1-dependent manner in Arabidopsis thaliana cotyledon pavement cells. **Plant Cell Physiol** 2016, E-00504.
3. Takigawa-Imamura H, Morita R, Iwaki T, Tsuji T, Yoshikawa K. Tooth germ invagination from cell-cell interaction: Working hypothesis on mechanical instability. **J Theor Biol** 382, 2015, 284-291.
4. Hayashi T, Takigawa-Imamura H, Nishiyama K, Shintaku H, Kotera H, Miura T, Yokokawa R. Vascular network formation for a long-term spheroid culture by co-culturing endothelial cells and fibroblasts. **MEMS** 2015, 2015, 476-479.

●佐々木洋

1. Mamada H, Sato T, Ota M, Sasaki H: Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc. **J Cell Sci** 128, 2015, 790-803.
2. Wicklow E, Blij S, Frum R, Hirate Y, Lang R A, Sasaki H, Ralston A: HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. **PLoS Genet** 10, 2014, e1004618.
3. Rayon T, Menchero S, Nieto A, Xenopoulos P, Crespo M, Cockburn K, Cañon S, Sasaki H, Hadjantonakis A K, de la Pompa J L, Rossant J, Manzanares M: Notch and hippo converge on cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. **Dev Cell** 30, 2014, 410-422.
4. Imuta Y, Koyama H, Shi D, Eiraku M, Fujimori T, Sasaki H: Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos. **Mech Dev** 132, 2014, 44-58.
5. Sasaki H: Position- and polarity-dependent Hippo signaling regulates cell fates in preimplantation mouse embryos. **Semin Cell Dev Biol** (invited review), 47-48, 2015, 80-87.
6. Hirate Y, Sasaki H: The role of angiomin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development. **Tissue Barriers** (invited review) 2, 2014, e28127.

●森本充

1. Noguchi M, Sumiyama K, Morimoto M: Directed migration of pulmonary neuroendocrine cells toward airway branches organizes the stereotypic location of neuroepithelial bodies. **Cell Rep** 13, 2015, 2679-2686.
2. Liu Z, Brunskill E, Varnum-Finney B, Zhang C, Zhang A, Jay PY, Bernstein I, Morimoto M, Kopan R: The intracellular domains of Notch1 and Notch2 are functionally equivalent during development and carcinogenesis. **Development** 142, 2015, 2451-2463.
3. Tsao P, Matsuoka C, Wei SC, Sato A, Sato S, Chena HK, Ling TY, Mori M, Cardoso WV, Morimoto M: Epithelial Notch signaling regulates lung alveolar morphogenesis and airway epithelial integrity. **Proc Natl Acad Sci USA** 113, 2016, 8242-8247.

●永樂元次

1. Sakakura E, Eiraku M, Takata N. Specification of embryonic stem cell-derived tissues into eye fields by Wnt signaling using rostral diencephalic tissue-inducing culture. **Mech Dev** 141, 2016, 90-99.
2. Ozone C, Suga H, Eiraku M, Kadoshima T, Yonemura S, Takata N, Oiso Y, Tsuji T, Sasai Y. Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. **Nat Commun.** 7, 2016, 10351.

3. Shirai H, Mandai M, Matsushita K, Kuwahara A, Yonemura S, Nakano T, Assawachananont J, Kimura T, Saito K, Terasaki H, Eiraku M, Sasai Y, Takahashi M: Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A** 113(1), 2016, E81-90.
4. Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M, Takahashi J, Eiraku M, Sasai Y: Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. **Nat Commun** 6, 2015, 8896.
5. Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Adachi T, Sasai Y: Modeling cell apoptosis for simulating three-dimensional multicellular morphogenesis based on a reversible network reconnection framework. **Biomech Model Mechanobiol** 15(4), 2015, 805-816.
6. Kuwahara A, Ozone C, Nakano T, Saito K, Eiraku M, Sasai Y: Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. **Nat Commun** 6, 2015, 6286.
7. Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Adachi T, Sasai Y: Vertex dynamics simulations of viscosity-dependent deformation during tissue morphogenesis. **Biomech Model Mechanobiol** 14(2), 2015, 413-425.
8. Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, Yamada C, Eiraku M, Yonemura S, Sasai Y, Takahashi M: Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice. **Stem Cell Reports** 2(5), 2014, 662-674.

● 昆俊亮

1. Yamamoto S, Yako Y, Fujioka Y, Kajita M, Kameyama T, Kon S, Ishikawa S, Ohba Y, Ohno Y, Kihara A, Fujita Y: A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P) - S1P receptor 2 pathway in Epithelial Defense Against Cancer (EDAC). **Mol Biol Cell** 27(3), 2016, 491-499.
2. Yamauchi H, Matsumaru T, Morita T, Ishikawa S, Maenaka K, Takigawa I, Semba K, Kon S, Fujita Y: The cell competition-based high-throughput screening identifies small compounds that promote the elimination of RasV12-transformed cells from epithelia. **Sci. Reports** 5, 2015, 15336.
3. Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J, Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa S, Fujita Y: EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells. **J Cell Sci** 128(4), 2015, 781-789.

● 廣田泰

1. Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey S K, Furukawa K S, Fujii T, Osuga Y: STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. **JCI insight** 1(8), 2016, e87591.
2. Cha J, Burnum-Johnson K E, Bartos A, Li Y, Baker ES, Tilton S C, Webb-Robertson B J, Piehowski P D, Monroe M E, Jegga A G, Murata S, Hirota Y, Dey S K: Muscle Segment Homeobox Genes Direct Embryonic Diapause by Limiting Inflammation in the Uterus. **J Biol Chem** 290(24), 2015, 15337-15349.
3. Hiraoka T, Saito-Fujita T, Hirota Y: How does Progesterone Support Embryo Implantation? **J Mamm Ova Res** 32(3), 2015, 87-94.
4. Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, Bartos A, Cha J, Dey S K, Fujii T, Osuga Y: MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. **Mol Endocrinol** 28(7), 2014, 1108-1117.
5. Santoso E G, Yoshida K, Hirota Y, Aizawa M, Yoshino O, Kishida A, Osuga Y, Saito S, Ushida T, Furukawa K S: Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. **PLoS One** 9(7), 2014, e103201.

● 伊藤暢

1. Itoh T: Stem/progenitor cells in liver regeneration. **Hepatology** 64(2), 2016, 663-668.
2. Tanimizu N, Kaneko K, Itoh T, Ichinohe N, Ishii M, Mizuguchi T, Hirata K, Miyajima A, Mitaka T: Intrahepatic bile ducts are developed through formation of homogeneous continuous luminal network and its dynamic rearrangement. **Hepatology** 64(1), 2016, 175-188.
3. Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki O, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-Ya K, Mimori K, Suzuki A: Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 113(1), 2016, E71-80.
4. Kok C Y, Miyajima A, Itoh T: Adaptive remodeling of the biliary tree: the essence of liver progenitor cell expansion. **J Hepatobiliary Pancreat Sci** 22(7), 2015, 546-550.
5. Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A, Itoh T: Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. **Hepatology** 61(6), 2015, 2056-2066.

6. Miyajima A, Tanaka M, Itoh T: Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. **Cell Stem Cell** 14(5), 2014, 561-574.
7. Itoh T, Miyajima A: Liver regeneration by stem/progenitor cells. **Hepatology** 59(4), 2014, 1617-1626.
8. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, Yamamoto M: Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. **Mol Cell Biol** 34(5), 2014, 900-913.

●小林哲夫

1. Kobayashi T, Nakazono K, Tokuda M, Mashima Y, Dynlacht B D, Itoh H: HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma. **EMBO Rep** 18, 2017, 334-343.
2. Kobayashi T, Kim S, Lin YC, Inoue T, Dynlacht B D: The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. **J Cell Biol** 204, 2014, 215-229.

●西中村隆一

1. Recuenco M C, Ohmori T, Tanigawa S, Taguchi A, Fujimura S, Conti M A, Wei Q, Kiyonari H, Abe T, Adelstein RS, Nishinakamura R: Non-muscle myosin II regulates the morphogenesis of metanephric mesenchyme-derived immature nephrons. **J Am Soc Nephrol** 26(5), 2015, 1081-1091.
2. Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. **Mol Cell Biol** 34(16), 2014, 3096-3105.

●吉川大和

1. Kikkawa Y, Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M: Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. **Exp Cell Res** 344(1), 2016, 76-85.
2. Yamada H, Mori S, Miyakawa T, Morikawa R, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M, Takasu M: Structural study of cell attachment peptide derived from laminin by molecular dynamics simulation. **PLoS One** 11, 2016, e0149474.
3. Kumai J, Hozumi K, Yamada Y, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M: Effect of spacer length and type on the biological activity of peptide-polysaccharide matrices. **Biopolymers** 106(4), 2015, 512-520.
4. Hozumi K, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M: Suppression of cell adhesion through specific integrin crosstalk on mixed peptide-polysaccharide matrices. **Biomaterials** 37, 2015, 73-81.
5. Kikkawa Y, Miwa T, Tanimizu N, Kadoya Y, Ogawa T, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T: Soluble Lutheran/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. **Exp Cell Res**, 328, 2014, 197-206.
6. Katagiri F, Takagi M, Nakamura M, Tanaka Y, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Screening of integrin-binding peptides in a laminin peptide library derived from the mouse laminin beta chain short arm regions. **Arch Biochem Biophys** 550-551, 2014, 33-41.
7. Katagiri F, Hara T, Yamada Y, Urushibata S, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M: Biological activities of the homologous loop regions in the laminin alpha chain LG modules. **Biochemistry** 53, 2014, 3699-3708.

●清川悦子

1. Yoshizaki H, Ogiso H, Okazaki T, Kiyokawa E: Comparative lipid analysis in the normal and cancerous organoids of MDCK cells. **J Biochem** 159(6), 2016, 573-584.
2. Yoshizaki H, Kuwajima Y, Minato H, Kiyokawa E: Regulation of Ripply1 expression in MDCK organoids. **Biochem Biophys Res Commun** 468, 2015, 337-342.
3. Minato H, Kiyokawa E: Activated K-RAS and its effect on morphological appearance. **J Biochem** 156(3), 2014, 137-145.

【学会発表】(計画研究)

●鈴木淳史

1. Suzuki A: Stem Cells and Regeneration in the Digestive Organs, Stem cell systems in the liver. Keystone Symposia, March17, 2016, Keystone, Colorado, USA.
2. Suzuki A: Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate. CSHA/ISSCR Joint Meeting on Stem Cells in Science and Medicine, October17, 2013, Suzhou, China.
3. Suzuki A: Directed cell fate reprogramming of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells. ISSCR-Roddenberry International Symposium on Cellular Reprogramming, October25, 2012, San Francisco, CA, USA.
4. Suzuki A: Induction of functional hepatocytes from mouse fibroblasts. 47th annual meeting of the European

Association for the Study of the Liver (The International Liver Congress™ by EASL), April 19, 2012, Barcelona, Spain.

●大野茂男

1. Ohno S: Regulation of epithelial cell polarity by PAR3 depends on Girdin transcription and Girdin-Galphai3 signaling. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES Dynamics of Cellular Behavior During Development and Disease, November 17-21, 2014, Suzhou, China.
2. Ohno S: aPKC suppresses the growth of mammary luminal progenitors through a novel mechanism involving ErbB2. 14th Japanese-German Cancer Workshop, November 14-16, 2014, Berlin, Germany.
3. Ohno S: aPKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. The Fourth Shanghai International Forum on Acute and Chronic Kidney Injury, October 24-25, 2014, Shanghai, China.
4. 大野茂男: aPKC suppresses the growth of mammary luminal progenitors through a novel mechanism involving ErbB2. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日 - 27日, パシフィコ横浜.
5. Ohno S: Atypical PKC connects cell polarity and cancer. Federation of American Societies for Experimental Biology July 27-August 1, 2014, Steamboat Springs, USA.

●菊池章

1. Kikuchi A: Formation of epithelial branched tubules by Wnt and EGF in three-dimensional culture. EMBO conference 30 Years of Wnt Signalling, June 28, 2012, Egmond aan Zee, Netherlands.
2. Kikuchi A: Wnt5a; Signaling and its implication in cancer. Osong BioExcellence 2012-From HIT to NBE-. October 16, 2012, Korea.
3. Kikuchi A: Wnt5a; Signaling and its implication in cancer. Global COE Symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine, November 16, 2012, Nagoya.
4. Kikuchi A: Formation of epithelial branched tubules by Wnt and EGF in three-dimensional culture. EMBO conference 30 Years of Wnt Signalling, June 28, 2012, Egmond aan Zee, Netherlands.
5. Kikuchi A: Apical-basal secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by distinct mechanisms. Wnt Symposium 2013 Stem cells- Development- Disease, July 14-16, 2013, DKFZ, Communication Centre Im Neuenheimerfeld 280, Heidelberg, Germany.
6. Kikuchi A: Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. OR: Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. 14th Japanese-German Workshop, October 28- November 2, 2013, Germany.
7. Kikuchi A: Development of epithelial tube formation by growth factor signaling and tumorigenesis due to its abnormality. 2014 KSBMB Annual Meeting, May 14-16, 2014, COEX, Seoul, Korea.
8. Kikuchi A: Regulation of tubulogenesis and tumorigenesis by a combination of growth factor signaling. EMBO Workshop on Wnt signaling, October 6-9, 2014, Cable Beach Club Resort, Broome, Western Australia.
9. Kikuchi A: Epithelial tubular formation by a combination of growth factor signaling and tumorigenesis due to its abnormality. 14th Japanese-German Cancer Workshop, November 14-16, 2014, Hotel Adina, Berlin, Germany.
10. Kikuchi A: Wnt5a signaling; its implication in cancer and inflammation. University of Washington and Kobe University International Joint Symposium, December 15, 2014, Kobe Portpia Hotel, Kobe.
11. Kikuchi A: CKAP4 functions as a novel receptor for Dickkopf1, a Wnt signal inhibitor, and might be a molecular target for cancer therapy. 16th IUBMB conference, 2016, July 19, Vancouver, BC, Canada.
12. Kikuchi A: Epithelial morphogenesis regulated by Wnt signaling and implications in tumorigenesis due to its abnormality. Wnt Meeting 2016, September 16, Brno, Czech Republic.

●大橋一正

1. Ohashi K: Identification of Rho-GEFs involved in mechano-biological responses of vascular endothelial cells. International Symposium on Biomedical Engineering Interface, March 14, 2013, Sendai.
2. Ohashi K; Fujiwara S., Mashiko T., Abiko H., Sato M., and Mizuno K.: The role of Solo, a RhoA/RhoC-specific guanine nucleotide exchange factor, in mechanotransduction. 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年6月30日-7月2日, 東京.
3. 大橋一正、林文、日當竜一、辻拓史、水野健作: p63RhoGEF is required for chemotactic migration of breast carcinoma cells by forming a single polarized lamellipodium. 第65回日本細胞生物学会大会, 2013年6月19日-6月21日, 名古屋.
4. Ohashi K, Abiko H, Hiataru R, Sakamoto N, Sato M, Mizuno K: Identification of Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced alignment in vascular endothelial cells. International Symposium on Cellular

Mechanobiology, March16, 2012. Kyoto.

5. Ohashi K, Saito A, Kondo H, Miyajima K, Akatsuka J, Kiuchi T, Mizuno K: Phosphorylation and activation of LIMK1 by CaMKII β in BDNF-induced dendritogenesis. 第84回日本生化学会大会, 2011年9月21日-24日, 京都.

●大谷浩

1. Otani H, Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq A M, Jahan E, Kaneda R, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Hatta T: Interkinetic nuclear migration in the developing endoderm- and mesoderm-origin epithelial tubular structures, 第121回日本解剖学会全国学術集会, 2016年3月30日, ビックパレット福島, 郡山市.
2. 大谷 浩: ヒト・マウスの器官形成と組織形成における正常と異常. (招待講演) 第50回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2014年7月13日, シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル, 浦安市.
3. Lundh T, Udagawa J, Hänel S E, Otani H: Cross- and triple-ratios of human body parts during development. 3rd Swedish Meeting on Mathematics in Biology, December15, 2011, Umeå University, Sweden.
4. 大谷 浩: 知られざる先天異常—臓器の組織形成における個体差と疾病素因の関り—. (特別講演) 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 2011年8月11日, パシフィコ横浜, 横浜市.

●南康博

1. Minami Y: Roles of Wnt5a-Ror2 signaling in tumor development. Joint Symposium of Kobe University and Taipei Medical University, December 22, 2015, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan.
2. Nishita M, Minami Y: Novel role for Wnt5a-Ror2 signaling in regulating polarity and structure of the Golgi apparatus in osteosarcoma cells. University of Washington-Kobe University Joint Symposium on Cell Signaling, September10, 2015, University of Washington, Seattle, USA.
3. Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in patterning the metanephric mesenchyme during ureteric budding. Keystone Symposia “Developmental Pathways and Cancer: Wnt, Notch and Hedgehog (J7)”, February4, 2014, Banff, Canada.
4. Minami Y: Wnt5a-Ror signaling under physiological and pathological conditions. 3rd GCOE International Symposium, December10, 2012, Kobe, Japan.

●佐邊壽孝

1. 佐邊壽孝: Arf6-AMAP1 pathway drives mesenchymal metastasis and drug resistance of cancers under RTK and GPCR signaling. OOTR 第12回年次学会, 2016年3月6日, ウェスティン都ホテル京都, 京都市.
2. 小根山千歳、二宮悠一、穀田理恵: microRNA を介した c-Src 発現亢進とがん形質. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月10日, 名古屋国際会議場, 名古屋市.
3. 佐邊壽孝、橋本あり、橋本茂、杉野弘和、吉河歩、半田悠、大塚勇太郎、及川司、三上 修治、大家基嗣: Different genome statuses in breast cancer and renal cancer generate the Arf6-based mesenchymal machinery critical for metastasis and poor survival. The 4th Global Cancer Genomics Consortium Symposium, 2014年11月14日, 芝蘭会館, 京都市.
4. 佐邊壽孝: RTKs-GEP100-Arf6-AMAP1 pathway mediates cancerous EMT in response to mutant p53 and TGF β 1 signaling. 東北大学グローバル COE シンポジウム, 2013年2月1日, 良陵会館記念ホール, 仙台市.

【学会発表】(公募研究 24 年度～平成 25 年度)

●西森克彦

1. Oyama K (a), Shimoda T, Mohri Y, Mizuki-Sone M, Nishimori K(b): LGR4 is required for the development and the maintenance of mammary gland. Gordon Research Conference, June22, 2013, Stowe, VT, USA.
2. 大山一徳(a), 曾根瑞季, 毛利泰彰, 林遼太郎, Clevers H, 西森克彦(b), LGR4は子宮上皮において分泌腺形成に必要であり、子宮脱落膜化反応に寄与する. 第36回日本分子生物学会, 2013年12月2日—6日, 神戸.

●山城佐和子

1. 山城佐和子, 水野裕昭, Smith MB, Ryan GL, Vavylonis D, 渡邊直樹: New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. 第65回日本細胞生物学会大会, 2013年6月19日～6月21日, 名古屋.
2. Yamashiro S, Mizuno H, Smith MB, Ryan GL, Vavylonis D, Watanabe N: Revisiting lamella hypothesis and myosin II-induced actin disassembly using a high-resolution single-molecule speckle microscopy with a

new actin probe polymerizable to forming-assembled actin filaments. The Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, Dec15-19, San Francisco, USA.

●中村哲也

1. Nakamura T: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology, August27, 2012, Chicago, USA.
2. Nakamura T, Yui S, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. ISSCR 10th annual meeting, June15, 2012, Yokohama.

●松本邦弘

1. 佐井和人, 花房洋, 松本邦弘: PP5 prevents multipolar spindle formation by negatively regulating LRRK1 kinase activity. 第35回日本分子生物学会年会, 平成24年12月11日, 福岡.

●池ノ内順一

1. 池ノ内 順一: Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. 第65回日本細胞生物学会大会, 2013年6月21日, 名古屋.
2. 池ノ内 順一: 細胞膜脂質による微絨毛形成の制御機構. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月17日, 京都.

●吉村信一郎

1. Yoshimura S, Nakajo A, Harada A: The molecular function of a novel Rab8-binding protein in polarized transport. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017年3月29日, 長崎.
2. Yoshimura S, Nakajo A, Harada A: The molecular function of Rab8 in polarized transport. 第68回日本細胞生物学会大会, 2016年6月15日 - 17日, 京都.

●平島正則

1. Hirashima M: Platelet activation blocks misconnection of lymphatic to blood vessels in mouse peripheraltissues. 第35回日本血栓止血学会学術集会, 2013年5月30日, 山形.
2. 平島正則: Aspp1 ノックアウトマウスにみられる胎生期浮腫とリンパ管形成異常. 第38回日本リンパ学会総会, 2014年6月20日, 東京.

●谷水直樹

1. 谷水直樹, 三高俊広: 転写因子 Grainyhead like-2 による上皮細胞の形態形成及び分化可塑性の制御, ワークショップ 「器官形成・再生過程における上皮細胞による組織構築と修復のメカニズム」. 第36回分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸.
2. Tanimizu N, Mitaka T: A transcription factor grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by promoting the formation of the apical lumen. Joint Meeting of the 45th JSDB & the 64th JSCB May30, 2012, Kobe.

●芝大

1. Shiba D, Fukui H, Asakawa K, Kawakami K, Yokoyama T: The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2. The American Society for Cell Biology Annual Meeting. December15-19, 2012, The Moscone Center, San Francisco, CA.
2. Shiba D, Nakata K, Fukui H, Kobayashi D, Yokoyama T: A three-step process of Nphp3 ciliary localization CILIA 2012-1st International Scientific Conference. May16-18, London.

●堀田耕司

1. Hotta K: Three-Dimensional Anatomy of the Ciona intestinalis Tailbud Embryo at Single-cell Resolution. 2012 Asia-Pacific Developmental Biology Conference (APDBC), October5, 2012, Taipei Innovation City Convention Center.
2. Hotta H: Four-dimensional Imaging of Brain Morphogenesis in Ciona intestinalis. 7th International Tunicate Meeting, July21, 2013, Napoli, Italy.

●中村暢宏

1. Soonthornsit J, Ishida R, Nakamura N: Yip1 domain family members localizing in the trans-Golgi/ trans-Golgi network. 2013 "Molecular Membrane Biology" Gordon Research Conference, July14-19, 2013. Proctor Academy, Andover, NH, USA.
2. Yamaguchi Y, Tamura D, Soonthornsit J, Ishida R, Nakamura N: Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus in a phospholipase A2 dependent manner. Golgi Symposium 2013, September17-19, 2013. Bad Ischl, Austria.

●北館祐

1. Kitadate Y: Dosage of FGF5 in a subset of lymphatic endothelial cells determine spermatogenic stem cell pool size. International Symposium of Neurovascular Wiring, January 28, 2015, Kyoto.
2. Kitadate Y, Maruyama A, Ichikawa R, Ema M, Sugiyama F, Takahashi S, Nagasawa T, Yoshida S: FGF5 is expressed in the vasculature-associated peritubular cells and controls the size of spermatogenic stem cell pool in the mouse testis. GERM CELLS meeting, October 8, 2014, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

●加藤洋人

1. Katoh H: Epithelial Self-defense against Tumorigenesis of the Intestine in Mice. 新学術領域研究上皮管腔組織形成 第1回国際シンポジウム, 2013年6月22日~23日, 北海道大学学術交流会館, 札幌市.
2. Katoh H, Kitamoto S, Sasaki A, Fujita Y: Epithelial Self-defense against Colonic Tumorigenesis in Mice. 平成25年度「がん支援」公開シンポジウム, 2014年1月30日~31日, 一橋記念講堂(学術総合センター), 東京.

●阿部宏之

1. Takakura K, Kurotani R, Watanabe Y, Abe H: Development of 3D imaging system of follicles in mouse ovary using optical coherence tomography. IFFS/JSRM International Meeting 2015, April 26, 2015, Yokohama.
2. Abe H: Evaluation the quality of single embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of respiration activity by scanning electrochemical microscopy. The 16th Chongqing ART Conference, November 20, 2014, Chongqing, China.
3. 高倉啓, 黒谷玲子, 渡部裕輝, 阿部宏之: ウシ卵胞の非侵襲イメージングを可能とする光干渉断層撮影システム, 第56回日本卵子学会, 2015年5月30日, 栃木県総合文化センター, 宇都宮市.

●紙谷聡英

1. 紙谷聡英: Establishment of culture system for hepatic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells, 第87回日本組織培養学会, 2014年5月29日, 如月会館, 東京都.
2. 紙谷聡英, 柳田絢加, 伊藤慶一, 近田裕美, 中内啓光: An in vitro expansion system in generating purified hepatic stem/progenitor-like cells derived from human iPS cells, 第35回日本分子生物学会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場, 福岡市.

●川崎善博

1. Kawasaki Y, Akiyama T: The achilles' heel of cancers. International Symposium on "Integrative Research on Cancer Microenvironment Network", September 11, 2015, Tokyo.
2. 川崎善博, 秋山徹: APC 結合因子 Asef が関わる癌発症機構の解明. 第1回 Tubulology 研究会, 2013年8月25日, 東京.

●伊藤暢

1. Itoh T, Takase H, Miyajima A: FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease), February 28, 2013, Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada.
2. Itoh T, Takase H, Miyajima A: Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, June 14, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama.

●浅岡洋一

1. 浅岡洋一: Hippo シグナル伝達系の胚発生期における多彩な役割 (招待講演). 日本比較生理生化学会 第35回大会 (比較三学会合同シンポジウム), 2013年7月14日, イーグレひめじ, 兵庫県姫路市.
2. 浅岡洋一: Analysis of signaling networks governing the vertebrate body plan formation (吉田奨励賞受賞者講演). 日本比較生理生化学会 第34回大会, 2012年7月7日, 総合研究大学院大学 葉山キャンパス, 神奈川県三浦郡葉山町.

●鈴木聡

1. Nishio M, Goto H, Otsubo K, Togashi H, Shimono Y, Maehama T, Suzuki A: Role of Hippo pathway in vivo. 第75回日本癌学会学術総会シンポジウム (S12 Advances in cancer animal model: from mechanisms to clinical output), October 6-8, 2016, Yokohama.
2. Nishio M, Goto H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A: The Hippo signaling Pathway: Function, Disorders, and Therapeutic Targeting. 第89回日本生化学会総会シンポジウム (Symposium (3S05)) :

Development of molecularly targeted cancer drugs by fusion of different field (Tetsuo Noda, Minoru Yoshida)), September 25-27, 2016, Sendai.

●西中村隆一

1. Recuenco M C, Ohmori T, Fujimura S, Conti M A, Wei Q, Adelstein R S, Nishinakamura R: Nonmuscle myosin II is essential for nephron development in the embryonic kidney. 日本分子生物学会, 2012年12月14日, 福岡.

●谷口喜一郎

1. Taniguchi K, Abe S, Minami R, Imano T, Kokuryo A, Nakagoshi H, Adachi-Yamada T: Elimination of malfunctioning cells in *Drosophila* male accessory gland, a non-regenerative tissue. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日, 神戸ポートアイランド, 神戸.
2. 谷口喜一郎, 中越秀樹, 安達卓: ショウジョウバエ組織における生理的アポトーシス耐性の解析. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月1日-4日, 神戸ポートアイランド, 神戸.

●清川悦子

1. 清川悦子: 蛍光ライブイメージングによって明らかにされた腺管の充実性病変の発生機構. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月21日, ホテルロイトン札幌.
2. 清川悦子: ライブイメージングと診断を繋ぐ: 管腔構造の制御機構の観点から. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月6日 ホテルロイトン札幌.

●山越貴水

1. Katano S, Kimura H, Ohtani N, Hara E, Maruyama M, Yamakoshi K: p16^{Ink4a} contributes to the age-dependent fate of stem/progenitor cells in the submandibular gland. Gordon Research Conferences (Salivary Glands & Exocrine Biology), February 4-5, 2013, TX, USA.
2. Yamakoshi K: Role of p16^{INK4a} in the age-related functional decline of the submandibular gland. KEYSTONE SYMPOSIA (Aging and Diseases of Aging), October 25, 2012, Tokyo.

【学会発表】(公募研究 26年度～平成 27年度)

●中村哲也

1. Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Ichinose S, Watanabe M, Nakamura T: Successful Engraftment of Cultured Small Intestinal Epithelial Stem Cells onto Damaged Colonic Mucosa by Heterotopic Transplantation. ISSCR 12th annual meeting, June 19, 2014, Vancouver, Canada.
2. Nakamura T: Adult stem cell therapy for gastrointestinal epithelial repair: CSI Seminar, National University of Singapore, January 28, 2013, Singapore.

●松本邦弘

1. 花房洋, 慶田城迅, 手塚基弘, 宇佐美学史, 豊島文子, 松本邦弘: PLK1 依存的に活性化した LRRK1 は CDK5RAP2 をリン酸化することでスピンドル配向を制御する. 第37回日本分子生物学会年会, 平成26年11月25日, 横浜.

●木岡紀幸

1. Ichikawa T, Kita M, Sezaki T, Chiang S H, Saltiel A R, Kimura Y, Ueda K, Kioka N: Comparison of the effect of the vinexin family proteins on vinculin-mediated mechanosensing. 2014 Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, December 6-10, 2014, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
2. 木岡紀幸: Membrane microdomain and mechanosensor for stiffness of extracellular matrix (ECM). 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年6月30-7月2日, 東京.

●山城佐和子

1. 山城佐和子, 田中総一郎, 渡邊直樹: ナノスケール単分子スペックル解析による細胞仮足が「つかみ取る」しくみ, 第68回日本生物学会・第11回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会, 2016年6月15日-6月17日, 京都.
2. 山城佐和子, 田中聡一郎, 渡邊直樹: The role of actomyosin contraction on actin filament turnover revealed by using new easy-to-use Single-Molecule Speckle (eSiMS) microscopy. 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月9-11日, 横浜.

●大澤志津江

1. Ohsawa S, Kunimasa K, Yamamoto M, Igaki T: Cell competition that regulates epithelial homeostasis in *Drosophila*. MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics, December 4, 2014, National University of Singapore, Singapore.

2. 大澤志津江: 上皮の恒常性維持を司る細胞競合の分子基盤. 第 1006 回生物科学セミナー, 2015 年 1 月 7 日, 東京大学, 東京.

●池ノ内順一

1. Shigetomi K, Shiomi R Ikenouchi J: Qualitative changes of plasma membrane during epithelium-mesenchyme transition. ASCB 2015 annual meeting, December14, 2015, San Diego, USA.
2. 池ノ内 順一, 塩見 僚, 重富 健太: 上皮間葉転換における細胞膜脂質の質的变化の意義について. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 3 日、神戸).

●今村寿子

1. Takigawa-Imamura H: Observation of FGF response in lung epithelium and modeling for branching morphogenesis. 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, June3, 2015, International Congress Center Epochal Tsukuba.
2. Takigawa-Imamura H: Observation of FGF response in lung epithelium and modeling for branching morphogenesis. The Second International Meeting for Epithelial Tubulology, August23, 2015, Hokkaido University Furate Hall, Sapporo.
3. Takigawa-Imamura H: Emergence of hierarchical structure of lung: a model and observation of cellular response to FGF. The 2016 (26th) annual meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology, September7, 2016, Kyushu University Shiiki Hall, Fukuoka.

●佐々木洋

1. Sasaki H: Roles of Tead family proteins in cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts . Keystone Symposium: The Hippo Pathway: Signaling, Development and Disease. May17-21, 2015, Taos, New Mexico, USA.
2. Sasaki H: Tead and Myc cooperatively regulates cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts. 1st International Symposium on Cell Competition, "Cell Competition in Development and Cancer", Sep 10, 2015, Shiran Kaikan, Kyoto Univ, Kyoto.

●森本充

1. Morimoto M, Kishimoto K: A non-proliferating tissue enlargement controlling the trachea tubulogenesis. Keystone Symposia; Endoderm Lineages in Development and Disease, February10, 2015, Keystone, Colorado, USA.
2. Morimoto M, Noguchi M: 3D mapping and 4D imaging unveiled the size and positional regulation of developing neuroepithelial bodies following airway branching morphogenesis. FASEB Science Research Conferences; The Lung Epithelium in Health and Disease, August1, 2016, Saxtons River, Vermont, USA.

●昆俊亮

1. 昆俊亮: Warburg effect-like metabolic change induces apical elimination of transformed epithelial cells. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日-8 日, 横浜.
2. 昆俊亮: Role of cell competition in multi-sequential carcinogenesis. 発生生物学会秋期シンポジウム, 2016 年 10 月 20 日, 三島.

●廣田泰

1. Hirota Y: MicroRNA-200a confers progesterone signaling deficiency making the cervix unfavorable to embryo implantation. Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction, August13, 2014, New London, NH, USA.
2. Hirota Y: STAT3 promotes uterine regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction, August24, 2016, Waterville Valley, NH, USA.

●伊藤暢

1. Kaneko K, Itoh T, Miyajima A: Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries. FASEB Summer Research Conferences (Liver Biology: Fundamental Mechanisms and Translational Applications), July8, 2014, Keystone, Colorado, USA.
2. 伊藤暢: 肝再生の基盤となる肝臓上皮組織の可塑性. 第 42 回 日本臓器保存生物医学学会学術集会 特別講演, 2015 年 11 月 13 日, いわて県情報交流センター (アイーナ), 岩手県盛岡市.

●小林哲夫

1. Kobayashi T, Nakazono K, Tokuda M, Dynlacht BD, Itoh H: HDAC2 mediates loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. ASCB/IFCB Meeting 2014. December7, 2014. Philadelphia, PA, USA.

- 小林哲夫, 中藪昂亮, 徳田滯, 馬島友, Brian David Dynlacht, 伊東広: 膵管癌細胞における一次繊毛消失メカニズムの解析, 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会, 2015年12月2日, 神戸.

●西中村隆一

- Nishinakamura R: Transcriptional and morphogenetic regulation of developing nephrons. 2nd Asia-Pacific Kidney Development Workshop, September 23, 2014, Queenstown, New Zealand.

●吉川大和

- Kikkawa Y, Miwa T, Tanimizu N, Kadoya Y, Ogawa T, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T: Soluble Lutheran glycoprotein/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014, October 13, 2014, Cleveland, USA.
- Harashima N, Fujii S, Ikari K, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Kikkawa Y: Down-regulation of cell adhesion via ROCK pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. 2015 Annual Meeting the American Society for Cell Biology, December 15, 2015, San Diego, USA.

●清川悦子

- Kiyokawa E: FRET Imaging in Organoids and Mice. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015) Dec 15, 2015, Hawaii.
- Kiyokawa E: FRET Imaging in Organoids and Mice. Biophysical Society Thematic Meeting New Biological Frontiers Illuminated by Molecular Sensors and Actuators. July 1, 2015, Taipei.

【図書】(計画研究)

●鈴木 淳史

- Horisawa K, Suzuki A: Cell-based regenerative therapy for liver disease. Innovative Medicine: Basic Research and Development, Springer Japan (Tokyo), 2015, 327-339.

●大野茂男

- Ohno S, Goulas S, Hirose T: The PAR3-aPKC-PAR6 Complex. Cell Polarity 1. Biological Role and Basic Mechanisms. Ed. Ebnet K. Springer, 2015, 3-23.

●菊池章

- 菊池 章: DNA複製 (分担翻訳) : 生化学第4版 (BIOCHEMISTRY 4th Edition), 西村書店出版, 2015, 928-965.
- 菊池 章, 松本真司: 細胞増殖・運動・死とがん: プログレッシブ 生命科学, 2014, 79-100.
- 菊池 章: 細胞内シグナル伝達機構: 図説 分子病態学 (改訂5版), 2014, 53-59.
- 菊池 章: 遺伝子調節と癌 (分担翻訳) : 遺伝情報の発現制御 (Gene control), メディカル・サイエンス・インターナショナル社出版, 2012, 335-364.

●大橋一正

- Ohashi K, Mizuno K: A novel pair of split Venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. Springer, Methods in Molecular Biology, 1174: pp.247-262 (2014), 431p. (共著、1項目)

●南康博

- Endo M, Nishita M, Doi R, Hayashi M, Minami Y, Springer, Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies (edited by Wheeler, D. L. and Yarden, Y.), 2015, 48 ページ (The ROR Receptor Family. Chapter 13, 593-640)
- Endo M, Minami Y, Nova Science Publishers, Inc., Progenitor Cells: Biology, Characterization and Potential Clinical Applications (edited by Horton, P. M., Lawrence, B. E.), 2013, 16 ページ (Regulation of neural progenitor cells by Wnt5a-signaling in the developmental central nervous system. Chapter 4, 71-86)

●佐邊壽孝

- Hashimoto S, Hashimoto A, Sugino H, Yoshikawa A, Handa H, Yoshino M, Otsuka Y, Sabe H. (Ed. F. Wittenghofer, Springer Pub.) ArfGAPs: not only for the termination. In "Ras-superfamily small G-proteins" Vol. 2, 2014, 22.
- 小根山千歳, 南山堂, 次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて—「Src がん形質における microRNA 異常と mTOR シグナル」2013, 6.
- 橋本あり, 橋本茂, 佐邊壽孝, エル・アイ・シー (株), 疾患モデルの作製と利用—がん (編者: 中村卓郎) 「局所浸潤モデル—がんの浸潤転移に関わる分子装置の解析法」2012, 11.

- 橋本あり、杉野弘和、橋本茂、佐邊壽孝，メディカルレビュー社，乳がんレビュー2012（編者：戸井雅和）「EMT-基礎的観点から」2012，7.

【図書】(公募研究平成 24 年度～平成 25 年度)

●山城佐和子

- 山城佐和子、圓岡真宏、水野裕昭、渡邊直樹：アクチン研究の最新動向—構造から調節、恒常性、可視化、モデリングまで：Update Review 羊土社 実験医学 第30巻 第18号，2012年，pp2998-3005.

●阿部宏之

- 阿部宏之：医歯薬出版、酸素消費測定による胚の品質評価。—超高感度細胞呼吸測定装置の開発と不妊治療における臨床応用—、医学のあゆみ「生殖医療の最前線」，2014年.
- 阿部宏之：医学書院、ARTにおける新技術・酸素消費と胚評価，臨床婦人科産科「生殖医療の進歩と課題—安全性の検証から革新的知見まで」，2014年，8ページ.

●伊藤暢

- 高瀬 比菜子、伊藤 暢、宮島 篤：再生医療叢書5：代謝系臓器（日本再生医療学会 監修／後藤満一・大橋一夫 編集、4.1 肝臓の発生・分化制御機構、pp. 78-88），2012年，総ページ数192ページ.
- Itoh, T., Takase, H., Tanaka, M., Miyajima, A.: Springer, Regenerative Medicine: From Protocol to Patient, 2nd edition (edited by Steinhoff, G., Chapter 13, Liver stem cells, pp. 337-363), 2013, 1220 (total pages).

●鈴木聡

- Shimono Y, Mukohyama J, Isobe T, Johnston D M, Dalerba P, Suzuki A: Methods in Molecular Biology, :Organoid Culture of Human Cancer Stem Cells, 2016, p1-9.
- Nishio M, Goto H, Suzuki M, Fujimoto A, Mimori K, Suzuki A: INNOVATIVE MEDICINE : Basic Research and Development (edited by Nakao K), Springer,: The Hippo Signaling Pathway: A Candidate New Drug Target for Malignant Tumors. 2015, p79-94.
- 西尾美希、三森功士、森正樹、板見智、鈴木聡：次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学 —革新的シーズ育成に向けて—南山堂：Hippo 経路分子 MOB1 によるがん発症・進展制御とがん治療戦略，2013，p200-205.
- 河原康一、西尾美希、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、古後龍之介、三森功士、森 正樹、鈴木 聡. 遺伝子 Mook22 号 最新疾患モデルと病態解明、創薬応用研究、細胞医薬創製研究の最前線、メディカルドゥ社、：PICT1 による核小体ストレス経路を介した p53 と腫瘍進展制御～腫瘍予後マーカーや今後の創薬応用に向けて～、2012、p260-65.
- 西尾美希、佐々木雄彦、鈴木 聡. 疾患モデルの作製と利用 — がん，エル・アイ・シー社、：PTEN 変異による発がんモデル、2012、p145-171.

●山越貴水

- 山越貴水，原英二. 株式会社 エル・アイ・シー. がん—疾患モデルの作製と利用，細胞周期制御遺伝子—1 (*p16^{INK4a}*および *p53*) ，2012，181-187.

【図書】(公募研究平成 26 年度～平成 27 年度)

●山城佐和子

- 山城佐和子、渡邊直樹：細胞骨格（アクチン系）：生体の科学（特集：細胞シグナル操作法）医学書院、第66巻 第5号、2015年、pp504-505（2ページ）

●大澤志津江

- Kunimasa, K., Ohsawa, S., Igaki, T.: Cell competition: the struggle for existence in multicellular communities. “New Principles in Developmental Processes” Springer, 2014, 27-40.

●池ノ内順一

- 池ノ内順一、分担執筆、化学同人. 第4章「脂質の機能」『生体膜の分子機構』梅田真郷編，(2014)，85-116.

●佐々木洋

- Kondoh H, Kuroiwa A (eds.) Springers 社, New Principles in Developmental Processes, Sasaki H “Position-dependent Hippo signaling controls cell fates in preimplantation mouse embryos” pp 249-264, 2014, 321 (total pages).

●森本充

- Mitsuru Morimoto: Springer 社, New Principles in Developmental Processes, Part I-5, Building Functional

Internal Organs from a Naive Endodermal Sheet, 2015, 総ページ数 316 うち 14 ページ.

●伊藤暢

1. Itoh T: Springer, Tissue-Specific Stem Cell Niche (edited by Turksen, K., Chapter 5, Liver stem cell niche, pp. 83-97), 2015, 328 pages in total.
2. Itoh T, Kok C Y, Takase H M, Miyajima A: Springer, Regenerative Medicine: From Protocol to Patient, 3rd edition, Volume 2: Stem Cell Science and Technology (edited by Steinhoff G, Chapter 8, Liver stem cells, pp. 209-240), 2016, 455 (total pages).

