

令和元年5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08272

研究課題名(和文) Wntシグナルによる外分泌腺上皮の組織構築制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of exocrine glands development by Wnt signaling

研究代表者

松本 真司 (Matsumoto, Shinji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20572324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺の発生過程において、Wntシグナル活性は分岐形態形成を認める発生前期で最も高く、発生後期の腺房分化に向けて経時的に減少した。発生前期におけるWntシグナルの活性化はSCF受容体であるKITの発現を抑制することによって腺房分化の進行を抑えていた。発生後期ではWntシグナル活性の減弱にもなって、end budにおけるKITの発現が上昇し、AKTの活性化を介した腺房化が誘導された。本研究から、WntとKITシグナルの活性化バランスが器官形成過程における“形づくり”から“分化(機能獲得)”へのスイッチングを調節する新たな機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胎生期唾液腺をモデルとして、今回新たに確立した各種上皮単独培養法を用いて、生体内で起きている複雑な形態形成と分化のプロセスをin vitroで再現した。本研究成果は種々の管腔臓器の発生と再生の仕組みを理解するための分子基盤を提供するものであり、再生医療を現実のものにするための必須の事項である。また、正常な組織形成・維持のメカニズムの解明はその破綻に基づくがんの病態を理解する上でも重要であり、本研究は学術的に重要であるばかりでなく、医療という側面において社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Growth factor signaling is involved in the development of various tubular organs, but how signaling regulates organ early morphogenesis and late differentiation remains to be clarified. Experiments using genetically manipulated mice and organ cultures revealed that Wnt signaling at early stage of submandibular salivary gland (SMG) development inhibits end bud differentiation into proacini by suppressing KIT expression through the upregulation of the transcription factor Myb. In addition, Wnt signaling at the SMG development early stage promoted the expansion of end bud progenitor, leading to duct structure formation. In contrast, Wnt signaling reduction at a late stage of SMG development promoted end bud differentiation into proacini and suppressed duct morphogenesis. These results suggest that Wnt signaling activity fine-tunes the timing of end bud morphogenesis and differentiation into proacini, in co-operation with KIT signaling during salivary gland organogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：外分泌腺 唾液腺 Wnt

1. 研究開始当初の背景

肺や腎臓などの管腔臓器に加え、乳腺や唾液腺といった外分泌腺は上皮管腔組織と呼ばれ、器官ごとに特殊化した上皮細胞が管(チューブ)状の構造を形成している。上皮管腔組織は生命の維持に必須な排泄・吸収・分泌・交換といった生体内外での物質の出入りをつかさどっている。外分泌腺上皮は発生過程において、表面積を拡大するために分岐と伸長を繰り返しながら管腔構造を形成し、分泌物を産生する腺房上皮と分泌物を生体外へ輸送する導管上皮へと機能的に分化する(図1)。このような管腔上皮

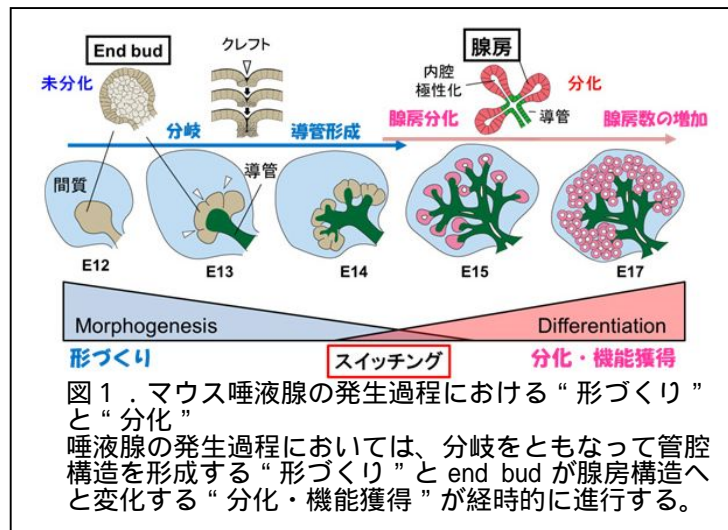


図1. マウス唾液腺の発生過程における“形づくり”と“分化”
唾液腺の発生過程においては、分岐をともなって管腔構造を形成する“形づくり”と end bud が腺房構造へと変化する“分化・機能獲得”が経時的に進行する。

