

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590243

研究課題名(和文)細胞外シグナルが多細胞体制の構築に関わる機構の解析

研究課題名(英文) Roles of basement membrane-actin cytoskeletal system on the epithelial branching of embryonic submandibular gland of mouse

研究代表者

門谷 裕一 (KADOYA, Yuichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：10185887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、分枝形態形成における基底膜-アクチン細胞骨格系の役割を明らかにすることを最終目的とし、種々条件下で培養したマウス胎仔顎下腺(上皮)に細胞骨格系の機能阻害剤、プレビスタチンやPF573228、を添加しそれぞれの効果を細胞骨格の分布、分枝形態形成に際しての細胞の移動の観点から比較検討した。その結果焦点接着キナーゼのリン酸化が唾液腺分枝形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、ミオシンIIの活性はクレフト形成を抑制している可能性が示唆された。しかしながら、クレフト形成やその伸長機構は将来の課題として残った。

研究成果の概要(英文)：I attempted to clarify roles of the basement membrane-actin cytoskeleton system for the epithelial branching morphogenesis. Submandibular rudiments from the embryonic day-13 mice were dissected and cultured. Some rudiments were further treated with dispase and the epithelia were separated. Then they were monolayer-cultured on the iMatrix511-coated culture dish, or embedded within the Matrigel. Effects of a myosin II inhibitor, blebbistatin, and a focal adhesion kinase inhibitor, PF573228, were tested in these culture conditions. The phosphorylation of the focus adhesion kinase was found to play roles for the salivary gland branching morphogenesis. A suppressive role of the myosin II was also suggested for controlling the clefting. However, mechanism controlling the initiation and elongation of cleft remained for the future studies.

研究分野：解剖学(含む組織学)

キーワード：唾液腺 分枝形態形成 細胞骨格 焦点結合 ライブイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

発生期の上皮系組織は、周囲の間葉組織と相互作用をくり返しながらか、特徴的な構造や機能を獲得する(組織形成)。この組織間の相互作用を司る実体(分子)には、各種の液性増殖因子や、細胞外マトリックスの成分がある。筆者は細胞外マトリックス分子のラミニンに注目し、主に唾液腺組織形成におけるラミニン分子の機能を微細構造、器官培養、免疫組織化学などの手法で研究してきた。これらの細胞外のシグナルは直接には腺組織を構成する細胞に作用し、その結果生じる個々の細胞の変形、運動、分裂の総体として組織レベルでの構造・機能発現が起こるわけだが、従来の組織形成メカニズムの研究にはこの細胞の視点が大きく欠けていた。

## 2. 研究の目的

筆者は、共焦点レーザー顕微鏡上に設置したガラスボトム培養皿内に置いた丸ごとの器官を細胞膜非透過性の蛍光トレーサーを添加した液中で培養し、組織形成期における器官を構成する1つ1つの細胞の動態を、生きたままタイムラプス観察する手法 extracellular polar-tracer time-lapse (EPTTL 法)を開発した。この方法は、組織中の生きた細胞の運動を高い時間・空間分解能でムービーとして記録できる。実際これを駆使して、マウス唾液腺原基の個々の細胞の振る舞いを追跡したところ、組織形成過程では上皮細胞が組織内で極めてダイナミックに運動し、またその形態を変化させるという新知見を得ている。

本研究は、旧来の手法で明らかにしてきた腺組織構造形成における細胞外シグナル研究の成果を背景に、細胞外シグナルの作用を組織中の1つ1つの細胞の振る舞いの変化として捉える。そして、これらの知見を総合することで、分子細胞組織という生命現象の階層性をふまえた組織形成メカニズムの理解を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 器官培養と細胞培養

妊娠日確定 ICR 系マウスは、SLC (浜松) 又は日本クレア (東京) より購入した。母獣を頸椎脱臼法で安楽死させ、胎生 13 日目(臍線確認日の朝の胎子を胎齢 0 日とする)胎子より顎下腺原基を取りだした。原基は、ただちにニュークリポアメンプレ(Whatman、GEヘルスケア、東京)に載せ 5 µg/ml トランスフェリン含有 DMEM/F12 (GIBCO、ライフサイエンステクノロジー、東京)でフィルター上培養、又は、0.5%マトリゲル(成長因子低減タイプ、コーニング、東京)でコートしたガラス底培養皿(イワキ、東京)上で少量の 10%牛胎仔血清含有 DMEM/F12 で培養した。一部の顎下腺はデイスパーゼ(合同酒精、東京)処理(1000U/ml、20分)後、実体顕微鏡下で上皮を分離し、マトリゲルに