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

●大野茂男

「初期乳癌の検出方法」

出願日 平成 23 年 3 月 1 日 (2011. 3. 1)

出願番号 特願 2011-044047

発明者 秋本和憲、大野茂男

「子宮頸がんの予防を目的とした前がん病変の増悪および軽快を予見する検査方法」

出願日 平成 26 年 2 月 4 日 (2014. 2. 4)

出願番号 特願 2014-019201

発明者 大野茂男

●佐邊壽孝

「膀胱癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに予測方法」

出願日 2015 年 12 月 17 日

出願番号 特願 2015-246132、

発明者 佐邊壽孝、平野聡、古川聖太郎

「放射線治療増強薬及び放射線抵抗性癌の治療方法」

出願日 2013 年 7 月 17 日

出願番号 特願 2013-148970

発明者 佐邊壽孝、小野寺康仁、Nan Jin Min、橋本茂、橋本あり

「腎癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに予測方法」

出願日 2013 年 7 月 17 日

出願番号 特願 2013-148969

発明者 佐邊壽孝、大屋基嗣、三上修治

「乳癌乳房温存療法後の再発リスクの予測に用いるための診断薬並びに予測方法」

出願日 2013 年 3 月 4 日

出願番号 特願 2013-041644

発明者 佐邊壽孝、橋本茂、橋本あり、小野寺康仁、白土博樹、木下留美子

「mTOR 阻害剤の投与が有効ながん患者の選択方法」

出願日 2011 年 9 月 30 日

出願番号 特願 2011-218271、

発明者 小根山千歳、岡田雅人、田村研治

●池ノ内順一

「タイトジャンクション形成促進を評価するための細胞およびタイトジャンクション形成促進剤」

出願人 国立大学法人九州大学

出願年月日 2015年4月13日

出願番号 PCT/JP2015/061374

発明者 池ノ内順一、塩見僚

●吉川大和

「抗癌剤」

出願番号 特願 2015-230926

出願日 2015 年 11 月 26 日

発明者 吉川大和（東京薬科大学）、福原武志（東京薬科大学）、野水基義（東京薬科大学）、伊東祐二（鹿児島大学）

各研究班の研究成果

計画研究

公募研究（平成 24 年度～平成 25 年度）

公募研究（平成 26 年度～平成 27 年度）



研究課題名：組織幹細胞の維持と分化の制御機構

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112002

研究代表者名：鈴木 淳史(九州大学・生体防御医学研究所・教授)

【研究の目的】

本新学術領域の目的は「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。上皮管腔組織は「非極性化上皮細胞集団が間質へ肥厚し伸長と分岐を繰り返した後に極性化して管腔構造を構築する形式」と「極性化上皮細胞が内腔を有したまま伸長し分岐する形式」といった二つの異なった形式によって形成されると考えられる。ところが、それら上皮管腔組織を構成する個々の上皮細胞を見てみると、それらの分化・成熟の機序には類似点が多いことがわかる。すなわち、どちらの形式であっても上皮管腔組織が形作られるためには、まず、組織幹細胞から上皮細胞が分化し、それらが機能的かつ形態的に成熟する必要がある。そこで本研究では、二種類の管腔形成における共通の分子基盤と相違を理解するために、管腔組織を形成する上皮細胞の供給源である組織幹細胞に着目し、その維持や上皮細胞への分化決定を制御する分子機構を明らかにする(図1)。

肝臓は、肝芽細胞(肝発生時期の肝幹細胞)が盛んに増殖する中で、肝細胞と胆管上皮細胞へと分化しながら徐々に上皮細胞としての特徴を獲得することによって形成されていく。そして、成熟した肝臓では、肝細胞間で形成される毛細胆管に肝細胞から胆汁が分泌され、その後、胆汁は胆管上皮細胞が形成する肝内胆管を通じて肝外の総胆管へと流出する。こうしたことから、肝臓は、組織幹細胞が上皮細胞へと分化し、上皮管腔組織を形成する一連の過程を理解するために適した研究対象のひとつということが出来る。これまでの研究で、我々は、マウス胎仔肝臓から肝芽細胞を特異的に分離し、それらをクローナルな培養系を用いて解析する方法を独自に開発している。そのため、肝芽細胞の増殖や分化を制御する分子機構を詳細に解析することが可能である。以上のことから、本研究では、発生段階の肝臓の組織幹細胞である肝芽細胞に着目して研究を行うことにより、肝芽細胞の維持や、肝細胞や胆管上皮細胞へと分化して上皮管腔組織を形成する一連の過程を制御する分子機構・形態形成機構を明らかにし、組織幹細胞を用いた再生医療の実現やがん幹

細胞による組織形成異常の理解に貢献する。

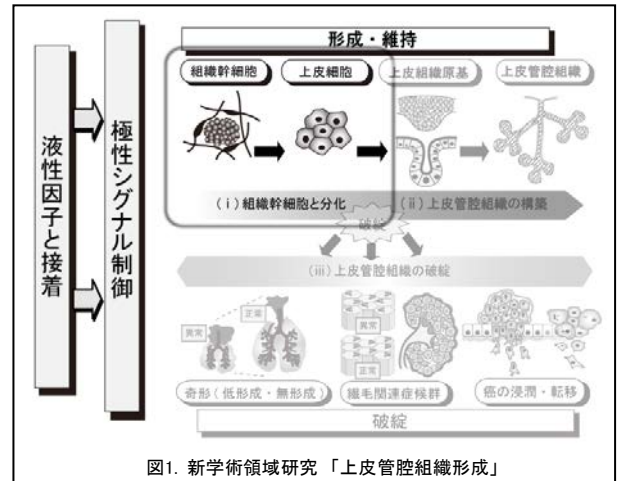


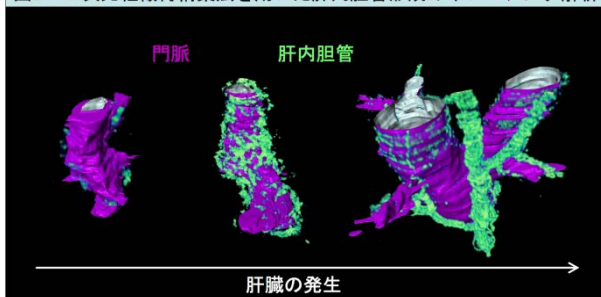
図1. 新学術領域研究「上皮管腔組織形成」

【研究の成果】

これまでに行った研究で肝芽細胞の増殖や分化を制御する転写因子として同定した Tbx3 についてさらに詳しく解析を進めた結果、特定のシグナル伝達経路による Tbx3 の発現制御機構を発見し、肝芽細胞の未分化性維持における Tbx3 の発現誘導メカニズムを明らかにした。また、肝芽細胞の未分化性維持に関するマイクロ RNA の機能と制御についても解析を行った結果、マイクロ RNA 制御タンパク質として知られる Lin28b が、マイクロ RNA の let-7b 並びに miR-125a/b の成熟化を阻害し、相互抑制的フィードバック作用を介して Lin28b 自身の発現を維持するとともに、肝芽細胞の幹細胞性(増殖能や分化能)の維持において重要な役割を果たすことが明らかとなった。興味深いことに、肝芽細胞における Lin28b の機能阻害は、肝芽細胞の増殖を抑制するだけでなく、肝臓内で管腔構造を形成する胆管上皮細胞への分化決定を促進することも判明した。以上の成果に加え、肝細胞分化にも着目して研究を行ったところ、肝細胞への分化決定がたった2種類の転写因子によって支配的に制御されていることを発見し、線維芽細胞にこれら2種類の転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞(誘導肝細胞様細胞:iHep細胞)へと直接変化させることに成功した。また、部分肝

切除等の障害後に生じる肝幹細胞が関与しない肝再生において、分裂を停止した肝細胞が再び増殖を開始するための分子機構を発見し、肝臓に対する再生療法や肝再生不全の原因究明と治療法の開発につながる研究成果を発表した。一方、生体内における細胞の分化転換と肝臓病との関係に着目して行った研究では、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がんや慢性肝炎時の細胆管反応が、実際は Notch シグナルを介した肝細胞の分化転換によって生じることを明らかにした。また、管腔形成の三次元立体解析においては、高解像度デジタル三次元再構築法と形態計測学的手法を用いた時空間的かつ定量的な解析により、肝発生における肝内胆管の立体的な形態形成機序を解明することに成功し

図2：三次元組織再構築法を用いた肝内胆管形成のイメージング解析



た(図2)。

【研究の意義・展望】

本研究では、肝臓における組織幹細胞の維持や分化決定を制御する分子機構だけでなく、肝臓の発生や再生、そして疾患のメカニズムについての理解が大きく進んだといえる。得られた知見や技術は、今後の再生医療の進展や新しいがん治療技術の開発に向け、その貢献が期待される。例えば、線維芽細胞から作製される iHep 細胞は、肝細胞の代わりとして細胞移植医療やバイオ人工臓器、創薬研究での利用が期待できる。また、肝内胆管がんや慢性肝炎時の細胆管反応が Notch シグナルを介した肝細胞の分化転換に起因するという発見は、今後の治療戦略を考える上で重要な知見となりうる。さらに、本研究で見出された Tbx3 や Lin28b などの転写因子は肝がん細胞でも発現が認められることから、肝がん細胞の増殖制御による肝がん治療法の開発にもつながると考えられる。一方、本研究で用いた三次元イメージング技術は、アプローチのしにくい組織内部の立体構造を解析可能なことから、今後、発生学や病理学の分野で広く利用されることが期待される。

このように、本研究では、肝臓における組織幹

細胞の維持や分化決定を制御する分子機構の解明に向け、肝臓の発生、再生、疾患のメカニズムを統合的に解析することにより、肝臓学全体に対する知識を集積し、それらの理解を深めることができた。今後も基盤となる肝臓の基礎生物学研究を進めながら、得られる知見や技術を利用した医療分野での応用研究の可能性に挑戦し続けていきたい。

【主な研究発表】

1. Takashima Y, Terada M, Uono M, Miura S, Yamamoto J, and *[Suzuki A](#). Suppression of lethal-7b and miR-125a/b maturation by Lin28b enables maintenance of stem cell properties in hepatoblasts. *Hepatology* 64, 245-260, 2016
2. Takashima Y, Terada M, Kawabata M, and *[Suzuki A](#). Dynamic three-dimensional morphogenesis of intrahepatic bile ducts in mouse liver development. *Hepatology* 61, 1003-1011, 2015
3. Sekiya S and *[Suzuki A](#). Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 122, 3914-3918, 2012
4. Sekiya S and *[Suzuki A](#). Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390-393, 2011



研究課題名：組織幹前駆細胞の極性制御と運命決定

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112001

研究代表者：大野茂男（横浜市立大学・医学研究科・教授）

連携研究者：廣瀬智威（横浜市立大学・医学研究科・講師）

連携研究者：秋本和憲（横浜市大・医・助教、現東京理科大学・薬学部・准教授）

連携研究者：佐々木和教（横浜市立大学・医学研究科・助教）

連携研究者：中谷雅明（横浜市立大学・医学研究科・助教）

連携研究者：Spyros Goulas（横浜市立大学・医学研究科・特任助教）

【研究の目的】

様々な組織の基本型の一つとも言える上皮管腔組織の形成・維持と破綻の仕組みを理解するためには、組織を構成する多様な分化段階の細胞群の起源となっている組織幹細胞や前駆細胞（幹前駆細胞）の理解が必要です。

本研究では、乳腺組織をモデルとして、組織幹前駆細胞の実態に迫ることを目的としました。乳腺は、組織幹前駆細胞の濃縮及び同定技術や、単離細胞から上皮管腔組織を構築する様々な実験系が開発されていると同時に、最終的にマウスモデルを用いた検証が可能だからです。

本研究では、解析の切り口として、細胞極性タンパク質（様々な細胞の極性を制御する普遍的な因子）に着目しました。細胞極性因子は、上皮管腔組織の機能に必須であると同時に、形成と維持に必要なであるとの証拠がマウスモデルの研究から多数集積しているからです。また、幹細胞の非対称細胞分裂に関わる事が、線虫受精卵やショウジョウバエ神経芽細胞で示されているからです。この点は、哺乳動物ではほとんど未解明の分野です。

本研究では、具体的に以下の点を明らかにすることを目的として設定しました。

1. 乳腺組織幹細胞及び前駆細胞の本態
2. 両者の増殖制御機構
3. 乳がんとの関わり
4. 細胞極性の制御機構

これらの解析を通じて、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の根底にある普遍的な機構に迫ることを最終的な目標としました。

【研究の成果】

1. 乳腺組織幹細胞及び前駆細胞の本態について

マウス乳腺組織の細胞をバラバラにして、浮遊培養系でのスフィア形成、単層培養系でのコロニー形成、三次元マトリゲル内でのオルガノイド形成の三通りの条件で培養し、サイズ、CD44、Ki67、K18 の発現などで、パターン化すると、単一の幹細胞からできた様々なスフィアの中で、最もサ

イズが大きく CD44 陽正細胞を多数含むものが出現します。様々な解析の結果、これは幹細胞に由来するものと判断できました。

また、K18 陽正の小さなスフィアはコロニーを形成し、管腔前駆細胞に由来するものと判断できました。一方、セルソーターを用いて分離した幹細胞のマーカーCD49 と CD29 強陽性の細胞分画からは充填したオルガノイドが形成されました。管腔前駆細胞の濃縮した CD24 陽正 CD29 弱陽正の細胞分画からは、内腔が抜けたアシナーあるがノイドが形成されました。

これらの培養系を用いて、幹細胞と管腔前駆細胞とを明確に区別して、それらの性質を調べる事が出来るようになりました。

2. 幹細胞と管腔前駆細胞の増殖制御機構

上述の系を用いて、極性タンパク質 aPKC の阻害剤を用いて aPKC のキナーゼ活性を抑制したり、或いは aPKC-shRNA を発現するレンチウイルスを導入して aPKC をノックダウンして発現を抑制する事により、幹細胞に由来するスフィア形成と充填型オルガノイド形成、或いは管腔前駆細胞に由来するアシナー様オルガノイド形成とコロニー形成などを調べました。その結果、aPKC の抑制が幹細胞に由来するスフィア及びオルガノイド形成を強く抑制する事を見いだしました。このことは、aPKC が幹細胞の自己更新に正の役割を持っていることを示しています。一方、aPKC の抑制は、管腔前駆細胞に由来するコロニーの巨大化と充填型の異常な形状を有するオルガノイドの形成を誘導しました。このことは、管腔前駆細胞では、aPKC はその増殖に抑制的な役割を果たしている事を示しています。

つまり、極性タンパク質 aPKC が、幹細胞と管腔前駆細胞とで、逆の役割を果たしている事がわかりました。さらなる研究から、幹細胞の増殖・自己更新における aPKC の促進的役割を媒介する新たな転写因子の同定に成功しました。

前駆細胞での aPKC の抑制的な役割に関しても、マウスの乳腺で aPKC 遺伝子をノックアウトする事により生じる異常を解析する事により

明らかにすることができました。そこでは乳管上皮細胞の異常増殖に起因する前がん病変が表れ、細胞レベル及び分子生物学的な解析から、ErbB2 遺伝子の転写亢進と増殖シグナル活性化が起きていることを見つけました。分子レベルでは、通常の乳腺前駆細胞において aPKC は ErbB2 を介する増殖を抑制している事がわかりました (aPKC-ErbB2 軸)。なお、このマウスでは幹細胞 aPKC 遺伝子がノックアウトされていないらしく、幹細胞の異常は見られませんでした。

3. 乳がんと関わり

ErbB2 は、一部の乳がんで遺伝し増幅している事がわかっており、ErbB2 の抑制抗体が、著効を示します。しかし、一部の症例では遺伝子増幅はないにも関わらず、発現が亢進しています。上述の管腔前駆細胞における aPKC-ErbB2 軸の発見は、この種の乳がんを説明できる可能性が浮上しました。そこで、乳がんの症例における aPKC、ErbB2、がん幹細胞マーカーALDH などの発現を調べ、一部の乳がんで、aPKC 陰性、ErbB2 陽正、ALDH 陽正細胞が増加している事を確認しました。これは、ヒト乳がんの一部の症例では、aPKC の消失により ErbB2 を起点とする増殖異常が生じている事がわかりました。管腔前駆細胞の増殖抑制機構の破綻がこのがんの発症の原因となっていることを明確に示しています。

なお、これまでに、様々ながんで、aPKC の発現が亢進している事、そしてそれががんの悪性度と相関していることが、我々及び他のグループによって報告されています。乳がんでも半分以上の症例では、aPKC が高発現しています。また、子宮頸がんの前がん病変 CIN では、aPKC の核移行が予後判定に利用可能であることも見いだしました (文献1)。

4. 細胞極性の制御機構

細胞極性タンパク質 aPKC-PAR3 系を介した上皮細胞極性の制御機構についても、腎尿細管上皮細胞の二次元培養系を用いて、新たな媒介因子 Girdin を見つけました。aPKC-PAR 系の抑制因子 Lgl1 が細胞増殖を直接制御している事も見つけました。

【研究の意義・展望】

本研究により、普遍的な細胞極性制御系である aPKC-PAR 系が、様々な細胞の極性制御に加えて、幹細胞や前駆細胞の増殖に様々な形で影響を与えていることがわかりました。さらんい、その分

子機構の一端が見えてきました。また、培養上皮細胞系を用いて、aPKC-PAR 系の制御機構について新規の標的タンパク質を多数見いだすなど、分子機構に関して深い理解を得ることができました。つまり、上皮管腔組織において、aPKC-PAR 系は、細胞 (と組織) のかたち (極性) のみならず、幹細胞や前駆細胞の増殖を様々な機構で制御していることが明らかになったこととなります。

さらに、これらを踏まえてヒトがんの臨床検体を解析した結果、aPKC の発現と核局在とが、子宮がん、乳がんなどの前がん病変、悪性度と予後の判定に利用できる可能性を提示することができました。aPKC の発現は、同じ乳がんでも症例により、逆の役割を果たしている事も明らかとなりました。

今後、aPKC の発現や核局在は、乳がんを初めとする様々ながんの精密診断の基準として利用できる可能性があります。

【主な研究発表】

1. Mizushima T, Asai-Sato M, Akimoto K, Nagashima Y, Taguri M, Sasaki K, Nakaya M, A, Asano R, Tokinaga A, Kiyono T, Hirahara F, Ohno S, *Miyagi E: Aberrant Expression of the Cell Polarity Regulator aPKC λ /iota is Associated With Disease Progression in Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN): A Possible Marker for Predicting CIN Prognosis. *Int J Gynecol Pathol*, 35(2): 106-117, 2016.
2. *Osada S, Minematsu N, Oda F, Akimoto K, Kawana S, Ohno S: Atypical Protein Kinase C Isoform, aPKC λ , Is Essential for Maintaining Hair Follicle Stem Cell Quiescence. *J Invest Dermatol*, 135(11): 2584-2592, 2015.
3. Yamashita K, Ide M, Furukawa K. T, Suzuki A, Hirano H, *Ohno S: Tumor suppressor protein Lgl mediates G1 cell cycle arrest at high cell density by forming an Lgl-VprBP-DDB1 complex. *Mol Biol Cell*: 26(13):2426-38, 2015.
4. Sasaki K., Kakuwa T, Akimoto K, Koga H, *Ohno S. Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-Galphi3 signaling. *J Cell Sci*, 128: 2244-2258, 2015



研究課題名：分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112001

研究代表者名：菊池 章(大阪大学・医学系研究科・教授)

研究分担者名：麓 勝己(大阪大学・医学系研究科・助教)

松本 真司(大阪大学・医学系研究科・助教)

【研究の目的】

本研究では、[液性因子]と「接着」により、上皮細胞が管腔構造を形成する分子機構を明らかにすることを目的とした。臓器固有の機能に応じて管腔組織の構造は臓器毎に多様性があり、管腔構造の形成機序には一定の臓器特異性があると考えられる。そこで、管腔構造形成の過程を上皮細胞集団の「伸長」、「分岐」、「極性化」に分け、これらの過程における共通の制御機構を見出すと共に相違点を明らかにする。

「伸長」：管腔構造を形成するためには、上皮細胞は基質内で増殖すると共に、伸展・運動しなければならない。上皮細胞の伸長を制御する「液性因子」と「接着」シグナルを明らかにする。

「分岐」：限られた体積の中で管腔内腔の表面積を広くするために、管腔構造が分岐することが必須である。上皮細胞と間質細胞から分泌される液性因子や ECM ならびに上皮細胞と間質細胞との相互作用が分岐を誘導する機構を明らかにする。

「極性化」：上皮細胞が頂底極性を構築することは、生体内外を分離し、中空構造を形成するために必須である。一方、管腔構造を伸長したり、分岐したりする際には、上皮細胞は極性を維持し続ける場合と、一過的・局所的に頂底極性を喪失する場合がある。この上皮細胞の管腔構造形成における極性化・脱極性化の分子機構を明らかにする。

本研究では、三次元培養法と器官培養法を用いて、二種類の上皮管腔組織形成における液性因子と細胞接着の役割を、「伸長」、「分岐」、「極性化」の三つの過程において、Wnt シグナルによる制御を中心に解析する。さらに、管腔組織の形成過程並びに恒常性維持の機構が破綻し、細胞ががん化に至るプロセスについて明らかにする。

【研究の成果】

1. 新規の管腔制御因子の発見と発がんへの関与

正常上皮を Wnt3a と EGF いう二つの液性因子の存在下で培養すると、上皮が伸長と分岐を繰り返してチューブ状の管腔構造を形成する新たな三次元管腔形成モデルを作製し、Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF/Ras シグナルの同時活性化によって発現が誘導される形態形成制御因子として Ar14c と P2Y2R を報告した。Ar14c は Rac と Rho の活性制御を介して細胞骨格と形態を変化させ、細胞の運動能を亢進すると同時に細胞骨格の変化は転写活性化因子 YAP/TAZ によって細胞増殖

シグナルへと変換された。一方で、P2Y2R は細胞膜上でインテグリンと相互作用し、フィブロネクチンとインテグリンとの結合を適切に抑制することで管腔形成を誘導した。

Wnt と EGF シグナルの異常活性化が報告されているヒトがん Ar14c の発現との関係に着目し、大腸癌および肺腺癌において Ar14c が高発現することを見出した。Ar14c の siRNA は皮下ゼノグラフト腫瘍形成を阻害することから、Ar14c が癌における新規創薬標的となる可能性を明らかにした。さらに、Ar14c は肺扁平上皮癌においては Wnt および EGF シグナル非依存的に高発現しており、その発現には脱メチル化酵素 TET1-3 依存的な Ar14c 遺伝子の 3' 非翻訳領域の脱メチル化が重要であることを明らかにした。

2. Wnt シグナルによる唾液腺の分化と形態形成の制御

外分泌腺である唾液腺原基を用いた解析では、Wnt シグナルの活性化が分岐形態形成に進行に伴って生じる End bud (未分化) から腺房上皮への分化を強く抑制することを見出した。唾液腺発生前期において Wnt/ β -カテニンシグナルは転写因子 Myb の発現を介して KIT の発現を抑制し、腺房分化を抑えるとともに導管形成を促進した。発生段階に応じた Wnt と KIT シグナルの活性化バランスが発生過程における管腔形態形成から腺房分化へのスイッチングを調節する新規の機構を明らかにした。

3. Wnt シグナルによる肺胞形態形成の制御

肺を用いた解析では発生初期 (E9.5-E16.5) で形成された分岐構造が発生後期 (E16.5-E18.5) に肺胞へと変化する機構を上皮培養系及び数理モデルを用いて解析した。発生初期では Wnt シグナル依存的に上皮細胞が頂端収縮することで分岐構造を形成した。一方、発生後期では Wnt シグナルが抑制されることにより頂端収縮が解除されることで肺胞構造へと変化するを見出した。この過程に関連する Wnt 下流因子として Mark1 を同定し、頂端収縮を仲介する因子として機能することを明らかにした。これらの結果から、

胎生期肺の上皮組織が Wnt シグナルの活性に依存して形態変化する新たな機構を明らかになった。

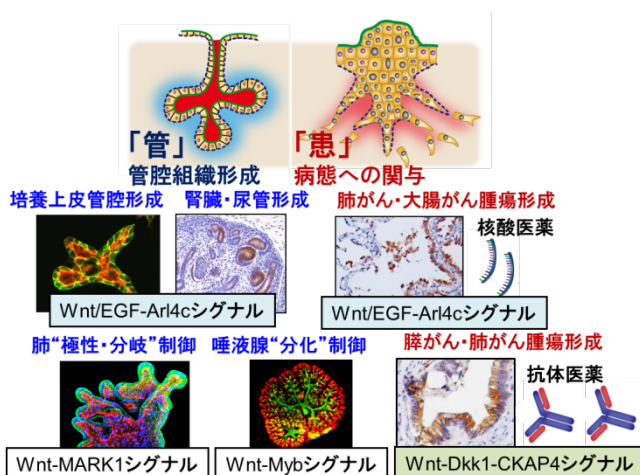
4. 新規の発癌シグナルの発見と抗がん剤開発への可能性

分泌タンパク質 DKK1 は Wnt シグナルの抑制因子として知られている一方、がん細胞において過剰発現し、がん増殖を亢進することが報告されていた。そこで、DKK1 の受容体を探索することを目的し、極性化 MDCK 細胞において DKK1 が細胞増殖を促進することを見出し、DKK1 の新規受容体として CKAP4 を同定した。DKK1 は CKAP4 を介して PI3K-AKT 経路を活性化し、細胞増殖を誘導することを見出した。DKK1 と CKAP4 は膵癌と肺腺癌、肺扁平上皮癌において高発現すること、両タンパク質の共発現症例が予後不良であることを明らかにした。膵がん及び肺がん細胞株において DKK1 と CKAP4 が過剰発現し、それぞれを発現抑制することによってがん細胞増殖が阻害された。さらに、抗 CKAP4 抗体は皮下ゼノクラフト腫瘍形成を阻害したことから、DKK1-CKAP4 シグナルもまた癌の創薬標的となる可能性が示唆された。

以上の、5年間の研究期間を通して、管腔形成の新たな制御機構を解明するとともに、その破綻ががんを初めとする種々の疾患に関与することを明らかにした。

【研究の意義・展望】

Ar14c は多様ながん種において過剰発現し、腫瘍化に関与することが明らかになってきている。そこで血中全身投与で Ar14c の発現を抑制し、抗



腫瘍効果を有する医薬品、特に核酸医薬品としてアンチセンス核酸の開発を目指す。

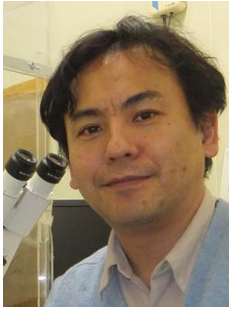
胎生期の唾液腺原基においては Wnt シグナルが分化を抑制しながら幹・前駆細胞の増殖を促進することで形態形成を促す働きを有していたことから、成体唾液腺における Wnt シグナルの役割を明らかにする。特に、成体唾液腺の傷害後の再生過程に着目し、Wnt シグナルの活性化が組織再生に与える影響と再生に寄与する Wnt 依存的な新規唾液腺幹細胞の同定を目指す。

胎生期の肺原基においては Wnt シグナルによる発生初期における分岐形成での役割を明らかにした。一方、発生後期及び出世前後や生体における呼吸器での機能は不明である。この点について、特に肺管形成における生理的意義を解析するために、Wnt シグナル関連因子の遺伝子改変マウスを用いた解析を行っている。

DKK1 は DKK2-4 を含むファミリーを構成する。他の DKK ファミリータンパク質についても同様に CKAP4 を受容体としてがん細胞増殖を制御するか否かを解析する。さらに CKAP4 の治療コンセンプトを確立するため、抗 CKAP モノクローナル抗体を作製し、中和活性の高い抗体のエピトープを決定する。

【主な研究発表】

1. [Fumoto K](#), Takigawa-Imamura H, Sumiyama K, Kaneiwa T, and [*Kikuchi A](#). Modulation of apical constriction by Wnt signaling is required for lung epithelial shape transition. *Development*. 144(1), 151-162, 2017
2. The WNT/MYB pathway suppresses KIT expression to control the timing of salivary proacinar differentiation and duct formation. [Matsumoto S](#), Kurimoto T, Taketo MM, Fujii S, and [*Kikuchi A](#). *Development*. 143(13), 2311-24, 2016
3. Kimura H, [Fumoto K](#), Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, Eguchi H, Shintani Y, Endo E., Inoue M, Doki Y, Okumura M, Morii E, and [*Kikuchi A](#). CKAP4 is involved in tumor progression as a Dickkopf1 receptor. *J Clin. Invest.* 126, 2689-2705, 2016
4. [Matsumoto S](#), Fujii S, Sato A, Ibuka S, Kagawa Y, Ishii M, and [*Kikuchi A](#). A combination of Wnt and growth factor signaling induces Ar14c expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J.* 33, 702-718, 2014



研究課題名：上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の3次元イメージング解析

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112005

研究代表者名：大橋 一正(東北大学・大学院生命科学研究科・教授)

【研究の目的】

私たちの体を構成している肝臓や肺、腎臓といった器官は、上皮細胞が層となった管状の上皮管腔組織を基本にして形作られている。組織の個々の上皮細胞は、三次元的な位置を認識し、協調的に表裏を決定する極性を形成して層構造となり、管腔を形成していく。このような組織の形態形成過程には、細胞の形や運動を制御する細胞骨格、細胞間の接着、細胞の極性を時空間的に適切に制御する必要がある。これらの制御には細胞骨格の一つであるアクチン骨格を制御するシステムが重要な役割を持つことが知られている。また、上皮細胞が集団となって協調的な振る舞いをするために、細胞間の接着や外環境の硬さなどから受ける機械的な力の作用に対する細胞の応答(メカノストレス応答)が重要な役割を担うことが明らかとなってきた。しかし、これらの細胞応答を行う細胞内の分子レベルの情報伝達機構は未だ不明な点が多く残されている。本研究は、上皮細胞が細胞集団内において外環境を感知して引き起こされるアクチン骨格の再構築、細胞接着、細胞極性形成、メカノストレス応答、細胞の増殖、分化を制御する分子機構をイメージング解析と関与する分子の機能解析によって解明することを目的とした。特に、細胞間接着からの張力と外環境の硬さによるアクチン骨格の再構築に関与する分子の網羅的探索を行いその制御機構を解明し、上皮管腔組織形成における三次元的な細胞集団の運動や形態の制御におけるメカノストレス応答の役割の解明を目指した。本研究は、上皮管腔組織形成制御の基本的な分子機構とその破綻による癌の悪性化の機構を理解するものであり、医療における基盤研究となることが期待される。

【研究の成果】

1. 乳腺上皮細胞の細胞外マトリックスの硬さ依存的な形質転換に関与する Rho-GEFの探索

乳腺上皮細胞は、正常組織と同等の硬さのコラーゲンゲル内で三次元培養すると極性化し内腔をもつシストが形成されるが、乳癌組織と同等の硬さの硬いゲル内では極性を失い無秩序な細胞塊となって増殖が促進される形質転換を引き起こす。この形質転換には、アクチン骨格の制御を

行う低分子量G蛋白質Rhoファミリー分子が関与しており、私たちは、Rhoファミリー分子の活性化因子(Rho-GEF)を網羅的な発現抑制実験によってスクリーニングして関与するものを探索した。その結果、Farp1を含む5種類のRho-GEFを同定した。Farp1は、細胞外マトリックスへの接着による増殖シグナルの活性化に必要であることが明らかとなり、また、接着分子であるインテグリンと結合することを見出した。

2. メカノストレス応答に関与するRho-GEFの同定と上皮細胞集団における機能の解明

メカノストレス応答に寄与するRho-GEFを探索するため、細胞への繰り返し伸展刺激による細胞の配向に寄与するRho-GEFをDbp1ファミリー分子63種類の発現抑制実験を行って探索した。その結果、11種類のRho-GEFが関与することを発見した。その中の一つであるSoloは、上皮細胞のカドヘリン依存的な細胞間接着を介して繰り返し伸展刺激による細胞の整列に寄与することが明らかとなった(研究発表論文2)。

3. メカノストレス応答に関与するRho-GEF, Soloを介したメカノシグナル伝達経路の解明

メカノストレス応答に関与するRho-GEFとして同定したRhoAのGEFであるSoloについてさらに解析を進め、上皮細胞に対するインテグリンを介した張力の負荷においてもSoloがRhoAの活性化、ストレスファイバー形成の誘導に必要であることを明らかにした。また、Soloが単層上皮特異的な中間径フィラメントであるケラチン8/18繊維に結合し、この結合がメカノストレス応答に必要であることを明らかにした。さらに、Soloの発現抑制は上皮細胞内のケラチン8/18ネットワークに大きな乱れを引き起こし、ケラチン8/18繊維の細胞膜への連結にSoloが重要であることが示唆された(研究発表論文1)。

4. 上皮細胞集団の秩序化におけるRho-GEF, Soloの機能解明

上皮組織が形成される初期の過程や管腔の伸長において、上皮細胞は協調して移動する集団移動を行う。集団移動において細胞間の接着部位に発生する機械的な力の役割を解明するため、メカノストレス応答に関与するRho-GEF, Soloの機能

を解析した。イヌ腎上皮MDCK細胞のコラーゲンゲル上における集団移動のモデルにおいてSoloの発現抑制を行った結果、細胞間接着を形成していない細胞の運動性には影響せず、細胞が集団となったときの移動速度のみが有意に加速することが明らかとなった。また、Soloの発現抑制は細胞内のケラチン8/18ネットワークの乱れと共に、細胞間接着構造の一つであるデスモソームにケラチン繊維を係留させるプラコグロビンの局在を細胞間接着部位において減少させることが明らかとなった。プラコグロビンとケラチン8/18繊維は、細胞間からの張力刺激に依存した細胞遊走に関与することが報告されており、張力の刺激によるデスモソームとケラチン8/18ネットワークの再構築にSoloが関与することが強く示唆された。

5. 上皮管腔組織形成過程におけるRho-GEF, Soloの機能解明

上皮管腔組織の形態制御におけるメカノストレス応答の関与と役割を明らかにするために、MDCK細胞のコラーゲンゲル内における管腔形成のモデルを構築してSoloの機能解析を行った。その結果、Soloの発現抑制により管腔の伸長が抑制され内腔が肥大することが明らかとなった(図1)。また、管腔構造に作用しているミオシンの収縮力に対するSoloの機能を解析した結果、内腔ルーメンの部位と外側の基底側のミオシン軽鎖のリン酸化にSoloが促進的に働くことが明らかとなった。これらの結果からSoloは、上皮管腔組織において管となった細胞層の内腔、基底面の協調した収縮力の発生に寄与し、管腔の伸長した形状や内腔の大きさを制御することが強く示唆さ

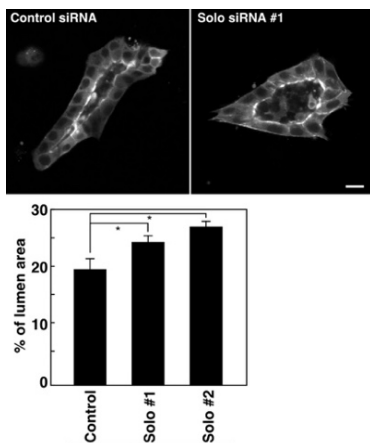


図1. MDCK細胞の管腔形成におけるSoloの発現抑制の効果。(上)正常条件での管腔構造(左上)とSoloを発現抑制した場合の管腔構造(右上)をアクチン骨格を染色して可視化した。(下)管腔全体に占める内腔(lumen)の面積の割合に対するSoloの発現抑制の効果を示した。Bar: 50 μ m

れた。

【研究の意義・展望】

本研究によって私たちは、上皮細胞が集団となって管腔を形成する過程において寄与するメカノストレス応答によるアクチン骨格再構築の新たな分子機構を発見することに成功した。外環境の硬さに依存した細胞増殖の制御機構の発見は、

癌の悪性化のメカニズムを解明する基礎研究に寄与するものである。また、上皮細胞間に発生させる張力を相互に調整し、細胞集団の協調した運動、形態形成、管腔組織の恒常性の維持に寄与する可能性をもつ分子機構を明らかにすることができた。さらに、メカノストレス応答に寄与するRho-GEF, Soloと単層上皮特異的な中間径フィラメントであるケラチン8/18繊維の結合を見出し、Soloが細胞内の正常なケラチン8/18ネットワークの形成とメカノストレス応答に寄与することを明らかにすることに成功した。これは、アクチン骨格と中間径フィラメントを協調的に制御して上皮管腔組織の形態形成を制御する新たな分子機構の発見であった。

今後は、細胞間に作用する張力などの機械的力を生細胞内でリアルタイムに可視化する方法を開発し、細胞集団において個々の細胞に作用する機械的な力が細胞の形態、運動、極性、分化・増殖をどのように時空間的に制御しているかを解明することが重要である。これらの解析技術の開発と合わせてメカノストレス応答に関与する分子群の解析を行うことで、上皮管腔組織の形態形成における新たな分子機構の発見が期待される。さらには、これらの研究がメカノストレス応答の異常による疾患の原因解明やエネルギー代謝の人為的制御といった新たな研究へと発展することが期待される。

【主な研究発表】

1. Fujiwara S, *Ohashi K, Mashiko T, Kondo H, * Mizuno K. Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for force-induced stress fiber reinforcement. *Mol. Biol. Cell*, 27, 954-966, 2016
2. Abiko H, Fujiwara S, *Ohashi K, Hiataru R, Mashiko T, Sakamoto N, Sato M, and * Mizuno K. Rho-guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch induced reorientation of vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 128, 1683-1695, 2015
3. *Ohashi K, Sampei K, Nakagawa M, Uchiumi N, Amanuma T, Aiba S, Oikawa M, and * Mizuno K. Damnacanthal inhibits cell migration and invasion via direct inhibition of LIM-kinase. *Mol. Biol. Cell* 25, 828-840, 2014
4. *Ohashi K, Fujiwara S, Watanabe T, Kondo H, Kiuchi T, Sato M, and * Mizuno K. LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 286, 36340-36351, 2011



研究課題名：器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112006

研究代表者名：大谷 浩(島根大学・医学部・教授)

研究分担者名：八田 稔久(金沢医科大学・医学部・教授)

宇田川 潤(滋賀医科大学・医学部・教授)

【研究の目的】

私たちの身体には、消化器、呼吸器などチューブ状の組織（上皮管腔組織）の組み合わせでできた臓器があり、生命を支えています。細胞や組織はきちんとした方向性（極性）をもって配列して、臓器の「正しい」形ができあがっています(図1)。形態異常（奇形）は、細胞や組織の極性の異常が重なりあって、臓器の形の異常を生じるもので、臓器自体の大きさの異常や、管腔の長さや伸びる方向の異常、管腔の太さや分岐の異常など、様々なパターンが知られています。これまで多くの臓器の様々な異常を、「極性」の異常という観点から俯瞰的にとらえる研究はなされてきませんでした。私たちは、上皮管腔組織の異常およびその基礎となる正常の発生パターンを、個体レベルにおける観察、細胞・組織レベルにおける観察・計測と実験的な解析、ならびに数学の解析手法を用いて、統合的・俯瞰的に詳しく調べ、全身の多くの臓器に共通した、あるいは臓器によって異なる、細胞や組織の極性の異常がどのように重なって、全身の管腔臓器における共通あるいは異なる形態異常のパターンにつながるのかを明らかにすることを目的としました。

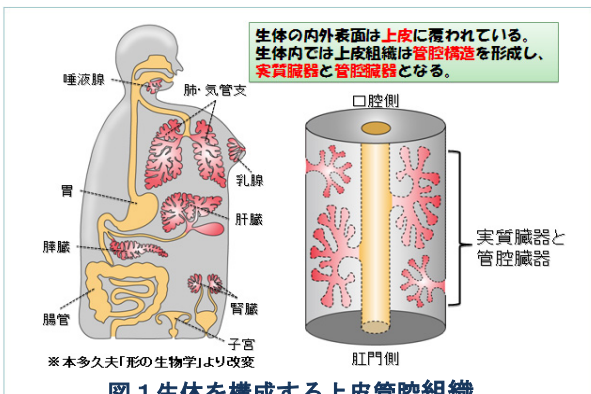


図1 生体を構成する上皮管腔組織

【研究の成果】

(1) 発生過程の形態学的データの蓄積と解析

①ヒト胎児およびマウス胎仔の臓器の大きさなどを詳しい観察して正確に計測し、それらのデータに基づいて数学的に解析することにより、腸管、膵臓、尿管、脳、心臓、さらに、方向性（極性）をもって細胞が増殖する骨・軟骨など全身の臓

器・組織について、発生が異常かどうかを調べるための、正常な発生過程における肉眼レベル及び顕微鏡レベルの形の正常な基準に関して、多くの新しい知見を得ました。

②数学的な解析により、ヒトの全身の臓器が、臓器の間で「調和」しながら発生することを明らかにして、また成人で働くことが知られている副腎皮質刺激ホルモンなどのホルモンが、このような臓器の生まれる前の発生を調節する可能性を新たに明らかにしました。

(2) 上皮管腔組織における幹細胞の増殖調節機構 (interkinetic nuclear migration: INM) の解析

脳や眼など（外胚葉に由来する上皮組織に分類されます）において幹細胞の増殖や分化を調節する機構として INM と呼ばれる現象が詳しく研究されています。発生初期の上皮管腔組織の壁を作っている細胞（上皮幹細胞）は、内腔表面（頂表面）と管腔の周囲との境（基底面）を垂直に結ぶ軸（頂底軸）に沿って並んでいます。INM は、その上皮細胞の細胞核が頂底軸に沿って上下に周期的に移動しながら分裂する現象で、幹細胞の増殖の効率や幹細胞からより成熟した細胞への分化を調節する機構として重要であることが分かっています。

このように INM は、頂底軸という細胞極性に基づいた制御と細胞の増殖・分化が連動して調節されるメカニズムです。今回の研究によって、細胞核の分布がどのように変化するかについての詳細なデータを数学的に解析した結果、INM が、マウス胎仔の腸管の全長と食道・気管（内胚葉由来の上皮組織）、尿管（中胚葉由来の上皮組織）に存在することが明らかになりました。さらに INM は共通してありますが、臓器によって、あるいは発生段階の時期によって、INM の周期パターンなどが変化することを明らかにしました（図2）。これによって、INM が全身の三胚葉由来の上皮管腔組織において共通した幹細胞の増殖や分化を調節するメカニズムとして働くことが明らかになりました。さらに INM は、発生の時期や臓器ごと、臓器の部位ごとに変化して働くことにより、臓器を作る細胞の種類や総数、分布

を調節することを通して、臓器の位置、形、大きさ(さらに例えば腎臓における尿のろ過器にあたるネフロンなどの構造機能的単位の総数)の決定にとても重要な役割を果たす可能性が示されました。

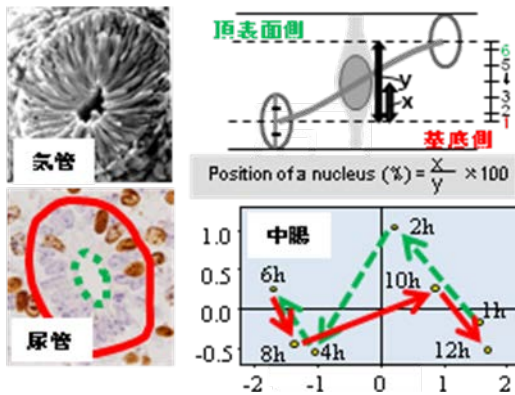


図2 上皮管腔組織における INM の解析

全身の上皮管腔組織はこれまで一般に考えられていた重層上皮ではなく単層(偽重層:重層のようにみえる)上皮であり、DNA 合成期にマークした核の位置が細胞周期に同期して時間とともに移動すること (INM) を、詳しい核の位置の計測と数学による解析を用いて示しました。