の“分岐形態形成”と“機能的分化”のプロセスが協調的に進行することによって機能的な組織構造が構築されるが、その協調的制御機構は不明である。

唾液腺は代表的な外分泌腺の一つであり、組織構造が比較的単純で、マウス胎児唾液腺原基を用いた器官培養法も確立していることから、古くから上皮管腔形成のモデルとして解析されてきた。私共は最近、マウス胎生期(13日目)唾液腺原基を汎 Wnt シグナル阻害剤 (IWP2) 存在下で4日間原基培養すると、分岐形態形成が抑制され、器官の大きさが減少することを見出した。腺房上皮マーカー (AQP5) と導管上皮マーカー (KRT19) で染色し詳細な構造を観察したところ、終末部の分岐不全による腺房数の減少と、導管終末部の肥大化が認められた。腺房数の減少は外分泌腺の“分泌”機能に影響し、また導管は終末部に向けて先鋭化(先細り)することによって効率的な分泌物の流れ(輸送)を生み出すため、導管の終末部肥大化は“輸送”機能に影響を与えたと考えられた。一方興味深いことに、腺房の機能的分化(分泌能)を表す後期腺房分化マーカー PSP の発現は Wnt シグナルの抑制によって増加し、腺房の早期成熟の表現型を呈した。これらの結果は、Wnt シグナルが外分泌腺(唾液腺)の分岐形態形成と機能的分化の両プロセスを制御する新規の機構の存在を示唆するものであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、外分泌腺上皮の分岐管腔形成と機能的分化の関性に焦点をあてて、Wnt シグナルによる新規の形態形成制御機構を明らかにすることを目的とする。具体的には研究期間内に次の3点を明らかにする。

- (1) Wnt シグナルが唾液腺の分岐形態形成を制御する機構の解明
- (2) Wnt シグナルが唾液腺の機能的分化を制御する機構の解明
- (3) 唾液腺上皮の機能的な分化が分岐形態形成に与える影響の解明

3. 研究の方法

(1) Wnt シグナルが唾液腺の分岐形態形成を制御する機構の解析

Wnt/ -カテニン経路の唾液腺上皮における活性化パターンの解析

Wnt/ -カテニン経路が唾液腺上皮のどこで強く活性化しているかを明らかにする。形態形成にともなった時空間的な活性化のパターンをさらに詳細に明らかにするために Wnt/ -カテニン経路のレポーターマウスである Axin2-LacZ マウスを用いて、胎生 13-18 日目までの唾液腺原基を1日毎に摘出し、LacZ 染色を行う。

Wnt/ -カテニン経路が導管形成と導管部上皮前駆細胞に与える影響の解析

唾液腺原基の器官培養法を用いて、Wnt/ -カテニン経路を活性化させるリガンドである Wnt3a や CHIR99021 (GSK3 阻害剤) による処理が導管形成に与える影響を導管の長さ、太さ、分岐数を指標に検討する。また、Wnt/ -カテニン経路を抑制する目的で Wnt 分泌阻害剤である IWP2 が導管形成に与える影響を検討する。

また、導管部上皮には KRT5 または KRT14 陽性の多能性唾液腺上皮前駆細胞が局在し、KRT5/14 陽性細胞の増加は唾液腺の分岐形態形成を促進することが知られている。そこで、Wnt/ -カテニン経路の活性化もしくは抑制が上皮前駆細胞に与える影響について、リアルタイム PCR および免疫染色による KRT5/14 の発現や細胞局在を指標に検討する。さらに、Ki67 との共染色によって KRT5/14 陽性細胞の増殖についても評価する。

-カテニン非依存性 Wnt シグナルの唾液腺形態形成における役割の解析

-カテニン非依存性 Wnt シグナルの唾液腺形成への関与を明らかにする。代表的な -カテニン非依存性 Wnt リガンドに Wnt5a がある。Wnt5a のノックアウト (KO) マウスは顎顔面部、四肢等の形成不全を呈し、胎生致死となる。私共は Wnt5a KO マウスをすでに保有しているため、顎顔面部の形態に顕著な異常を認めない胎生 13 日目の唾液腺原基を摘出して原基培養を行な

い、Wnt5a KO が唾液腺の形態形成に与える影響を検討する。

(2) Wnt シグナルが唾液腺の機能的分化を制御する機構の解析

Wnt/ β -カテニン経路が腺房細胞分化に与える影響の解析

器官培養法と上皮単独培養法を用いて、Wnt/ β -カテニン経路の活性化が腺房の分化に与える影響について、腺房の前駆 (ETV4/5)、前期分化 (AQP5)、後期分化 (PSP) マーカーの発現を指標にリアルタイム PCR とウェスタンブロッティングで検討する。一方で、IWP2 が腺房の分化に与える影響を腺房マーカーの発現を指標に検討する。

他の液性因子と Wnt/ β -カテニン経路の相互作用が腺房細胞分化に与える影響の解析

唾液腺の発生には EGF や FGF といった他の液性因子 (増殖因子) が関与することが報告されている。そこで、特に腺房分化に必要な液性因子と下流のシグナルを EGF や FGF 受容体、MEK/ERK、AKT、JNK 等の阻害剤を用いて明らかにする。さらに、Wnt/ β -カテニン経路の活性化と抑制がそれらのシグナルに与える影響を生化学的に検討する。Wnt シグナルが相互作用する標的のシグナル経路が同定できた場合、相互作用 (活性化または抑制) のメカニズムを分子レベルで明らかにする。

(3) 唾液腺上皮の機能的な分化が分岐形態形成に与える影響の解析

唾液腺上皮の分岐は、終末小体/EB (将来の腺房) の上皮細胞間にクレフトと呼ばれる裂け目が入ることで形成される。この時、EB の上皮細胞は多層・非極性化状態にある。私共は腺房分化が後期 (PSP 陽性) まで進行すると EB の上皮細胞は単層・極性化して多数の緻密な腺腔構造を形成することを見出している。唾液腺の分岐は一定の段階まで発生すると停止するが、この分岐形成の停止が腺房上皮の分化およびそれにとまなう上皮の単層・極性化と相関するか否かを検討する。具体的には、上述 (2-) で明らかにした Wnt 以外の腺房分化シグナルを活性化または抑制することで腺房分化のタイミング・速度を早める、または遅らせた場合に終末分岐の形成 (腺房数、導管分岐) に影響するか否かを原基培養と導管/腺房形成型の上皮単独培養で検討し、Wnt シグナル抑制の表現型の再現を試みる。

4. 研究成果

(1) Wnt シグナルが唾液腺の分岐形態形成を制御する機構の解析

Wnt/ β -カテニン経路の唾液腺上皮における活性化パターンの解析:

Wnt/ β -カテニン経路の唾液腺上皮における時空間的活性化パターンを Wnt レポーターマウス (Axin2-LacZ) または、唾液腺局所の細胞を用いたリアルタイム PCR で検討した。Wnt シグナルの活性は発生初期には End bud (EB) 周囲の間質と上皮導管部で活性化しており、また EB 上皮でも弱い活性化を認めた。発生後期では導管部上皮を除く、周囲間質と EB における Wnt シグナル活性化が時間依存的に減弱した。