(3) 遺伝子改変動物の解析

発生の過程で重要な役割を果たす成長因子とその受容体の遺伝子 (*Wnt11*, *Wnt5a/Ror2*) を遺伝子工学により壊したマウス (ノックアウト: KO マウス) の腸管や腎臓・尿管などに形態異常 (奇形) が起こることを明らかにしました。そして、その異常には、太く短い形から細長い形に変わる現象(粘土の棒を手のひらで押しながら転がすと細長くなるように、中心の軸に向かって押されて細胞の配置が変わることで細長くなる現象:収斂伸長) など、細胞・組織レベルにおける極性をコントロールする機構 (例えば、上のような中心軸へ向かう頂底軸に沿った方向に細胞を再配置する) の異常が関係することを明らかにしました。さらに上で述べた INM の異常によって肉眼レベルの形態異常 (奇形) が生じることを、腸管の例で明らかにしました (図3)。これは、細胞・組織の極性と幹細胞の増殖や分化を制御するメカニズムである INM の調節が、上皮管腔組織や臓器の形・大きさの調節に密接に関係することを示すものです。つまり、全身の上皮管腔組織に共通してはたらいっている細胞レベルの極性制御や幹細胞の増殖分化を調節する機構の破綻が、全身の臓器における組織・肉眼レベルの形態形成の異常に、臓器に共通して、あるいは臓器ごとに違うやり方で関わる可能性を示した端緒となるもの

です。

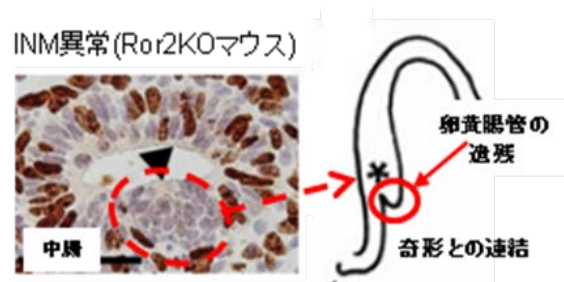


図3 *Ror2*KO マウス胎児の腸 (中腸) における INM の異常と肉眼的奇形との関連

「卵黄腸管遺残」という肉眼レベルの奇形と、マークされない(赤点線: INM をしていない)上皮細胞の塊が対応して存在することから、両者の間に因果関係があることが示唆されました。

【研究の意義・展望】

本研究により、全身の臓器の発生過程に共通した、幹細胞の極性と密接に関係する増殖・分化を調節するメカニズムである INM が存在し、かつ臓器や発生時期により使い分けられていることが明らかになりました。これにより全身の上皮管腔臓器の形態異常を、包括的に理解できる糸口が見つかったといえます。しかし、各臓器の部位や、発生時期による違いはまだ十分に調べられていません。また KO マウスにおける形態異常と INM による細胞数や配置の調節の異常がどのように関係するのか、詳細はまだわかっていません。今後さらにこれらの研究を展開して、細胞の極性の制御と臓器の形態異常と関係を解明していきます。

【主な研究発表】

1. Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, and *Otani H. Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Congenit Anom* 56, 127-134, 2016
2. *Naito K, Notsu A, Udagawa J, and Otani H. Statistical analysis with dilatation for development process of human fetuses. *Stat Methods Med Res* 2014 Jul 22
3. *Inoue T, Hashimoto R, Matsumoto A, Jahan E, Rafiq AM, Udagawa J, Hatta T, and Otani H. In vivo analysis of Arg-Gly-Asp sequence/integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated signal involvement in embryonic enchondral ossification by *exo utero* development system. *J Bone Miner Res* 29, 1554-1563, 2014



研究課題名：平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112007

研究代表者名：南 康博(神戸大学・医学研究科・教授)

研究分担者名：真嶋 隆一(東京大学・医科学研究所・助教)平成23～24年度

手塚 徹(東京大学・医科学研究所・助教)平成25～27年度

【研究の目的】

上皮管腔組織は、ヒトをはじめとする多細胞生物における多くの器官において必須かつ基本となる構造ですが、このような構造が如何にして構築されるのか、またどのような分子機序により上皮管腔組織が破綻に至り諸疾患をきたすのか、については未だ謎に包まれ不明な点が多いのが実状です。上皮管腔組織の形成や維持には様々な過程が必要ですが、上皮管腔組織の頂表面(内腔面)と基底面の確立に重要な‘頂底極性シグナル’とその軸と直交する‘平面細胞極性シグナル’が秩序だって協調的に働くことが必要不可欠です。また、上皮細胞の頂上側には一次繊毛と呼ばれる構造が存在し、内腔面での物理的・化学的信号を受容するシグナルセンサーとして機能することが知られています。

我々は、平面細胞極性を制御する液性因子である Wnt5a とその受容体である Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ (Ror1, Ror2) を介する平面細胞極性シグナル (Wnt5a-Ror2 シグナル等) が様々な細胞機能を制御すること、またこのシグナルの異常が上皮管腔組織の先天奇形や癌の浸潤などに密接に関わることを明らかにしてきました。また、一次繊毛の形成や機能の制御に重要な‘繊毛シグナル’が癌細胞の特性に関わることを示唆する成果を得ておりました。

このような我々独自の研究背景を踏まえて、本研究では‘細胞平面極性シグナル’に着目し、上皮管腔組織の形成・維持とその破綻の仕組み、さらにはこのシグナルと‘繊毛シグナル’に着目し、癌の浸潤などの病態との関連を明らかにすることを目的としました。本研究では病的側面からのアプローチを主軸としていますので、細胞レベルでのこれらのシグナルの攪乱実験、三次元培養や器官培養でのシグナル攪乱実験、さらには個体レベルでこれらのシグナルを攪乱した各種遺伝子改変マウスを用いて、分子・細胞・組織/器官レベルでのシームレスな研究を行いました。上皮管腔組織としては、消化管、腎臓、神経管、唾液腺(顎下腺)を対象として研究を行いました。以下に腎臓を対象とした研究の成果と癌細胞の浸

潤の仕組みについて本研究から得られた成果を紹介いたします。

【研究の成果】

腎臓の形態形成では、ウォルフ管(上皮組織)と後腎間葉(間葉組織)の適切な相互作用による左右一対の尿管芽形成過程が重要な役割を担っています。平面細胞極性シグナルにおいて中心的役割を担う Wnt5a やその受容体である Ror2 を欠損したマウスでは、ヒトの代表的腎奇形である重複尿管・腎臓や腎無形成が見出され、腎形成における Wnt5a-Ror2 シグナルの重要性が明らかになりました。尿管芽形成においては、後腎間葉(間葉)から分泌される GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) がウォルフ管の上皮細胞表面の Ret (GDNF 受容体) に結合することにより惹起される GDNF-Ret シグナルが重要な役割を担うことが知られていました。本研究により、時空間的に制御された Wnt5a-Ror2 シグナルと Wnt5a-Ror1 シグナルが協調的に働き、発生過程での間葉の配置やそこでの GDNF の発現を制御し、腎臓の形態形成において重要な役割を担うことを明らかにしました。

一方、片側尿管結紮による腎線維症モデルマウスを用いた解析から、腎障害・炎症による尿管上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT:epithelial-to-mesenchymal transition) に伴い Wnt5a-Ror2 シグナルが過剰に活性化され、マトリックスメタロプロテアーゼ 2 [MMP (matrix metalloproteinase) -2] の発現、産生を介して基底膜が破壊され、腎間質での線維化の亢進がもたらされることを明らかにしました。

また、本研究から骨肉腫細胞や乳癌細胞などの癌の浸潤において Wnt5a-Ror2 シグナル、または Ror2 シグナルが重要な役割を担うことを明らかにしました。骨肉腫細胞では EMT 関連転写因子 Snail を介して Wnt5a、Ror2 の発現が誘導され、Wnt5a-Ror2 シグナルが恒常的に活性化されることにより、MMP-13 の発現及び浸潤突起の形成が誘導されることが見出されました。また、骨肉腫細胞や乳癌細胞などでは、(Wnt5a 非依存的な)

Ror2 シグナルにより、繊毛形成に必須な役割を担う繊毛内輸送タンパク質の1つである IFT20 (intraflagellar transport 20) の発現が誘導されることを見出しました。これらの癌細胞では一次繊毛が消失していますが、発現誘導された IFT20 はシスゴルジ体に局在し、そこでゴルジ体膜タンパク質 GM130 や AKAP450 (A kinase-anchoring protein 450) と結合することにより微小管マイナス端を形成し、ゴルジ由来微小管の重合・伸長を促進することを明らかにしました。その結果、ゴルジ体から浸潤突起への極性を持った順行性細胞内小胞輸送が促進し、MMP-13 や MT1-MMP などの浸潤に関わる、細胞外基質を分解するタンパク質が効率的に浸潤突起に運ばれ、これらの癌細胞の浸潤能が亢進することが示されました。

さらに、新たな成果として、間葉系幹細胞 (MSCs: mesenchymal stem cells) では、発現レベルは低いものの Wnt5a、Ror2 が発現しており、細胞自律的な機構で活性化された Wnt5a-Ror2 シグナルにより、ケモカインの1つである CXCL16 の発現誘導、産生が認められることを見出しました。MSCs は癌微小環境の構成要素 (細胞) の1つであることが知られていますが、MSCs より産生・分泌される CXCL16 が、CXCL16 の受容体である CXCR6 を発現する低分化型胃癌細胞に作用して、胃癌細胞の増殖が促進されることが明らかになりました。すなわち、Wnt5a-Ror2 シグナルは、癌細胞そのものにかぎらず、癌細胞を取り巻く癌微小環境を構成する MSCs においても重要な役割を担い、癌細胞の増殖に寄与することが示されました。

【研究の意義・展望】

本研究により、平面細胞極性シグナル、特に Wnt5a-Ror2 シグナルが、発生過程での上皮管腔組織の形成において担う新しい役割が明らかになりました。これまで Wnt5a-Ror2 シグナルは、発生における収斂伸長運動や平面細胞極性を制御することにより、形態形成や消化管などの上皮管腔組織の構築に必須の役割を担うことが知られていましたが、本研究から Wnt5a-Ror2 シグナルが、上皮-間葉組織の相互作用を制御することにより腎臓の組織構築において重要な役割を担うことが明らかになりました。Wnt5a、Ror2 遺伝子欠失マウスにおいて、ヒトでの代表的腎奇形である重複尿管、重複腎臓、さらには腎無形成が見られたことから、今後実際にヒトでの重複尿管・腎臓の症例において、Wnt5a-Ror2 シグナル (ま

たは Wnt5a-Ror1 シグナル) の異常が認められるかどうかを明らかにすることが重要だと思われます。

また、本研究から、癌細胞で恒常的に高いレベルで活性化された Ror2 シグナルが一次繊毛形成に重要な IFT20 を発現誘導し、それが一次繊毛ではなくシスゴルジ体に局在し、癌細胞の浸潤に大きく関わることを明らかにしました。この成果は、今後シスゴルジ体における IFT20 の機能を阻害することが癌治療の1つの新しい戦略となることを示唆しております。これまで、一次繊毛はほとんど全ての正常細胞に存在しますが、一方、癌細胞ではしばしば一次繊毛が消失していることが知られており、癌細胞における一次繊毛の消失は、癌細胞の特性の1つと考えられています。残念ながら、現時点では、なぜ癌細胞では一次繊毛が消失しているかについて、その分子機構については明らかになっていません。この点について、本研究の成果は、癌細胞において恒常的に高レベルで活性化された Ror2 シグナルが細胞内の IFT20 の局在を制御していることを示唆していると考えられる。今後はこのような視点から、癌細胞の特性の1つである一次繊毛の消失の分子機構を解明していきたいと考えております。

【主な研究発表】

1. Nishita, M., Nishio, T., Park, S-Y., Kamizaki, K., Wang, Z-C., Tamada, K., Takumi, T., Hashimoto, R., Otani, H., Pazour, G. J., Hsu, V. W., and *Minami, Y. Ror2 signaling regulates Golgi structure through IFT20 for tumor invasiveness. *Scientific Rep.* 7, 1, 2017
2. Takiguchi, G., Nishita, M., Kurita, K., Kakeji, Y., and *Minami, Y. Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis. *Cancer Sci.*, 107, 290-297, 2016
3. Nishita, M., Qiao, S., Miyamoto, M., Okinaka, Y., M., Yamada, M., Hashimoto, R., Iijima, K., Otani, H., Hartmann, C., Nishinakamura, R., and *Minami, Y. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. *Mol. Cell Biol.* 34, 3096-3105, 2014
4. Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., and *Minami, Y. Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP)-13 expression. *J. Biol. Chem.* 287, 1588-1599, 2012



研究課題名：上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23112008

研究代表者名：佐邊 壽孝(北海道大学・大学院医学研究院・教授)

研究分担者名：小根山 千歳(愛知県がんセンター・感染腫瘍学部・部長)

【研究の目的】

癌の最大の脅威は再発であり、再発のほとんどは、癌細胞の示す浸潤的運動性による転移、並びに、抗癌剤などに対する治療抵抗性に起因する。胃癌や大腸癌など消化管上皮に由来する癌では、早期発見が比較的有効であり、早期段階での外科的切除が主な治療戦略であり、効を奏している。一方、乳癌、腎明細胞癌や膵管癌は、消化管ではなく分泌・循環体液と接する管腔組織を発生母地とする。乳癌は浸潤性の低いタイプも多く、それらの予後は比較的良いが、浸潤性乳癌や、腎明細胞癌、膵管癌は、例え早期発見できたとしても高頻度で転移再発し、治療抵抗性も高く予後不良である。このような臨床的観察は、消化管上皮癌と体液管腔上皮癌とは本質的に異なった過程を経て悪性度が進展することを示唆する。

癌悪性度進展に関しこれまでに多くの研究があるが、腎明細胞癌や膵管癌に関し、悪性度進展過程や薬剤抵抗性の分子的詳細はまだ不明であり、有効な治療薬や治療法がない。乳癌に関しても悪性度が高い場合、有効な治療手立てがないのが現状である。本研究においては、乳癌、腎明細胞癌、膵管癌に焦点を当て、その浸潤・転移と抗癌剤抵抗性を促進する分子機構を解明することを目的とした。

【研究の成果】

これまでに、低分子量 G 蛋白質 Arf6 とその effector である AMAP1 を軸とした、細胞の運動性や浸潤性を促進するシグナル伝達経路を発見している。本研究の開始当時、癌細胞が間充織様形質を獲得することが悪性度進展の根幹であることを示す幾つかの証拠が提示されていた。我々はまず、悪性乳癌には EPB41L5 という、本来は間充織細胞に発現する蛋白質が発現すること、EPB41L5 は AMAP1 の結合相手であり乳癌の浸潤・転移を促進する因子であることを明らかにした。従って、この Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路は癌特異的間充織型経路である。

乳癌では、EGFR や Her2 など受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の異常発現が危険因子である。RTK は GEP100 を介して Arf6 を活性化する

ことを既に明らかにしていたが、この Arf6 活性化には細胞内メバロン酸経路活性が必須であることをその分子的詳細と共に明らかにした。同時に、癌抑制遺伝子 TP53 の変異がどのようにして癌悪性度を進展させるのかに関する分子機構も明らかにした。Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路は癌薬剤耐性の根本でもあることも示した。高脂血症治療薬スタチンはメバロン酸合成経路の阻害剤であるが、スタチンによって乳癌の浸潤転移、並びに薬剤耐性を著しく阻害できた。

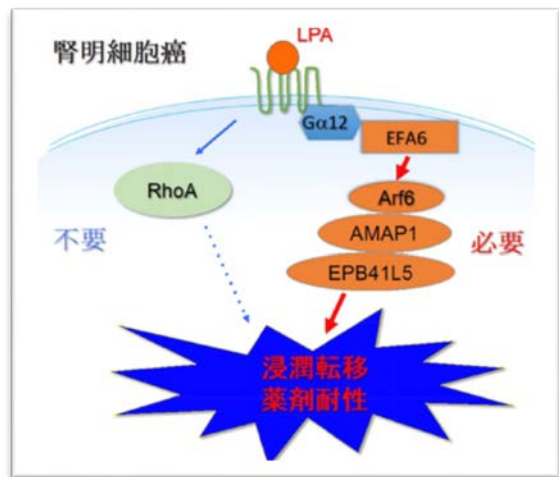
腎癌の危険因子は不明のままであった。本研究において、腎明細胞癌では RTK ではなく脂質メディエーター LPA がその三量体 G 蛋白質型受容体 (GPCR) と EFA6 を介して Arf6 を活性化し、間充織様形質を促進し、悪性度を促進させることを明らかにした。

乳癌と腎明細胞癌に関して、病院に保管されている病理標本の解析や国際的ゲノムデータベースでの解析も行い、Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路と RTK や GPCR との同時高発現は、それぞれの癌における術後早期再発や患者生存性不良と高い統計的優位差を持って相関することを示した。以上の成果は当初目的を十分に達成したものである。研究成果は掲載誌記事に大きく取り上げられ、マスコミ報道もされた。

研究期間の後半から膵管癌に関しても研究を開始した。膵臓癌は極めて予後不良であり、患者5年生存率は数%を超えない。多くの場合、初期診断時に悪性度が進行しており、効果的治療の確立が強く望まれている。PDAC において、KRAS 変異が95%以上に見られ、TP53 変異は約70%に見られる。PDAC においては、KRAS 変異と TP53 変異によって Arf6 とそのシグナル因子群が高発現し活性化されることを、分子的詳細と共に明らかにした。この結果は、多くの PDAC で発癌過程と悪性度進展とが couple して進行することを明らかにし、何故、初期診断時に悪性度が進行しているのかを治療可能性と共に示した(投稿準備中)。

【研究の意義・展望】

乳癌と腎明細胞癌における研究成果は、それぞれの癌の悪性度進展とその刺激因子、さらには抗癌剤抵抗性の分子的基盤を明らかにし、新しい治療の可能性を切り開いた。特に、コレステロール合成経路として知られているメバロン酸代謝活性と癌悪性度進展との関連を明確化し、Arf6 経路が高発現する癌においては市販薬スタチンと抗癌剤との組み合わせによる治療が有効であることを示したものとして、多くの学術誌や国内外マスコミで報道された。論文が掲載された *J. Cell Biol.*誌と *Nature Comm.*誌においても、特に優れた研究として紹介された(下図:Nature Comm. 記事は和訳してある)。*J. Cell Biol.*論文は、2007年米国癌学会での outstanding paper にも選ばれている。研究成果を受けて、臨床現場移行への基盤となる臨床研究の準備を進めている。



PDAC など悪性癌に関して PD-1/PD-L1 免疫治療が期待されている。しかし、理論的期待とは異なり、このような免疫治療は、稀に劇的寛解をみるものの、総体としての有効性は従来の抗癌剤を超えるものではなく、今後の改善が待たれる。Arf6 経路の異常発現と活性化は、PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント機能を増強し、癌免疫サーベイランスの障害になることも明らかにしている。現在、スタチン投与や脂質合成代謝を抑制による Arf6 経路阻害が、実際に PD-1/PD-L1 免疫治療に資するの否か基礎的研究を進めている。全体として、無駄な治療をなくし、人間本来の免疫力に基づく癌治療を可能とする学問的知見の提示を目指す。

【主な研究発表】

1. Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, and *Sabe H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* 213, 81-95, 2016
2. Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, Oya M, and *Sabe H. Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat. Commun.* 7, 10656, 2016
3. Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Norman JC, Shirato H, Hashimoto S, *Sabe H. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J. Cell Biol.* 197, 983-996, 2012
4. Li J, Malaby AW, Famulok M, Sabe H, Lambright DG, *Hsu VW. Grp1 plays a key role in linking insulin signaling to glut4 recycling. *Dev. Cell* 22, 1286-1298, 2012

Published April 4, 2016

Lead by Sam Shart
shart@rockefeller.edu

In Focus

Arf6 wins the MVP award

The mevalonate pathway drives cancer metastasis and drug resistance by promoting the activation of Arf6.

FOCAL POINT

Left to right: Arif Hashimoto, Takao Oikawa, Shigeru Hashimoto, Yasuhiko Onodera, Yukari Kado, Hisataka Sabe, and colleagues investigate how the mevalonate pathway enhances the invasiveness of some, but not all, breast cancer cell lines. The researchers find that the pathway promotes the prenylation and membrane trafficking activity of Rab11b (red), which delivers the Arf6 GTPase (green) to the plasma membrane where it can be activated to promote cancer cell invasion and drug resistance. The mevalonate pathway only enhances the invasiveness of cell lines that overexpress Arf6 signaling proteins, but patients whose tumors show up-regulation of both Arf6 and mevalonate pathway components have poor long-term survival rates.

Hashimoto et al. found that silencing the enzyme geranylgeranyl transferase II (GGT-II) also inhibited Arf6's plasma membrane recruitment and activation. GGT-II promotes the membrane association of certain GTPases by modifying them with prenyl groups generated by the MVP. "But Arf6 is acylated, not prenylated, so it can't be a direct target of the MVP or GGT-II," Sabe explains. Instead, the researchers thought, GGT-II might prenylate a Rab family GTPase responsible for delivering Arf6 to the plasma membrane. Hashimoto et al. found that knocking down the endosomal Rab protein Rab11b blocked the plasma membrane recruitment and activation of Arf6. Moreover, MDA-MB-231 cells lacking Rab11b were less invasive in vitro and were no longer able to metastasize when injected into nude mice, suggesting that the MVP enhances Arf6 signaling by promoting the prenylation and membrane trafficking activity of Rab11b. "But abnormal overexpression of every component of the Arf6 pathway is necessary to substantially promote invasion and metastasis," Sabe says, explaining why MDA-MB-468 cells do not become more invasive upon MVP up-regulation. "The Arf6 pathway may also be a critical step in the GTPase's activation by receptor tyrosine kinases."

GGT-II, Rab11b, or Arf6's downstream effector EPB41L5, increased the sensitivity of MDA-MB-231 cells to two different cytotoxic compounds. "We are very interested in understanding how Arf6 and EPB41L5 promote drug resistance," Sabe says. Statins, which inhibit the MVP's rate-limiting enzyme HMG-CoA reductase, have been investigated as potential anticancer drugs due to their ability to block the prenylation of Ras. Clinical trials have so far produced mixed results, but Hashimoto et al.'s data suggest that future efforts might focus on breast cancer patients whose tumors express high levels of Arf6 signaling components, and which could therefore be susceptible to a reduction in Rab11 prenylation. Indeed, the researchers found that simvastatin increased the drug sensitivity of MDA-MB-231 cells, and inhibited the cells' ability to metastasize in vivo. "Blocking the MVP might effectively kill cancer cells that overexpress the Arf6 pathway, especially in combination with other drugs," Sabe says. Developing this therapeutic approach could be crucial, because the researchers found that patients whose tumors expressed high levels of both MVP components and Arf6 signaling proteins showed poor long-term survival rates.

1. Ghittoni, J.J., and M.S. Brown. 1990. *Nature*. 343:425-430.
2. Freed Paton, W.A., et al. 2012. *Cell*. 149:244-258.
3. Hashimoto, A., et al. 2016. *J. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201508002>
4. Sabe, H. 2003. *J. Biochem.* 134:485-489.

Downloaded from jcb.aphis.org on April 4, 2016

In Focus • THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 57



研究課題名：新規Wntシグナル修飾因子LGR4による乳腺上皮細胞運命の決定と極性制御機構解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24114702

研究代表者名：西森克彦(東北大学・大学院農学研究科・教授)

【研究の目的】

R-spondins (Rspns)をリガンドとする LGR4 (受容体 LGR ファミリーに属す) は Wnt 系因子の Flizzed や LRP と協調し Wnt シグナルを亢進する作用を持つ。マウス *Lgr4* 欠損は乳腺組織の伸長遅延と枝分かれ不全をもたらすこと、他の上皮性管腔構造組織、又はその類似組織である尿管芽や子宮内腔の形成と制御などで重要な役割を果たす事を見出しており、我々の実験結果は LGR4/Rspo が乳腺幹細胞の運命決定や細胞極性を制御し乳腺発生を支えている事を示唆しており、Rspns-LGR4 シグナルが乳腺組織形成に於いての乳腺幹細胞や幹細胞前駆細胞の運命決定と極性の制御メカニズム解明を目的として本研究を行った。また、併せて子宮内膜での分泌管管腔組織の型性と、機能的分泌腺から分泌される成長因子が胚の着床に於いて、死活的役割を占める機構の解析、及び上皮性組織をオリジンとする臼歯の形成に於いても、Rspns-LGR4 シグナルの強い関与が認められ事を見出し、これらの発生分化メカニズム解明研究も並行して行った。

【研究の成果】

野性型マウスと上皮特異期 LGR4 KO マウスである LGR4(*fx^{K5}/fx^{K5}*)雌の乳腺よりそれぞれ調整した細胞乳腺管腔組織から細胞を調整、ファクス分析し、加齢に伴って幹細胞分画が著しく減少する事を見出した。研究推進中に、ほぼ同じ実験結果を示す論文が他グループから公表され(Wang, Y. et al., *Stem Cells*, 31, 1921-31, 2013)、論文発表を控えている。一方並行して行った、子宮内膜分泌管の形成と機能発現に於ける LGR4 の機能解明と、臼歯の連続的形成に於ける LGR4 の重要な働き

については、公表に至っている。

【研究の意義・展望】

現在、化学発癌に於ける腫瘍の悪性化を LGR4 シグナルが誘導している実験結果が見出された。この機構は、毛根に存在する皮膚幹細胞に発現する LGR4 を経由して制御されていると推定され、LGR4/Rspns シグナルが上皮性癌の悪性化に関与している可能性を示し、腫瘍悪化のメカニズム解明とともに、新たな対癌戦略の可能性を示していると考えている。

【主な研究発表】

1. Mohri, Y., Oyama, K., Sone, M., Akamatsu, A., and Nishimori, K. "LGR4 is required for the cell survival of the peripheral mesenchyme at the embryonic stages of nephrogenesis." *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 888-91, 2012
2. Sone M, Oyama K, Mohri Y, Hayashi R, Clevers H and Nishimori K, "LGR4 expressed in uterine epithelium is necessary for uterine gland development and contributes to decidualization in mice." *The FASEB Journal*, **27**, 1-12, 2013
3. Koizumi, M. Oyama, K., Yamakami, Y., Kida, T., Satoh, R., Kato, S., Hidema, S., Oe, T., Goto, T., Clevers, H., Nawa, A., Nishimori, K. "Lgr4 Controls Specialization of Female Gonads in Mice." *Biol Reprod*, **93**, 1-11, 2015
4. Mahasarakham, C. P. N., Izu, Y., Nishimori, K., Izumi, Y., Noda, M., Ezura, Y. "Lgr4 expression in osteoblastic cells is suppressed by hydrogen peroxide treatment." *J Cellular Physiol*. **232**, 1761-1766, 2017



研究課題名：上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112503

研究代表者名：山城 佐和子(東北大学・生命科学研究所・特任助教)

【研究の目的】

細胞-基質間接着（接着斑）形成と細胞仮足の伸展は、がん細胞の運動能亢進や上皮の創傷治癒に重要である。細胞は、これらの構造でアクチン細胞骨格の発生する力を利用するが、力をリアルタイムで非侵襲的に捉えることは難しく「力」動態は不明な点が多い。一方、培養細胞仮足では、アクチン繊維が絶え間なく求心的に移動するアクチン繊維流動が存在する。繊維流動は、ミオシンによる牽引とアクチン重合で駆動され、力の作用を可視化する指標となり得る。本研究では、単分子スペckルイメージングによりアクチン繊維流動を可視化・高精度に解析し、多重蛍光イメージングや各種阻害剤による影響の解析からアクチン繊維流動力の役割を解明することを目的とした。

【研究の成果】

本研究ではまず、簡便で時空間分解能が大幅に向上した単分子スペckル法を開発した。新しい方法では、明るく、高い退色耐性を持つ蛍光色素 DyLight-550 で標識したアクチンをエレクトロポレーションで細胞内に導入することで、ほぼ100%の細胞で蛍光アクチンの単分子観察が可能となると共に、±8nm の高精度分子トラッキングが実現された。

この方法を用い、細胞仮足内の接着斑周辺でのア

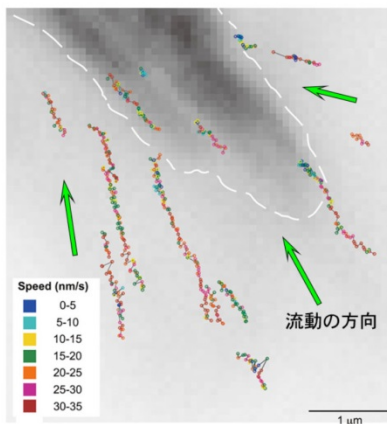


図 接着斑前方のアクチン繊維流動速度・軌跡マップ

た(図)。興味深いことに、接着斑前方のアクチ

クチン繊維流動をサブミクロンスケールで解析した結果、接着斑がアクチン流動の速度と方向を複雑に変化させることを見出し

ン繊維が接着斑に集まるように速く流動するなど、接着斑がアクチン流動を引き寄せる効果が観察された。この現象は、接着斑構成因子の集積やアクチン繊維の配向を接着斑周囲で回転させる機構として働く可能性がある。

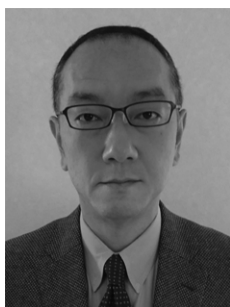
【研究の意義・展望】

本研究で開発した新しい単分子スペckル顕微鏡法は、従来の方法と比較して格段に簡便・高効率であり、多くの研究者が利用可能である。蛍光プローブや光学系をさらに改良することで、上皮組織の形態形成に伴う複雑な細胞現象の仕組みを分子レベルで捉える手段となり得る。

本研究では、高精度の時空間分解能で接着斑とアクチン流動の連関を明らかにした。さらに接着分子や細胞外基質分子に観察対象を広げることで、「力」が細胞外微小環境と連結する仕組みを分子可視化解明できる可能性がある。

【主な研究発表】

1. Yamashiro S, Mizuno H, Smith MB, Ryan GL, Kiuchi T, Vavylonis D, *Watanabe N. New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. *Mol. Biol. Cell* 25, 1010-1024, 2014
2. *Watanabe N, Yamashiro S, Vavylonis D, Kiuchi T. Molecular viewing of actin polymerizing actions and beyond: Combination analysis of single-molecule speckle microscopy with modeling, FRAP and s-FDAP (sequential fluorescence decay after photoactivation). *Development, Growth & Differentiation* 55, 508-514, 2013
3. Cox-Paulson EA, Walck-Shannon E, Lynch AM, Yamashiro S, Zaidel-Bar R, Eno CC, Ono S, *Hardin J. Tropomodulin protects α -catenin-dependent junctional-actin networks under stress during epithelial morphogenesis. *Curr. Biol.* 22, 1500-1505, 2012
4. Yamashiro S, Gokhin DS, Kimura S, Nowak RB, *Fowler VM. Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton* 69, 337-370, 2012



研究課題名：独自の正常大腸上皮幹細胞培養技術を用いた管腔形成機構の解析

研究期間：平成24年度平成25年度

研究課題番号：24112508

研究代表者名：中村 哲也(東京医科歯科大学・消化管先端治療学・寄付講座教授)

【研究の目的】

大腸疾患における上皮再生不全や発癌機構には、大腸上皮の増殖・分化調節や細胞配置調節の破綻が関わるものと考えられてきた。しかしながら、正常な大腸上皮細胞を体外で維持する手法、すなわち体外培養技術が十分ではないことが、これら大腸上皮細胞研究の妨げとなってきた。本研究では、分化細胞および幹細胞集団を含む正常大腸上皮細胞を体外で3次元的に培養する新技術を確立し利用することで、1) 単一幹細胞から始まる細胞増殖過程での管腔形成超初期過程を解析すること、および2) 管腔の内腔側ー基底側環境差が極性におよぼす影響を解析することを目的とした。

【研究の成果】

マウス大腸から単離した上皮細胞を細胞外基質に包埋し、Wnt3、R-spondin1、Noggin、EGF、HGF、BSAを添加した無血清培地で3次元的に維持する既報と異なる独自の培養技術を確立した。また、大腸粘膜傷害を誘導した別のマウスに本法で維持・増幅される大腸上皮細胞を注腸移植することに成功し、移植細胞が傷害組織を修復しうることを明らかにした。さらに、この移植組織が長期にわたり自己複製能と多分化能をもつことを示し、組織再生能を保持する機能的な大腸上皮幹細胞の培養と移植が可能であることを明らかにした。本培養技術を利用し、正常大腸上皮細胞の管腔形成初期相を解析するために、培養大腸上皮細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入をおこなう技術を構築した。これを用いて、培養大腸上皮細胞が3次元構造をとり管腔形成にいたる過程を、特に一個の細胞から増殖を開始した細胞群が管腔形成に至る初期過程に着目して解析をすすめた。

一方、嚢胞構造をとる培養大腸上皮オルガノイド内腔物を採取し解析する計画は、嚢胞内容物吸引を可能とする技術の開発が課題として残った。また、培養腸上皮幹細胞が個体内で管腔上皮組織の構築に至る仕組みを、特に成体上皮と胎生期上

皮の相違に着目し解析するため、デンマークのグループと国際共同研究をおこない、胎生期腸管上皮前駆細胞の成体大腸への移植をおこなった。その結果、胎生期の小腸上皮前駆細胞も大腸へ生着可能であること、しかもこの際移植細胞が移植先環境に適応し、大腸型形質に転換する可塑性をもつことを明らかにした。

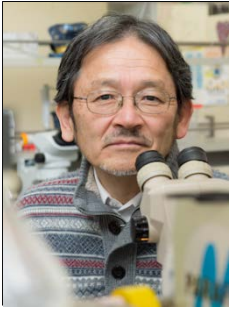
【研究の意義・展望】

本研究で開発した正常大腸上皮細胞の体外培養技術およびこれへの遺伝子導入技術は、大腸上皮細胞幹細胞の増殖・分化機構、嚢胞構造構築過程の解析の基礎技術になるものと考えた。

また、胎生期小腸上皮前駆細胞移植の成果は、発生期腸上皮細胞の可塑性を明示した点や、上皮-非上皮間の相互作用が頭尾軸に沿う腸上皮の固有性獲得に関わる可能性を示した点で重要と考えられた。

【主な研究発表】

1. Mizutani T, *[Nakamura T](#), Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 419(2): 238-243: 2012
2. Yui S, [Nakamura T](#), Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, *Clevvers H, *Watanabe M. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18(4): 618-623: 2012
3. Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Søndergaard C, Madgwick A, Schweiger PJ, Nielsen OH, Vallier L, Pedersen RA, [Nakamura T](#), Watanabe M, *Jensen KB: Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell.* 13(6): 734-744: 2013



研究課題名：管腔形成過程における紡錘体配向の変換機構

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112510

研究代表者名：松本邦弘(名古屋大学・大学院理学研究科・教授)

【研究の目的】

上皮管腔組織は、様々な形態の器官を構成している。その形成・維持のためには、個々の細胞が極性に沿って正しい方向に分裂しなければならない。これまでの研究から細胞の分裂方向は、細胞分裂(M)期紡錘体の傾き(配向)によって制御されていることが明らかとなっている。我々は、M期紡錘体の配向を制御するキナーゼをスクリーニングする過程で、ROCOファミリーキナーゼLRRK1を同定した。LRRK1をノックダウンした細胞では、M期紡錘体の配向がランダムになり、細胞の分裂方向も異常になる。そこで本研究では、LRRK1によるM期紡錘体配向の制御メカニズムの解明及び、上皮管腔形成におけるLRRK1の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

【研究の成果】

LRRK1の変異体を用いたレスキュー実験から、LRRK1はキナーゼ活性依存的にM期紡錘体の配向を制御することが明らかとなった。そこでまず、LRRK1の活性化機構を検討した。その結果、LRRK1はM期中心体において、M期キナーゼPLK1によって1790番目のセリンがリン酸

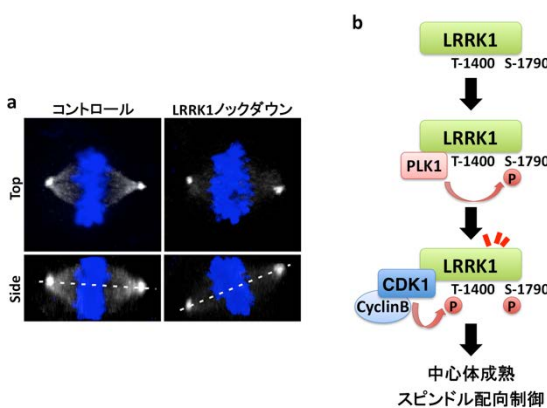
このリン酸化依存的に別のM期キナーゼCDK1によって1400番目のスレオニンがリン酸化され、活性化することが明らかとなった(図b)。次に、LRRK1が管腔形成に重要なか、モデル細胞であるイヌ腎臓尿細管上皮(MDCK)細胞を用いて検討した。MDCK細胞を3次元培養すると、管腔形成を模倣する形で嚢胞を形成することが知られている。我々は、siRNAを用いてLRRK1をノックダウンすると、嚢胞の形成が異常になることを見出した。これらの異常は、細胞分裂軸がランダムになった時に見られるものと同様であった。以上の結果から、LRRK1は、M期中心体で活性化しM期紡錘体の配向を制御することで、細胞の分裂軸をコントロールし、適切な管腔形成に機能している可能性が考えられる。

【研究の意義・展望】

本研究からLRRK1が、(1)M期キナーゼPLK1及びCDK1によって連続的にリン酸化され活性化すること、(2)キナーゼ活性依存的にM期紡錘体の配向を制御すること、(3)MDCK細胞による嚢胞形成に必要なことが明らかとなった。上皮管腔組織形成において、初期のステップ(極性化した細胞がどのように分裂方向を制御しているのか)は不明な点が多く、本研究から細胞分裂軸制御の新たなキープレーヤーが同定できたことは重要な進展と思われる。今後は、LRRK1の基質を同定し、LRRK1がキナーゼ活性依存的にどのようなメカニズムでM期紡錘体の配向を制御しているのか明らかにする必要がある。

【主な研究発表】

1. Kedashiro S, Pastuhov SI, Nishioka T, Watanabe T, Kaibuchi K, *Matsumoto K, and *Hanafusa H. LRRK1-phosphorylated CLIP-170 regulates EGFR trafficking by recruiting p150Glued to microtubule plus ends. *J. Cell Sci.*, 128, 385-396, 2015



LRRK1によるスピンドル配向制御 (a) LRRK1をノックダウンした細胞では、紡錘体配向異常が生じる。(b) PLK1、CDK1による連続的なリン酸化が、LRRK1の活性化に必要である。



研究課題名：細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112511

研究代表者名：池ノ内 順一（九州大学・理学研究院・教授）

研究分担者名：

【研究の目的】

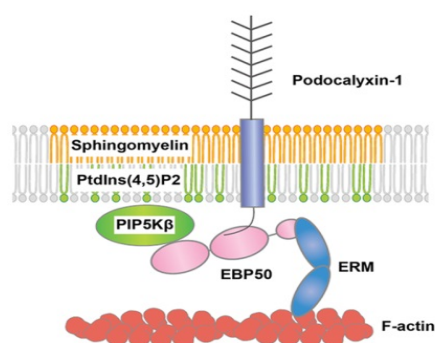
私たち多細胞生物のからだは、上皮細胞と間葉細胞から構成されているが、上皮細胞は、恒常的にアピカル膜とバソラテラル膜という、機能も構成要素も異なる細胞膜ドメイン（細胞内極性）を有している。この恒常的な上皮細胞の極性によって、からだの内外で、方向性をもった物質の輸送が可能となり、生体の恒常性が維持されている。このような細胞内極性を生み出す分子機構については、これまでタンパク質の相互作用の観点から研究が進められてきた。一方で、たとえば上皮細胞では、アピカル膜とバソラテラル膜では、タンパク質に加えて、細胞膜を構成する脂質が異なることが古くから知られているが、それらの可能にする脂質の選択的輸送のメカニズム、またその結果生じた細胞膜の非対称性の生理学的な意義は、ほとんど明らかになっていない。本研究提案で、私は細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割を明らかにすることを目的に研究を行った。私は、これまでの研究において、アピカル膜とバソラテラル膜あるいは上皮細胞と間葉細胞の脂質組成の違いを質量分析により網羅的に解析しており（Ikenouchi et al. *J Biol Chem* 2012）、このようなアピカル膜とバソラテラル膜の脂質が上皮管腔構造形成に果たす役割の解明を試みた。

【研究の成果】

私は、上皮細胞のアピカル膜において、スフィンゴミエリンが高度に集積していることを見出した。さらに、スフィンゴミエリンに結合するライセニンを用いて免疫電顕をおこなったところ、アピカル膜の中でも微絨毛と呼ばれる細胞膜構造においてスフィンゴミエリンが高度に集積していることを明らかにした。

また既に極性を獲得した上皮細胞でスフィンゴミエリンを消失させると極性を維持したまま微絨毛のみが失われることを見出した。更にスフィンゴミエリンと特異的に共役して微絨毛を形成する膜タンパク質ポドカリキシンおよびその分子複合体（Podocalyxin-1—EBP-50—PIP5Kbeta）を同定した（右図）（Ikenouchi et al. *J Cell Sci.* 2013）。

ポドカリキシンは先行研究に於いて上皮管腔形成に必須のタンパク質であることが報告されている（Meder et al. *J Cell Biol* 2005）。そこで、三次元培養の開始時に、スフィンゴミエリンの生合成を抑制すると、異常な管腔を持つシストが形成された。この結果よりスフィンゴミエリンが極性形成に関与することが明らかになった（論文投稿準備中）。



Ikenouchi et al. *J Cell Science* (2013)

【研究の意義・展望】

上皮細胞において、細胞膜脂質の一つスフィンゴミエリンがアピカル膜に於いてのみ高度に集積することを見出し、さらに微絨毛形成やアピカル膜管腔の形成に必須であることを明らかにした。今後は、アピカル膜のみでスフィンゴミエリンの分布状態が異なるメカニズムや管腔形成におけるスフィンゴミエリンの役割について、引き続き明らかにしていきたい。

【主な研究発表】

1. *Ikenouchi J, Hirata M, Yonemura S and Umeda M. Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. *J Cell. Sci.* 15, 3585-3592, 2013
2. Area-Gomez E1, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, Guardia-Laguarta C, de Groof AJ, Madra M, Ikenouchi J, Umeda M, Bird TD, Sturley SL and *Schon EA. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* 31, 4106-4123, 2012



研究課題名：管腔形成における細胞内極性輸送の機能の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112512

研究代表者名：吉村信一郎(大阪大学・医学系研究科・講師)