Wnt/ β -カテニン経路が導管形成と導管部上皮前駆細胞に与える影響の解析:

上皮単独培養系において、Wnt/ β -カテニン経路を活性化させるリガンドである Wnt3a や CHIR99021 による処理は、導管上皮の長さおよび太さを増加させた。さらに、導管部上皮に局在する前駆細胞マーカーである Krt5 の発現は Wnt シグナルの活性化によって増加した。一方で、Wnt シグナルの活性化によって導管形成が促進している状況下においても、EdU の取り込みを指標とした細胞増殖はコントロール群と比較して変化していなかった。

β -カテニン非依存性 Wnt シグナルの唾

液腺形態形成における役割の解析:

Wnt/ β -カテニン経路を活性化させる Wnt3a を唾液腺上皮に過剰発現させると導管形成の活性化を認めたが、 β -カテニン非依存性 Wnt シグナルを活性化させる代表的リガンドである Wnt5a は唾液腺上皮の形態に影響を与えなかった。さらに、Wnt5a のノックアウト (KO) マウスから摘出した胎生 13 日目の唾液腺を器官培養したところ、野生型と比較して顕著な形態学的表現型を認めなかった。

(2) Wnt シグナルが唾液腺の機能的分化を制御する機構の解析

Wnt/ β -カテニン経路が腺房細胞分化に与える影響の解析:

Wnt シグナルを恒常的に活性化したマウス

(安定型 β -カテニン発現マウス) の唾液腺において、胎生 17 日目における腺房分化が著しく抑制された (図 2)。Wnt/ β -カテニン経路を CHIR99021 (GSK3 阻害剤) で活性化すると前期腺房分化マーカー AQP5 に加え、後期腺房分化マーカー PSP の発現が強く抑制された。また、IWP2 (Porcupine 阻害剤) 処理による Wnt シグナル (β -カテニン経路および β -カテニン非依存

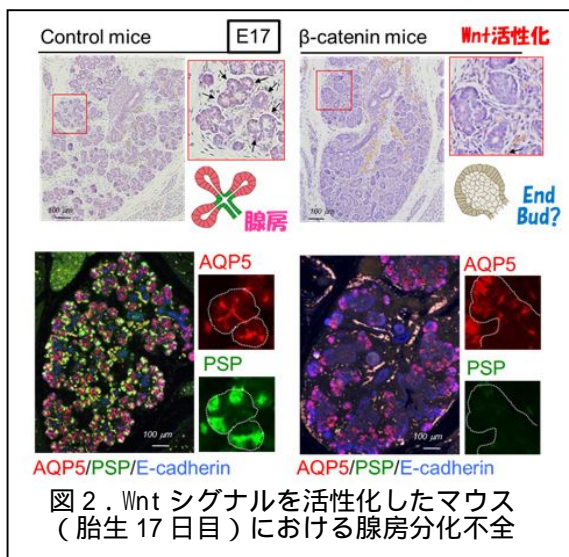


図 2. Wnt シグナルを活性化したマウス (胎生 17 日目) における腺房分化不全

性経路)の抑制によって認められる腺房分化促進の表現型は、CHIR99021 処理によってキャンセルされたことから、Wnt シグナル、特に Wnt/ -カテニン経路が唾液腺の腺房分化を負に制御することが明らかになった(図3)。

他の液性因子と Wnt/ -カテニン経路の相互作用が腺房細胞分化に与える影響の解析:

Wnt/ -カテニン経路の活性化によって唾液腺上皮において AKT のリン酸化が抑制されることが明らかになった。EGFR、FGFR、KIT といった増殖因子受容体阻害剤で唾液腺を処理したところ、AKT のリン酸化は FGF-FGFR または SCF-KIT シグナルに依存していた。CHIR99021 処理は FGF シグナルの標的遺伝子である Etv4/5、Ccnd1