【研究の目的】

腸管の管腔の内面には上皮細胞が層をなして並んでおり、上皮細胞の極性は管腔の形成、維持や機能に必須である。上皮細胞の極性には上細胞内の方向性を持つ輸送(極性輸送)が重要だが、極性輸送の分子機構、更に極性輸送と管腔形成の関連については未だ不明な点が多い。本研究では、①極性輸送に重要と考えられる既知の分子 ②線虫の腸等で同定した極性輸送に重要な新規分子についてノックアウト(KO)マウスを作製・解析した。解析にあたっては、その腸を個体で解析すると共に、小腸の初代培養系を用いて個体に近い状態で細胞内の極性輸送がどう変化するか、またその変化が管腔の形成にどのように関わるか、を解明した。

本研究で最終的には、極性輸送と管腔形成の包括的な分子機構の解明を目指した。

【研究の成果】

①既知の極性輸送関連分子のKOマウスの解析：apical面への輸送に重要な syntaxin3 の小腸特異的 KO では、apical面への輸送の異常や細胞増殖の亢進が生じた。DNA microarray 法から増殖因子の転写亢進が確認されたため、その原因を解析しており、今年度に投稿予定である。

②線虫のスクリーニングの過程で同定された遺伝子の脊椎動物特異的なパラログ EHP1L1 について集中的に解析した結果、EHP1L1 が低分子量 G タンパク質である Rab8 と結合すること、さらに EHP1L1 が輸送小胞の形成に機能する Bin1-Dynamin 複合体と結合し、小腸上皮細胞において頂端面方向の輸送を制御することを、マウスおよび小腸オルガノイドを用いた実験にて示すことができた。これらの結果を学術誌に報告しさらにその号の表紙を飾ることができた(Nakajo A Yoshimura S et al. *J. Cell Biol.* 212, 297–306, 2016)。

【研究の意義・展望】

① syntaxin3 の小腸特異的 KO の結果は今年度に投稿するが、今後他の既知の極性輸送関連分子の KO マウスについても引き続き投稿の予定である。

②線虫のスクリーニングで得られたいくつかの候補遺伝子のマウスホモログについて現在ノックアウトマウスを作製し、小腸組織を解析しているところである。特に膜輸送に関与する遺伝子のノックアウトについては上皮頂端面あるいは側底面方向の輸送の不全が観察されており、それらが上皮極性形成、管腔形成にどのような関与するかを現在解析しているところである。それによって今後極性輸送と管腔形成の機能的関連の理解がより深まることが期待される。

【主な研究発表】

1. Nakajo A, *Yoshimura S, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto, A, Sato, T, and * Harada A. EHP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 212, 297–306, 2016
2. Gerondopoulos A, Bastos R. N, Yoshimura S, Anderson R, Carpanini S, Aligianis I, * Handley M. T, and * Barr F. A. Rab18 and a Rab18 GEF complex are required for normal ER structure. *J. Cell Biol.* 205, 707–720, 2014
3. Linford A, Yoshimura S, Bastos R. N, Langemeyer L, Gerondopoulos A, Rigden D. J, and * Barr F. A. Rab14 and Its Exchange Factor FAM116 Link Endocytic Recycling and Adherens Junction Stability in Migrating Cells. *Dev. Cell.* 22, 952–966, 2012
4. Longatti A, Lamb C. A, Razi M, Yoshimura S, Barr F. A, and * Tooze S. A. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 197, 659–675, 2012



研究課題名：リンパ管腔形成と維持における Aspp1 の役割と分子機構

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112513

研究代表者名：平島 正則(神戸大学・医学研究科・准教授)

【研究の目的】

リンパ管形成の初期過程では、既存の静脈を構成する内皮細胞が極性を失って遊走した後に再集合して管腔形成し初期リンパ嚢が形成され、その後リンパ管が伸長する。これらの過程で、内皮細胞は運動能や細胞間接着能について精巧な制御を受けていると考えられるが、それらの分子機構についてほとんど明らかにされていない。我々は、内皮細胞特異的に発現する分子 Aspp1 がリンパ管内皮細胞の細胞運動や細胞間接着などを制御して管腔の形成と維持に寄与する可能性を見出した。本研究では、遺伝子改変マウスや発生過程にある内皮細胞の培養系を用いた解析で、リンパ管内皮細胞において Aspp1 が果たす役割を細胞レベル・分子レベルで明らかにすることで、リンパ管腔形成機構を明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

マウス胎仔における初期リンパ嚢形成とリンパ管伸長が起こる胎生 9.5～12.5 日目の野生型と Aspp1 欠損マウス胎仔を採取して、血管およびリンパ管内皮細胞のマーカー等でホールマウント染色し、共焦点レーザー顕微鏡で三次元的に解析した。Aspp1 欠損マウス胎仔において、リンパ管内皮細胞が頸部静脈で分化して遊走する過程は正常であるが、小リンパ嚢同士の融合に異常があることを明らかにした。また、Aspp1 欠損マウス胎仔の一部において、静脈角で見られる生理的なリンパ管・静脈吻合形成に異常があることを明らかにした。野生型と Aspp1 欠損 ES 細胞を OP9 フィーダー細胞上で低密度培養して分化させて得られる内皮細胞を解析したところ、分化後 8 日目頃から野生型内皮細胞ではシート状から網状へとコロニー形態が変化するが、Aspp1 欠損内皮細胞ではシート状構造が維持される傾向が明らかになった。

ショウジョウバエ ASPP との機能的関連が報告されている分子 Csk のリンパ管内皮細胞における役割を解析するために、リンパ管内皮細胞特異的

Csk 欠損マウスを解析した。この変異マウスにおいて、初期リンパ嚢形成および皮膚リンパ管ネットワーク形成が異常であることを明らかにした。

【研究の意義・展望】

リンパ管腔の形成と維持における Aspp1 の役割について解析して、Aspp1 はリンパ管内皮細胞の平面内細胞極性を制御して、リンパ管融合の効率化に寄与している可能性を見出した。このことは、発芽によって伸長する血管と異なり、融合過程を伴うリンパ管腔形成における新しい一面を示している。これらを制御する分子機構と Aspp1 との関連について今後の研究課題であるが、Csk がリンパ管形成に重要であることも明らかになったため、この経路を中心とした研究展開を計画している。

【主な研究発表】

1. Liu X, Uemura A, Fukushima Y, Yoshida Y, *[Hirashima M](#). Semaphorin 3G provides a repulsive guidance cue to lymphatic endothelial cells via Neuropilin-2/PlexinD1. *Cell Rep* 17, 2299-2311, 2016
2. Otowa Y, Moriwaki K, Sano K, Shirakabe M, Yonemura S, Shibuya M, Rossant J, Suda T, Kakeji Y, *[Hirashima M](#). Flt1/VEGFR1 heterozygosity causes transient embryonic edema. *Sci Rep* 6, 27186, 2016
3. [Osada M](#), [Inoue O](#), [Ding G](#), [Shirai T](#), [Ichise H](#), [Hirayama K](#), [Takano K](#), [Yatomi Y](#), [Hirashima M](#), [Fujii H](#). *[Suzuki-Inoue K](#), [Ozaki Y](#). Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 287, 22241-22252, 2012.
4. [Sano K](#), [Katsuta O](#), [Shirae S](#), [Kubota Y](#), [Ema M](#), [Suda T](#), [Nakamura M](#). *[Hirashima M](#). Flt1 and Flk1 mediate regulation of intraocular pressure and their double heterozygosity causes the buphthalmia in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 422-427, 2012.



研究課題名：胆管をモデルとした管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112519

研究代表者名：谷水 直樹(札幌医科大学・医学部・准教授)

【研究の目的】

臓器が効率よく機能するためには、構成細胞である上皮細胞が機能的に分化・成熟するとともに、3次元的な組織構造を形成する必要がある。細胞の分化・成熟や細胞極性形成に関与する分子が、組織形成においても重要な役割を担っていることが報告されている。しかしながら、3次元組織形成の全容を明らかにするためには、組織形成に関与する新たな分子を同定し、それらの機能を解析する必要があると考えた。

我々が研究対象としている肝臓には、チューブ状組織構造である胆管ネットワークが張り巡らされている。肝前駆細胞株 HPPL は、基底膜成分を含むゲル中で培養すると、胆管上皮細胞に分化し、中央が空洞（以下管腔）になったシストを形成する。しかしながら、HPPL が形成する管腔構造は小さく未熟であった。そこで、3次元培養において管腔構造を発達させる作用を持つ分子を探索し、組織形成に関与する分子の同定とその制御メカニズムを解析することとした。

【研究の成果】

発生過程で組織幹細胞（肝前駆細胞）から上皮細胞（胆管上皮細胞）が分化する際に発現上昇する分子を探索した。その結果、胆管上皮細胞特異的な遺伝子として転写因子 grainyhead like-2(Grhl2) を同定した。Grhl2 を HPPL に導入して3次元培養を行うと、管腔形成が促進され、拡張したシスト構造が形成された。Grhl2 は上皮バリア機能を発達させる作用を示したことから、密着結合の構成分子であるクローディン(Claudin (Cldn)) の発現を制御している可能性を考えた。タンパク質の発現量を解析した結果、Grhl2 は CLDN3 および 4 の発現を制御していることが明らかになった。さらに、Grhl2 のターゲット分子の一つとして Rab25 を同定し、Rab25 が CLDN4 の密着結合への局在を促進していることも明らかになった。以上のように、Grhl2 は、密着結合の機能的成熟を促して、上皮形態形成を促進していることを明らかにした(1)。

Grhl2 は上皮細胞、分化とともに発現が上昇する

ことから、肝臓の前駆細胞の分化能の制御にもかかわっている可能性を検討した。Grhl2 は HNF4 α や C/EBP α などの肝細胞分化に必須の転写因子の発現を抑制していた(3)。さらに、肝細胞分化に重要である MicroRNA122 の発現を抑制することが明らかになった(4)。

以上の結果から、Grhl2 は Cldn3, Cldn4, Rab25 からなる分子間ネットワークをターゲットとして上皮細胞の成熟化を促すとともに、上皮細胞の分化能の制御を行っていると言える。

【研究の意義・展望】

転写因子が構造的な分化成熟を促す一方で、組織幹細胞の分化能を制御していることを明らかにした。今後は、Grhl2 の機能について生体内での解析も行い、転写因子による上皮組織構造形成と組織幹細胞の分化能制御の分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

【主な研究発表】

1. Senga K, Mostov KE, Mitaka T, Miyajima A, *Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol. Biol. Cell*, 23, 2845-2855, 2012
2. *Tanimizu, N., Kikkawa, Y., Mitaka, T., and Miyajima, A. α 1- and α 5-containing Laminins Regulate the Development of Bile Ducts via β 1 Integrin Signals. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 28586-28597.
3. *Tanimizu N., Ichinohe N, Mitaka T, et al. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. *J Cell Sci*, 126, 5239-5246, 2013
4. *Tanimizu N., Kobayashi S, Ichinohe N, Mitaka T. Downregulation of miR122 by grainyhead like-2 restricts the hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells. *Development*, 141, 4448-4456, 2014



研究課題名：腎尿細管構造の維持機構解析の基盤となる一次繊毛蛋白による細胞周期調節のしくみ

研究期間：平成 24 年度（単年度）

研究課題番号：2 4 1 1 2 5 2 0

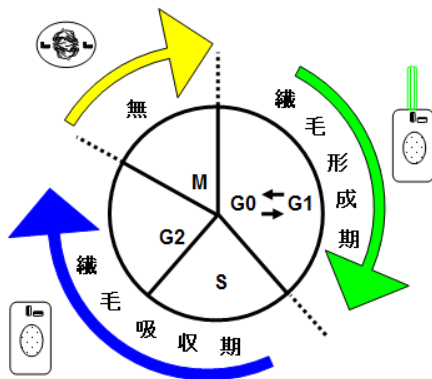
研究代表者名：芝 大(京都府立医科大学・医学研究科・講師)

連携研究者：福井 一(京都府立医科大学・医学研究科・助教)

【研究の目的】

一次繊毛は細胞表面から突き出した細胞内小器官であり、外界の情報を感受する細胞センサーであると想定されている。近年、腎尿細管上皮に存在する一次繊毛の機能不全が、平面細胞極性 (PCP) の破綻に関連し、嚢胞腎発症に関与することが報告されてきた。しかし、尿細管上皮細胞では一次繊毛蛋白と PCP 関連蛋白の細胞内局在は一致せず、繊毛から送り出されているであろうシグナルがどこで PCP シグナルと関連するのか明らかになっていない。

一次繊毛の形成は細胞周期と密接な関係があり、G₁/G₀ 期で繊毛が形成され、S・G₂ 期で消失する (図)。繊毛消失にともない大部分の繊毛局在蛋白は分解されるが、分解されずその局在を変える蛋白もある。この分解されない繊毛蛋白が細胞分裂軸や細胞周期の制御に機能しており、腎尿細管の管腔構造維持に機能していると仮説を立て、それを検証する。本研究により、一次繊毛による細胞周期制御の一端も世界に先駆けて解明できることが期待され、「繊毛⇒細胞周期制御」という新たな研究領域の開拓につながることを期待される。



S・G₂ 期に着目！分解されない繊毛蛋白がある！

図：細胞周期と繊毛形成
G₀/G₁ 期に繊毛は形成され、S・G₂ 期に消失する

【研究の成果】

Inversin (Inv) は内臓逆位や腎嚢胞発症に関

与する一次繊毛タンパクである。Inv は PCP タンパクである Dishevelled (Dvl) と結合し、PCP 経路・増殖経路のスイッチに関与すると報告されたが (Simons M *Nature Genetics* 2005)、その詳細機構は不明である。そこで Inv の細胞周期局在変化を調べたところ、Inv が核に局在する時期があることが明らかとなり、Inv と PCP タンパク・細胞増殖制御因子との関連を分子・細胞・個体レベルで解析を進めた。

Inv/NPHP2 に関連する繊毛タンパクのクローニングを進め (NPHP1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, Dvl1, 2, 3, Ahi1)、また、これらのタグタンパクコンストラクトを作成し、細胞内局在変化を調べたところ繊毛以外 (核) で局在が一致するタンパクが見い出された。

また、Inv が核へ集積するために必要な遺伝子領域を同定するとともに、それらの領域欠失コンストラクトを作成し、生体内での機能発現を評価するためにゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 実験を行い、核へ集積するために必要な Inv 領域が腎尿細管構造維持に必須であることを見出した。

【研究の意義・展望】

一次繊毛と核に両局在するタンパクが共同的に機能することで腎尿細管構造が維持されていることが強く示唆された。今後、相互作用するタンパク群を解析することで、管腔構造の維持機構が詳細に明らかにされることが期待される。

【主な研究発表】

1. Fukui, H., Shiba, D., Asakawa, K., Kawakami, K., and *Yokoyama, T. The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. *FEBS Lett.* 30;586(16):2273-9., 2012.
2. Shiba, D., *Yokoyama, T. The ciliary transitional zone and nephrocystins. *Differentiation.* 83:S91-S96, 2012.



研究課題名：脳胞形成の4次元定量解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112522

研究代表者名：堀田 耕司(慶應義塾大学・理工学部生命情報学科・専任講師)

【研究の目的】 脳は一本の管から生じます。発生後間もない胎児は神経管の前方が

膨らみ、前端から終脳、脳幹、間脳などの基本的な脳部位の原型を形成します。各脳部位は異なる転写因子による発現の差異があることがわかりつつあるものの、その後の脳の"形作り"の解明までには至っていませんでした。例えば、神経管形成はシート状の神経板が湾曲することにより管を作るといった単純なモデルが教科書等で述べられています。しかし、このモデルでは神経板全体が同じ動きを行うことから、脳部位ごとに太さの異なる管がどうしてできるのか説明できません。本研究では、連続性を保った一本の管が、脳部位ごとに管の違いを生み出すしくみを解明するため、脳を含む全神経板の動きを1細胞レベルの解像度でイメージングすることで脳形成過程をすべて明らかにすることとしました。本実験を遂行するにあたり、個体まるごと1細胞レベルでイメージングが可能なホヤを実験材料として用いました。そして最終的に脳部位ごとに太さの異なる管がどうして生じるのかがわかる4D(時空間)モデルを確立しました。

【研究の成果】

ホヤ尾芽胚期の神経管形成過程を一細胞レベルで明らかにするために以下の研究を行いました。まず神経管形成過程を可視化するために、神経細胞の核に局在する FoxB::H2B-CFP、神経細胞の膜に局在する FoxB::LifeAct-GFP、前方の脳胞を形成する神経細胞の核に局在する

DMRT::H2B-mCherry を作製し、これらをホヤ胚に導入し、共焦点顕微鏡で4Dイメージングを行いました。次に核をトラッキングし、全細胞系譜情報を付加し、それを元に神経細胞の細胞動態を網羅的に解析しました。その結果、(1)

FoxB::H2B-CFP を用いて、原腸胚期から初期尾芽胚期まで4Dイメージングに成功し、(2) 32個の予定神経細胞すべての細胞系譜をマッピングし、先行研究で示された系譜とは異なる点を明らかにしました。これにより、神経管形成過程においてこれまで予想されていた分裂と異なるパターンで神経管の形成が行われていることがわ

かりました。さらに、(3) 神経管形成過程のそれぞれのステップにおいて領域ごとに異なる細胞の動態を明らかにしました。原腸胚期で神経板の後方細胞が活発に移動すること、神経胚期で中心の細胞が腹側へ移動し正中線上の入り込み運動を示すこと、尾芽胚期で前方の細胞が背腹方向に分裂することを明らかにしました。これらの観察結果から神経管形成の新しいモデルを作成しました (Fig. 1)。これらの結果を基に、ホヤの全神経細胞系譜と動態(移動と分裂)を網羅的に明らかにしました。

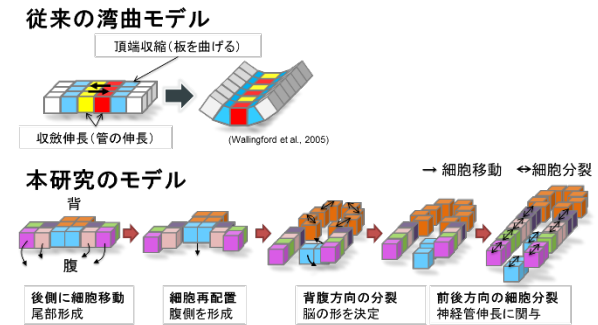


Fig. 1 新たなホヤ神経管形成モデルの構築

上記をまとめ、従来の湾曲モデルをさらに発展させたホヤ神経管形成モデルを提案することができました。これらの研究成果は2つの学会で発表されました(日本動物学会第84回岡山大会、7th International Tunicate Meeting)

【研究の意義・展望】

従来の湾曲モデルをさらに発展させたホヤ神経管形成モデルを提案することができた。今後このモデルがどのような遺伝子によって裏付けられているのか実験による検証を行う。

【主な研究発表】

1. Nakamura MJ, Terai J, Okubo R, *Hotta K, Oka K. Three-dimensional anatomy of the *Ciona intestinalis* tailbud embryo at single-cell resolution. *Dev Biol.* 372:274-284, 2012
2. Nakamura MJ, *Hotta K, Oka K. Raman spectroscopic imaging of the whole *Ciona intestinalis* embryo during development. *PLOS ONE.* 8, e71739, 2013



研究課題名： 分泌経路のリモデリングが上皮管腔組織形成に果たす必須の役割

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112525

研究代表者名：中村 暢宏(京都産業大学・総合生命科学部・教授)

研究分担者名：なし

【研究の目的】

発生時の上皮組織形成に、極性細胞頂端側へのゴルジ体移動（リモデリング）が重要な役割を果たしている。我々は、このゴルジ体のリモデリングにゴルジ体に局在する GRASP65 のリン酸化が必須であることを見いだした。これとは独立に、ゴルジ体を通らない分泌経路（ゴルジバイパス経路）の活性化が細胞の極性化に重要であることも明らかになってきた。ゴルジバイパス経路は、GRASP65 がゴルジ体から細胞膜へ移行することによって活性化される。さて、GRASP65 は GM130 と複合体を作ってゴルジ体に結合するが、その調節機構は明らかではない。

また、GRASP65 がゴルジ体から細胞膜へ移行する分子機構も不明である。そこで本研究では、培養細胞とゼブラフィッシュ個体を用いた実験により、GRASP65-GM130 複合体のゴルジ体や細胞膜への結合が、リン酸化によってどのように調節されているかを明らかにして、ゴルジ体のリモデリングとゴルジバイパス経路が上皮管腔組織形成に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

イヌ腎臓上皮細胞(MDCK)をガラス基質上でコンフルエントになるまで培養し、単層上皮様の構造を形成させた。免疫蛍光染色法を用いて、ゴルジ体に局在する GRASP65 の局在を解析したところ、細胞が密着結合を形成し単層上皮様の構造を形成するにもなって、GRASP65 の細胞膜への移動が観察された。GRASP65 は小胞繫留因子として機能し、小胞体からゴルジ体への輸送小胞の標的となり輸送を促進する働きを持つ。従って、GRASP65 は単層上皮構造形成の際、細胞膜にも局在して、ゴルジ体を介さない新規な輸送経路に関与することが示唆された。

GRASP65 の細胞膜局在を形態学的・生化学的手法で精査したところ、リン酸化された GRASP65 が細胞表面に移行している可能性が示唆された。しかしながら、リン酸化 GRASP65 抗体を用いてリン酸化 GRASP65 のウェスタンブロッティングによる検出を試みたところ、予想される 65KDa の位

置にシグナルが検出されず、一方 110KDa の位置に強いシグナルが検出された。共同研究によって、この 110KDa のタンパク質を同定したところ、βカテニンであることが明らかとなった。この結果から、リン酸化 GRASP65 抗体がβカテニンと交叉反応することが強く示唆された。従って、残念ながらリン酸化 GRASP65 の細胞膜への特異的な移行を証明することができなかった。

【研究の意義・展望】

GRASP65 を過剰発現させると細胞膜へ容易に移行することから、リン酸化 GRASP65 が細胞分化・分極にともなって細胞膜へと移行する可能性は十分残っている。逆にβカテニンとの交叉反応は、リン酸化された GRASP65 とβカテニンが共通の結合基質を持つ可能性を示しており、GRASP65 とβカテニンのクロストークという画期的な可能性が示唆された。

【主な研究発表】

1. Cervigni RI, Bonavita R, Barretta ML, Spano D, Ayala I, Nakamura N., Corda D and *Colanzi A. JNK2 controls fragmentation of the Golgi complex and the G2/M transition through phosphorylation of GRASP65. *J Cell Sci* 128, 2249–2260, 2015
2. Ishida R, Yamamoto A, Nakayama K, Sohda M, Misumi Y, Yasunaga T and *Nakamura N. GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. *FEBS J* 282, 2232–2244, 2015
3. Soonthornsit J, Yamaguchi Y, Tamura D, Ishida R, Nakakoji Y, Osako S, Yamamoto A and *Nakamura N. Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. *Exp. Cell Res.* 328, 325–339, 2014



研究課題名：マウス精上皮管腔極性化機構の解明

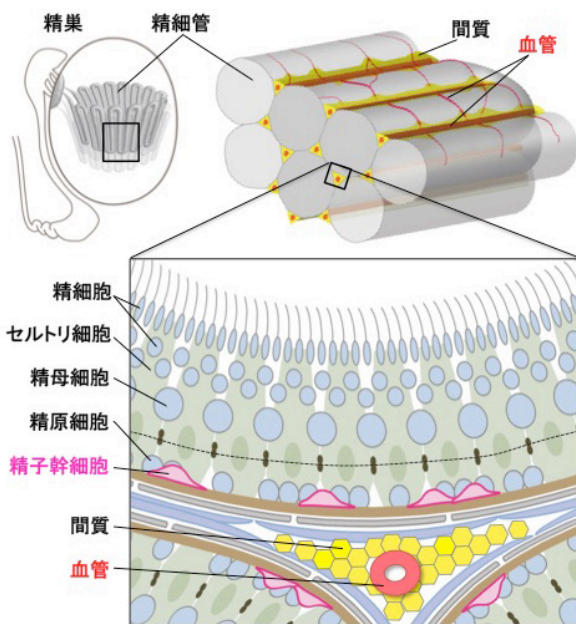
研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112526

研究代表者名：北館 祐(基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教)

【研究の目的】

上皮管腔構造をした組織の一つとして、精上皮(精細管)があげられます。精細管は極性の無い管構造と考えられてきました。しかし、興味深いことに、精子の幹細胞は精細管の中でも血管や間質の近くに偏って存在します(図1)。



(図1) 精子の幹細胞は血管付近に偏在する

なぜ、精子幹細胞は精細管の中でも血管付近に多いのでしょうか。一見、極性が無いように見える精細管が実は血管近くで「極性化」し、幹細胞の分布に影響しているのではないかと考えました。

本研究は精子幹細胞が血管近くに多いことをヒントに、精細管の極性化現象を調べました。これは管構造がどのようにして極性化されるのか、という本領域の問いと関連します。

【研究の成果】

第一に、血管近くの細胞群をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、発現遺伝子をスクリーニングしました。この中で、分泌タンパク質をコードする FGF5 が血管に沿って精細管表面を

覆うシート状の細胞に発現することを見出しました。しかし、この細胞の役割は未だ明らかにされていませんでした。

私はこのシート状の細胞が精子幹細胞を血管近くで高密度化させているのではないかと考え、FGF5 と精子幹細胞の密度の関係を調べました。具体的には、FGF5 機能喪失マウスおよび FGF5 過剰発現マウスの精子幹細胞の密度を計測しました。その結果、FGF5 の遺伝子量と精子幹細胞の密度が正に相関することが明らかとなりました。

【研究の意義・展望】

管構造がどのようにして極性化されるのか、という問題にはまだ十分に答えられていません。しかし、本研究は精子幹細胞が血管近くに多いことをヒントに、精細管の極性化現象を調べることで、FGF5⁺細胞が精細管構造を不均一化していること、さらに、FGF5 が精子幹細胞の密度を制御していることを明らかにしました。

今後、精細管構造を外側から極性化する FGF5⁺細胞とともに、FGF5 が精子幹細胞の密度を調節するメカニズムを明らかにすることで、上皮管腔に普遍的な「極性化」メカニズムの一端を解明することを試みます。

さらに、FGF5⁺細胞や FGF5 の機能を解析することで、精子幹細胞が血管付近に偏らなくなったとき、何が起こるのかを調べることで、なぜ精子幹細胞が血管付近に偏るのか、その意義に迫りたいと考えています。

【主な研究発表】

1. Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo M M, Sugiyama F, Ogawa T, Kobayashi S, Ueno N, Takahashi S, Takada S, and *Yoshida, S. SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/beta-catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. *Stem Cell Reports* 8, 561-575, 2017.



研究課題名：神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112527

研究代表者名：永楽 元次（京都大学・ウイルス再生医科学研究所・教授）

【研究の目的】

申請者はこれまでに、マウス胚性幹細胞（ES細胞）から管腔構造をもつ網膜前駆神経上皮組織を誘導し、立体的な“眼杯”様構造への形態変化を *in vitro* で再現できる実験系を構築した。レンズや間葉系細胞などの周辺組織がない *in vitro* 培養系においても眼杯形成が再現できたことから、網膜前駆神経上皮組織に内在する自己組織的な眼杯形成メカニズムの存在が示唆された。さらに詳細な解析の結果、*in vitro* における眼杯形成には、細胞分化に伴うアクトミオシン活性の時空間的制御と、細胞増殖に伴う組織を横方向へ押す力が重要な役割を果たすことが明らかになった。実際の胚発生においても同様の自己組織的な形態形成メカニズムが働いていると考えられるが、眼杯形成過程における各細胞の挙動や細胞骨格の時空間的制御についてはほとんど明らかにされていない。その理由として、子宮内で起こるほ乳類の胚発生をリアルタイムで可視化することが困難であることが挙げられる。そこで、本研究はES細胞からの立体組織培養系と3次元イメージング技術を組み合わせ、眼杯形成についての分子・細胞・組織の各階層をまたいだ解析を行うことで、神経上皮管腔組織の自己組織的な形態形成機構についてさらに詳細に解析し、その分子機構について新たな知見を得ることを目的とする。

【研究の成果】

本研究ではES細胞からの立体組織培養系と3次元イメージング技術を組み合わせ、眼杯形成についての分子・細胞・組織の各階層をまたいだ解析を行うことで、上皮組織の形態形成制御機構について新たな知見を得ることを目的とした。二光子顕微鏡を用いて眼杯形成過程に

おける個々の細胞動態やアクチンや微小管などの細胞骨格動態を長期にわたってイメージング出来る実験観察系の構築を行った。また同時に細胞内カルシウム動態を観察することで、眼杯形成過程における領域特異的な細胞形態変化と自発的な細胞内カルシウム動態との相関関係を明らかにした。同時に、ヒトES細胞から *in vitro* でヒトの眼杯組織および大脳組織を構築することにも成功し発表した。これらの研究により、将来のヒト網膜組織を用いた、網膜色素変性症などの眼疾患の移植治療の実現化に大きく近づくことができた。

【研究の意義・展望】

本研究で得た実測データを三次元上皮組織の力学的特性を検証するための数値シミュレーションモデルと組み合わせることで眼杯形成の基本原理についてより厳密に検討することが可能になった。

【主な研究発表】

1. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, **Eiraku M**, *Sasai Y. Self-organization of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 10:771-785, 2012
2. Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, **Eiraku M**, *Sasai Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110:20284-20289, 2013
3. Okuda S, Inoue Y, **Eiraku M**, Sasai Y, *Adachi T.
4. Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance. *J Biomech*, 46:1705-13, 2013



研究課題名：上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合 —超初期発がんメカニズムの解明—

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112501

研究代表者名：加藤 洋人（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教）

【研究の目的】

悪性腫瘍の多くは、上皮管腔形成組織に1個の変異細胞が発生し増殖を開始する事から始まる。ショウジョウバエや哺乳類培養細胞系においては、正常上皮細胞シートに変異細胞を混在させた場合に、変異細胞に細胞死が起こるか、あるいは管腔側への排除が起こることが示されている（細胞競合という）。しかしながら、発がんに対する生理的防御反応とも言えるこの重要な現象が、哺乳動物生体内で実際に起こっているか否かは、適切なモデルシステムが存在しないことから明らかにされてこなかった。

本研究計画は、細胞競合のマウスモデルを開発することで、哺乳類生体内においても細胞競合現象が存在することを証明し、さらに細胞競合現象の分子メカニズムの解明を志すものであった。正常上皮管腔組織の破綻（腫瘍性変異細胞の発生）が起こった際の変異細胞と正常細胞の相互作用について解明する事は、本学術領域の統合的理解と領域の推進に貢献できるだけでなく、超初期発がんメカニズムの解明及びがん予防薬の開発へと繋がる基盤的成果となることが期待された。

【研究の成果】

研究期間内での本研究の成果は以下2点である。

(1) 上皮管腔組織における細胞競合マウスモデルを世界に先駆けて作成した。(2) *ex vivo* 及び *in vivo* において細胞競合現象の存在を明らかにした。以下、具体的に記載する。

(1) マウス上皮組織においてモザイク状にごく少数の腫瘍性変異細胞を発生させるモデルを作るため、*Kras^{V12-K1}*; *Villin-Cre/ER* 及び *Kras^{V12-K1}*; *Lgr5-Cre/ER* などのマウスモデルを作成した。このモデルは、特定の細胞特異的に *Cre-recombinase* が発現し当該細胞に *KrasV12* 遺伝子の恒常発現を誘導する系であるが、タモキシフェンの投与量依存性に変異細胞の発生頻度を制御する事が可能であるため、投与する薬剤を極めて低容量に抑えることで、「正常上皮組織の中

にごく少数の変異細胞が混在している」という超初期発がん段階の状態を再現することができた。また、マウスから採取した腸管クリプトの *ex vivo* 培養系と共焦点顕微鏡を用いることによる「細胞競合現象のリアルタイム可視化プロトコール」のプロトタイプを樹立した。

(2) 上記で作成された細胞競合マウスモデルを用いて、正常上皮細胞シートに少数モザイク状に出現させた腫瘍性変異細胞を観察することによって、*ex vivo* 及び *in vivo* において細胞競合現象が存在することを明らかにすることができた。すなわち、細胞競合現象のマウスモデルが樹立され、また実際に細胞競合現象を観察することが可能だということが示された。

【研究の意義・展望】

本研究は、上皮管腔組織形成過程における正常上皮細胞と変異細胞の境界で起こる現象の解明に焦点を当てたものであった。この研究によって、哺乳動物における初めての細胞競合モデルが作成された。このマウスモデルは、管腔形成過程における上皮細胞競合の解明のみならず超初期発がん過程における分子メカニズムの解明に繋がる新しいツールであり、発展性の高いものである。今後の研究によって、管腔形成過程における細胞競合現象の分子メカニズムが明らかとなれば、新規性の高いがん治療薬・診断法の開発につながる事が予想される。正常細胞ががん細胞を排除するメカニズムを活性化し、あるいはがん細胞が正常細胞からの排除を免れるメカニズムを不活性化するという、新しい観点に基づくがん治療薬・予防薬の開発に繋がる事が期待される。

【主な研究発表】

1. Katoh, H., *Fujita, Y. Epithelial homeostasis: elimination by live cell extrusion. *Curr. Biol.* 22:R453-45, 2012.



研究課題名：光干渉断層画像化法を応用した肺組織構築イメージングシステムの開発

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112504

研究代表者名：阿部 宏之（山形大学・理工学研究科・教授）

【研究の目的】

一般的な画像解析技術では、管腔組織内に存在する上皮細胞を非侵襲的に観察することは困難である。本研究では、光干渉断層画像化法（オプティカル・コヒーレント・トモグラフィ：OCT）を応用した新しい上皮管腔組織解析システムの開発を目的とした。具体的には、OCT技術を応用し、管腔組織構造と管腔の上皮細胞を無侵襲的に画像解析できるイメージングシステムを開発するとともに、肺管腔組織の「正常」と「異常」を非侵襲的に可視化できる技術の開発を目指した。

【研究の成果】

肺管腔組織の非侵襲イメージング技術を開発するために、(1) 超高速画像処理技術の開発、(2) マウス肺気管培養システムの確立、(3) 肺組織イメージング解析を行った。(1)では、従来の中心波長 $\lambda_0=841.1$ nmのSLD光源に替えて中心波長 $\lambda_0=1300$ nmのSLD光源を用いた結果、深さ方向 $14\mu\text{m}$ 、横方向 $22\mu\text{m}$ のより高い分解能を得ることができた。さらに、このOCTシステムに高速演算可能なGPU（Graphics Processing Unit）を導入した結果、画像処理速度の著しい向上が可能となった。(2)では、専用培養皿とステンレスメッシュ製ウェルを用いた器官培養系を確立し、マウス胎仔（胎生11.5日）胚の培養を行った。その結果、従来よりも気管支の細分岐や上皮細胞の分化が正常に起こる3次元培養システムを確立することができた。(3)では、生後7、14、24日のマウスから採取した肺の組織イメージングを行った結果、気管支の分岐と上皮細胞の繊毛運動をリアルタイムでイメージングすることができた。また、ブレオマイシン投与によって肺線維症を誘導した組織を観察した結果、繊維化した病変部位と正常部位を輝度によって識別することができた。

本研究の結果、肺の管腔構造及び病変組織を非侵襲的にイメージングできる高感度OCTシステムの開発に成功した。

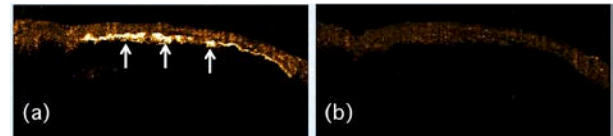


図1：OCTによるマウス肺組織（繊毛細胞）の非侵襲イメージング。(a)上皮細胞の繊毛運動（矢印）が検出できた。(b)固定により繊毛運動がなくなった肺組織。

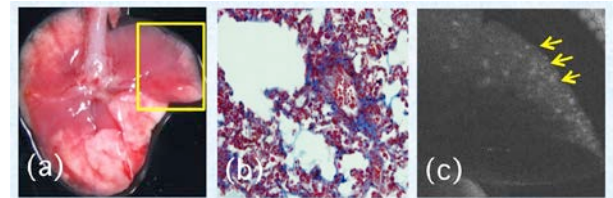


図2：OCTによるマウス肺病変組織の非侵襲イメージング。(a)ブレオマイシン投与により線維症を発症したマウス肺。(b)病変部の組織像。(c)OCTで観察した病変部。病変部が高輝度（矢印）で識別できる。

【研究の意義・展望】

本研究で開発するOCTシステムは、これまで不可能であった上皮管腔組織を「生きたままで」可視化できる新しい解析技術として、当該研究領域へ貢献できる。今後は、ドップラーOCTなどの先進技術を取り入れることで、病変部のより詳細な解析を実現するOCT技術の開発を計画している。本研究は、光を用いた画期的な組織・臓器診断装置開発の基盤となる。

【主な研究発表】

1. *Watanabe, Y., Takakura, K., Kurotani, R., Abe, H. Optical coherence tomography imaging for analysis of follicular development in ovarian tissue. *Applied Optics*, 54: 6111-6115, 2015
2. *Sato, M., Saito, D., Shoji, K., Kurotani, R., Abe, H., Nishidate, I. Ultrathin forward-imaging short multimode fiber probe for full-field optical coherence tomography. *Optical Commun.*, 381: 296-308, 2016



研究課題名：多能性幹細胞由来肝幹・前駆細胞を用いた胆管疾患解析系の構築

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112505

研究代表者名：紙谷聡英(東海大学・創造科学技術研究機構・准教授)

【研究の目的】

胆管は胆汁酸の輸送に関わる上皮系管腔で、肝幹・前駆細胞に由来する肝内胆管と肝臓の外から十二指腸までを結ぶ肝外胆管の二つに分類される。炎症や胆道閉鎖による肝内胆管の損傷は胆汁酸による肝細胞死を誘導し、強い肝障害(原発性胆汁性肝硬変など)から肝臓・胆管癌といった重篤な肝疾患へと進行する。また、胆管細胞の機能異常は肝嚢胞などの疾患につながることから、ヒト胆管系を用いた機能・病態解析が必要とされている。

肝発生過程では、腸管の一部が心筋・横隔膜からのシグナルにより肝芽に分化誘導され、その後肝芽の成長に従って肝前駆細胞の分化・増殖が見られる。その後、胚発生の進行に伴い肝前駆細胞は成熟肝細胞・胆管細胞へと分化する。我々は、ヒトiPS細胞から肝前駆細胞を効率的に誘導・培養する系を構築済みである。そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞を胆管細胞へと分化誘導する系を構築し、胆管疾患のin vitro解析系の構築等へと応用する。

【研究の成果】

本研究ではヒト多能性幹細胞を用いて、肝臓における胆汁酸分泌を司る胆管細胞の破綻・機能異常により生じる病態の再現系構築を行った。ヒトiPS細胞からのin vitro胆管様構造の培養系の樹立のために、ヒトiPS細胞を肝分化誘導した後に、肝前駆細胞マーカーであるCD13, CD133陽性細胞を純化した。この細胞を継代培養後にコラーゲン・マトリゲル混合ゲル内に細胞を包埋しサイトカインで刺激することで、胆管様のCyst構造が形成された。この胆管様Cyst構造は胆管細胞マーカーであるサイトケラチン7を発現する一方で、上皮系細胞に特有の細胞極性を保持していた。

次に胆管病変である多発性肝のう胞症の原因遺伝子の一つと推定されるPRKCSHに注目した。ゲノム編集酵素を用いて、多発性肝のう胞症患者と同様のPRKCSH遺伝子欠損を持つヒトiPS細胞を作製した。この細胞から肝前駆細胞を誘導しin vitro胆管分化系で解析を進めた結果、PRKCSH欠損によって胆管分化の効率が変化することを明らかにしてお

り解析を進めている。

【研究の意義・展望】

本研究ではヒトiPS細胞の多能性に着目し、特異的マーカーによる細胞純化や独自の培養系を組み合わせることで、ヒトiPS細胞由来in vitro胆管様構造の誘導系の構築に成功した。さらに、ヒト遺伝性胆管疾患の一つである多発性肝のう胞をin vitroで再現するためにその原因遺伝子であるPRKCSHの欠損ヒトiPS細胞を作製した。この細胞を上記の培養系で分化誘導した結果、コントロールに比べて胆管様構造の分化誘導頻度が高いことがわかり、病態を一部in vitroで再現できていると考えられる。今後、難治性疾患である多発性肝のう胞症の治療薬開発等への応用が期待できる。

【主な研究発表】

1. *[Kamiya A](#), Ito K, Yanagida A, Chikada H, Iwama A, Nakauchi H. MEK-ERK activity regulates the proliferative activity of fetal hepatoblasts through accumulation of p16/19cdkn2a. *Stem Cells Dev.* 24, 2525-35, 2015
2. Tsuruya K, Chikada H, Ida K, Anzai K, Kagawa Y, Inagaki Y, Mine T, and *[Kamiya A](#). A paracrine mechanism accelerating expansion of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells. *Stem Cell Dev.* 24, 1691-702, 2015
3. Yanagida A, Ito K, Chikada H, Nakauchi H, *[Kamiya A](#). An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. *PLoS One* 8, e67541, 2013
4. Kiyohashi K, *[Kakinuma S](#), [Kamiya A](#), Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, *[Watanabe M](#). Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology* 57, 2502-13, 2013



研究課題名：癌抑制遺伝子産物 APC が関わる上皮管腔形成機構とその破綻による癌発症機構の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112506

研究代表者名：川崎 善博(東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授)

【研究の目的】

癌抑制遺伝子 APC(adenomatous polyposis coli)の異常は、大腸癌発症の最も重要な原因の一つであると考えられている。申請者らは APC に結合する新規蛋白質として Rac1/Cdc42 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 Asef を同定し、APC-Asef 複合体は細胞運動の制御や大腸癌の発生・進展に関与していることを明らかにしてきた。さらに、APC や Asef の発現抑制が管腔形成能低下に繋がること示す予備的な結果を得ていた。そこで本研究では、これまでの研究内容をさらに発展させ、APC/Asef 複合体が関わる細胞運動のメカニズムやその破綻による癌発症機構の詳細を解明し、管腔形成機構の解明や大腸癌の新しい治療法開発に繋がる足掛かりを得ることを目的とした。

【研究の成果】

本研究では、これまでの研究内容をさらに発展させ、以下のことを明らかにした。即ち、(1) ほとんどの大腸癌で Asef の発現は亢進していること、およびその発現亢進は Notch3 経路の活性化に依存していること、(2) マイクロ RNA の一種 miR-1 が Notch3 mRNA の 3'-UTR に結合することで Notch3 の発現を抑制し、Notch3/Asef の上流因子として働いていること、(3) 下流因子を用いた機能的レスキュー実験によって、miR-1/Notch3/Asef 経路は大腸癌細胞の運動能亢進に重要であることを突き止めた。さらに、単層培養した HUVEC (ヒト臍静脈内皮細胞) の上から大腸がん細胞を播種した後、下層への移動度を観察することで本経路が内皮下浸潤

(Transendothelial migration) に与える影響を検討した。その結果、血管内皮細胞が提示する Notch ligand (DLL4)は大腸癌細胞内での Notch3/Asef 経路を活性化することで、大腸癌細胞の運動能亢進を招くことを見出した。したがって、Notch3/Asef 経路を介した血管構造と癌細胞の相互作用が大腸癌細胞の振る舞いに大きな影響を与えている可能性が示唆された。

【研究の意義・展望】

癌特有の形質である転移・浸潤は癌細胞のみでは誘発されず、癌細胞と間質細胞との相互作用が重要であることが明らかになってきている。本研究において我々は、血管内皮細胞が提示する DLL4 が大腸癌細胞の Notch3/Asef 経路を介して大腸癌細胞の運動を誘導できることを明らかにした。これらの知見から、Notch3/Asef 経路と血管構造のつながりは、①癌細胞が転移・浸潤能を獲得する原因の一つになっている可能性、および②立体的な組織構築の要因の一つになっている可能性が示唆された。

【主な研究発表】

1. *[Kawasaki Y](#), Komiya M, Matsumura K, Negishi L, Suda S, Okuno M, Yokota N, Osada T, Nagashima T, Hiyoshi M, Okada-Hatakeyama M, Kitayama J, Shirahige K, *Akiyama T. MYU, a target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates induction of CDK6 to promote cell cycle progression. *Cell Rep.* 16, 2554-2564, 2016
2. *[Kawasaki Y](#), Matsumura K, Miyamoto M, Tsuji S, Okuno M, Suda S, Hiyoshi M, Kitayama J, *Akiyama T. REG4 is a transcriptional target of GATA6 and is essential for colorectal tumorigenesis. *Sci. Rep.* 5, 14291, 2015
3. Tsuji S[#], [Kawasaki Y](#)[#], Furukawa S, Taniue K, Hayashi T, Okuno M, Hiyoshi M, Kitayama J, *Akiyama T. ([#] co-first author) The miR-363-GATA6-Lgr5 pathway is critical for colorectal tumorigenesis. *Nat. Commun.*, 5, 3150, 2014
4. Furukawa S, [Kawasaki Y](#), Miyamoto M, Hiyoshi M, Kitayama J, and *Akiyama T. The miR-1-Notch3-Asef pathway is important for colorectal tumor cell migration. *PLoS One* 8, e80609, 2013



研究課題名：新規可視化法を用いた、正常時と障害時における胆管 3 次元ダイナミクス解析

研究期間：平成 24 年度～平成 25 年度

研究課題番号：24112507

研究代表者名：伊藤 暢（東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授）

【研究の目的】

肝臓の中を走行する胆管（肝内胆管）は、胆管上皮細胞により構成され、胆汁という液体を流す「導管」としての役割を担う、典型的な『上皮管腔組織』です。一方で、肝臓の実質組織の恒常的なターンオーバーや障害からの再生に関わる組織幹／前駆細胞が胆管中に存在することが明らかとなりつつあり、胆管は肝組織の「幹細胞プール」という視点でも捉えることのできるユニークな系です。

胆管は肝臓内に樹状に張り巡らされており、従来の組織切片を用いた 2 次元解析手法では、その実像の正確な把握は困難でした。我々は、マウス成体肝臓の内部における胆管の樹状構造を 3 次元レベルで高精細に観察するための新たな手法を開発しました。本研究課題では、この独自の新規可視化法を駆使したアプローチにより、正常時および肝障害・再生過程における胆管系の 3 次元形態・動態の観察を行うと共に、その制御に関わる細胞間相互作用とシグナル分子・経路の解明を目指しました。

【研究の成果】

① 正常時および肝障害・再生過程における胆管系の 3 次元形態・動態の観察

種々のマウス肝障害モデルを用いて、胆管系がどのような構造・挙動をとるのかを観察し、比較を行いました。その結果、肝臓組織中での障害部位（門脈域、中心静脈域、および実質域全体）に応じて、胆管系がそれぞれ異なる形態変化を示すことを見出しました。特に、四塩化炭素やチオアセトアミドといった薬物の投与モデルにおいて、中心静脈域に「異所性（胆管系とは独立に）」出現するとされていた胆管上皮細胞様の細胞は、門脈域に存在する本来の胆管系が障害部位に向かって伸長したものであり、これと管腔構造として完全に接続されていることを初めて明らかにしました。すなわち、胆管の 3 次元組織構築は疾患・障害の種類に応じて動的かつ適応的（adaptive）に変化するものであり、こうした組織の可塑性が、

肝臓のもつ高い再生能力に寄与することが強く示唆されました。

② 胆管系の挙動を制御する細胞間相互作用とシグナル分子・経路の解析

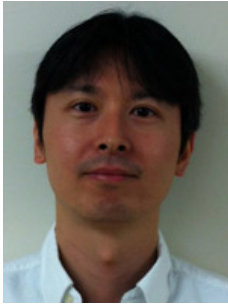
肝障害時における胆管系の構造変化には、周囲に存在する間葉系細胞との相互作用が重要であることを見いだしました。それら間葉系細胞は FGF7 という増殖因子を分泌し、その作用によって胆管上皮細胞の増殖と胆管組織の伸長・分岐が誘導されることを明らかにしました。

【研究の意義・展望】

本研究課題では、組織観察の視点を 2 次元から 3 次元へと高めることで、肝障害に伴う胆管上皮樹状組織のダイナミックな構造変化という現象を世界で初めて捉えることに成功しました。胆管をはじめとする成体の上皮管腔組織は、身体や臓器を形作って支えるだけの単なる静的な構造物（building block）ではなく、動的な可塑性をもって生体機能の調節に関わる存在であることが明らかとなりました。今後は、3 次元レベルでの観察に、さらに時間軸や、増殖・分化といった種々の細胞機能の評価系を加えた「多次元イメージング解析」へと展開していくことで、肝障害・再生過程における胆管系の動態と生理機能、および、その制御機構の詳細についての解明を、さらに進めていきたいと考えています。

【主な研究発表】

1. Takase HM, *Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev.* 27, 169-181, 2013
2. Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A, and *Itoh T. Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology* 61, 2056-2066, 2015



研究課題名：器官サイズ制御シグナルによる神経管・血管系上皮組織の3次元構築機構の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112509

研究代表者名：浅岡 洋一（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教）

連携研究者名：仁科 博史（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授）

平山 順（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授）

岩月 麻美子（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教）

【研究の目的】

器官サイズ制御シグナル Hippo 伝達系が上皮管腔組織の3次元構築を規定する分子メカニズムの詳細は未解明な点が多い。我々はこれまでに Hippo シグナルの下流標的因子 YAP のメダカ変異体を単離し、この変異体が神経管や網膜などの上皮組織の破綻という特徴的な表現型を呈することを見出した。そこで本研究では、YAP による上皮管腔組織の3次元形成機構およびその破綻による管腔形成異常の発症機序を明らかにすることを目的として研究を推進した。これにより、上皮細胞が3次元的に管腔組織を維持する機構の解明とその破綻による病態についての理解を目指す本領域の推進に貢献できると考えられる。

【研究の成果】

生きた個体全体の中で神経管腔組織の破綻を細胞張力の観点から検証するため、張力可視化用センサープローブをメダカ胚に導入した。蛍光タイムラプス顕微鏡により、メダカ胚における細胞間張力の組織分布を FRET の蛍光強度の変化として捉えられるかどうか検討した。これまでに期待したほどの FRET 効率は得られていないが、リンカーの種類や長さの条件検討により FRET 効率の最適化を培養細胞にて試みている。

Hippo シグナル伝達系による上皮組織の構築機構を明らかにするため、YAP の様々な機能ドメインに変異を施した mRNA をゼブラフィッシュ胚へ導入し、表現型の詳細な解析を行なった。その結果、YAP の TEAD 結合ドメイン、WW ドメインおよび転写活性化ドメインの3者が網膜上皮組織の形成過程において重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに YAP の WW ドメインが網膜の転写因子 Rx1 の PPXY モチーフと相互作用し、網膜神経細胞の分化のタイミングを制御することを見出した。

YAP のメダカ変異体の表現型を細胞張力の観点から精査した結果、YAP がアクトミオシンの活性を制御することを見出した。また、YAP はアクトミオシンの活性制御を通じてフィブロネクチ

ンの重合化を惹起し、眼のレンズと網膜の正常な組織配置に関与することが明らかとなった。これらメダカで見出された YAP の新機能はヒトにおいても保存されていることが、ヒトスフェロイドを用いた解析により判明した。

【研究の意義・展望】

本研究により、YAP によるメカノホメオスタシス制御という新たな概念を提唱するに至った点は意義深い。今後は、YAP のターゲット遺伝子群によるメカノホメオスタシスの統御機構に迫ることが急務と考えられる。

【主な研究発表】

1. *[Asaoka Y.](#), Hata S, Namae M, Furutani-Seiki M, and *[Nishina H.](#) The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE*. 9, e97365, 2014
2. Shimomura T, Miyamura N, Hata S, Miura R, *[Hirayama J.](#), and *[Nishina H.](#) The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 917-923, 2014
3. Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, Northrop, JP, Lehnertz B, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Arrowsmith CH, [Nishina H.](#), Gold MR, Rossi FM, Gingras AC, and *Zaph C. Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 26, 188-194, 2013
4. Hata S, [Hirayama J.](#), Kajiho H, Nakagawa K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, and *[Nishina H.](#) A novel acetylation cycle of transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J Biol Chem.* 287, 22089-22098, 2012



研究課題名：上皮管腔形成における Mob1 の役割とその破綻

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112515

研究代表者名：鈴木 聡(九州大学・医学系研究科・教授)

マウスとなり治療開発に必須なツールとなる。

【研究の目的】

上皮管腔組織の形成・維持には、液性因子起因性シグナル経路と細胞接触起因性シグナル経路による細胞増殖、細胞死、幹細胞動員、未分化性維持、極性等複数の事象制御が大切である。

近年、新たな細胞接触起因シグナルとして Hippo 経路が報告された。しかしながら哺乳類 Hippo 経路各分子には相同分子が極めて多く、どの上皮管腔組織の形成・維持局面にどの Hippo 経路分子が最も大切であるかの解明が急務である。また Hippo 経路遺伝子欠損マウスの多くは胎生早期致死であり、各 Hippo 経路分子の上皮管腔組織形成における役割やその破綻病態の多くが不明であった。

本研究では、この Hippo 経路の中でも、癌において蛋白質発現低下や遺伝子変異を高頻度に見、機能が未だ不明な MOB1 による上皮管腔組織制御機構やその破綻病態を解析することをその目的とする。

【研究の成果】

MOB1 全身ホモ欠損マウスが胎生早期に致死となること、全身部分欠損マウスに、管腔臓器の1つである毛嚢腫瘍である皮膚外毛根鞘がんが発症することを見出した。また肝・胆管細胞特異的な MOB1 ホモ欠損マウスでは胆管の過形成と未分化性亢進を見、早期に胆管がんや肝がんを発症すること、肺細気管支上皮特異的な MOB1 欠損マウスでは、肺胞細気管支上皮の過形成を見るものの、ヘミデスモソーム構造が障害されるために、気管支上皮や肺幹細胞は内腔側への剥離し、これによって化学発症肺腺がん形成には抵抗性となることを見出した。

【研究の意義・展望】

本研究は今後、上皮管腔組織の形成・維持機構の解明に、管腔組織上皮由来悪性腫瘍の治療標的解明につながり、作成したマウスは疾患治療モデル

【主な研究発表】

1. Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki SO, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, *[Suzuki A](#) Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice *J.Clin.Invest* 122(12), 4505-18, 2012
2. Takasuga S, Horie Y, Sasaki J, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Sato Y, Chida S, Kotani K, Harada A, Katada T, [Suzuki A](#), Wada Y, Ohnishi H, *Sasaki T. Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(5); 1726-31, 2013
3. Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki SO, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-ya K, Mimori K, *[Suzuki A](#) Dysregulated YAP1/TAZ and TGF-beta signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(1), E71-80, 2016
4. Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, *[Suzuki A](#) MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion, and tumor formation *Oncogene* in press, 2017



研究課題名：細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112518

研究代表者名：西中村 隆一（熊本大学・発生医学研究所・教授）

【研究の目的】

腎臓は後腎間葉と尿管芽という2つの組織の相互作用によって発生する。間葉はWnt4の作用によって上皮化して管腔を形成し（間葉上皮転換）、尿管芽由来の管腔と接続して、一続きの機能単位すなわちネフロンを形成する。我々は間葉に発現する新規キネシン Kif26b を同定し、この欠失マウスが腎臓を完全に欠損することを示した (Uchiyama et al. Proc Nat Acad Sci USA 2010)。さらに Kif26b の結合因子として非筋肉型ミオシン II (Myh9/10) を同定した。本計画では、腎臓発生中期以降に Kif26b 及び Myh9/10 を欠失させることにより、細胞骨格系が腎臓間葉の極性及び間葉上皮転換に果たす役割を解析することを目的とする。

他の臓器も間葉と管腔上皮との相互作用によって形成されるが、腎臓は間葉も管腔上皮に転換し、さらにそれが尿管芽という管腔上皮と結合するという点でユニークである。現在の腎臓発生学は液性因子あるいは転写因子の研究に留まっており、細胞骨格と上皮形成という視点は少ない。本計画は、申請者が独自に同定してきた Kif26b や Myh9/10 を軸に、腎臓における細胞骨格制御という視点を、上皮管腔形成領域に導入できると考えている。さらに腎臓という臓器を用いた in vivo の研究が、主に培養細胞を使って発展してきた上皮形成研究と融合することで、新しい領域の開拓が期待できる。

【研究の成果】

1. 上皮管腔形成におけるミオシンの役割

後腎間葉特異的な非筋肉型ミオシン II のノックアウトマウス (Myh9/10 二重ノックアウト) を作成したところ、生直後に死亡し、糸球体・尿管等のネフロンがほぼ消失していた。胎生期では、間葉上皮転換後の未熟なネフロンの管腔伸長が阻害されて細胞死を起こしていた。よってミオシンはネフロンの形態形成に必須であることが

明らかになった。一方後腎間葉特異的 Myh9 の単独欠失では、出生時に尿細管の拡張が認められ、生後10ヶ月には顕著な腎不全に至った。これに対して、尿管芽特異的な Myh9 の単独欠失では明らかな異常が見られなかった。よって Myh9 への依存度が後腎間葉と尿管芽という2つの前駆細胞集団によって異なることが判明した。

2. 上皮管腔形成における Kif26b の役割

通常の Kif26b ノックアウトマウスは、後腎間葉と尿管芽の相互作用が起こらずに、腎臓をほぼ完全に欠失する。この腎臓発生初期の異常を迂回するために、後腎間葉特異的な Kif26b のノックアウトマウスを作成した。このマウスでは、発生中期及び出生時において、ネフロン前駆細胞の接着が低下し、出生時の前駆細胞数も軽度減少した。したがって Kif26b はネフロン前駆細胞の維持に必須であることが明らかになった。しかし出生時の腎臓のサイズは正常で、生存にも影響がなかった。Myh9/10 の二重ノックアウトでもネフロン前駆細胞の異常が見られたので、この部分は Kif26b との協調の可能性があるが、その後のネフロン形成におけるミオシンの機能は Kif26b とは独立であることが示唆された。

【研究の意義・展望】

腎臓の管腔上皮形成過程における細胞骨格系の重要性を解明した。その後の平成26-27年度公募研究でその機序を明らかにした。

【主な研究発表】

1. Recuenco MC, Ohmori T, Tanigawa S, Taguchi A, Fujimura S, Conti MA, Wei Q, Kiyonari H, Abe T, Adelstein RS and *Nishinaka R. Non-muscle myosin II regulates the morphogenesis of metanephric mesenchyme-derived immature nephrons. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 1081-1091, 2015



研究課題名：非再生系成体組織における異常細胞の検出・排除システム

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112521

研究代表者名：谷口 喜一郎(学習院大学・理学部・助教)

【研究の目的】

多くの上皮組織は、細胞傷害に応答してプログラム細胞死を誘導することで、異常細胞の出現を防いでいる。一方で、プログラム細胞死は、組織の部分的喪失を伴う恒常性維持機構であり、強い再生能力があって初めて成立する。

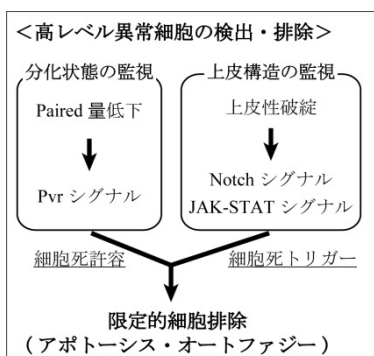
上皮組織の中には、再生能力がきわめて低いものも存在する。このような組織では、細胞を長期に維持し、深刻な異常をきたした細胞のみを限定的に排除する必要がある。しかしながら、このような異常レベルの検出や限定的排除の仕組みは不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエ非再生系組織である附属腺をモデルとして用いて、この問題に取り組んだ。

【研究の成果】

附属腺では、限定的細胞排除（アポトーシス・オートファジー）が加齢にともない散見される。代表者は、老化細胞で活性化するシグナルとして、Notch シグナル・JAK-STAT シグナルを同定していた。また、上記シグナルは、DNA 傷害・酸化といった細胞傷害ではなく、分化状態の異常（附属腺の主因子 Paired 量の低下）に応答していた。一方で、これらのシグナルの細胞排除における役割は不明であった。

本研究の結果、加齢時における細胞排除に関与するシグナルとして、新たに Pvr シグナルを同定した。興味深いことに、Pvr シグナルは Notch・JAK-STAT シグナルとは異なる細胞異常により誘導されていた（交付後の検証により上皮性破綻であることが判明）。各シグナルの役割について遺伝学的解析を行ったところ、細胞死の“トリガー”は Pvr シグナルであった。一方で、Notch と JAK-STAT シグナルは、Pvr シグナル誘導性の細胞死を“許容”していると考えられた（右図）。

本研究成果によ



り、上皮性異常と分化状態異常が同時に生じた場合のみに、3つのシグナルにより協調的に細胞排除が誘導され、異常レベルが高い細胞のみを限定的に検出・排除するという、新たな細胞排除機構が明らかになった。

【研究の意義・展望】

本研究成果および交付期間後の検証により、1) 分化状態の監視システム：Paired レベルに逆相関して活性化する JAK-STAT・Notch シグナル応答、2) 上皮構造の監視システム：上皮性破綻により活性化する Pvr シグナル応答の存在が明らかになり、本研究目的である“異常細胞の検出・排除システム”の概観が見えてきた。上皮管腔組織の異常レベルを“分化状態”・“上皮性”をもとに監視し、両者が破綻した場合のみ細胞排除を行うというシステムは、シンプルで合理的な異常監視システムであり、多くの組織に一般化できる概念かもしれない。

一方で、本研究における結果は、強制発現実験から得られたものであり、加齢時の老化組織を用いた検証も必要である。また、この排除機構を喪失した組織における組織破綻を明らかにし、疾患との関連を見いだしていきたい。

【主な研究発表】

1. Nakamura M, Matsumoto K, Iwamoto Y, Muguruma T, Nakazawa N, Hatori R, Taniguchi K, Maeda R, *Matsuno K. Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of *pebble*, encoding a RhoGEF, in *Drosophila* embryos. *Mech. Dev.* 130,169-180, 2013
2. Okumura T, Takeda K, Taniguchi K, *Adachi-Yamada T. βv integrin inhibits chronic and high level activation of JNK to repress senescence phenotypes in *Drosophila* adult midgut. *PLoS One* 9, e89837, 2014
3. Taniguchi K, Kokuryo A, Imano T, Minami R, Nakagoshi H, *Adachi-Yamada T. Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of *Drosophila* male accessory gland cells. *BMC Dev. Biol.* 14, 46, 2014



研究課題名：大腸上皮の癌化に伴う管腔形成異常メカニズムの解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112523

研究代表者名：佐藤 俊朗(慶應義塾大学・医学部・准教授)

【研究の目的】

腸管上皮は腺管構造を形成し、水分・栄養の消化吸収を司る組織である。腺管構造は癌化に伴い、構造形成異常を示していく。大腸未分化型腺癌は腺管構造をとらず、高率の浸潤転移を示すため大腸癌の中でも予後不良（化学療法の抵抗性）である。上皮間相互作用は腸管上皮生存に必須なシグナルとなっているが、癌化に伴う管腔形成異常とともに、癌細胞は上皮間葉移行を示し、間質に浸潤していく。従って、管腔形成異常機構の解明から大腸癌の進行メカニズムの理解と治療標的の開発が期待できる。

申請者は世界で初めて、マウスおよびヒト腸管上皮幹細胞培養の確立、腸管上皮幹細胞の自己複製機構を明らかにした。本培養システムでは効率的にヒト腸管上皮管腔形成をリアルタイムに観察することができ、遺伝子操作による人工的な段階的発癌における管腔形成異常のメカニズムの解明が期待できる。

【研究の成果】

我々は、平成24-25年度の研究期間にヒト正常大腸上皮オルガノイドへの人工的な遺伝子変異導入技術の確立を行った。研究期間中にCRISPR-Cas9によるゲノム編集技術が報告され、本技術をオルガノイドへ導入した（Fujii M et al. *Nature Protocol* 2015）。ゲノム編集技術により、APC, KRAS, SMAD4, TP53, PIK3CAの5つの遺伝子変異を正常上皮に導入しても腫瘍化は認められるものの、浸潤能・転移能を有する大腸癌には悪性転化しないことを示した。また、ゲノム不安定性を有する大腸腺腫は遺伝子変異導入により転移性大腸癌に進展したことから、ヒト上皮細胞を用いた人工大腸癌モデルを世界で初めて実証した（Matano M et al. *Nature Medicine* 2015）。

【研究の意義・展望】

大腸がんの臨床診断は臨床病理学的な組織構造異常によって診断される。我々は、ヒト大腸上皮の多段階発がん仮説を直接的に実証し、遺伝学的変化と組織形質変化の対応性を記載した。しかしながら、既知のドライバー遺伝子変異だけでは完全な組織学的悪性転化には不十分であることもわかり、今後、責任となる分子遺伝学的変容の解析とその診断・治療への応用が期待される。

【主な研究発表】

1. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, **Sato T***. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature* 2017;545:187-192.
2. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Ohta Y, Nanki K, Kawasaki K, Nakazato Y, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, **Sato T***. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements. *Cell Stem Cell* 2016;18:827-38.
3. Fujii M, Matano M, Nanki K, **Sato T***. Efficient gene engineering of human intestinal organoid using electroporation. *Nature protocol*. 2015;10:1474-85.
4. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, **Sato T***. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. 2015;21:256-62.



研究課題名: 類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング

研究期間: 平成24年度~平成25年度

研究課題番号: 24112524

研究代表者名: 清川 悦子 (金沢医科大学・医学部・教授)

【研究の目的】

これまで上皮細胞の研究は培養細胞を用いて行われてきたが、通常の培養ではシート状に生育するが、生体内では3次元の腺管構造を形成しているという違いがあった。近年、ゲルのなかで培養することにより試験管内でも3次元腺管構造に類似した構造(類器官)をつくる手法が開発されてきた。我々はこれまでに、ラパマイシン依存的にヘテロオリゴマーを形成するFKBP-FRBの系を用いて、3次元腺管構造において細胞形質膜に信号伝達分子を移行させることで腺管構造の維持機構における信号伝達を解明してきたが、基底膜側に蛋白質を局在させる方法がなかった。そこで本研究では、それを開発することを目的とした。また上皮構造が維持される機構、およびその破綻によって形態変化を引き起こす機構を明らかにすることも目的とした。

【研究の成果】

接着斑に局在するチロシンリン酸化酵素 FAK のもつ FAT (Focal Adhesion Targeting) 配列と植物ユビキチンによって分解される信号を持つ AID を付加した赤色蛍光蛋白質が、培養細胞である MDCK 細胞から成る類器官の基底側に局在することを見出した。この蛋白質に細胞骨格を制御する低分子量 G 蛋白質の恒常的活性化型、優勢劣性型を付加したものを作製し、基底膜に局在させ、浸潤などの悪性の形態変化を誘導できるかを調べたが、形態的に大きな変化は見られなかった。

類器官形成の初期と後期で異なる発現量を示す分子群を mRNA の発現を比較するマイクロアレイを用いて調べた。そのうちのひとつ Ripply1 という分子は、早期に比べて後期にて mRNA の発現が上昇することを見出した。通常は核内に存在し、自身はユビキチン化を受けることはないが、TLE1 という転写因子と会合することで核内で分解を受けることを見出した。分解を受けない変異体を発現させることで、基底膜側から細胞が動き、類器官が出芽することを見出したが、この形態変化

を起こすのはごく少数の類器官に限られていた。また核外に局在させた変異体では類器官の形成が阻害される傾向があった。以上のことから Ripply1 の発現や局在の変化が類器官形成に何らか関与している可能性が示唆された。

また、低分子量 G 蛋白質 Ras の活性化型を類器官に誘導的に発現させると細胞周期が進行し、細胞が内腔に充満するという腺腫(あるいは過形成)の形態変化を示すことを見出した。

【研究の意義・展望】

上皮細胞の浸潤は基底側で突起形成をすることで起こると考えられているので、今回の研究では基底膜に局在させる道具を開発することが出来た。局在させる蛋白質の選定(種類、アミノ酸長など)を今後工夫すれば、機能を保ったまま基底側特異的に形態を変化させる信号伝達を誘導できる可能性がある。

【主な研究発表】

1. Yoshizaki H, Ogiso H, Okazaki T, *Kiyokawa E.: Comparative lipid analysis in the normal and cancerous organoids of MDCK cells. *J Biochem*, 159, 573-584, 2016
2. Yoshizaki H, Kuwajima Y, Minato H., *Kiyokawa E.: Regulation of Ripply1 expression in MDCK organoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 468:337-42, 2015
3. Mori Y, Yagi S, Matsuda M, *Kiyokawa E. Insufficient ability of Rac1b to perturb cystogenesis. *Small GTPases*. 4, 9-15, 2013
4. Sakurai A, Matsuda M, *Kiyokawa E. Activated Ras protein accelerates cell cycle progression to perturb MDCK cystogenesis. *J Biol Chem*, 287, 31703-31711, 2012



研究課題名：幹細胞老化の制御機構とその破綻による上皮管腔組織機能低下メカニズムの解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24112528

研究代表者名：山越 貴水(国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・室長)

【研究の目的】

高齢者では殆どの組織に存在する組織幹細胞の機能が低下することにより組織恒常性が破綻し、様々な老化関連疾患を発症することが知られている。しかし、組織幹細胞の幹細胞性を維持する機構が何故、老化に伴い破綻するのかについてはよく分かっていない。私達はこれまでに、インビボ・イメージング技術を用いて老化マーカーである $p16^{Ink4a}$ の発現を生体内で捉えることに成功しており、最近、幹細胞維持に重要なポリコム蛋白 $Bmi1$ を欠損したマウスの顎下腺において $p16^{Ink4a}$ の発現が著しく上昇することを見出している(図A)。そこで、本研究では、このシステムを用いて、上皮管腔組織の一つである顎下腺について顎下腺幹細胞の機能低下が生じるメカニズムの詳細を解明する。

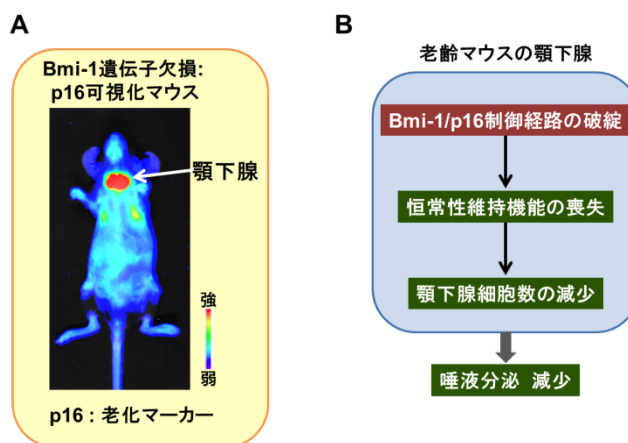
【研究の成果】

動物モデルを用いて上皮管腔組織の一つで唾液分泌を担う顎下腺組織を組織形態学的観点から解析すると同時に、顎下腺組織の幹/前駆細胞や実質細胞における細胞周期制御因子に焦点を当てて研究を進めた。その結果、老化により顎下腺組織の実質細胞数が減少するだけでなく、唾液を産生する腺房細胞内に含まれる唾液成分の割合が変化し、粘性物質が増えることが示された。また、顎下腺組織の幹/前駆細胞や実質細胞では、老化により $Bmi-1/p16^{Ink4a}$ 制御経路が破綻し $p16^{Ink4a}$ の発現が高くなるために、これらの細胞が機能低下を起こすことが示された。以上のことから、顎下腺組織では $Bmi-1/p16^{Ink4a}$ 制御経路の破綻により顎下腺組織の幹/前駆細胞や実質細胞において機能低下が引き起こされた結果、実質細胞数が減少し、上皮管腔組織の一つである顎下腺組織の重要な唾液分泌機能が破綻し、加齢により唾液分泌量が減少することが示唆された(図B)。

【研究の意義・展望】

老化は唾液の量だけでなく唾液の質をも低下させるが、本研究において、老化により唾液分泌細胞内に粘性物質が蓄積する知見が得られている。

今後、粘性物質の実態や粘性物質が増えるメカニズムなどを明らかにしていくことが、老化に伴い増加する口腔乾燥症状の原因の全貌解明に繋がっていくものと考えられる。



【主な研究発表】

1. *Yamakoshi, K., Katano, S., Iida, M., Kimura, H., Okuma, A., Ikemoto-Uezumi, M., Ohtani, N., Hara, E., Maruyama, M. Dysregulation of the $Bmi-1/p16^{Ink4a}$ pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. *Aging Cell*, 14(4), 616-624, 2015
2. Sato, S., Kawamata, Y., Takahashi, A., Imai, Y., Hanyu, A., Okuma, A., Takasugi, M., Yamakoshi, K., Sorimachi, H., Kanda, H., Ishikawa, Y., Sone, S., Nishioka, Y., *Ohtani, N., *Hara, E. Ablation of the $p16^{INK4a}$ tumour suppressor reverses ageing phenotypes of klotho mice. *Nat. Commun.*, 6:7035, 2015
3. Doi, R., Endo, M., Yamakoshi, K., Yamanashi, Y., Nishita, M., Fukada, S., *Minami, Y. Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ β -catenin signal in myogenic cells during differentiation. *Genes Cells*, 19(4), 287-296, 2014



研究課題名：腸管上皮幹細胞 3次元培養技術を利用した 管腔形成機構解析

研究期間：平成26年度-平成27年度

研究課題番号：26112705

研究代表者名：中村 哲也(東京医科歯科大学・消化管先端治療学・寄付講座教授)

【研究の目的】

消化管内腔を覆う上皮組織は、陰窩や絨毛と呼ばれる特徴的構造をとり、吸収、消化、ホルモン分泌、免疫調節などの重要な機能を担う。正常消化管上皮が固有の組織構築を通して固有の機能を担う詳細を解明することは、消化管上皮機能の異常が関与するさまざまなヒト消化管疾患の病態解明にも重要である。本研究では、研究代表者が独自にもつ消化管上皮細胞の培養と移植の技術を利用し、特に小腸および大腸上皮に着目することで、1) 上皮が管腔構造を構築する初期段階における調節機構の解明、2) 管腔構造形成に関わる細胞内物質輸送機構の解析、および 3) 小腸・大腸上皮がもつ部位特異的な固有性を維持する機構の解析をおこない、正常腸上皮が管腔形成を通して固有の機能を獲得する機構を明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

腸管上皮幹細胞が管腔構造を構築する初期相の解析では、マウス大腸上皮オルガノイド培養技術を用い、単一の上皮幹細胞が細胞分裂を重ね多細胞集団となり、3次元的に嚢胞構造を構築する数日間にわたる全過程をリアルタイムイメージングでとらえる実験系を構築した。当初計画したところの、各種細胞への分化を可視化可能なレポーター遺伝子導入オルガノイドの作成は課題として残ったものの、本イメージングシステムの構築により、腸管上皮幹細胞が分裂・分化を経て特有の管腔構造を構築し始める初期相を、個々の細胞を区別し経時観察することが可能になると考えた。

管腔構造形成に関わる細胞内物質輸送機構の解析では、培養小腸上皮オルガノイドが例えば p-glycoprotein などの薬物トランスポータを体内と同様に発現し、基底側から管腔側への分子輸送機構を保持していることを明らかにした。オルガノイド内腔内容の採取とその網羅的な解析は継続研究課題として残った。

管腔組織形成における小腸と大腸上皮の部位特異性の研究では大きな成果が得られた。国際共

同研究により、胎生後期小腸上皮を培養し移植すると成体マウスの大腸に生着すること、しかもこのとき、生着後の移植片が一部大腸上皮形質を獲得することを見いだした。一方、興味深いことに、成体マウスの小腸に由来するオルガノイド細胞も大腸への異所移植が可能であること、そしてこの場合には移植小腸細胞が胎生期の小腸細胞とは異なる挙動を示した。すなわち大腸内に生着した成体小腸移植細胞は、構造、分化細胞種、および発現遺伝子プロファイルのいずれにおいても小腸形質を維持していた。このことから、小腸上皮が大腸上皮と異なる固有の形態・機能を示す機構が上皮内因性にプログラムされること、そしてこの機構は胎生後期以降のいずれかの時点で獲得される機構であることが示された。

【研究の意義・展望】

本研究では、適切な細胞配列と極性をもつ腸上皮組織構築機構を解析する基礎技術を提供するとともに、小腸・大腸上皮が部位特異性を獲得する機構の一旦を明らかにした。今後の展開により、腸上皮恒常性維持機構の解明のみならず、小腸や大腸上皮の個々の特性の理解に基づく腸上皮再生技術、組織エンジニアリングの基礎を提供できるものと考えられた。

【主な研究発表】

1. Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, *[Nakamura T](#). Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev.* 28(16): 1752-1757; 2014
2. Nozaki K, Mochizuki W, Matsumoto Y, Matsumoto T, Fukuda M, Mizutani T, Watanabe M, *[Nakamura T](#). Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *J Gastroenterol* 51(3): 206-213; 2016



研究課題名：de novo 管腔形成の制御機構

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112706

研究代表者名：松本邦弘(名古屋大学・大学院理学研究科・教授)

【研究の目的】

上皮管腔組織は、様々な形態の器官を構成している。これらの器官のほとんどは、上皮細胞の頂端面に囲まれた管腔を持ち、ここで内容物の分解など上皮管腔組織に特徴的な機能を果たしている。しかし、上皮細胞集団の中で、管腔がいつ、どこに形成されるのか、また、上皮細胞がどのように極性を獲得するのかなど、初期のステップについては不明な点が多い。我々は、ROCOファミリーキナーゼ LRRK1 が、イヌ腎臓尿細管上皮 (MDCK) 細胞の囊胞形成時、新たに形成される管腔 (de novo 管腔形成) に重要であることを見出した。また、昨年度までの研究から、LRRK1 は M 期中心体で活性化し、M 期紡錘体の配向を制御することで、細胞の分裂方向をコントロールしていることも明らかにしていた。そこで本研究では、LRRK1 の中心体における基質を同定し、LRRK1 による細胞分裂軸制御のメカニズムを明らかにする。また LRRK1 が、細胞の分裂方向を制御することで、新規管腔形成にどのように機能しているのかも併せて明らかにする。

【研究の成果】

LRRK1 の基質を同定するため、LRRK1 と相互作用する因子の探索を行った。その結果、中心体成熟に重要なタンパク質 CDK5RAP2 を同定した。CDK5RAP2 はショウジョウバエ Centrosomin のヒトホモログであり、種を越えて中心体成熟に機能していることが知られている。LRRK1 と CDK5RAP2 の結合部位を検討したところ、LRRK1 は CDK5RAP2 の CM1 モチーフと呼ばれる、種を越えて保存された領域で結合し、この領域をリン酸化していることを明らかにした。これまでの研究から、CDK5RAP2 は CM1 モチーフで γ -tubulin と結合し、微小管 nucleation に必須な複合体 γ TuRC (γ -tubulin ring complex) を活性化し、中心体からの微小管形成に重要な働きをしていることが報告されていた。

そこで我々は、LRRK1 が CDK5RAP2 をリン酸化することで、 γ TuRC の活性化に影響を与えていないか検討した。その結果、LRRK1 は CDK5RAP2 CM1 モチーフをリン酸化することで、CDK5RAP2 と γ -tubulin との結合を促進し、 γ TuRC からの微小管 nucleation を促進していることを明らかにした。また、LRRK1 をノックダウンした細胞では、中心体からのスピンドル微小管の形成は正常に起きるにもかかわらず、星状体微小管の形成が阻害されることから、LRRK1 による γ TuRC の活性化は星状体微小管の形成に重要なことが明らかとなった。星状体微小管は細胞膜と相互作用することで、紡錘体の配向を制御していることから、LRRK1 をノックダウンした細胞ではこの相互作用が消失することで、紡錘体の配向がランダムになっている可能性が考えられた。

【研究の意義・展望】

本研究から、LRRK1 が中心体構成因子 CDK5RAP2 をリン酸化することで、 γ TuRC の活性化及び中心体からの星状体微小管の形成に機能し、M 期紡錘体の配向を制御していることが明らかとなった。これらの成果は、新たな細胞分裂軸制御機構を明らかにするものであり意義深いと考えられる。

今後は、LRRK1 による紡錘体配向制御のメカニズムが、管腔形成にどのように機能しているのか、MDCK 細胞の3次元培養系やモデル動物を用いた解析から明らかにしていきたい。

【主な研究発表】

1. *Hanafusa H, Kedashiro S, Tezuka M, Funatsu M, Usami S, Toyoshima F, and *Matsumoto K. PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. *Nat. Cell Biol.* 17, 1024-1035, 2015



研究課題名：細胞外マトリックスの硬さによる上皮管腔組織形成の制御

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112707

研究代表者名：木岡 紀幸(京都大学・農学研究科・准教授)

【研究の目的】

上皮管腔組織形成および維持は、液性因子などの「化学的」な要因だけではなく、細胞外マトリックス(代表的なものにコラーゲンやヒアルロン酸がある)の硬さなどの「物理的」な要因によっても大きな影響を受けている。しかし、上皮管腔組織形成時に細胞外マトリックスの硬さを感知するセンサーについてはほとんどわかっていない。我々は細胞と細胞外マトリックスとの接着装置である接着斑に着目し、研究を行ってきた。これまでに接着斑タンパク質であるビンキュリンとピネキシンの相互作用が繊維芽細胞における細胞外マトリックスの硬さを感知するセンサーであることを明らかとしている。本研究では、細胞外マトリックスの硬さに応じて乳腺上皮細胞株が囊胞管腔を形成する実験系を構築し、それを利用してビンキュリンの役割を明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

乳腺上皮細胞の囊胞管腔形成における細胞外基質の硬さの役割とそれを感知する仕組みについて調べるために、まず乳腺上皮細胞株を濃度の異なるコラーゲンゲル(濃度が高くなるとゲルが硬くなる)内で培養し、コラーゲン濃度に応じて囊胞と管腔を形成する実験系を構築した。次に、線維芽細胞で細胞外マトリックスの硬さを感知するセンサーとして働くことがわかっているビンキュリンの発現を抑制した乳腺上皮細胞を作成した。これにはRNA干渉法の技術を利用した。さらにビンキュリンの発現抑制細胞にビンキュリンを再発現させた再発現細胞も構築した。このビンキュリン発現抑制細胞と再発現細胞を用いて細胞外マトリックスの硬さに応じた囊胞管腔形成を調べたところ、ビンキュリン発現抑制細胞では異常がみられ、ビンキュリン再発現細胞ではその異常が回復した。このことからビンキュリンは、上皮細胞の囊胞管腔形成においても細胞外マトリックスの硬さを感知するセンサーとして働いている可能性が示された。さらに乳腺上皮細胞、線維芽細胞、および間葉系幹細胞においてビンキ

ュリンの変異体や阻害剤の効果を調べ、これらの細胞において同じ仕組みでビンキュリンが細胞外マトリックスの硬さを感知するセンサーとして働いている可能性について検証した。その結果、いずれ細胞においてもアクトミオシン系の作用が重要であることを明らかにした。

【研究の意義・展望】

ビンキュリンが乳腺上皮細胞の囊胞管腔形成の過程においても硬さの感知にかかわる可能性が示された。今後ビンキュリンの様々な変異体などの解析をさらにすすめることで、細胞外マトリックスの硬さが囊胞管腔形成を調節する詳細なメカニズムを明らかにしていく必要がある。細胞外マトリックスの硬さは、乳がんの発症や悪性化に密接に関与していることから、本成果ががんの治療法の開発へとつながっていくことが期待される。

【主な研究発表】

1. Kuroda, M., Wada, H., Kimura, Y., Ueda, K., and *Kioka, N. Vinculin promotes nuclear localization of TAZ to inhibit stiffness-dependent differentiation into adipocytes. *J Cell Sci* 130, 989-1002, 2017
2. Omachi, T., Ichikawa, T., Kimura, Y., Ueda, K., and *Kioka, N. Vinculin association with actin cytoskeleton is necessary for stiffness-dependent regulation of vinculin behavior. *PLoS One* 12, e0175324, 2017
3. Nagasato, A. I., Yamashita, H., Matsuo, M., Ueda, K., and *Kioka, N. The distribution of vinculin to lipid rafts plays an important role in sensing stiffness of extracellular matrix. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017
4. Tomiyama, L., T. Sezaki, M. Matsuo, K. Ueda, *N. Kioka Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation. *Oncogene*, 34, 1141-1149, 2015.