等の発現に影響しなかったことから、Wnt/ -カテニン経路は SCF-KIT シグナルを介して AKT の活性化に関与する可能性が示唆された。Wnt/ -カテニン経路が SCF-KIT シグナルに与える影響を検討したところ、CHIR99021 処理によって KIT の発現が mRNA レベルで抑制された。そこで、KIT の遺伝子発現制御に関わる転写因子群の発現を検討したところ、CHIR99021 処理によって Myb (転写促進・抑制の両作用あり)の発現が増加した。そこで shRNA を用いて唾液腺上皮で Myb を発現抑制したところ、KIT の発現が増加するとともに、腺房分化が促進することが明らかになった。

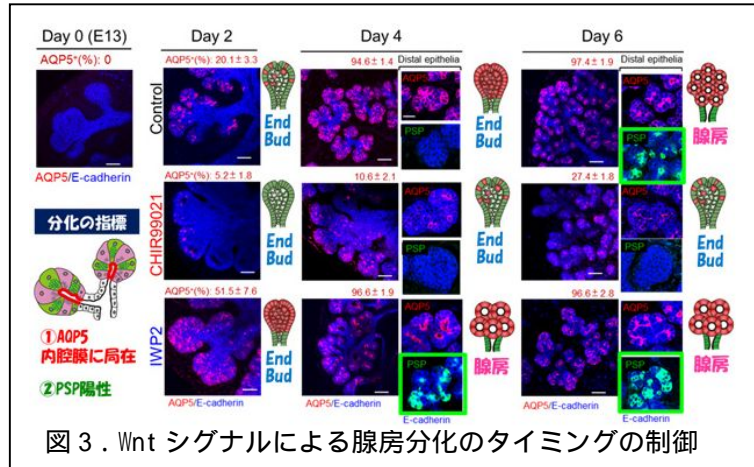


図3. Wnt シグナルによる腺房分化のタイミングの制御

(3) 唾液腺上皮の機能的な分化が分岐形態形成に与える影響の解析

CHIR99021 による Wnt シグナルの活性化によって腺房分化が抑制されるのとともに導管構造の過形成・肥大化を認めた。細胞増殖活性について EdU を指標に検討したところ、細胞増殖は遠位側腺房部でのみ活性化していたことから、肥大化した導管細胞は遠位腺房部細胞由来である可能性が示唆された。そこで、光変換蛍光蛋白質 KikGR (Kikume Green-Red) を唾液腺上皮に発現させ、遠位端細胞を蛍光標識後 CHIR99021 処理をしたところ、遠位端由来細胞が近心導管部へ移動する様子が観察され、Wnt シグナルの活性化によって近心側への細胞移動が亢進することが明らかになった。これらの結果から、Wnt シグナルは遠位端細胞の腺房細胞への分化を抑制するとともに導管部への細胞移動を亢進する結果、唾液腺形成の初期過程において導管形成を促進することが明らかになった。また、Wnt シグナル依存的に導管部で増加する未分化な細胞が AQP3 を特異的に発現することを見出し、FACS に使用可能な AQP3 に対するモノクローナル抗体の作製に成功した。

本研究から、Wnt と KIT シグナルの活性化バランスが器官形成過程における“形づくり”から“分化(機能獲得)”へのスイッチングを調節する新たな機構が明らかになった(図4)。

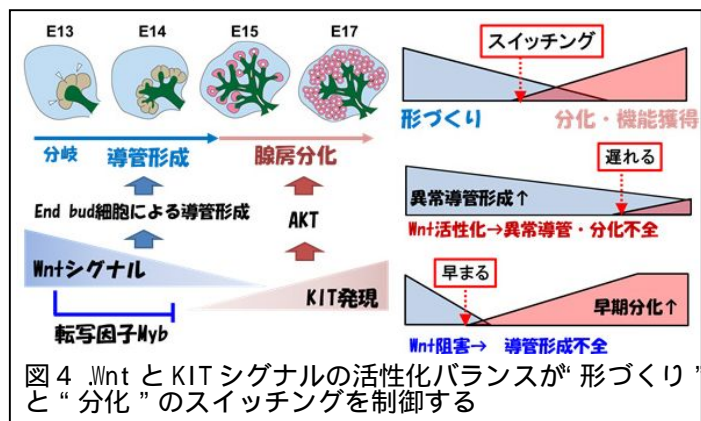


図4. Wnt と KIT シグナルの活性化バランスが“形づくり”と“分化”のスイッチングを制御する

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10件)

1. Harada T, Matsumoto S, Hirota S, Kimura H, Fujii S, Kasahara Y, Gon H, Yoshida T, Itoh T, Haraguchi N, Mizushima T, Noda T, Eguchi H, Nojima S, Morii E, Fukumoto T, Obika S, Kikuchi A. Chemically Modified Antisense Oligonucleotide Against ARL4C Inhibits Primary and Metastatic Liver Tumor Growth. *Mol. Cancer Ther.* 18(3):602-12. 2019. (査読有)
2. Yamamoto H, Umeda D, Matsumoto S, Kikuchi A. LDL switches the LRP6 internalization route from flotillin dependent to clathrin dependent in hepatic cells. *J. Cell. Sci.* 130(20):3542-56. 2017. (査読有)
3. Matsumoto S, Fujii S, Kikuchi A. Arl4c is a key regulator of tubulogenesis and tumorigenesis as a target gene of Wnt- -catenin and growth factor-Ras signalling.

- J. Biochem.* 161(1):27-35. 2017. (査読有)
4. Fujii S, Shinjo K, Matsumoto S, Harada T, Nojima S, Sato S, Usami Y, Toyosawa S, Morii E, Kondo Y, Kikuchi A. Epigenetic upregulation of ARL4C, due to DNA hypomethylation in the 3'-untranslated region, promotes tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7(49):81571-87. 2016. (査読有)
 5. Lim BC, Matsumoto S, Yamamoto H, Mizuno H, Kikuta J, Ishii M, Kikuchi A. Prickle1 promotes focal adhesion disassembly in cooperation with the CLASP-LL5 complex in migrating cells. *J. Cell. Sci.* 129(16):3115-29. 2016. (査読有)
 6. Matsumoto S, Kurimoto T, Taketo MM, Fujii S, Kikuchi A. The WNT/MYB pathway suppresses KIT expression to control the timing of salivary proacinar differentiation and duct formation. *Development* 143(13):2311-24. 2016. (査読有)
 7. 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- in colitis. *Sci Rep* 5:10536. 2015. (査読有)
 8. Fujii S, Matsumoto S, Nojima S, Morii E, Kikuchi A. Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and may represent a novel therapeutic target. *Oncogene* 34(37):4834-44. 2015. (査読有)
 9. Ibuka S, Matsumoto S, Fujii S, Kikuchi A. The P2Y₂ receptor promotes Wnt3a- and EGF-induced epithelial tubular formation by IEC6 cells by binding to integrins. *J. Cell. Sci.* 128(11):2156-68. 2015. (査読有)
 10. Yamamoto H, Awada C, Matsumoto S, Kaneiwa T, Sugimoto T, Takao T, Kikuchi A. Basolateral secretion of Wnt5a in polarized epithelial cells is required for apical lumen formation. *J. Cell. Sci.* 128(5):1051-63. 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 3件)

松本 真司、唾液腺における Wnt シグナル依存的新規前駆細胞の同定と機能解析、生化学会大会、2018

松本 真司、Wnt と KIT シグナルの活性化バランスによる唾液腺の形づくりと機能獲得過程の制御、歯科基礎医学会、2016

松本 真司、Wnt/ -カテニンシグナルは終末部上皮の腺房化の調節を介して胎生期唾液腺の形態形成を制御する、日本分子生物学会年会、2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学医学系研究科 分子病態生化学ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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