研究課題名:革新的イメージングによる上皮細胞間コミュニケーションの異常における力の役割

研究期間:平成26年度~平成27年度

研究課題番号:26112702

研究代表者名:山城 佐和子(京都大学・生命科学研究所・助教)

【研究の目的】

上皮組織形成において、細胞集団は個々の細胞の発生する力により協調した形態形成を遂行する。細胞はどのように細胞内力を隣接する細胞や基質に伝達し、細胞-細胞間または細胞-基質間で力を調節し、協調した形態形成を遂行するのか? この問いを明らかにするため、本研究は、平成24~25年度の当該領域公募研究「上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明」(研究代表:山城 佐和子)で開発した、簡便で時空間分解能が大幅に向上した単分子スペckル法を駆使して、アクチン繊維流動力を中心として、細胞内力の作用する分子群を直接可視化し、力の動態、作用と調節機構を明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

本研究の主な研究成果は、以下の2点である。

(1) 細胞仮足で接着斑分子(ビンキュリン、タリン、インテグリン β 1)を一分子観察すると、アクチン繊維流動の作用を受け同一方向・速度で流動することから、流動力がリンカー分子を介してインテグリンに作用することを直接可視化により初めて見出した。さらにコラーゲン上培養系において、上皮細胞の細胞仮足周辺でコラーゲンが細胞仮足に向かってアクチン流動と同一方向に移動することを明らかにした。これらの結果から、アクチン繊維流動力は接着分子インテグリンを介して細胞外基質(ECM)に作用し、ECMを変形させ得ることを示した。

(2) アドヘレンスジャンクション裏打ちアクチンの単分子イメージング解析。自家蛍光の影響の少ない波長で観察可能な近赤外蛍光アクチンプローブ(CF680R 標識アクチン)を開発し、厚みのある上皮細胞内アクチン立体構造を対象とする単分子イメージングに初めて成功した。この結果、アドヘレンスジャンクション裏打ちアクチン繊維束を構成するアクチン繊維は、半減期約441秒の安定な構造であることを明らかにした。

【研究の意義・展望】

細胞仮足はこれまで、移動する細胞を進行方向

に伸展させる舵取り装置であると考えられている。本研究では、細胞仮足内のアクチン繊維流動がECMを変形させる新規の役割を持つ可能性を示した。細胞によるECMリモデリングは細胞移動と関連し、初期胚発生における細胞移動や、癌細胞の浸潤に先行して起こることが知られている。アクチン繊維流動はECMリモデリングに寄与する可能性があり、今後詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、細胞移動・ECMリモデリングを伴う様々な生体運動や病態生理の理解につながることを期待できる。

単分子スペckル顕微鏡法は、自家蛍光の影響の少ない細胞辺縁や細胞膜近傍が主な観察領域であるが、より立体的な細胞構造の中で分子イメージングを導入することが重要な課題であった。本研究では良好な特性を示す蛍光色素CF680Rで標識したアクチンを用い、アドヘレンスジャンクションでの単分子イメージングに成功した。この手法を応用し、上皮細胞アピカル領域や、3次元培養系で起こる細胞現象を分子レベルで捉えることが可能になりつつある。

【主な研究発表】

1. *[Yamashiro S](#), Watanabe N. An easy-to-use single-molecule speckles microscopy enabling nanometer-scale flow and wide-range lifetime measurement of cellular actin filaments. *Methods Cell Biol.* 125,43-59, 2015
2. Ono K, Obinata T, [Yamashiro S](#), Liu Z, *Ono S. UNC-87 isoforms, *C. elegans* calponin-related proteins, interact with both actin and myosin and regulate actomyosin contractility. *Mol. Biol. Cell* 26, 1687-1698, 2015
3. *[Yamashiro S](#), Watanabe N. A new link between the retrograde actin flow and focal adhesions. *J. Biochem.* 156, 239-248, 2014
4. [Yamashiro S](#), Gokhin DS, Sui Z, Bergeron SE, Rubenstein PA, *Fowler VM. Differential actin-regulatory activities of tropomodulin1 and tropomodulin3 with diverse tropomyosin and actin isoforms. *J. Biol. Chem.* 289, 11616-11629, 2014



研究課題名：上皮管腔組織が内包する細胞間相互作用を介したがん抑制システムの遺伝的基盤

研究期間：平成26年度～平成27年度（中途終了）

研究課題番号：26112708

研究代表者名：大澤 志津江(京都大学・生命科学研究科・准教授)

【研究の目的】

ヒトのがんのほとんどは上皮由来であり、上皮がんの発生・進展には上皮細胞の頂底極性（apico-basal 極性）の崩壊が深く関与している。一方、上皮管腔組織に極性が崩壊した細胞が生じると、正常な組織は極性崩壊細胞を積極的に組織から排除することでその恒常性を維持する可能性が近年示唆されている。我々のグループはこれまでに、嚢状の上皮管腔構造を示すショウジョウバエ成虫原基をモデル系として用い、このような細胞排除システムが実際に上皮管腔組織に存在することを明らかにしてきた。しかしながら、その分子基盤についてはいまだ不明な点が多い。本研究では、正常な上皮細胞が極性崩壊細胞を認識・排除する分子基盤を明らかにし、上皮管腔組織が内包するがん抑制システムの分子基盤を生体レベルで理解することを目指した。

【研究の成果】

上皮管腔構造を示すショウジョウバエ成虫原基において、apico-basal 極性が崩壊したがん原性の細胞（極性崩壊細胞）がその周囲を正常な上皮細胞に取り囲まれると、細胞死を起こして組織から排除される。しかしながらこれまで、正常細胞がいかにして極性崩壊細胞を「認識」するのか、細胞排除を実行するその上流メカニズムは全く分かっていなかった。そこで本研究では、正常細胞が極性崩壊細胞を認識するメカニズムを明らかにするため、極性崩壊細胞を取り巻く正常細胞側に突然変異を導入し、これにより細胞排除システムに異常をきたす変異体を網羅的に単離・同定する大規模な遺伝学的スクリーニングを実施した。その結果、正常細胞側で機能する細胞膜上のリガンド様タンパク質 Sas（Stranded at Second）を同定することに成功した。さらに我々は RNAi スクリーニングを行い、この正常細胞側の Sas と結合する、極性崩壊細胞上の受容体型チロシンホスファターゼ PTP10D（哺乳類 PTPRJ）を同定した。興味深いことに、Sas と PTP10D は、通常

は上皮細胞の頂端膜に局在するのに対し、正常細胞と極性崩壊細胞との境界面においては、正常細胞側の Sas、極性崩壊細胞側の PTP10D がともに側面膜へとその局在することが分かった。この Sas-PTP10D はショウジョウバエの神経系の発生過程において、神経細胞の軸索誘導を制御することが報告されていた。本研究により、神経系においてリガンド受容体として機能する Sas-PTP10D が、上皮組織において自己（正常な上皮細胞）—非自己（極性崩壊細胞）を認識するシステムとして機能する可能性が示唆された。

【研究の意義・展望】

今後は、本研究により同定されたリガンド受容体システム Sas-PTP10D が細胞排除を実行する分子機構を、ショウジョウバエ遺伝学的解析により明らかにする。本研究の遂行により、「リガンド受容体システムを介した上皮管腔組織における内在性がん抑制」という新たな概念を提起し得ると考えられる。

【主な研究発表】

1. Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, and *Igaki T. JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity. *Dev Biol.* 403, 162-171, 2015
2. Nakamura M#, Ohsawa S# (# equal contribution), and *Igaki T. Mitochondrial defects trigger proliferation of neighboring cells via senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nat Commun.* 5, 5264, 2014
3. Takino K#, Ohsawa S# (# equal contribution), and *Igaki T. Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*. *Dev Biol.* 395, 19-28, 2014
4. Ohsawa S, Takemoto D, and *Igaki T. Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic cooperation. *J Biochem.* 156, 129-136, 2014



研究課題名：細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112713

研究代表者名：池ノ内 順一（九州大学・理学研究院・教授）

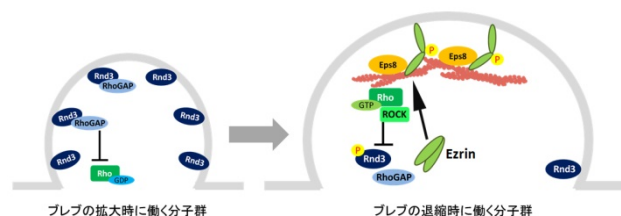
【研究の目的】

私たち多細胞生物のからだは、上皮細胞と間葉細胞から構成されている。上皮細胞は、お互いに接着することにより上皮細胞シートを形成し、管腔構造を構成する。一方、上皮細胞は、浸潤癌になる過程で、細胞接着が消失することが知られているが、どのような分子メカニズムによって接着や管腔構造の破綻が起こるかについて、詳細な機構は明らかになっていない。これまで、研究代表者は、上皮細胞が間葉細胞に転換する現象（上皮間葉転換）に着目し浸潤癌の形成に関わる分子機構の研究を進めてきた。その結果、上皮間葉転換のマスター転写因子 **Snail** が細胞接着分子群の転写を抑制することによって、上皮細胞の細胞接着構造を破綻させることを明らかにした。一方で、近年、**Snail** 非依存的に上皮細胞が遊走性を獲得する例も報告されている。そこで、本研究提案では、上皮細胞が浸潤性を獲得するメカニズムの解明および浸潤性獲得における細胞膜脂質の寄与について解明することを目的として研究を行った。

【研究の成果】

私は2014年に大腸がん由来の上皮細胞 **DLD1** 細胞を用いて実験していたときに、**DLD1** 細胞をプラスチックシャーレに播種した時は安定的な細胞接着を形成するのに対して、**Type I** コラーゲンのゲル中に播種した場合、細胞間接着が崩壊しブレブと呼ばれる特徴的な細胞の形態を示すことに気付いた。さらにブレブを起こした細胞は、細胞外マトリックス内を自由に遊走する能力を示すことを見出した。上述の上皮間葉転換の場合と異なり、**DLD1** 細胞がブレブを形成して遊走性を獲得する際には、細胞接着分子の遺伝子発現は低下しておらず、またブレブを形成した **DLD1** 細胞を再びプラスチックシャーレに播種すると元の接着を有する上皮細胞の形態に戻る。このことから、上皮間葉転換とは異なる機序で、癌細胞が細胞接着を喪失し、遊走性を獲得するメカニズムとして、ブレブによる細胞運動が重要でないか、と考え、ブレブの形成に関わる分子機構の解明を行った。具体的には、ブレブを起こしている

DLD1 細胞に **GFP** タグのついた遺伝子ライブラリーを導入して、ブレブの形成・退縮過程における **GFP** タンパク質の局在を観察し、興味深い挙動を示す分子群の探索を行った。その結果、2つの低分子量 **G** タンパク質 **Rnd3** と **RhoA** の相互拮抗作用が、ブレブの形成・退縮の中心的なメカニズムであることを明らかにした（下図：Aoki et al. PNAS 2016）。



【研究の意義・展望】

近年、マウスの体内に人為的に誘導した膵臓がんにおいて、上皮間葉転換のマスター転写因子 **Snail** の発現を消失させた場合においても、癌の浸潤や転移能が損なわれないという報告がなされた（Zheng et al. Nature 2015）。このことは癌の転移や浸潤に上皮間葉転換が必ずしも必要でない場合が存在することを意味している。私たちは、そのような上皮間葉転換非依存的な細胞接着の破綻・細胞運動能の獲得機構として、ブレブを介した細胞運動が本体ではないかと考えている。今後は、癌細胞がブレブを形成して移動する際にトリガーとなるシグナルやブレブの形成退縮を制御するメカニズムを解明することによって、癌細胞の浸潤・転移を抑制する方法論の開発に繋げたい。

【主な研究発表】

1. Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, and *Ikenouchi J. RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113, E1863-E1871, 2016
2. Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M and *Ikenouchi J. CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci Rep.* 5, 13262, 2015



研究課題名:分岐形成を生み出す細胞動態を実験—理論相互運動によって解明する

研究期間:平成26年度~平成27年度

研究課題番号:26112714

研究代表者名:今村 寿子(九州大学・医学研究院・助教)

【研究の目的】

形態形成機構はシグナル因子の濃度分布に応じた組織成長を前提として理解されています。これまで様々な数理モデル研究により、肺の分岐形成が説明されてきましたが、実際に肺上皮がシグナル因子に高感度に反応しているのか確認されていません。そこで本研究では、肺上皮組織のFGF10 応答性を定量的に調べて既存の仮説を検証したうえで、その実験結果を取り入れた数理モデルを改めて構築することにより、肺の分岐形成機構の大局的な理解を得ることを目指しました。特に肺の構造は、近位が太く長い枝で構成され、遠位が細く短い枝で構成されているという特徴があります。複雑な制御機構があると推測されますが、ここでは上皮組織の応答性に絞って、それがどのように肺全体のデザインを制御するか探りました。

また領域内の共同研究として、細胞変形による肺分岐形成のモデル化や、組織内細胞移動による組織運動のモデル化に取り組みました。

【研究の成果】

マウス胎仔由来の腺様期の肺上皮組織片をFGF10 添加マトリゲル中で培養し、どのようにFGF10 に応答しているか調べました。その結果、肺上皮のFGF10 取り込み量は広範囲のFGF10 濃度に対して高感度に変化することを確認しました。またFGF10 下流のMAPキナーゼであるERKの活性は、FGF10 濃度のみならず上皮組織の形状(厚みおよび曲率)によっても変化していました。このようなERK 活性亢進の感受性は、胎生13.5日肺では顕著で、胎生14.5日に減弱することが分かりました。

以上の実験結果から2つの数理モデルを構築しました。まず、組織の曲率に依存して細胞増殖と走化性が変化すると仮定したモデルを構築し、感受性に応じて分岐頻度が変わることを見出しました。このことから、発生過程でFGF 感受性が変化することにより、先端ほど細かい分岐構造が生み出されるという理論的予測を得ました。

次に、組織の厚みについては、大阪大学麓勝己助教との共同研究として、同氏が見出したWnt

依存的頂端収縮による分岐調節メカニズムを説明するべく、細胞間の力学的相互作用を表現する数理モデルを構築しました(主な研究発表の1.)。このモデルから、細胞形状を変化させる力が組織の分岐形成を引き起こすことを説明できました。さらに管状期から嚢状期にかけての細胞と組織形状の変化についても実験的に示唆された細胞内骨格制御の重要性を支持する理論的予測を得ました。

【研究の意義・展望】

細胞の増殖、変形、運動がどのように組織の形態と運動につながるのか、実験観察から得られる推論は、数理モデルを用いることでより多面的に検討できることが示せました。継続して肺の樹状構造や上皮シストの運動に取り組んでおり、実験と協同することで、実験技術の発展を促進するような新しい見地の仮説を提案していきたいと考えています。

【主な研究発表】

1. Fumoto K, [Takigawa-Imamura H](#), Sumiyama K, Kaneiwa T, *Kikuchi A. Modulation of apical constriction by Wnt signal is required for the lung epithelial shape transition. *Development*. 144, 151-162, 2017
2. *Takumi H, [Takigawa-Imamura H](#), Akita K, Kutsuna N, Kobayashi R, Hasezawa S, Miura T. Exogenous cellulase switches cell interdigitation to cell elongation in a RIC1-dependent manner in Arabidopsis thaliana cotyledon pavement cells. *Plant Cell Physiol*. E-00504, 2016
3. [Takigawa-Imamura H](#), Morita R, Iwaki T, Tsuji T, *Yoshikawa K. Tooth germ invagination from cell-cell interaction: Working hypothesis on mechanical instability. *J. Theor. Biol.* 382, 284-291, 2015
4. Hayashi T, [Takigawa-Imamura H](#), Nishiyama K, Shintaku H, Kotera H, Miura T, *[Yokokawa R](#). Vascular network formation for a long-term spheroid culture by co-culturing endothelial cells and fibroblasts. *MEMS* 2015. 476-479, 2015



研究課題名：上皮組織の細胞動態制御機構の解析

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112715

研究代表者名：佐々木 洋(大阪大学・生命機能研究科・教授)

【研究の目的】

上皮管腔組織をはじめ、我々の体は全て細胞の集団として成り立っており、隣接する細胞同士が細胞間接着によるコミュニケーションによりその挙動を調節することで、恒常性を保っていると考えられる。本研究では、細胞間の接着等の情報によって活性化される Hippo シグナルに注目し、細胞集団における細胞動態制御機構を明らかにすることで、本領域の推進に貢献することを目的とした。具体的には、培養細胞およびマウス初期胚を用いて、Hippo シグナルによる細胞集団における細胞動態の制御の機構の解明と細胞間コミュニケーションの一つである細胞競合機構の解明を行い、さらにそのマウス初期胚における役割を明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

我々は細胞間コミュニケーションの仕組みを明らかにするために、マウス胚由来線維芽細胞 NIH3T3 を用いて細胞競合の簡便なモデル系を樹立した。この系では、Hippo シグナル経路の転写因子 Tead の活性が異なる細胞を共培養すると細胞競合が起こり、その機構として Myc が Tead 活性と協調的に作用することを明らかにした (Mamada, Sato et al J Cell Sci 2015)。

さらに、マウス上皮細胞株 MTD-1A においても、同様の Tead 活性の違いによる細胞競合が見られることを見出し、Tead 活性の異なる細胞間での細胞競合は線維芽細胞に特異的なものではなく、上皮細胞にも共通した普遍的なものであることが示唆された。

一方、GFP と Yap の融合タンパク質を発現する MTD-1A 細胞を樹立し、Yap の核移行の変動をライブイメージングで観察したところ、Yap の細胞内局在はダイナミックに変動しているが、時間の経過と共に隣接細胞間では変動の様子がそろってゆく傾向があることが分った。すなわち、隣接した細胞間では Tead 活性を認識比較するしくみがあり、正常な細胞間では、Tead 活性が協調するのに対し、Tead 活性を大きく操作した細胞

間では細胞競合が起こることが分った。

さらに Tead 活性の違いによる細胞競合の in vivo での役割を明らかにするため、Tead 活性が低下する Tead1 遺伝子を欠損した胚性幹細胞を作成し、8細胞期胚に注入しキメラ胚を作成した。その結果、Tead1 欠損細胞単独でキメラ胚を作製すると胚体部分の全てが Tead1 欠損細胞よりなる 7.5 日胚を得ることができたが、Tead1 欠損細胞と正常細胞とを混ぜてキメラ胚を作製すると、7.5 日胚には Tead1 欠損細胞がほとんど含まれていなかった。これは、Tead1 欠損細胞自体は胚を作る能力を持っているが、正常細胞の存在下では、正常細胞に対して細胞競合の敗者となり排除されることを示している。本研究により、着床後マウス胚においても Tead 活性の違いによる細胞競合機構が働いていることが明らかになり、このようなしくみにより、適応度の高い細胞の選別することが、正確な胚発生を支えていると考えられた。

【研究の意義・展望】

本研究は、上皮シート等の細胞集団における隣接細胞間のコミュニケーションには Hippo シグナルが重要な働きをしており、個々の細胞の動態の制御(調和と競合)をしていることを明らかにしたものである。さらに、そのコミュニケーションの一つである細胞競合がマウス初期胚発生に果たす役割の一端も明らかにすることができた。今後は、胚内での Hippo シグナルの制御機構に注目することで、細胞間コミュニケーションの仕組みを明らかにできることが期待される。

【主な研究発表】

1. Mamada H, Sato T, Ota M, and *[Sasaki H](#). Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc. *J. Cell Sci.* 128, 790-803, 2015



研究課題名：気管管腔形成メカニズムの解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112721

研究代表者名：森本 充(国立研究開発法人理化学研究所・チームリーダー)

【研究の目的】

人を含む動物界の生き物は体内に内腔を持っている。内腔を持つことで、エネルギーの獲得、体液の循環、老廃物の排泄が可能になる。これまでの発生生物学研究では血管などの微細な管腔形態の形成機構はよく研究されてきたが、呼吸器、消化器、泌尿器等の比較的位大きな径を持つ管腔組織の研究は進んでこなかった。

本研究ではマウスの気管形成における上皮細胞の増殖と3次元構造変化の定量解析を軸にして、内臓の大型管腔形態が形成される過程を、上皮と間充織の貢献を分けてそれぞれ理解することを目的とする。間充織由来の気管軟骨形成を阻害し、気管上皮の形態形成に与える影響を3次元かつ定量的に評価する。そして気管の上皮形態異常と気管の短縮を示す変異マウスを通して気管形成のメカニズムを理解し、健全な呼吸機能が構造的にどのように維持されているのか解明する。

【研究の成果】

気管の成長は初期に起こる前後軸方向に沿った異方性の成長と、その後続く軟骨に誘導される等方性の成長の2段階で起こることが明らかになった。軟骨無形成の変異マウスの解析により、後期の等方性拡大の動力は軟骨の発生、成熟であった。さらに、同変異マウスは上皮の偽重層上皮構造形成に失敗し、重層様構造を示していたことから、間充織と上皮の成熟化には相関性があることが示唆された。特に、軟骨が円周方向への拡大がE14.5からE18.5にかけて起こる上皮細胞の1)円柱形態への変化、2)新たな頂表面をもつ細胞の出現が寄与し、その結果として気管内腔を拡大させている可能性が考えられた。さらに、気管が短くなるWntシグナル変異マウスを用いた解析から、初期の気管の異方性成長には間充織細胞の配向性が重要であることが明らかになった。現在我々は、間充織細胞の配向性、形態変化を制御するWntシグナルのメカニズムの解明を進めている。

【研究の意義・展望】

気管狭窄症に代表されるような先天的な気管形成異常は気管軟骨の形成不全と関わりが深いことが指摘されてきた。一方でこれまでの発生学研究の知見は管腔の形成維持は上皮が主導する事を示唆してきた。本研究が実行されれば、気管形成を経時的、3次元、定量的に評価することで、従来よりも正確で高い解像度の解析を可能にする。さらに上皮の再編成を制御する分子メカニズムも解明する。気管形成機構の理解は呼吸器全般の形成機構や呼吸器疾患の病態の理解。さらには他の大型管腔を含む腸管や子宮など形成機構の理解にも貢献する。

【主な研究発表】

1. Noguchi, M., Sumiyama, K., Morimoto M*: Directed migration of pulmonary neuroendocrine cells toward airway branches organizes the stereotypic location of neuroepithelial bodies. *Cell Rep.* 13, 2679-86, 2015
2. Liu Z, Brunskill E, Varnum-Finney B, Zhang C, Zhang A, Jay PY, Bernstein I, Morimoto M, Kopan R*: The intracellular domains of Notch1 and Notch2 are functionally equivalent during development and carcinogenesis. *Development* 142, 2451-63, 2015
3. Tsao P*, Matsuoka C, Wei SC, Sato A, Sato S, Chena HK, Ling TY, Mori M, Cardoso WV, Morimoto M*. Epithelial Notch signaling regulates lung alveolar morphogenesis and airway epithelial integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 8242-7 (2016)



研究課題名：上皮組織の分化パターンと形態形成をつなぐ力学制御メカニズムの解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112723

研究代表者名：永樂 元次（京都大学・ウイルス再生医科学研究所・教授）

【研究の目的】

上皮組織の形態形成を理解するためには、細胞の分化や増殖などを制御する **化学的特性** と組織の物性や内部応力などの **力学的特性** の二つの側面を明らかにする必要がある。しかしながらこういった化学的シグナルがどのようにして組織の形態変化を実現する力学的シグナルへと変換されるのかという分子レベルのメカニズムについては、他の多くの上皮形態形成過程と同様にほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、ES細胞からの眼杯形成系を用いて、上皮組織において化学的シグナルが力学的シグナルに変換されるための分子機構を明らかにし、*in vitro* で上皮組織の変形をコントロールする技術の確立を目指す。

【研究の成果】

本研究では研究代表者らがこれまでに確立した *in vitro* での眼杯形成をモデルとして形態形成過程における、**化学的特性** と組織の物性や内部応力などの **力学的特性** をつなぐメカニズムの解明を行った。これまでに明らかになっているカルシウムを介した局所の上皮形態を制御するフィードバック機構についてさらに詳細に解析した。具体的には力学刺激の強度および時間依存的に上皮組織が弾性変形的および塑性変形的な2つのモードによりその形状を制御されていることを明らかにした。また、これまでに構築してきた眼杯形成の力学数値シミュレーションを可能にするフレームワークの改良を行い、細胞死の形態変化への影響を検討できるようになった (*Biomech Model Mechanobiol*, 2015)。このフレームワークを用いて、眼杯の三次元的な形態変化における局所の力学的なパラメータの寄与を検討し、背腹軸の極性を生む新たな眼杯形成モデルを確立した (論文作成中)。

【研究の意義・展望】

本研究により、網膜と網膜色素上皮の分化パターンの獲得後、領域特異的な力学特性を獲得することが眼杯形成において重要である事が明らかになった。また、2つの領域の境界においてカルシウムを介した力学/化学シグナルのフィードバック機構が存在する事が明らかになった。これらの上皮組織の力学特性の発見は、任意の形状を持った組織を iPS 細胞等から誘導できる技術開発につながる事が期待される。

【主な研究発表】

1. Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M, Takahashi J, *Eiraku M, Sasai Y: Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat. Commun.*, 6: 8896, 2015
2. *Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Adachi T, Sasai Y: Modeling cell apoptosis for simulating three-dimensional multicellular morphogenesis based on a reversible network reconnection framework. *Biomech Model Mechanobiol.*, Sep 11, 2015 (on line)
3. Kuwahara A, Ozone C, Nakano T, Saito K, *Eiraku M, Sasai Y: Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. *Nat. Commun.*, 6: 6286, 2015
4. Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Adachi T, Sasai Y: Vertex dynamics simulations of viscosity-dependent deformation during tissue morphogenesis. *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 14: 413-425, 2014
Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance. *J Biomech*, 46:1705-13, 2013



研究課題名：多段階発がん過程における細胞競合の関与

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112701

研究代表者名：昆 俊亮(北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教)

【研究の目的】

最近の研究により、正常細胞層にがん変異を有した細胞が少数発生したとき、正常上皮細胞とがん変異細胞との細胞競合の結果、変異細胞が上皮層より排除されることが明らかとなってきている。このような上皮管腔組織の恒常性維持を支える細胞競合現象が、哺乳動物生体内で実際に起きているかは不明であった。そこで本研究課題では、世界初の細胞競合マウスモデルを開発し、細胞競合による抗腫瘍機能が哺乳動物成体に備わっていることを検討する。さらに、このマウスモデルを用いて、上皮管腔組織の破綻および発がんにおける細胞競合の役割を明らかにすることへと展開する。がんの進展は、特定の遺伝子に変異が生じ、さらには規則性をもって多段階的に変異が蓄積していく。そこで、APC→Rasの順序で変異が生じることが知られている家族性大腸がんをモデルとして、これらの遺伝子変異の積み重ねにより、上皮層での正常上皮細胞とがん変異細胞との生存競争のバランスがどのように変化するかを評価することを目的とした。

【研究の成果】

マウス腸間上皮細胞にタモキシフェン依存的に恒常活性化型 Ras 変異を導入できる Villin-CreERT2/LoxP-stop-LoxP(LSL)-RasV12-eGFP マウスを用い、タモキシフェンの投与量を調節することによって、モザイク状に Ras 変異を誘導できる細胞競合マウスモデルを開発した。このマウスの解析の結果、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞が管腔側へ排除される様子を観察した。このことから、哺乳動物生体内においても、がん変異細胞が細胞競合により排除されていることを世界で初めて観察できた。続いて、APC 遺伝子に変異を有する APCmin マウスを上記の細胞競合モデルマウスと交配し、多段階の変異蓄積 (APC→Ras) による Ras 変異細胞の排除効率に与える影響を検討した。その結果、APC 変異上皮細胞層に出現した Ras 変異細胞の一部は基底膜を抜け、絨毛間質内へと進行・浸潤することを見出し

た。さらには、間質内で増殖した APC/Ras 二重変異細胞は、粘膜下層ならびに筋層深部まで浸潤し、組織内乳糜管への選択的な侵襲も認められた。また、この腫瘍発生領域の周辺には、腺腫様の異型腺管構造は認められなかったことから、*de novo* がんを発症すると結論づけた。

【研究の意義・展望】

本研究成果より、APC 変異により細胞競合のバランスが脱制御され、Ras 変異細胞の一部が間質へと浸潤し、発がんすることが示された。今後は、基底膜側へと浸潤する分子機構を解明することにより、細胞競合とがん細胞の浸潤機構との関連をより詳細に検証する。さらには、p53 変異細胞と正常細胞との細胞競合を評価できるマウスモデルの開発にも着手する。このマウスモデルを用いて、正常上皮細胞に囲まれた p53 単独変異細胞の挙動を観察することに加え、APC→Ras→p53 の多段階変異を再現できるマウスを用いて、多段階発がんにおける細胞競合の役割についてより詳細に究明していく。

【主な研究発表】

1. Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y, Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki J, Duchon MR, Nam JM, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, and * Fujita Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol. In press*, 2017
2. Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J, Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa S, and * Fujita Y. EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells. *J. Cell Sci.* 128, 781-789, 2015



研究課題名：妊娠における子宮内膜上皮形成の分子機構とその破綻

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112703

研究代表者名：廣田 泰(東京大学・医学部附属病院・講師)

【研究の目的】

卵子は卵管内で精子と受精した後、着床前期胚として卵管内で発育し、胚盤胞となり着床直前に子宮内に移入する。着床の場である子宮内膜は卵巣からのステロイドホルモンの影響で着床可能な組織変化をきたす。子宮内膜管腔の形態は、排卵直後には卵巣からの卵胞ホルモン(エストロゲン)の作用によって鋸歯状であるが、その後黄体化卵巣から分泌される黄体ホルモン(プロゲステロン、P4)によりスリット状になる。このような着床に際して起こる子宮内膜上皮管腔形成の分子機構や着床における意義はこれまで不明であったため、本研究ではマウスモデルおよびヒト臨床検体を用いて検討した。

【研究の成果】

(1) 着床直前の子宮内膜では、管腔上皮の細胞増殖が止まって細胞分化が開始し、間質の細胞増殖が開始すること(子宮内膜の分化増殖スイッチング、PDS)、このPDSが子宮の着床能の指標になることを、マウスおよびヒトの免疫組織学的検討から見出した。PDSがP4依存的な変化であることを、子宮におけるP4機能の低下したP4受容体(PR)コシヤペロンFKBP52の遺伝子欠損マウスを用いた検討で見出した。着床が元来起こらない子宮頸部上皮では着床の場である子宮内膜管腔上皮に比較してmicroRNA-200aが増加していること、microRNA-200aによってPR発現低下と局所でのP4分解が起こって子宮頸部上皮でのP4作用が低下していること、子宮内膜管腔上皮では着床期にmicroRNA-200aが低下することを、マウスを用いた解析から見出した。着床におけるmicroRNAのP4作用調節機構の存在が明らかとなった。

(2) P4によって着床期子宮での発現が誘導維持されるホメオボックス遺伝子MSX1の遺伝子欠損マウス子宮では子宮内膜管腔上皮の細胞極性低下しPDSとスリット状の形態変化が起こらず着床障害をきたすこと、子宮内膜が着床能を獲得する以前から炎症を調節する転写因子であるNF-κBの活性化が誘導され、非特異的に子宮内膜管腔上皮直下に炎症応答が起こることにより着床が成立していないのに着床様の変化が子宮に起こってしまうこと、が明らかになった。ヒト子宮内膜において、MSX1が着床期に増加すること、ヒト不妊女性の着床期子宮内膜では妊孕能のある女性の子宮内膜と比較しMSX1が低下すること、を見出した。

(3) 脱細胞化担体の移植法を用いた子宮内膜上

皮管腔の部分的な再生技術を、マウスモデルを用いた研究により確立した。

【研究の意義・展望】

本研究により、着床直前の子宮内膜の上皮管腔形成、特にPDSやスリット状の形態変化が、着床の開始に必須の変化であることが示された。この変化を誘導する分子機構として、P4-PR-MSX1という作用軸を見出した。これまでブラックボックスであった着床の分子メカニズムの一端が解明され、PDS・MSX1、脱細胞化担体移植を用いたヒト不妊症や着床障害の診断・治療への臨床応用の可能性を見出せたことは意義深い。

今後の研究により、着床直前の子宮内膜上皮管腔形成が、その後の胚と子宮内膜上皮の接着や浸潤という着床のステップへどのように影響するのかを解明するとともに、ヒト着床能のバイオマーカーとしての子宮内膜のPDSやMSX1の有用性の検討を行いたいと考えている。

【主な研究発表】

1. Haraguchi H, Saito-Fujita T, *Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, Bartos A, Cha J, Dey SK, Fujii T, Osuga Y. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Mol Endocrinol.* 28, 1108-17, 2014
2. Cha J, Burnum-Johnson KE, Bartos A, Li Y, Baker ES, Tilton SC, Webb-Robertson BJ, Piehowski PD, Monroe ME, Jegga AG, Murata S, Hirota Y, *Dey SK. Muscle Segment Homeobox Genes Direct Embryonic Diapause by Limiting Inflammation in the Uterus. *J Biol Chem.* 290, 15337-49, 2015.
3. Bolnick AD, Bolnick JM, Kilburn BA, Stewart T, Oakes J, Rodriguez-Kovacs J, Kohan-Ghadr HR, Dai J, Diamond MP, Hirota Y, Drewlo S, Dey SK, *Armant DR; NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network. Reduced homeobox protein MSX1 in human endometrial tissue is linked to infertility. *Hum Reprod.* 31, 2042-50, 2016.
4. Hiraoka T, *Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey SK, Furukawa KS, Fujii T, Osuga Y. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight.* 1, e87591, 2016.



研究課題名：肝臓上皮組織の再生・維持機構の生体内多次元イメージング解析

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112704

研究代表者名：伊藤 暢（東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授）

【研究の目的】

肝臓の実質細胞である上皮系の肝細胞は、きわめて高い再生能力を有することで知られています。一方、肝細胞が分泌する胆汁の流路である胆管は典型的な『上皮管腔組織』ですが、重篤な障害時に肝細胞を新たに産生・供給するための肝前駆細胞を保持する「幹細胞プール」という役割も担っています。我々はこれまでに、マウス肝臓内の胆管樹状構造を3次元レベルで高精細に観察するための新規手法を開発し、従来の組織切片による2次元解析では捉えられなかった、全く新しい肝前駆細胞／胆管系の動態を明らかにしてきました。本研究課題では、そうした3次元組織構造解析に、さらに時間軸に沿っての観察や、細胞増殖・分化・細胞死などの細胞機能動態の評価系を組み合わせた「多次元イメージング解析」の手法を構築した上で、

- (1) 組織恒常性維持に関わる肝細胞の挙動
- (2) 前駆細胞依存性再生過程における肝前駆細胞／胆管系の挙動と機能

をそれぞれ精密に追跡・解析し、その背景にある分子メカニズムの一端を解明することを目的としました。

【研究の成果】

(1) 生体マウス肝臓でのイメージング系の確立と肝細胞の挙動のイメージング解析

多光子励起レーザー走査型顕微鏡での観察を安定に長期間行うために、臓器保持用の固定具を独自に開発しました。これに、マウス肝臓の組織・細胞で各種の蛍光タンパク質レポーター／プローブを発現させる系を組み合わせることで、生体マウス肝臓での多次元イメージング解析系の構築に成功しました。

多次元イメージング解析系を用いた観察の結果、種々の肝障害に伴い、肝細胞の間に形成されている毛細胆管構造の崩壊と胆汁の流れの混乱が引き起こされることを新たに見出しました。さらに、そうした変化が要因となって、胆管系の構造変化が誘導されることも示しました[次項 (2) とも関連]。こうした知見に基づき、障害時に誘

導される胆管系の増生には「崩壊した毛細胆管網を補完することで、胆汁の流路を再構築する」という新たな生理的意義があることを明らかにしました（論文投稿準備中）。

(2) 前駆細胞依存性再生過程における肝前駆細胞／胆管系の挙動と機能のイメージング解析

胆管系を構成する個々の細胞の分裂回数を計測するイメージング系を構築し、観察を行いました。その結果、胆管系が増生する際、これを構成する細胞の増殖は一律に起こるわけではなく、集団の一部に生体内において高い増殖能（クローン増殖性）を示す特殊な前駆細胞が出現することを見出しました。数理モデル等を用いた詳細な解析により、このような前駆細胞は元から運命付けられて存在するのではなく、集団の中から確率的（stochastic）に生じてくること、それらが組織の増生・形態変化の主要な要因となることを明らかにしました。

【研究の意義・展望】

多次元イメージング解析系を用いた、これまでとは全く異なる視点からの解析により、肝障害・再生過程における胆管系の組織構造変化のメカニズムと新たな生理的意義を明らかにすることができました。今後は、胆管系の「幹細胞プール」としての機能についても詳細なイメージング解析を進めていくことで、肝臓が再生する仕組みの全容の解明に取り組んでいきます。

【主な研究発表】

1. Kamimoto K, Kaneko K, Kok CY, Okada H, Miyajima A, and *Itoh T. Heterogeneity and stochastic growth regulation of biliary epithelial cells dictate dynamic epithelial tissue remodeling. *eLife* 5, e15034, 2016
2. *Tanimizu N, Kaneko K, Itoh T, Ichinohe N, Ishii M, Mizuguchi T, Hirata K, Miyajima A, and Mitaka T. Intrahepatic bile ducts are developed through formation of homogeneous continuous luminal network and its dynamic rearrangement. *Hepatology* 64, 175-188, 2016



研究課題名：膵管癌細胞における一次繊毛消失機構の解明と癌治療への応用

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112712

研究代表者名：小林 哲夫(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教)

連携研究者名：伊東 広(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授)

【研究の目的】

殆ど全ての脊椎動物細胞に存在する一次繊毛は、細胞表面から外側に向けて突出している一本の不動性の構造体であり、細胞外の様々なシグナル分子を受容し細胞内へ伝達するセンサーとして機能する。細胞が細胞周期を脱して静止期に入ると、分裂期の紡錘体形成を担う中心小体が細胞膜近傍へ移動し、そこから細胞膜外側へ微小管が伸展し一次繊毛が形成される。

一次繊毛の構造・機能異常は、繊毛性疾患と総称される多くの疾患を惹起するが、様々な癌細胞においても一次繊毛が消失することが知られている。上述したように、一次繊毛は細胞分裂に重要な役割を果たす中心小体依存的に形成され、シグナル伝達の間としても機能することから、癌細胞における一次繊毛の消失が、細胞分裂・増殖の異常やシグナル伝達の乱れを引き起こし、ひいては癌の発生・進行を促進することが想定される。本研究では、一次繊毛の消失が報告されている膵管癌に着目し、膵管癌細胞における一次繊毛消失に介在する分子基盤を明らかにすること、さらに、得られた知見を元に形成誘導した一次繊毛が膵管癌細胞に及ぼす影響を検討することを目的とする。

【研究の成果】

我々は、膵管癌細胞の一次繊毛形成に介在するタンパク質を探索した結果、転写調節因子として働くヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 の機能阻害、及び発現抑制が一次繊毛形成を誘導することを見出した。また、HDAC2 の一次繊毛形成抑制効果にはその脱アセチル化酵素活性が必要であることが分かった。これらの結果から、HDAC2 は膵管癌細胞の一次繊毛抑制に寄与することが示唆された。

HDAC2 は核内に局在し一次繊毛に直接作用することが出来ないことから、HDAC2 の下流で一次繊毛抑制に働く分子として、一次繊毛分解を促

進するキナーゼである Aurora A kinase (AURKA) に着目した。HDAC2 を発現抑制した膵管癌細胞においては、AURKA のタンパク質、及び mRNA 発現量、中心小体局在量、キナーゼ活性の低下が観察された。また、HDAC2 の発現抑制により引き起こされる一次繊毛誘導は、AURKA の異所性発現により抑制された。これらの結果は、膵管癌細胞において HDAC2 の下流で AURKA が一次繊毛消失に働くことを示唆している。

膵管癌細胞においては、高頻度でがん原遺伝子 Kras に恒常的活性化型変異が存在し、Kras シグナルが一次繊毛形成を抑制することが知られている。そこで、Kras の下流に AURKA が存在するかを調べたところ、HDAC2 と同様に Kras が AURKA の発現量を正に制御することがわかった。一方で、HDAC2 と Kras はそれぞれ独立した経路で一次繊毛消失に寄与することが分かった。

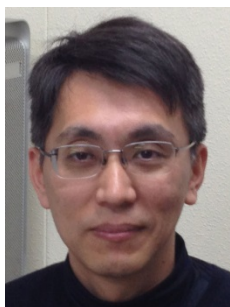
以上の研究から、膵管癌細胞において HDAC2 と Kras がそれぞれ別経路で AURKA の発現量を正に制御することにより一次繊毛形成を抑制しているというモデルが提示された。

【研究の意義・展望】

本研究により、膵管癌細胞における一次繊毛消失機構の一端が解明された。今後、この知見を活かして発現誘導した一次繊毛が膵管癌に対して抑制的に働くかを検証していく予定である。

【主な研究発表】

1. *[Kobayashi T](#), Nakazono K, Tokuda M, Mashima Y, Dynlacht BD, [Itoh H](#). HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma. *EMBO Rep.* 18, 334-343, 2017
2. *[Kobayashi T](#), Kim S, Lin YC, Inoue T, *Dynlacht BD. The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *J. Cell Biol.* 204, 215-229, 2014



研究課題名: マウス及びヒト発生期腎臓における管腔上皮形成機構と破綻

研究期間: 平成26年度～平成27年度

研究課題番号: 26112716

研究代表者名: 西中村 隆一 (熊本大学・発生医学研究所・教授)

【研究の目的】

腎臓は後腎間葉と尿管芽という2つの組織の相互作用によって発生する。間葉は上皮化して管腔を形成し(間葉上皮転換)、複雑な形態変化を経て糸球体と尿管からなる一続きの機能単位すなわちネフロンを形成する。本計画は、マウスのネフロン形成における細胞骨格系の機能を解明するとともに、新たに開発したヒトiPS細胞からのネフロン誘導法を用いてヒト腎疾患の病態解明に貢献することを目的とした。

他の臓器も間葉と管腔上皮との相互作用によって形成されるが、腎臓は間葉も管腔上皮に転換し、さらにそれが尿管芽という管腔上皮と結合するという点でユニークである。この過程にWntシグナルが重要であることは既知であるが、その後の形態変化の制御機構はほとんどわかっていない。本申請計画は、腎臓における管腔形成と破綻という視点をこの新学術領域に導入できる。さらに患者由来のiPS細胞を使うことによって、幹細胞学、ヒト疾患の病態解明という視点を持ち込むことで、新しい領域の開拓が期待できる。

【研究の成果】

1. マウスのネフロン形成における細胞骨格系の機能解明

これまでの研究から、後腎間葉特異的な非筋肉型ミオシンIIのノックアウトマウス(Myh9/10二重ノックアウト)は、生直後に死亡し、ネフロンが消失することを見出していた。胎生期では、間葉上皮転換後の未熟なネフロンの管腔伸長が阻害されて細胞死を起こしていた。組織学的解析及び培養細胞を用いた実験から、ネフロン上皮管腔側のミオシンによる収縮が不十分なためとの結果が得られた。さらにネフロン前駆細胞の接着が低下し、出生時の前駆細胞数も減少した。したがって非筋肉型ミオシンIIは未熟なネフロンの形態形成及び前駆細胞の維持に必須であることが明らかになった。一方Myh9の単独欠失マウス

では近位尿管が拡張して、生後に腎不全を呈した。しかしヒトMyh9の遺伝性変異疾患においては、尿管の拡張ではなく糸球体硬化病変が認められることが知られている。この違いの原因を解くには、ヒトと同じ変異をもつマウスを作成するとともに、ヒトの腎臓でミオシンの機能を解析する必要がある。

2. ヒトMyh9変異iPS細胞の樹立とネフロン誘導

我々はヒトiPS細胞から立体構造をもったネフロンを誘導することに成功した(Taguchi et al. Cell Stem Cell, 2014)。そこでMyh9変異をもつ患者から血液を採取し、iPS細胞を樹立した。この細胞株から糸球体や尿管という3次元構造が形成されたが、少なくとも光学顕微鏡レベルでは異常を認めなかった。電子顕微鏡レベルでの異常、あるいはまだ疾患が発症していない、という2つの可能性が考えられる。

【研究の意義・展望】

腎臓の管腔上皮形成過程におけるミオシンの重要性を解明した。患者由来iPS細胞に関しては、現時点で誘導できるステージがかなり初期であり、生後に発症する病態を捉えられない可能性が高い。そのためまず正常iPS細胞を使って、長期に培養する、あるいは移植することで、より後期まで発生させる方法を確立したのち、再び患者由来のiPS細胞を使って検討したい。

【主な研究発表】

1. Recuenco MC, Ohmori T, Tanigawa S, Taguchi A, Fujimura S, Conti MA, Wei Q, Kiyonari H, Abe T, Adelstein RS and *Nishinakamura R. Non-muscle myosin II regulates the morphogenesis of metanephric mesenchyme-derived immature nephrons. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 1081-1091, 2015



研究課題名：上皮管腔組織における基底膜形成メカニズムの解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112718

研究代表者名：吉川 大和(東京薬科大学・薬学部・准教授)

【研究の目的】

基底膜の主要な分子であるラミニンは、 α 、 β 、 γ の3つの鎖からなるヘテロ3量体の糖タンパク質であり、 α 鎖が5種類、 β 鎖が3種類、 γ 鎖が3種類存在し、それらの組み合わせによって、現在までに18種類の組み合わせが報告されている。上皮管腔組織の基底膜における主要なアイソフォームは、 $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖からなるラミニン-511であることが知られている。このラミニン-511は、上皮管腔組織において上皮細胞を秩序よく接着させているにもかかわらず、癌化した細胞では接着を破壊させ運動を促進させる。しかしながら、このラミニン-511に対する正常上皮細胞と癌細胞の挙動の違い、および基底膜形成のメカニズムについては十分に明らかになっていない。上皮管腔組織において基底膜は必須な組織の構造であり、基底膜の存在なしに上皮細胞と結合組織を区画し、上皮細胞の極性を維持することはできない。本研究では、管腔上皮細胞の基底膜への接着および基底膜の形成の2点において本領域への貢献を目指した。

【研究の成果】

①基底膜は上皮細胞と結合組織を繋ぐ構造体であり、上皮細胞は基底膜と結合するための受容体を細胞表面に発現している。この受容体の中で、ラミニン-511に結合するルテランが、細胞表面からMT1-MMPと未知のプロテアーゼによって切断され、細胞表面からシェディングされることを見出した。このシェディングされたルテランは、切断後もラミニンに対する結合活性を維持し、上皮細胞と基底膜の接着に影響することが示唆された。

②ラミニン-511は、正常の上皮細胞を基底膜に安定的に接着させているにもかかわらず、癌細胞に対してはその運動を促進するという二面性の機能を*in vitro*において示す。ラミニン-511に接着した細胞を、細胞運動しやすい状態に転換する因子の探索を行い、発癌プロモーターであるPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)が細胞運動を促進することを見出した。さらに、PMAは、rho-associated protein kinase (ROCK)を介し

てインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ のラミニン-511に対する細胞接着を弱めることによって、細胞運動を促進することを明らかにした。

③抗ルテラン・ファージ抗体を肝細胞癌患者由来のファージ抗体ライブラリーから単離した。高い特異性を持つクローンは、ルテランとラミニン $\alpha 5$ 鎖の結合を阻害することを明らかにした。

【研究の意義・展望】

プロテアーゼによって細胞表面からシェディングされたルテランは、ヒト肝細胞癌患者の血漿中に検出されることから、新たな腫瘍マーカーとして期待される。また、細胞とラミニン-511の接着をコントロールするROCK経路は、上皮細胞と基底膜の相互作用が起点となる管腔構造の分岐形成メカニズム解明へのアプローチとして期待される。そして、抗ルテラン・ファージ抗体の遺伝子配列が明らかになり、抗原結合部位もヒト由来であるヒト型抗体の作製されている。この抗体は、ルテランの機能を解析する新しいツールとしてだけでなく、抗体-薬物結合体(ADC)などDDSへの利用も期待される。

【主な研究発表】

1. *[Kikkawa Y](#), Harashima N, Ikari K, Fujii S, Katagiri F, Hozumi K, and [Nomizu M](#). Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. *Exp Cell Res*, 344, 76-85, 2016
2. *[吉川大和](#), がん細胞の接着および運動における基底膜分子ラミニン-511とその受容体Lu/B-CAMの役割. 生化学, 87: 609-611, 2015.
3. *[Kikkawa Y](#), Miwa T, [Tanimizu N](#), Kadoya Y, Ogawa T, Katagiri F, Hozumi K, [Nomizu M](#), Mizuguchi T, Hirata K, and Mitaka T. Soluble Lutheran/basal cell adhesion molecule is detectable in plasma of hepatocellular carcinoma patients and modulates cellular interaction with laminin-511 in vitro. *Exp Cell Res*. 328, 197-206, 2014



研究課題名：脈管内腺構造の回転と浸潤・転移

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26112719

研究代表者名：清川 悦子（金沢医科大学・医学部・教授）

【研究の目的】

生体の3次元腺構造は、培養細胞をゲル内で培養することで試験管内で再構成できる。正常状態ばかりでなく、癌化した状態も再現でき、各種の癌で活性化型変異が知られている低分子量 G 蛋白質 Ras のを類器官に誘導的に発現させると内腔に細胞が充満するという形態の他、ライブイメージングをすることでコヒーレントな回転をすることを発見した。この回転が生体内でどのような役割を果たすのかは不明だが、脈管内で回転することにより転移能が亢進するという仮説を立て、それを生体内で観察することで証明することを目的とした。また、類器官回転の分子機構を明らかにすることも目的とした。

【研究の成果】

まず、マウス肝臓の生体内イメージング系を立ち上げることとし、類器官を生体内で観察する前に、同じく Ras の活性化型変異を持つマウス大腸由来の Colon26 細胞を用いて2光子顕微鏡を用いた生きたマウスの肝臓イメージングを行った。Colon26 は脾臓に移植することで、肝臓に転移することが知られている。蛍光蛋白質 GFP を恒常的に発現させてみたが、解剖後では肝臓に転移することは目視あるいは組織標本にて確認できるものの、ライブで捉えることは出来なかった。直接肝臓に移植し、直後に観察することも試みたが、癌細胞は観察できても数時間の観察時間では肝内を浸潤する様は観察することが出来なかった。

類器官の回転を抑制する薬剤を調べることで回転に必要な機構は何か見つけることが出来ると期待し、様々な薬剤を処理し動態を観察した。そのうち、ヒストンアセチル化阻害薬が抑制するのではなく、回転を促進することを見出した。正常の類器官、および活性化 Ras を発現し回転する類器官に、更にこの薬剤を処理した類器官の RNA の発現をマイクロアレイを用いて比較した。得られたデータより特定の信号伝達経路が予測を行い、いくつかの候補経路を得た。そのなかの鍵となる分子を発現させ、類器官の回転に及ぼす影響を検討している。

【研究の意義・展望】

これまでの研究では好中球などの消化管における炎症細胞は数時間の観察で血管外から遊出する様子が観察できたが、生体内では上皮細胞の移動は、好中球に比べて遅く、長期間のイメージングシステムを構築する必要があることがわかった。その場合、腹腔内臓器である肝臓よりは、皮下移植で行う方法や、化学発光などを用いて体外から移植した細胞の場所がある程度わかるようにするなどの工夫が必要であることもわかった。

回転の機構に関しては、鍵となる蛋白質群を発現させて、実験的に分子を絞り込むことも他に、コンピュータ内で類器官を再構成し、細胞間あるいは細胞と基質の相互作用をシミュレーションすることで、回転の機構を予測できるのではないかと考えられ、プログラムの構築を始めたところである。

【主な研究発表】

1. *Hirata E, *Kiyokawa E. Future Perspective of Single-Molecule FRET biosensors and Intravital FRET Microscopy. *Biophys J*, 111(6):1103-11, 2016
2. Minato H, *Kiyokawa E.: Activated K-RAS and its effect on morphological appearance. *J Biochem*, 156(3): 137-145, 2014

領域活動

●領域会議

- 第1回領域会議 平成23年9月9日(金) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第2回領域会議 平成24年2月18日(土)～19日(日) 川崎グランドホテル(神奈川県川崎市)
第3回領域会議 平成24年6月9日(土)～10日(日) 東北大学
第4回領域会議 平成26年7月18日(金)～19日(土) 九州大学

●代表者会議

- 第1回代表者会議 平成23年9月9日(金) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第2回代表者会議 平成24年2月19日(日) 神奈川県川崎市
第3回代表者会議 平成24年6月10日(日) 東北大学
第4回代表者会議 平成25年1月31日(木) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第5回代表者会議 平成25年6月23日(日) 北海道大学
第6回代表者会議 平成26年2月14日(金) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第7回代表者会議 平成26年7月19日(日) 九州大学
第8回代表者会議 平成27年2月18日(水) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第9回代表者会議 平成27年8月23日(日) 北海道大学
第10回代表者会議 平成28年2月22日(月) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

●国際会議

- 第1回国際シンポジウム 平成25年6月22日(土)～23日(日) 北海道大学
第2回国際シンポジウム 平成27年8月22日(土)～23日(日) 北海道大学

●若手シンポジウム

- 若手主催研究会「第1回Tubulology研究会」 平成25年8月25日(日) 東京大学
若手主催研究会「第2回Tubulology研究会」 平成26年11月28日(金) フクラシア浜松町(静岡県浜松市)

●若手研究成果支援と発表会

- 第1回若手共同研究進捗報告会 平成25年1月31日(木) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第2回若手共同研究進捗報告会 平成26年2月14日(金) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
第3回若手共同研究進捗報告会 平成27年2月18日(水) 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

●ニュースレター

各年度末に発行するニュースレター(No.1～No.5)が下記領域ホームページにPDF版として掲載されている。

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

●領域ホームページ

領域ホームページ <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/tubulology/index.html>

本ホームページに班員の研究成果や業績を掲載すると共に、各班員のホームページにリンクされている。

●技術講習会

- 第1回技術講習会 平成24年2月22日(水)～24日(金) 島根大学
- 第2回技術講習会 平成24年10月10日(水) 理化学研究所(神戸研究所)
- 第3回技術講習会 平成25年11月20日(水) 神戸大学
- 第4回技術講習会 平成26年8月21日(木)～22日(金) 東北大学

技術講習会内容

子宮外発生法 (exo utero development) を用いた実験手技マニュアル

島根大学医学部 解剖学講座 発生生物学

概要：

子宮外発生法とは、発生中期以降のマウスおよびラット胎仔に対して、子宮筋層切開後、胎膜越しに直視観察下で部位特異的操作（生理活性物質、薬剤、外来遺伝子などの局所投与、縫合 固定による物理的処置など）を行い、子宮壁を切開した状態で胎仔を母獣腹腔内に戻して、腹腔内（＝子宮外）にて発生を継続させる発生工学的手法である1。最大の特徴は、処置後の胎仔が胎盤を介して母体から栄養を受け続けられる in vivo の実験系であり、肉眼で確認できる精度で部位・ 時期特異的な操作が可能なことである。以下マウスについて、当教室で行っている胎仔側脳室へのマイクロインジェクションを例にとり、一連の手技を記載する。 なお参考文献に、応用例、他の 動物への手技、in utero 実験系についてのものも挙げているので、参照されたい2－5。

手順：

【妊娠母獣の準備】

9～20 週齢の雌マウスを雄マウスと一晚交配させ、翌朝雌マウスの膣栓が確認された場合、交配成功と判断し、膣栓確認日の正午を胎生 0.5 日 (embryonic day 0.5 [E0.5]) とする。

マウスの場合、E12 - E18 までの胎仔に処置が可能である。

【器具等の事前準備】

- ・ あらかじめマウス手術台用と術後のマウスの安置用に 2 台の保温プレートの電源を入れ、37℃に温めておく。
- ・ 生理食塩水（注射用 20 ml バイアル）数本、清潔なシャーレ 2 つを保温プレートで温めておく。
- ・ 手術器具、マウスの手術台として使用する金属製の浅型トレー（回転など位置調節が容易）をアルコール消毒する。
- ・ 滅菌済みガーゼをシャーレにとり、生理食塩水に浸しておく（6～10 枚程度）。
- ・ ハサミの先端を湿らすための生理食塩水入りシャーレを用意する。
- ・ マイクロピペットに注入物を充填しておく。

【手術手技】

1. 麻酔 [麻酔薬注射時刻記録]

メドトミジン・ミダゾラム・ブトルファノールの三種混合麻酔薬の腹腔内注射を行う 6, 7。*注射の際、腹腔内の臓器を傷つけないよう腹部正中で針をねかせ尾側方向に刺す。

薬剤名	商品名	市販濃度	投与量	調整時混合割合
メドトミジン	ドミトール	1.0 mg/ml	0.3 mg/kg	0.3 ml
ミダゾラム	ドルミカム	5.0 mg/ml	4.0 mg/kg	0.8 ml
ブトルファノール	ベトルファール	5.0 mg/ml	5.0 mg/kg	1.0 ml
注射用蒸留水				7.9 ml
合計				10 ml

マウスへの投与量： 0.1 ml/体重 10 g

*混合後の麻酔薬は、4℃冷蔵にて 8 週間保存可能（麻酔効果に変化なし）。

*5 分～10 分で全身麻酔状態となり、約 40 分麻酔状態が維持されると報告されているが、経験上 1 時間から 90 分まで麻酔状態が維持される。

2. 子宮筋弛緩剤投与

母獣が不動になるまで待ち、塩酸リトドリン ritodrine hydrochloride (1.4 mg/0.1 ml 生理食塩水) を母獣に 0.1 ml 腹腔内注射を行う。

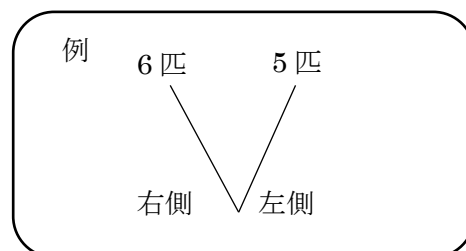
3. 処置台への固定

母獣腹部の体毛を除去（バリカンでカット）し、手術台に仰臥位にてサージカルテープで固定。腹部をアルコール綿で清拭する。

4. 開腹～子宮引き出し [手術開始時刻記録]

*開腹から閉腹まで 1 時間程度を目安にする。

腹部正中線上の皮膚をハサミで切開し、正中部の皮膚と腹筋の結合を剥離。腹筋、腹膜を正中線上にある白線に沿って切開。



*剥離や切開の際、皮下の血管を傷つけないよう注意。

創周囲を生理食塩水で湿らせたガーゼで被覆し、そのガーゼ上に片側の子宮を傷つけないようにして引き出す。胎仔数の確認と記録を行う。

5. 子宮筋層切開

子宮筋層を外側（子宮動脈・胎盤側の反対側）で切開し、胎膜に包まれた状態で胎仔を直視下に置く。

*胎膜保護のため、先端の尖っていないピンセットとハサミを使用し、先端は生理食塩水で湿らせる。術野の乾燥予防のため、生理食塩水で湿らせたガーゼでこまめに被覆。

6. 胎仔への処置（例：側脳室内微量注入）

下に敷いてあるガーゼをつまんで動かし胎仔の向きを変え（胎膜・胎仔に直接触れない）、注入部位が確認できるように適切な向きにする。

胎仔側脳室にマイクロピペットの先端を刺してインジェクターで注入（1 μ l）。

胎仔3個体に処置を行い、処置に成功した3個体以外の胎仔は胎膜と臍帯を切り摘出する。

*3個体以上残すと、死亡率が上がる。

*胎膜と臍帯を切る際、切れにくいハサミを使用し、血管の断端を潰すように切り、出血を防ぐ。

また、胎盤に触れて傷つけないよう注意。

*注入した胎仔と間引いた胎仔の記録をとる。

7. 胎仔および子宮の腹腔内への還納

周囲のガーゼをつまみ胎仔および子宮を移動させ、腹壁を引いてスペースを作りながらガーゼで丁寧に押し入れるようにして母獣腹腔内に還納する。

*出血の原因になるため胎盤に触れないよう注意。

8. 反対側の子宮および胎仔に対する操作

反対側で4～7までの操作を同様に行う（対照群とするなど実験計画による）。

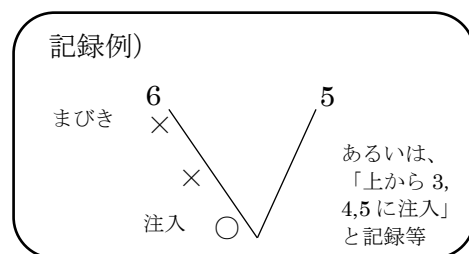
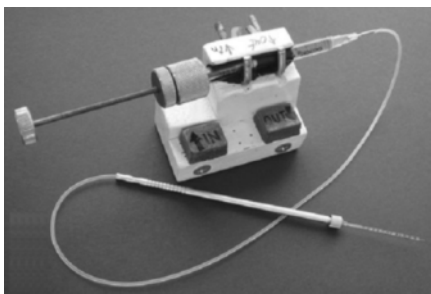
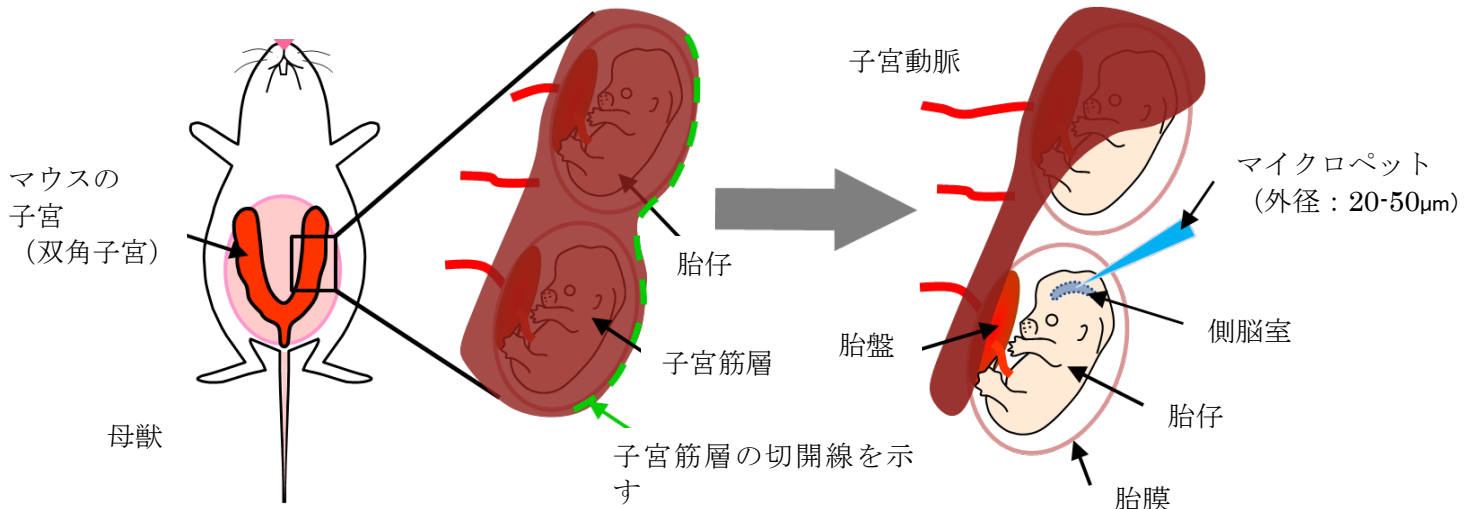
*片側同様3個体残し、他の胎仔は摘出する。

9. 腹筋縫合

縫合用絹糸で腹筋切開部分を縫合。

完全に閉じる前に生理食塩水（ハンクス液でもよい）を腹腔内に2 ml 注入する。

*癒着を防ぐのに有効。



10. 閉腹 [手術完了時刻記録]

オートクリップ（手術創用ホッチキス）で皮膚の切開部分を留める。

（皮膚を縫合糸で結紮した場合、マウスは糸を噛み切ってしまう恐れがあるため、金属製のクリップを使用する。）

11. 保温・母獣の覚醒

37℃保温プレート上に母獣を移す（ペーパータオル上で）。

麻酔拮抗薬のアンチセダンを腹腔内投与する。

母獣が覚醒するまで待つ（歩行できるようになっても30分程度保温を続ける）。

*麻酔拮抗薬について…三種混合麻酔を用いた場合、麻酔からの覚醒時間を短縮できる。

アチパメゾール（商品名：アンチセダン；メデトミジン拮抗薬）を注射用蒸留水に3%になるよう希釈し、0.1 mg/体重10 gの量を腹腔内投与する。

（調整法…アチパメゾール0.3 ml + 注射用蒸留水9.7 ml）

12. 母獣が十分覚醒したのを確認したのち、清潔な単独ケージにて維持管理する。

（通常、各機関の実験動物施設の規則に従った手順で飼育室に再搬入し、継続飼育を行う。）

【採材】

母獣腹腔内での胎仔発生を継続させ、実験計画に従い、1日後、3日後などの設定されたタイミングで胎仔を採材する（生後の解析については後述）。

母獣は、ペントバルビタールの過量投与（200 mg/kg）腹腔内投与により安楽死させた後、胎仔を摘出する。

（麻酔薬は三種混合麻酔薬を用いても良いが、安楽死のためには過量投与の必要がある。）

*子宮の上下左右、胎仔の順番など確実に同定する。

摘出・同定した胎仔について生理食塩水中で外表観察を行う。

生存胎仔の頭殿長（crown-rump length; CRL）と体重を計測する。

必要に応じて解剖し、あるいは必要な組織のみ摘出し、実験計画に即した処置・解析を行う。

組織学的解析を行う場合には以下に示すような固定液に浸漬し、その後の工程・解析へと進める。

なお、事前に固定液を調整しておくこと。

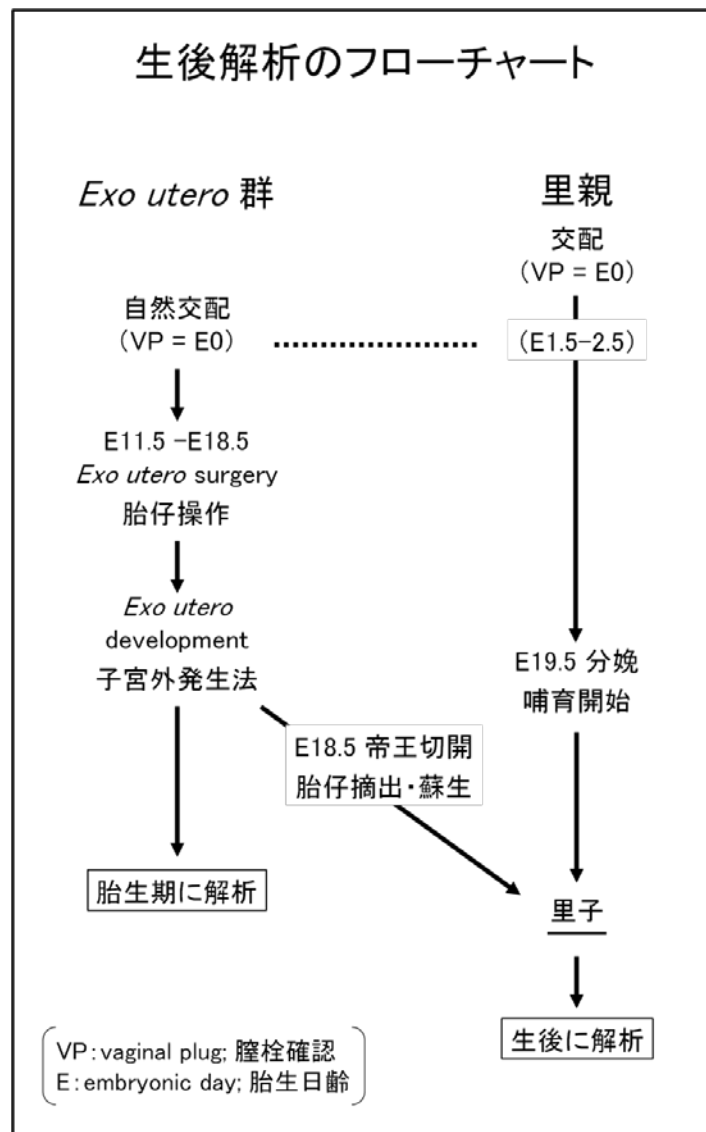
例1) 4% パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液（phosphate buffer; PB）

例2) 10% ホルマリン + 70% メタノール固定液（残り20%は蒸留水）

【処置した胎仔の生後における解析】

子宮外発生法では、胎生期における操作の影響を生後に解析することができる。これは、器官培養や全胚培養などの *in vitro* の実験系では不可能であり、子宮外発生法の利点である。

このためには、下図のフローチャートに示したような母獣の帝王切開と新生児の蘇生、および里親の準備が必要となる。



(参考文献)

1. Embryo Manipulation after Mid-Gestation Stages in Mice. (1994) Hatta T, Naora H, Udagawa J, and Tanaka O. SURGICAL TECHNOLOGY INTERNATIONAL III. Universal Medical Press, Inc., San Francisco, pp. 95-98.
2. Application of the mouse exo utero development system in the study of developmental biology and teratology. (2004) Hatta T, Matsumoto A, and Otani H. Congenit Anom. 44(1): 2-8.
3. マウス胎児子宮外発生法. (2007) Hatta T, Yamada M et al. J Kanazawa Med Univ. 32: 16-22.
4. Mouse exo utero development system: Protocol and troubleshooting. (2008) Yamada M, Hatta T, and Otani H. Congenit Anom. 48(4): 183-7.
5. In utero and exo utero fetal surgery on histogenesis of organs in animals. (2015) Jahan E, Rafiq AM, and Otani H. World J Surg Proced. 5: 198-207.
6. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. (2011) Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, and Kurosawa T. Exp Anim. 60(5): 481-487.
7. Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. (2013) Kirihara Y, Takeuchi M, Kurosaki K, Kobayasi Y, and Kurosawa T. Exp Anim. 62(3): 173-180.

◆子宮外発生法におけるマイクロインジェクション用機器および器具

【マイクロピペット作製】

(*ナリシゲ WEB サイト: www.narishige.co.jp、「製品カタログ」→「針作製ツール」ページ参照)

[機器]

・プーラー:

Microelectrode puller (PN-3, ナリシゲ) 235,000 円 (1991 年)

現行モデル： ナリシゲ PN-31

・ マイクロフォージ：

Micro-forge (MF-79, ナリシゲ) 437,000 円 (1991 年)

現行モデル： ナリシゲ MF-900

・ グラインダー (研磨機)：

Pipette grinder (MCG-IV; Chatani Limited, Tokyo, Japan) 377,000 円 (2009 年)

類似品： ナリシゲ EG-45

[器具]

・ ガラス管 G-1.2 (1.2 x 90 mm, 500 pcs) (ナリシゲ) 14,200 円 (2012 年)
Narishige Scientific Instrument Lab.

・ Diamond paste (Metadi II, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) 26,250 円 (2008 年)

(グラインダーの研磨部に塗布して使用)

【マイクロインジェクション】

[器具]

・ ハミルトン・シリンジ

(500 μ L, Model 1750 LT Threaded Plunger SYR)

Cat. # 容量 (1 回転あたり)

1750TPLT プランジャータイプ 81242 500 μ L (5.29 μ L) 53,200 円

・ イントラメディックポリエチレンチューブ Cat. # 427435

(BD Intramedic™ Polyethylene Tubing (Non-Sterile) (PE 190) 10 ft (1 ea))

427435 イントラメディックポリエチレンチュービング PE No.190

内径 1.19×外径 1.70 mm、10 フィート 1 巻 1,350 円

・ 参考) マイクロインジェクター

ナリシゲ IM-6 … シリンジ、チューブ、インジェクションホルダーの一体型セット

[試薬]

・ ミネラルオイル … インジェクション用シリンジ内、チューブおよびマイクロピペット先端まで充填して使用。

・ 注入確認用色素

例 1) カーボンインク … 製図用インク (rotring 社製インク, 黒, 品番 591-017) など。

例 2) ファストグリーン … Fastgreen FCF (Sigma F7258), 最終濃度 0.1% など。

【その他】

・ 手術創用ホッチキス

BD BBL™ AUTOCLIP Wound Clip Applier Stainless for #427631

BD 9 mm オートクリップ・ウンドクリップ用アプライヤー

Cat. # 427630 1 個 36,000 円

・ BD 9 mm オートクリップ・ウンドクリップ

Cat. # 427631 1000/1 箱 36,000 円

・ コラーゲン使用吸収性局所止血材 (ゼリア新薬)

アビテン® (フラワータイプ)

1 g x 2 pack 25,400 円

1. フローサイトメーターとは

フローサイトメーターは、フロー（流路）とレーザー光（光路）を用いて、細胞一つ一つの蛍光強度を解析するフローサイトメトリーという測定法を用いた機器である。フローサイトメーターは、フローと測定系で成り立つ。フローに細胞をのせることで、細胞を一つ一つ解析することが可能となり、液滴荷電方式を用いて、目的の細胞を分取することが可能である。図 1 にフローサイトメーターの概略図を示した。また、フローサイトメーターで一般に利用されるレーザーと蛍光色素を表 1 に示した。

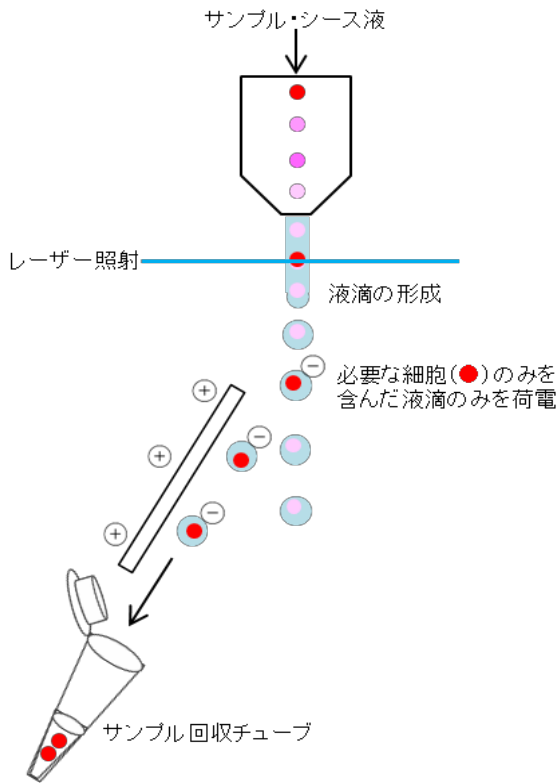


表 1. レーザーと蛍光色素

レーザー	蛍光色素
青 (λ : 488 nm)	FITC or Alexa Fluor 488
	PE
	PerCP/Cy5.5
	PE/Cy7
赤 (λ : 642 nm)	APC or Alexa Fluor 647
	Alexa Fluor 700
	APC/Cy7
紫 (λ : 405 nm)	Pacific Blue
	Brilliant Violet 510
	eFluor 650NC
	Brilliant Violet 785

図 1. フローサイトメーター概略図

細胞を含んだサンプル液は、フローセルでシース液の流れに合流し、一つ一つの細胞にレーザー光が照射され、測定される。液滴荷電方式により、フローセルからノズルを超音波振動させることによって液滴を形成させ、目的の細胞が含まれた液滴だけを荷電することによって、液滴が回収チューブに回収される。

2. フローサイトメーターでできること

フローサイトメーターは、蛍光色素を利用し、細胞を一つ一つ解析することが可能である。さらに、目的の細胞を生きたまま分取することが可能である。フローサイトメーターには、解析のみを行うセルアナライザーと、目的の細胞を分取する機能（ソーティング）がセルアナライザーに追加されたセルソーターが存在する。次ページに各メーカーより発売されているフローサイトメーターを抜粋して記載した。

3. フローサイトメーターの種類
セルアナライザー（解析のみ）

※使用方法については、各メーカーの使用方法を参照

BD バイオサイエンス



http://www.bdbiosciences.com/jp/instruments/facsverse/index.jsp?_ga=1.70839315.2021169219.1472218107

ベックマン・コールター



<https://ls.beckmancoulter.co.jp/products/flow-cytometers/gallios>

バイオラッド



http://www.bio-rad.com/ja-jp/product/ze5-cell-analyzer?pcp_loc=catprod

SONY



<http://www.sony.co.jp/Products/fcm/products/sa3800/index.html>

セルソーター（解析＋ソーティング）

BD バイオサイエンス



http://www.bdbiosciences.com/jp/instruments/facsaria/index.jsp?_ga=1.146778404.2021169219.1472218107

ベックマン・コールター



<https://ls.beckmancoulter.co.jp/products/flow-cytometers/moflo-astrios>

バイオラッド



<http://www.sony.co.jp/Products/fcm/products/sh800s/index.html>

SONY



4. 細胞の標識方法

フローサイトメーターでは、主に蛍光タンパク等でラベルされた細胞の蛍光強度を利用して細胞の解析を行う。以下に主に利用される標識方法を示した。

1) 細胞で発現する蛍光を利用

GFP (green fluorescence protein) に代表される細胞内で発現する蛍光タンパク質を指標として、培養細胞や組織細胞をフローサイトメーターで解析・分取することが可能である。

2) 抗体を利用

フローサイトメーターでは、細胞にレーザー光を照射し、反射された光を利用して解析を行っている。前述したように細胞自身が蛍光を有している場合には、目的細胞の蛍光を利用して解析することができる。それ以外に、細胞が発現するタンパク質に特異的な抗体を利用し、フローサイトメーターで解析することが広く利用されている。主にあらかじめ蛍光で標識された抗体等が利用される。以下に使用される抗体の例を示した。

細胞表面抗原に反応する抗体 細胞の表面に発現している特異的な抗原タンパク質に特異的に反応する抗体を用いて、細胞を染色し、蛍光強度に応じて細胞の解析を行う。リンパ球では、細胞表面抗原の CD4 や CD8 などがよく利用される。

細胞内タンパク質に反応する抗体 上記の細胞表面抗原以外にも、細胞内で発現するタンパク質に特異的に反応する抗体を利用して、フローサイトメーターで解析することも可能である。細胞内タンパク質の解析を行う場合には、界面活性剤等で細胞を処理し、細胞膜透過性を高めるような処理を行う必要がある。

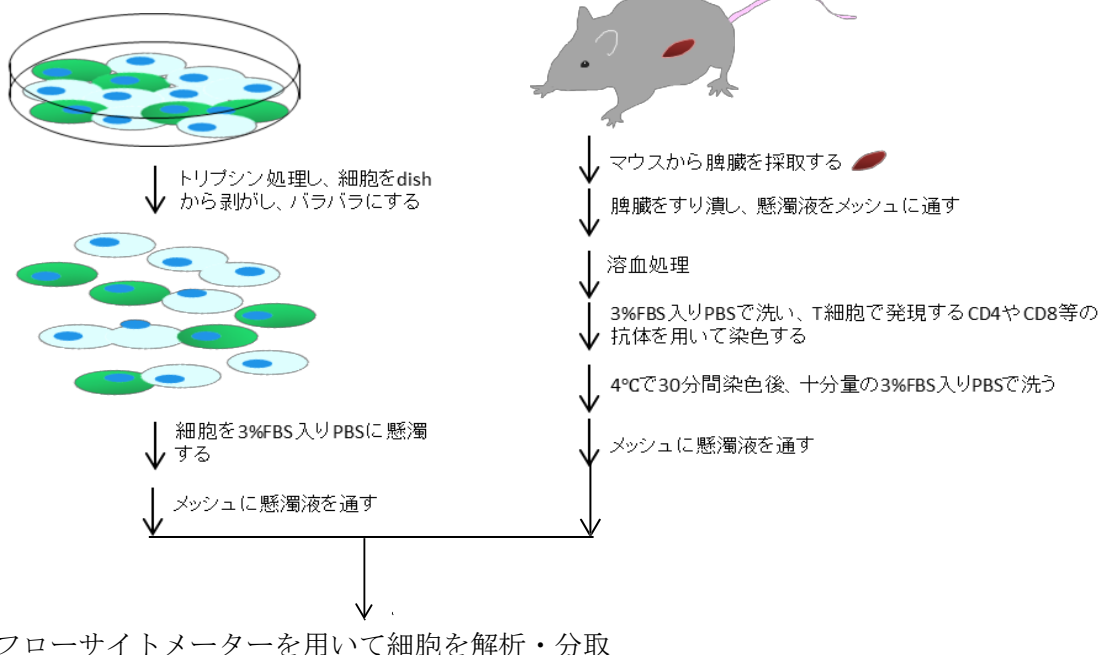
※上記以外にも核酸を標識する PI (propidium iodide) や Hechst33342 などの蛍光色素も抗体と組み合わせて利用される。

5. 細胞の調製とフローサイトメーターを用いた解析・分取

フローサイトメーターを用いた解析を行うための細胞調整方法を、GFPを発現をする培養細胞と、組織細胞（マウス脾臓の場合）に分けて以下に示した。

・培養細胞（GFP 発現細胞含む）

・組織細胞（マウス脾臓の場合）



・培養細胞の場合

フローサイトメーターを用いて、総細胞に占める GFP 陽性細胞の比率の解析や、GFP 陽性もしくは GFP 陰性細胞の分取が可能である。

・組織細胞（マウス脾臓）の場合

フローサイトメーターを用いて、CD4 陽性細胞や CD8 陽性細胞の比率解析や、CD4 もしくは CD8 陽性細胞の分取が可能である。

※各細胞ともに、ネガティブコントロールの準備が必須である。

※解析方法及びフローサイトメーターの使用方法は、各機種のマニュアルに準ずる。

※死細胞の除去には、PI 等を適宜使用する。

6. 参考

・実験医学別冊 直伝！フローサイトメトリー 中内啓光監修、清田純編集 羊土社

・ベックマンコールター フローサイトメトリー技術情報

<https://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple.html>

・BD バイオサイエンス フローサイトメーター関連

<http://www.bdbiosciences.com/jp/instruments/index.jsp>

・バイオラッド フローサイトメトリー

<http://www.bio-rad.com/ja-jp/category/flow-cytometry>

・SONY ライフサイエンス フローサイトメトリー

<http://www.sony.co.jp/Products/fcm/lineup/index.html>

はじめに

タンパク質の質量分析の主な目的としては、「プロテオーム解析」と、リン酸化部位の決定や糖鎖修飾の解析などの「翻訳後修飾の解析」が挙げられる。このうち、プロテオーム解析とは、タンパク質を網羅的に同定・定量解析する手法のことを指す。

プロテオーム解析法には、目的やサンプルに応じて様々な前処理法や解析法があるが、最も頻繁に使用され、基本的でかつ汎用性が高いのは、SDS-PAGE などの電気泳動後に染色したタンパク質バンド(もしくはスポット)に含まれるタンパク質の同定である。

そこで本稿では、実際に当センターで実施している、ゲルから切り出したタンパク質バンドの同定法について紹介する(図 1)。これには、サンプルの前処理法として、トリプシンによるゲル内消化(in-gel digestion)法を用いる。質量分析法として MALDI-TOF-MS を用いるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法がある。しかしこの方法は、あまり使用されなくなっている。その理由は、測定の際にペプチドの分離を行わないため、複数のタンパク質が混在するケースでは、多量に含まれるタンパク質由来のペプチド群が優先的に検出され、タンパク質の同定数が少なくなるからである。よって現在では、LC-MS/MS 法を用いたシークエンスタグ法による方法が主流となっている。

当センターでは、キャピラリーカラムを取り付けた LC をオンライン接続した「イオントラップ・飛行時間型ハイブリッド質量分析計 LCMS-IT-TOF (島津製作所)」を用いている。これにより、C18 カラムを用いた逆相 LC により分離したペプチドを質量分析計に導入し、順次 MS/MS 解析を行う LC-MS/MS 法により、ペプチドの質量分析データを取得している。得られた MS/MS データは、タンパク質同定解析ソフト Mascot を用いてアミノ酸配列を決定し、シークエンスタグ法により確率的に最も可能性が高いタンパク質から順に候補を結果として表示する。

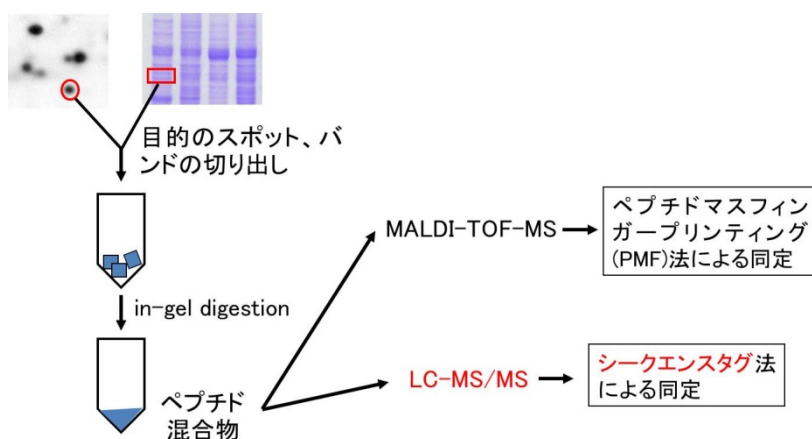


図1 質量分析計を使ったタンパク質同定の流れ
タンパク質の質量分析の基本となる手法である

準備

ゲル内消化法

アセトニトリル(HPLC グレード)

25 mM 重炭酸アンモニウム

CBB 脱染色溶液(30% アセトニトリル、25 mM 重炭酸アンモニウム)

還元化溶液(10 mM ジチオスレイトール(DTT)、25 mM 重炭酸アンモニウム)

アルキル化溶液(55 mM ヨードアセトアミド、25 mM 重炭酸アンモニウム)

ゲル脱水溶液(50% アセトニトリル、25 mM 重炭酸アンモニウム)

トリプシン溶液(20 µg/200 µL 0.1% 酢酸のトリプシン溶液(シークエンシンググレード、プロメガ)を、使用直前に氷冷した 25 mM 重炭酸アンモニウムで 10 倍希釈する)

ペプチド抽出溶液(50% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸)

0.1% ギ酸

インキュベーター(タイテック)

サーモミキサー(エッペンドルフ)

遠心濃縮機(トミー精工)

実験用手袋

質量分析 (LC-MS/MS 解析)

LC に使う移動相

2% アセトニトリル、0.1% ギ酸

95% アセトニトリル、0.1% ギ酸

プロトコール

1. ゲル内消化法

- ① 対象とするタンパク質バンド(もしくはスポット)を切り出し、ゲル片を 2 mm 角のサイの目状にする。
- ② 200 µL(ゲル片がすべて浸る程度)の CBB 脱染色溶液を加え、サーモミキサーを用い、室温(25°C)で 30 分間、650 rpm にて振盪し、CBB の脱染色を行う。溶液を捨て、ある程度色が抜けるまでこの操作を繰り返す(2-3 回程度)*a。
- *a 銀染色の場合は、銀染色キット(質量分析グレード)に添付している脱色液を用いた後、蒸留水で色が抜けるまで繰り返し洗浄する。
- ③ 溶液を捨て、100 µL アセトニトリルを加え、サーモミキサーを用い、室温(25°C)で 10 分間、650 rpm にて振盪し、完全に脱水する(ゲル片が真っ白になる)。溶液を捨て、室温で 30 分静置する。
- ④ 200 µL 還元化溶液を加え、インキュベーターを用い、56°C で 1 時間、260 rpm にて振盪する。システイン残基間のジスルフィド結合の切断を行う。
- ⑤ 溶液を捨て、200 µL 25 mM 重炭酸アンモニウムを加え、サーモミキサーを用い、室温(25°C)で 10 分間、650 rpm にて振盪し、ゲル片を洗浄する。
- ⑥ 溶液を捨て、200 µL アルキル化溶液を加え、サーモミキサーを用い、室温(25°C)で 45 分間、650 rpm にて振盪する。還元化されたシステインのチオール基のアルキル化を行う*^b。
- *^b フリーのチオール基が、ジスルフィド結合しないように、アルキル化処理する。イオン化効率の低下を防ぐため、ヨードアセトアミドによりカルバミドメチル化を施す。

- ⑦ 溶液を捨て、200 μ L 25 mM 重炭酸アンモニウムを加え、サーモミキサーを用い、室温 (25°C) で 10 分間、650 rpm にて振盪し、ゲル片を洗浄する。
- ⑧ 溶液を捨て、200 μ L ゲル脱水溶液を加え、サーモミキサーを用い、室温 (25°C) で 30 分間、650 rpm にて振盪する。溶液を捨て、この操作をもう 1 度繰り返す。
- ⑨ 溶液を捨て、100 μ L アセトニトリルを加え、サーモミキサーを用い、室温 (25°C) で 10 分間、650 rpm にて、完全に脱水する (ゲル片が真っ白になる)。溶液を捨て、室温で 30 分静置する。
- ⑩ 30 μ L (ゲル片がすべて浸る程度) のトリプシン溶液を加え、30 分間氷上にてゲル片に浸透させる。
- ⑪ 余分な溶液を捨て、インキュベーターを用い、37°C でオーバーナイト、260 rpm にて振盪する。
- ⑫ 50 μ L ペプチド抽出溶液を加え、サーモミキサーを用い、室温 (25°C) で 30 分間、650 rpm にて振盪し、ペプチドを含む溶液を 1.5 mL チューブに回収する。もう一度 25 μ L ペプチド抽出液を加え、この操作を繰り返す。溶液を回収し、一回目に回収した溶液に足し合わせる (計 75 μ L)。
- ⑬ 回収したペプチドを含む溶液を、遠心濃縮機を用い、室温 (25°C) で 45 分間、濃縮・乾燥する。
- ⑭ 乾燥したペプチドに、20 μ L 0.1% ギ酸を加えて溶解し、専用のバイアルに溶液を移し、質量分析計 (LCMS-IT-TOF) のサンプルホルダーにセットする。

2. 質量分析 (LC-MS/MS 解析)

- ① 順次サンプル解析を実行させるバッチテーブルに、サンプル名、取得するデータファイル名、注入するサンプル量を入力する。さらに、LC-MS/MS 解析の LC のグラジエントカーブの設定、イオントラップにかかる時間、プリカーサーイオンの選択方法、測定する m/z の範囲などを決定する「質量分析のメソッドファイル」を選択する。
- ② サンプルの解析を実行し、各サンプルについて、C18 逆相カラムから順次溶出されるペプチドについて、イオン強度の高いものから順にタンデムマススペクトルを取得する。
- ③ Mascot Distiller ソフトにより、タンデムマススペクトルのピークパターンの波形処理を行い、質量分析計から出力される質量データファイル (MS/MS データ) から Mascot 検索に適したピークリストを作成し、テキストファイルに変換する。
- ④ このファイルをタンパク質同定ソフト Mascot で解析し、ペプチドのアミノ酸配列を決定する (図 2)。Swiss-Prot、もしくは NCBI のタンパク質データベースを用い、確率の高い順に同定タンパク質の候補を結果として表示する。通常は、誤同定率が 5%以下をクライテリアとし、同定タンパク質とみなす。

MS/MSスペクトル

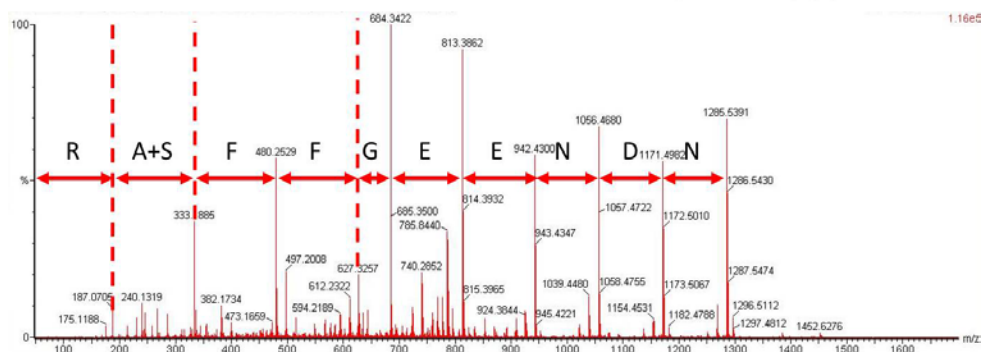


図2 ペプチドのタンデムマススペクトルデータの解析

ピークの差から、アミノ酸配列を決定でき、タンパク質の同定が可能となる。

おわりに

タンパク質の質量分析では、実験者由来のタンパク質(ケラチンなど)の混入を防ぐことが重要である。そのため、「プロテオーム解析専用の電気泳動装置を用意する」、「ゲルを素手で触れないようにする」、「サンプル処理中は実験用手袋を着用する」などの注意が必要である。

参考文献およびプロテオーム解析に有用な WEB 情報

<参考文献>

ゲル内消化法(in-gel digestion)

1. Hatano N, Hamada T. J. Proteome Res. 2008, 7(2): 809-816.

LC-MS/MS 解析(LCMS-IT-TOF の測定条件)

2. Izuchi Y, Takashima T, Hatano N. Mass Spectrom. 2016, 5(1): A0046.

質量分析によるタンパク質の解析の詳細

3. 改訂タンパク質実験ハンドブック(羊土社)

<WEB 情報>

1. タンパク質同定ソフト Mascot に関する情報

<http://www.matrixscience.com/>

2. タンパク質の公開データベース

Swiss-Prot : <http://www.uniprot.org/downloads>

NCBI : <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/>

概要

イメージング技術は、細胞生物学の研究において必須の技術である。蛍光タンパク質を用いた技術は大きなブレイクスルーをもたらし、細胞骨格や細胞小器官の構造変化、細胞内のタンパク質の局在の変化、さらには細胞内の情報伝達の時空間的变化を生細胞内で経時的に観察すること可能となってきた。これらの技術は、様々な細胞応答における分子の作用機構や時空間的な制御機構を明らかにする上で非常に有効な手段である。さらに近年では、光学顕微鏡の解像力の限界を超える超解像技術が新たな世界を見出している。本研究領域が対象とする上皮管腔組織形成においても、細胞集団が管腔を形成していく過程に寄与する様々な現象を分子のレベルで解明するためにこれらの技術は必要不可欠なものとなっている。本講習会では、生細胞内の分子、細胞内小器官や細胞骨格の動態を可視化する蛍光タイムラプスイメージング解析と細胞内の構造や分子の局在をより詳細に解析する超解像技術について実習を行った。これらの方法について、基本的な手法を本書において解説する。

1. 蛍光タイムラプスイメージング解析

本項では、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡を用いた2次元平面で培養された細胞の蛍光タイムラプス観察と3次元培養された細胞集団の3次元タイムラプス観察の基本的な方法を解説する。

観察対象

脊椎動物由来の培養細胞

試薬 (培地)

CO₂ガス濃度をコントロールできるステージインキュベーターを利用する場合は、CO₂インキュベーター内と同様の条件で一般的な細胞培養用培地 (DMEM、MEMなど) を用いて細胞を培養することができる。蛍光観察の場合、培地からの自家蛍光のバックグラウンドを少しでも減らすためにフェノールレッドを含まない培地を使用することを推奨する。CO₂ガスの供給ができない場合は、温度を維持し、Leibovitz's L-15培地 (大気組成で至適pHを維持する培地) を使用する。細胞種によってはこの培地を使用できないものもある。

細胞に依存するが、ステージインキュベーターにCO₂ガスが供給ができない場合でも30分程度は観察が可能である。その場合、Hepes-KCl pH 7.4を終濃度10~20 mMで添加してpHの上昇を抑える。しかし、長時間至適pHを維持することはできない。

器具 (倒立顕微鏡を使用することを前提とする。)

35 mm ディッシュ、35 mm ガラスボトムディッシュ (写真1) やチャンバースライドなど顕微鏡ステージに乗せられる形状のものを使用する。

プラスチックディッシュは厚みがあるため、開口数の高い高倍の対物レンズで細胞を観察することができない。20倍以下、又は、長焦点の対物レンズを使用する場合には用いることができる。

40倍以上の油浸、水浸、グリセロール、シリコンオイルなどの液浸レンズを使用する場合は、レンズの焦点距離が短い場合プラスチックディッシュは使用できない。ガラスボトムディッシュやチャンバースライドなどの対物レンズにあった厚さのカバーガラスの上に細胞を播種したサンプルを用意

する。

細胞の微分干渉像も観察する場合、ディッシュのふたをガラスにする必要があるため、ガラスをつかったディッシュのふたを用意する（写真2）。

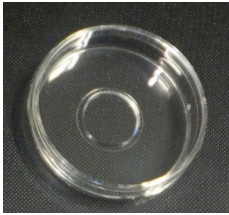


写真 1.
35 mm ガラスボトムディッシュ



写真 2.
35 mm 上面がガラスでできた 35 mm ディッシュのふた。
重りも兼ねる。（トッケン社製）



装置

共焦点顕微鏡、高感度CCDカメラを備えた蛍光顕微鏡（Zeiss, Leica, Olympus, Nikon社など）を使用することを前提とする。各社の顕微鏡を制御するソフトウェアによりタイムラプス観察を行う。タイムラプス観察する上で、顕微鏡ステージ上で細胞を正常な状態に維持することが必要である。そのために、温度の維持、培地のpHの維持（CO₂の供給）、湿度の維持を行うことが必要となる。また、長時間高倍のレンズで観察する場合、焦点面（ピント）を維持する必要がある。これらに用いる装置とその個々のセッティングを解説する。

対物レンズ

10倍、20倍、長焦点の40倍の対物レンズは焦点距離が長く、プラスチックディッシュでも観察することができる。40倍、60倍、63倍、100の油浸、水浸、グリセロール、シリコンオイルレンズは、開口数が高く明るく、蛍光観察で解像度の高い画像が得られるが焦点距離が短いため、細胞が接着する底面がカバーガラスとなっているガラスボトムディッシュやチャンバースライドを使用する。

ステージインキュベーター（ステージ上での細胞の維持）

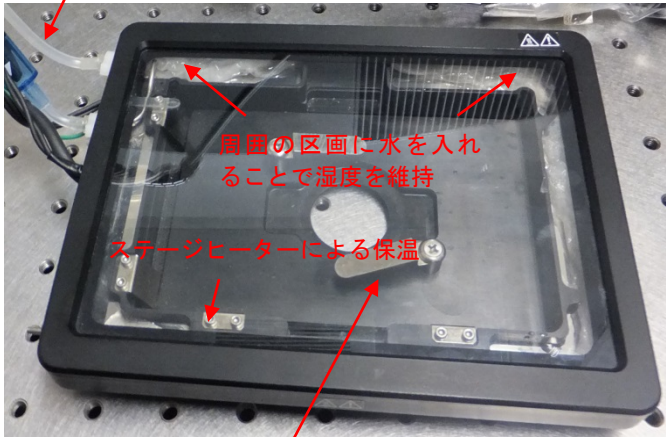
細胞を生きた状態で観察するために顕微鏡ステージにステージインキュベーターを設置し、CO₂インキュベーター内と同じ環境で細胞を維持する。（CO₂ガス供給機能付き、東海ヒット社製など）（写真3）

ステージインキュベーターは、ユニット自体を37°Cに暖め、上蓋のガラスも発熱するものが望ましい。上蓋は数度高い温度で維持することで曇りを抑えることができる。微分干渉像を得る場合は必要である。

CO₂ポンペを設置し、ガス混合機により5% CO₂にした空気をステージインキュベーター内に送り込む。

ステージインキュベーター内が外より高温となるため、長時間の観察では細胞の培地が蒸発することが問題となる。この培地の蒸発防止のために、ステージインキュベーター内に水を入れて湿度を高く保つ必要がある（写真3左）。

CO₂ 混合ガスの供給



前面の区画に水を入れる
ことで湿度を維持

ステージヒーターによる保温

ヒーティングガラスによる保温
と曇り防止



上面のヒーティングガラスの温度

ディッシュの接するステージの温度

周囲の water bath の温度

CO₂ 濃度

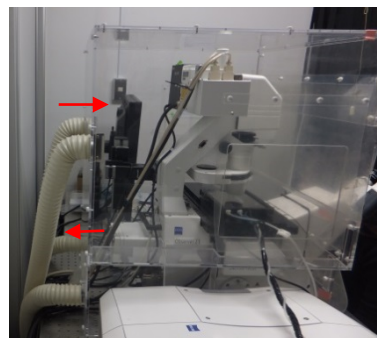
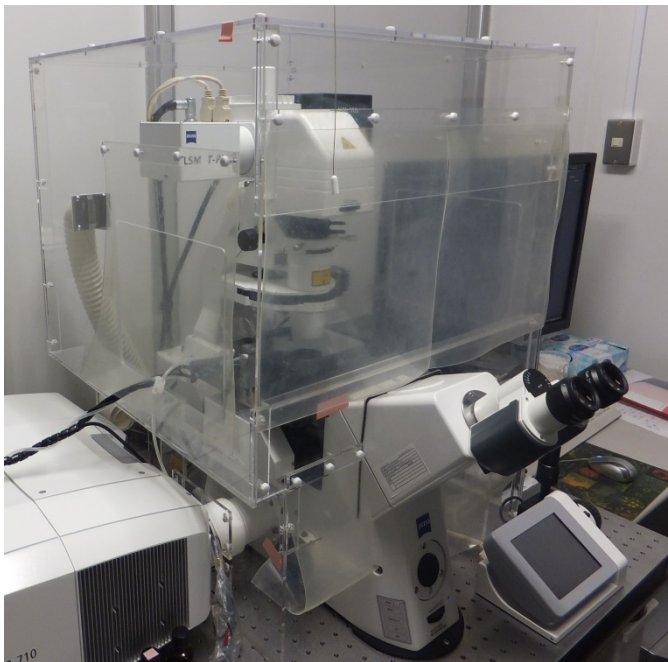
各部位の温度と CO₂ 濃度のコン
トローラー

写真 3.

ステージインキュベーター（東海ヒット社製）保温、CO₂ガスの供給、湿度の維持が可能である。
（左）ステージインキュベーター本体（右）制御ユニット

顕微鏡保温箱（トッケン社製など）（写真4）

ステージインキュベーターは、37°Cで維持しているため、ステージインキュベーターとその部屋の温度差が大きい場合がある。室温の変化による顕微鏡の温度変化によって顕微鏡のわずかな変形が生じタイムラプス撮影中に合わせていた焦点（ピント）がずれていく（ドリフト）。高倍の対物レンズを使用しているときは無視できないずれとなる。そのため、顕微鏡本体の温度変化を極力軽減するために顕微鏡保温箱（トッケン社製など、写真4）があることが望ましい。



温風を上から吹き込みましたから
出して保温箱内の空気を循環さ
せている。

写真 4.

顕微鏡保温箱（トッケン社製）顕微鏡ステージに温度プローブを設置し、ステージの高さを 37°Cに維持する

オートフォーカスユニット

焦点面をディッシュの底の面と対物レンズの距離を赤外線レーザー
ZEISS: Definite Focus (写真5)

Leica: Adaptive Focus Controlで測定し、顕微鏡の熱膨張による焦点面のZ方向のドリフトを補正する装置で長時間のタイムラプス観察には極めて有効な機能である(下記、各社の機能名)。焦点の合った位置を維持するものではなく、対物レンズとガラス面との距離を維持する機能である。補正できる距離には限界があるため、顕微鏡保温箱などによって顕微鏡自体の温度変化を極力避けることが望ましい。

Olympus: Zドリフトコンペンセーター

Nikon: パーフェクトフォーカスシステム



写真5.
ZEISS社製 Definite Focus

観察の手順

顕微鏡を事前に保温して、ステージ上を37°Cに維持しておく。高倍のレンズを用いる場合、保温開始から2~3時間は顕微鏡の熱膨張による焦点面のドリフトが生じる。

細胞の準備 (40倍以上の油浸レンズなどを使う場合)

- ・ ガラスボトムディッシュに蛍光タンパク質などを発現させて播種した細胞を用いる。
- ・ 実験に合わせた培地 (35 mmディッシュの場合1~2 ml) で培養している状態でステージインキュベーターにセットする。ディッシュ等は軽いので重りを乗せるなどして動かないように位置を安定させる。
- ・ ステージインキュベーターは周囲のウオーターバスに水を入れ、底面を37°Cに設定する。ステージインキュベーターの上面のふたのガラス (ヒーティングできるガラスを使用) は39°C程度の高めに設定し、ガラスのふたが曇ることを防ぐ。
- ・ CO₂ガスの混合機より5% CO₂に調整した空気をステージインキュベーターに供給する。
(上記を設定したのち温度が安定するのを待って撮影を開始する)

共焦点顕微鏡の場合

- ・ 蛍光タンパク質や蛍光物質の励起波長、蛍光波長に合わせたダイクロイックミラー、エミッションフィルター、又は、取得波長領域を設定する。なるべく効率の良いフィルターの組み合わせを選ぶ。2波長同時励起は、蛍光の損失が大きいこと、双方の蛍光が漏れこむ可能性があることから極力行わない。
- ・ 照射するレーザーの出力は極力低く抑える。(例、アルゴンレーザー488 nmの場合、通常の出力のセッティングで、AOTF 0.2-1%程度、スキャンスピードは、512 x 512の画角で一枚当たり0.5~1秒程度のスキャンスピードに設定する。(サンプルの蛍光強度に依存する。) 断層像を撮影する場合、ピンホールはレンズの焦点の厚さに合わせて絞ることが望ましいが、暗い場合はピンホールを開いて感度を確保する。スキャンの平均化を行うことによりノイズを減らすことができるが、細胞へのダメージを

考え極力平均化の回数を減らす。また、タイムラプス撮影の時間間隔によって一回に撮影するスキャン速度、断層像の枚数を設定する。

オートフォーカス機能を設定する。オートフォーカス機能が無い場合は、顕微鏡のピントのずれる方向の特性を事前に把握し、ずれる幅を考慮して撮影するZ方向の断層像の範囲を設定する。

蛍光顕微鏡でのCCDカメラによる撮影の場合

- ・ 照射する励起光を極力抑え、露光時間を長くすることで感度を確保する。オートフォーカス機能を設定する。オートフォーカス機能が無い場合は、顕微鏡のピントのずれる方向の特性を事前に把握し、ずれる幅を考慮してピント面をずらした像を同時に撮影する。
- ・ 撮影した画像は顕微鏡付属の解析ソフト、ImageJ等を使って目的にあった動画を作成する。

三次元蛍光タイムラプス観察（細胞外マトリックス内での3次元培養の場合）

- ・ ガラスボトムディッシュなどに薄くコラーゲンやマトリゲルを固化させる。（厚くしすぎると高倍の対物レンズではピントが届かなくなる。）その上に薄い濃度のコラーゲンやマトリゲルに懸濁した細胞を播種し培養する。
- ・ 共焦点顕微鏡により、細胞外マトリックス内の細胞集団のZ方向の上端から下端を含む連続した断層像として撮影する。細胞へのダメージを考えてレーザーパワーは極力低く抑える。ピンホールサイズはZ方向の解像力を決定するが、蛍光のシグナルが暗い場合はピンホールを開いて感度を確保する。断層像のZ方向のステップサイズは通常半分重なるように設定するが、細胞への光によるダメージが出る場合はステップ幅を広げてスキャン回数を減らして全体象を得られるように設定する。
- ・ 撮影した画像は顕微鏡付属の解析ソフト、画像処理ソフト（IMARIS、ImageJ）等を使って目的にあった動画を作成する。

2. 超解像顕微鏡

近年、光学顕微鏡の解像力の限界（回折限界）を超えて微細な構造や分子の局在を観察する超解像顕微鏡が開発されている。細胞生物学の分野において、超解像顕微鏡による新たな細胞内構造やタンパク質分子の詳細な局在解析が新たな発見を生み出している。超解像顕微鏡には、レーザー走査型顕微鏡を用いた誘導放出制御(STED)顕微鏡、蛍光物質の明滅を利用した超局在化顕微鏡法(PALM, STORM)、構造化照明顕微鏡法(SIM)が開発されている。顕微鏡メーカー各社が生物試料の解析に用いることのできるシステムを提供している。

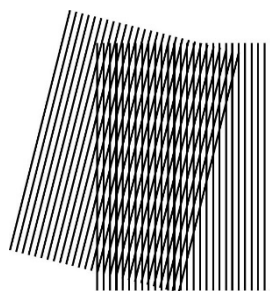
本マニュアルでは、顕微鏡システムがあれば汎用の蛍光色素を用いることができる導入が比較的簡単なSIMによる超解像観察を行うことを想定して、基本的なサンプル調整と観察方法の実際の注意点を解説する。

Structure illumination microscopy (SIM)の原理

SIMは通常の蛍光顕微鏡を用い、励起光として縞模様の構造化照明を用いることで超解像効果を生み出す方法である。回折によって生み出される縞模様の励起光を移動又は回転することによって少しずつずらして同一視野を撮影し、撮影した画像を重ねる。縞模様の励起光によって得られた画像を重ねること

によって、対象のサンプルの映像に依存したモアレ¹⁾がもとの映像より拡大されて浮かび上がる（下図）。このモアレが回折限界以下の解像できない形でもその形に依存したモアレとして認識することができるため、このモアレの像をもとに計算によってもとの像を再構築することで解像の限界以下の構造を映像化することができることになる。構造化照明の縞模様の間隔は光の回折限界に依存しているため、SIMは通常の顕微鏡の2倍程度の解像力が得られる。3次元の構造化照明を用いることによって3次元の超解像イメージングも可能である。

¹⁾モアレ（干渉縞）：縞模様のような周期性のある模様を重ねることによって生じる、もとの構造が拡大された干渉像（下図）



観察対象

- ・ 固定した培養細胞

細胞を固定する上で、細胞内の構造やタンパク質の局在が固定前の生きている状態と同じであることが理想である。蛍光染色するタンパク質の性質、注目する細胞内構造などに合わせて最適な固定方法を選ぶ必要がある。微細な構造を解像することから、Z方向に光を散乱するもの、自家蛍光を持つものや屈折率の異なるものが存在することは、構造化照明を不鮮明にすることから厚みの薄いサンプルの方が良い結果を得られる。

対物レンズから細胞との距離は近いほど解像力が高くなるため、細胞をカバーガラス、スライドガラスが底面にあるグラスボトムディッシュやチャンバースライドに播種したものをを用いる。

試薬、器具

固定試薬

- ・ 細胞を固定する上で、細胞内の構造やタンパク質の局在が固定前の生きている状態と同じであることが理想である。蛍光染色するタンパク質の性質、注目する細胞内構造などに合わせて最適な方法を選ぶ必要がある。（4% ホルムアルデヒド溶液，1% グルタルアルデヒド溶液，メタノール，アセトンなど）

蛍光色素、抗体など

- ・ Alexa-488などの明るく退色しにくい蛍光色素を用いる。主に抗体や化合物にこれらの蛍光色素を付加したもので細胞内の分子を標識することとなる。なるべくバックグラウンドが低く、シグナルノイズ比の高いシグナルが得られる抗体の組み合わせと条件を設定する。

包埋剤（マウント剤）

- ・ 構造化照明がサンプルに照射されるためには、対物レンズからの光が透過するの液浸、ガラス、サン

プルを満たしている溶液の屈折率が同じであることが理想である。各々の屈折率が異なると球面収差によって構造化照明が崩れてしまい超解像効果が低下してしまう。細胞を満たす方埋剤はガラスに近い屈折率のものを用いる。また、蛍光の退色を軽減する退色防止剤を用いる。市販のものとして、Vectashield (VECTOR LABORATORIES, INC.), Prolong Gold (Thermo Fisher)等がある。

カバーガラス、ガラスボトムディッシュ、チャンバースライド

- 細胞を付着させる基盤として用いる。液浸を通過した構造化照明が次に通過するものであり、球面収差の影響を減らすために厚さが均一であることが重要である。カバーガラスは、厚みの精度を揃えているグレードのものを用いる。JIS規格 No. 1S (松浪硝子社) 厚さ0.17 mm ± 0.01の規格のカバーガラス (Marienfeld社)、このカバーガラスを用いたガラスボトムディッシュ (Marienfeld社) など

蛍光ビーズ (オプション、下記は各メーカーにより調整済みの場合は省略)

- SIMによる超解像では、構造化照明が通過するサンプルの屈折率の違いによる球面収差の影響をうける。それ以前に、対物レンズの球面収差が補正されていることも重要である。球面収差は、カバーガラスの厚みによって対物レンズにある補正環で調整する必要がある。蛍光画像を取得する上で、対物レンズの調整、液浸、ガラス、包埋剤が適切であることを確認するために、蛍光ビーズを使って点像分布関数(Point spread function: PSF)を確認するとよい。PSFは点光源を焦点面の上下から撮影し、光源がZ方向にどのようにぼけていくかを示すものである。焦点面にシグナルがまとまり上下方向に対称にそのシグナルが広がっていくように見えるものが良好な状態である (下図)。実際に撮影する条件でPSFをみることで撮影の精度を判断できる。PSFがきれいにできない場合は、レンズの補正環の位置、包埋剤、液浸などの条件を最適化することが必要となる。



汎用の励起光で励起される蛍光ビーズ(直径が 100~200 nm 程度)をピントの合う位置の上下から断層像を撮影し(100~200 nm 程度のステップ)、X-Zの断層像を作製する(左図)。焦点より上下対称に光が広がる状態(左図 中央)が適正である。

装置

- 構造化照明の照射機能を有し高感度CCDカメラを備えたSIM撮影用の蛍光顕微鏡 (Zeiss, Leica, Olympus, Nikon各社) を用いる。各社の顕微鏡を制御するソフトウェアによりSIMの撮影を行う。

対物レンズ

- 開口数の高い高倍の液浸レンズで収差を低く抑えたもの。(油浸の100倍 NA1.4など) 各社、イメージジョンオイル、水、グリセロール、シリコーンなどの液浸の高性能レンズを用意している。

観察の手順

SIMによるサンプルの撮影は、各社のシステムの手順に従って行う。サンプル撮影にあたり各ステップの注意点を記述する。

サンプルの用意

- JIS規格No. S1の0.17 mmの厚みのカバーガラス、又は、それに準じる精度のカバーガラス上に細胞を播種し、個々の目的に合った操作を行う。
- 細胞を観察対象にあった方法で固定を行い、蛍光抗体、蛍光色素標識試薬によって染色を行う。細胞膜を可溶化しないホルマリンなどの固定では、Triton X-100による膜の透過性の確保を行う。
- 染色後、包埋剤（Prolong Goldなど）でスライドガラス上などに細胞を封入する。包埋剤が固化するものは一晩置いて固化させる。固化しないものは、周囲を蛍光の低い透明なマニキュアによりシールする。

顕微鏡の用意

- 超解像顕微鏡は、計算に用いる同一視野の画像がずれていると解像力が極端に落ちるため、撮影する視野が動かないように除振台の上に設置されている。顕微鏡が除振台上に無い場合は、周囲から振動を軽減する措置をとる必要がある。また、温度の変化による顕微鏡本体、ステージのドリフトも画像のずれの原因である。室温を一定にして、使用する2～3時間前に装置の電源を入れ、温度が安定するようにすることが望まれる。また、PCのモニターの明かりなどの外部からの光を極力遮断することが望まれる。（SIMの場合は1視野で撮影する枚数が10枚程度と少なく、解像度もさほど高くないためドリフトによる影響は受けにくい）

サンプルの設置と補正環の調整

- 各社推奨の液浸を対物レンズにのせてサンプルをステージに動かないように設置する。サンプル、液浸がステージや対物レンズと同じ温度になるようにする。
- 通常の撮影で0.1～0.3 μm程度のステップで対象をZ方向に全てカバーするようにZスタックを撮影する。
- (オプション) 蛍光ビーズをサンプルと同様に包埋したものを作成しZスタックを撮影しPSFの形状を確認する。（前述）
- X-Zの断層像を見て蛍光が上下に対称に広がっているかを確認する。対称ではない場合、対物レンズの補正環で調整する。補正できない場合は、包埋剤、液浸の組成（屈折率の異なるもの）を検討する。
- SIMのモードにして撮影し、構造化照明（縞模様）がはっきり見えることを確認する。
- 複数枚を撮影しステージのドリフトがないことを確認する。
- 各社のプロトコールに従い撮影を行い、超解像画像を作製する。

参考文献：「初めてでもできる超解像イメージング」実験医学別冊 最強のステップUPシリーズ 岡田康志編

評価

中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況

平成 25 年 9 月 5 日に行われた中間評価では、領域全体の進捗状況に対し、審査部会からは「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。」と「A」評価を受けた（平成 25 年 10 月 7 日付）。個々の計画研究に対する評価も全て「A」であった。

一方で、いくつかの指摘もあり、それには下記の通り対応した。

1「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できれば、本研究のさらなる飛躍が期待される。」これに対しては、若手女性研究者である今村を公募研究代表者として採択し、今村自身は FGF による肺気管支の分岐の数理的解析に関する成果を得た。菊池は、Wnt シグナルの活性化による頂側収縮 (apical constriction) と細胞伸長作用により肺上皮組織の分岐の位置が空間的に適正に調節される機構を 3 次元培養法により見出したが、さらに今村が数理シミュレーションすることにより、本機構の存在を *in silico* で証明した。

2「管腔形成、上皮化、細胞極性という既存の概念の組み合わ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」これまでの 2 次元平面の解析では、上皮管腔構造形成の分子機構は十分に理解されていなかったが、本領域研究において鈴木 (淳) は、3 次元再構築モデルを用いた時空間的な観察と形態計測学的解析による定量的な解析を行うことにより、肝内胆管が実際は細い未熟な胆管の網目構造が極性化を伴いながら、増加と選択を経て形成されることを見出した。菊池は、肺胞の 3 次元上皮細胞培養と器官培養を用いて、肺胞形成において上皮細胞の頂側収縮と間質側への増殖が、適切な分岐誘導に必須であることを数理モデルとともに明らかにした。これらの上皮形態形成にメカノストレスが重要であると考えられるが、大橋が上皮管腔組織の形態形成において管腔を構成する個々の細胞の増殖と分化を時空間的に制御するメカノストレス応答に依存した新たな分子機構が存在することを示した。これらの研究成果から、上皮細胞内骨格の動的制御を基盤とした上皮細胞-上皮細胞と上皮細胞-間質細胞の相互作用により、形づくりが行われることが考えられた。

3「新分野への発展、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」。これに対して、本研究領域では幹細胞の【幹】、管腔形成の【管】、疾患の【患】という 3 つのキーワードを設定し、各計画研究班と公募研究班がこれらのキーワードを共有化して新規の上皮管腔形成制御機構を解明した。例えば、菊池は管腔形成機構【管】を担当して解析を進め、その結果新規の制御因子として Ar14c を同定した。Ar14c は Wnt と EGF という 2 つの「協調的液性因子シグナル」によって発現が誘導されることが明らかとなった。Wnt や EGF シグナルの同時活性化はヒト癌の重要なシグナルであることが知られていることから、癌における Ar14c の関与を検討し、少なくとも大腸癌、肺腺癌では Ar14c が腫瘍形成を促進する分子として機能することが判明した。この成果によって、管腔形成/Tubulogenesis【管】と腫瘍形成/Tumorigenesis【患】の 2 つのキーワードを Ar14c という分子によって共通の機構で理解することが可能になった。管腔形成と腫瘍形成を共通の概念として理解できたことで、これまでに

注目されていない新たな癌分子標的を今後多数同定できる可能性があり、新分野への発展につながることを期待された。【幹】から【管】については、鈴木（淳）と大野が見出した Tbx3 と aPKC が上皮組織幹細胞から管腔構造形成に重要であるという知見が、今後肝臓や乳腺組織の他の研究に応用されることが期待される。

4 「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。」 これに対して、鈴木（淳）は、Wnt シグナルによる Tbx3 の発現を介して肝芽細胞が前駆状態を維持して、肝芽細胞から分化した胆管上皮細胞が内腔をもつ小さなシストを形成し、それらが徐々につながって網目構造を形成していくことを明らかにした。こうした管腔形成様式は他の器官ではあまり見られないことから、肝臓内の胆管形成に特異的なものと考えられた。菊池は少なくとも肺、腎臓、唾液腺という3つの臓器で Wnt シグナルが共通して、管腔形成において前駆細胞の維持に必要であることを明らかにした。しかし、Wnt シグナルは肺においては主に上皮の極性制御、腎臓においては増殖の制御、唾液腺においては分化の制御に重要であり、臓器毎の Wnt による制御特異性が認められた。Wnt シグナルは肺においては MARK1、腎臓においては Ar14c、唾液腺においては Myb の発現を誘導することから、このような器官特異的な標的遺伝子の発現が個々の器官特異的な原理につながることを解明できた。南は異なる器官由来の癌細胞において、PCP 経路を促進する Wnt シグナルが恒常的に活性化することにより、分子種は異なるものの同じ MMP ファミリーに属する分子の発現を共通して誘導し、がんの浸潤能を亢進させることを見出した。これらの一連の研究結果から、いくつかの上皮管腔器官においては、Wnt シグナル経路が上皮細胞の形態形成のための組織幹細胞の未分化能の維持に重要という共通原理が見出され、その後に発現する分子種の違いが組織、細胞毎に異なり、固有の形づくりを可能にしていくことが示唆された。

事後評価

平成 28 年 9 月 14 日に行われた領域に対する事後評価では、「A」（研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの成果があった）であった。所見として下記のものが挙げられた（平成 29 年 1 月 13 日付）

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という設定目標に向かい、上皮管腔形成が幹細胞からの細胞供給により起こり、さらに臓器間に共通した分子基盤により行われることを示すなど、総合的に期待どおりの成果が上がったと言える。管腔構築の破綻に関しては該当領域は広いが、中でも浸潤、奇形発生に関しては具体的な成果が上がっている。

計画研究・公募研究間での共同研究により、研究領域内の連携は密に行われていると評価され、本研究領域を形成したことにより得られた成果は多いと考えられる。また、若手研究者が本研究領域での成果により文部科学大臣表彰の受賞やキャリアアップを果たしており、本研究領域への参画が、若手研究者の育成に貢献していると評価できる。

研究成果は論文の発表にとどまらず、開発した技術の普及を目指した講習会を行なうなどにより、領域外の研究者にも十分に還元されている。

今後、本研究領域の成果を踏まえ、ここで明らかになったがん浸潤、奇形発生といった一部の障害の理解にとどまらず、他の障害にも展開し、上皮管腔形成の破綻について統合的な機構の解明により、さらに本研究領域の発展が図られることが期待される。

総括班評価委員による事後評価

竹縄忠臣（神戸大学医学系研究科・特命教授）

上皮細胞の管腔形成は様々な組織や器官の形作りの第一歩であり、その機序解明は組織、器官形成という生物学的に極めて重要な現象の解明につながる。今日個々の上皮細胞の極性形成のメカニズムや細胞接着の制御機序などについてはかなり明らかになってきた。しかしそれらを統合して管腔形成や組織形成へ至る機序はあまり分かっていなかった。そういう意味で本新学術領域「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」が平成23年度に発足したのはタイムリーであった。

ここ5年間の研究で成し得たこととして、特筆できるのは正常な器官発生を行うには組織幹細胞の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に Wnt シグナルが重要であることを解明し、その下流因子として Tbx3 や Arl4c や P2Y2R などと同定し、それらを介して組織特異的な管腔形成が行われることを解明した。このような研究から Wnt による同一の液性因子シグナルという臓器ごとの制御の共通性と異なる標的遺伝子を介する独立した機能制御という臓器ごとの相違の機序を解明できた。一方で、Wnt11, Wnt5a, Ror2 の KO マウスで生じる腸管形態形成異常に INM(interkinetic nuclear migration)が関与し、INM の異常が形態形成異常に関わっていることや PCP シグナル異常が腎臓や尿管の奇形を起こすことなども解明した。

これらの研究成果は管腔形成に関与する膨大なシグナル伝達の一部を解明したことになるのかもしれないが、Wnt を中心とした管腔形成の基本的なシグナル伝達系を明らかにしたことは高く評価できる。当初に目的とした「異なる学問分野の研究者が違う視点や手法を持って共同研究を行い、研究領域の発展を目指す」に関してはお互いに多くの班員同士が共同研究をして、一グループだけの研究では生まれなかったような成果を数多く出し、この試みは成功したと言える。若手の育成についても次世代に活躍する多くの若手の研究者を育て、独立した研究者として世に送り出している。

本多久夫（神戸大学医学系研究科・客員教授）

本領域の研究目的は「上皮管腔組織の形成が極性シグナルなどシグナルの制御によりなされている」を明らかにすることである。この研究内容は上皮管腔組織の維持の機構や、それが破綻したことによる疾患にもつながる。このように研究全体は広範囲におよぶから本領域でなされたことは多岐にわたる。この多くは高く評価されるものであった。しかしこの事後評価ではこれらの成果には言及せずに本題に立ち返り、管腔組織の形成メカニズムがどのように解明されたかに注目したい。ここにシグナルの制御が大きく関与していることは予想されていたことであるが、いくつかのシグナルが驚くべき緻密さで互いに連携し一つのストーリーをつくっていたことが明らかになった。この点で本領域の目的の主要なところは達成されたと考える。

上皮細胞が集まって内腔をアピカル側とする小胞（シスト）が作られることは周知の事実である。この小胞が管状に伸びたり枝分かれしたりする機構が謎であった。小胞は Wnt と EGF シグナル環境下で細胞増殖を起こし、低分子量 G タンパク質 Arl4c および P2Y2 receptor を発現する。Arl4c は細胞内で Rac 活性を高め、また Rho 活性を抑えて細胞が動き、柔らかくなり、変形できるようにする。増殖でできた突起の先端の細胞はこれにより大きくなり、大きくなったことで Hippo 系の YAP が核内に入り細胞は増

殖する。こうして Arl14c が働くことにより細胞が柔軟になり局所的な細胞増殖がおこって空胞は管になりまた枝分かれするのである。また Wnt と EGF シグナル環境下でできた P2Y2 receptor は、インテグリンを介し細胞外基質との接着を変化させ、空胞の変形すなわち管腔形成を起こしやすくする。このようにいくつかのシグナルの制御が絡み合っただけで細胞が形態形成を行うことが具体的に明らかになった。ここで重要な働きをした Arl14c が癌疾患でも大きな働きをすることが示された。

もう一つ注目したいことは、上皮組織形成と力との関係である。形態形成は細胞の具体的な並び替えであるから力を伴うはずであるが、細胞が力をシグナルと感知して反応する現象はこれまで研究が少なかった。力に反応する血管内皮細胞での Rho-GEF が探索され、その中の一つに SoLo があり、これと結合するタンパク質に中間径フィラメントであるケラチン 8/18 繊維と結合するものが見つかった。中間径フィラメントは細胞骨格として古くから知られ、力に関与すると想像されながら詳しい研究は後回しになっていた。細胞が力を感知すること、そこに中間径フィラメントが関与していることがわかり、これまで重要とは考えられながら手つかずであった分野に研究のきっかけができた。

具体例としては以上 2 件を取りあげたが、本領域で出た成果はこれからの上皮組織研究に大きな寄与をなすものがたくさんあると考えている。今後、この新学術領域研究上皮管腔組織形成が実施されたから進んだという例が続出するだろう。領域内での連携状況、若手研究者の育成、総括班の企画・運営・活動状況などについては中間評価の時に述べた通りのことがその後も継続され良好であった。

宮島篤（東京大学分子細胞生物学研究所・教授）

上皮管腔組織は肺や肝臓、腎臓などの器官の構築には必須の構造であり、本研究領域は、器官の正常な形成およびその破綻を管腔構造という視点から解析した。上皮管腔組織の形成・維持・破綻の分子機構の解明を目指して、幹細胞学、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の有機的な連携により研究が進められた。(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ことから、2つの研究項目を設定し、計画班員として、組織幹細胞の分離、3次元培養法、機能解析法、イメージング解析法などの技術を有する研究者に加えて、上皮管腔組織の破綻に伴う疾患を扱う研究者を集めた。さらに、公募班員として42名（前半25名、後半17名）の上皮管腔形成のみならず、神経や血管系、3次元培養やイメージングなど管腔形成に関与する研究者を幅広く採用しており、バランスのよい配置になっている。一方、本領域に限らず他の領域においても感じられることであるが、公募班員の入れ替えの合理性にはやや疑問が残る。現在の公募班員の選考では、外部評価委員の意見が強く反映されるようだが、基本的には領域代表を中心とする計画班／総括班の意向が尊重されるべきではないかと思う。

上皮管腔組織の形成と維持に関与する細胞内外のシグナル分子および転写因子による臓器の遺伝子発現を介する発生や再生、そして疾患のメカニズムについての解析が進み、数多くの成果が発表された。管腔形成が器官形成に極めて重要であることは論を待たないが、本領域では、さらにそれに関連する多くの分野を「管腔学」という形に統合した研究領域へと発展させた。そのために、領域代表の強力なリーダーシップの下に、技術講習会の開催など技術や情報の共有化を図るなど交流を積極的に行われ、領域内での共同研究が活発に行われており、優れた多くの研究成果に反映されている。発表された論文の

質と量が示すように、当初の目標であった管腔形成の組織幹細胞から疾患までの理解が大きく進展しており目標は十分達成されたといえる。また、本領域に関わった若手研究者の活躍は顕著であり、本領域が若手研究者のキャリアアップに寄与したことは高く評価できる。