包埋し 2ng/ml EGF と 200ng/ml FGF7 (いずれも R&D Systems、Minneapolis) と 5 µM リゾホスファチジン酸を添加した 0.1% BSA 含有 DMEM/F12 でマトリゲル包埋培養、又は、iMatrix511 (ニッピ、東京)でコートした培養皿に載せ少量の 10%牛胎仔血清含有 DMEM/F12 で単層培養した。

### (2) タイムラプス顕微鏡法

マトリゲルに包埋顎下腺上皮の一部は、顕微鏡用インキュベーター(東海ヒット、富士宮)をセットした倒立顕微鏡上におき、75秒間隔でタイムラプス撮影した。Bleb を添加する場合は、O-560 フィルター(オリンパス、東京)を用いて 560nm 以下の光を遮った。ガラス底皿培養では、培養液に sulforhodamine B を添加(終濃度 2.5 µM)した後、顕微鏡用インキュベーターをセットした共焦点顕微鏡(C2、ニコン、東京)にセットし、水浸 40 倍レンズで、75秒間隔でタイムラプス撮影した。撮影に際しては、いずれも最小の光量で良好長路凹がとれるようにレーザーの光量とカメラやフォトマルの感度を調整した。タイムラプス映像は、6 フレーム/秒(450 倍速)で動画として再生し細胞の動態を観察した。

### (3) 阻害剤

ミオシン II 阻害剤の-/blebbistatin(和光、東京、以下 Bleb と略)と Focal adhesion kinase (FAK) 阻害剤の PF573228 (シグマアルドリッチ、東京、以下 PF と略)は DMSO にそれぞれ 5mM と 2mM で溶解し、目的の終濃度に培養液で希釈した。とでは培養開始 2 時間後から、とでは一夜培養後から各阻害剤を添加した。

### (4) 蛍光抗体法

単層培養した顎下腺上皮は阻害剤添加後 3 時間後に 4%フォルムアルデヒドで固定した。0.5%tritonX-100 処理と 1%BSA によるブロッキング処理(各 1 時間)の後、rhodamine 標識 phalloidin (Molecular Probe、1:200)、Alexa488 標識抗 FAK clone 4.47 抗体 (Millipore、1:200)または biotin 標識抗リン酸化チロシン clone4G10 抗体 (Millipore、1:200)と 1 時間反応させた。biotin 化抗体の検出には Alexa488 標識 streptavidin (Molecular Probe、1:250)を用いた。

## 4. 研究成果

(1) フィルター上培養で、Bleb と PF が顎下腺分枝形態形成を阻害するのに要する最低濃度の検討を行った。Bleb 7.5 µM の条件で 2 日間培養すると分枝形態形成の明瞭な遅れと形態の異常を認めた。Bleb 0.75 µM とすると、この遅れはほとんど認められなくなった。PF は 2 µM で顎下腺原基の発育をほぼ完全に阻害した。0.4 µM でも明らかな阻害効果が認められたが、50nM ではほとんど阻害効果を認めなかった。これらの条件で、Bleb や PF の溶媒として用いた DMSO の濃

度は0.2%以下であり、この濃度以下のDMSO単独では顎下腺の分枝形態形成に異常は生じなかった。これらより、BlebとPFの阻害効果を検討する際の濃度として、7.5 μMと2 μMを用いることとした。

(2) 顎下腺上皮単層培養でのBlebとPFの効果を細胞骨格系に注目して蛍光抗体法で調査した。無処理の単層培養顎下腺上皮には、細胞境界部に沿った明瞭なアクチン線維束と、細胞内のストレス線維が明瞭に観察された。ストレス線維の遠位端にはFAKが集積した焦点結合が形成され、リン酸化チロシン抗体により、焦点結合の構成タンパクがリン酸化されていることが判った。Bleb添加後3時間では、ストレス線維が消失し、それに伴い焦点結合タンパクの集積も認められなくなった。細胞境界部のアクチン線維束は存在した。一方、PF処理3時間では、細胞境界部に沿った明瞭なアクチン線維束も細胞内のストレス線維も維持された。ストレス線維の遠位端にはFAKが集積したが、その部位からリン酸化チロシンの存在を示すシグナルが大きく減弱した。これらより、Blebはストレス線維の形成阻害、PFは焦点結合を介した細胞内への内向きのシグナル伝達を阻害したと判断した。

(3) マトリゲルに包埋した顎下腺上皮培養にBlebもしくはPFを添加し、それぞれが上皮組織に直接作用して阻害効果を現すのか、上皮周囲の間葉組織を介して阻害効果を及ぼすのかを検討した。2日間培養で比較するとBlebとPFは分離上皮の分枝形態形成を明瞭に阻害し、それぞれが上皮組織に直接作用することを示した。Blebの作用機序は極めて興味深く、培養1日目では上皮集塊にコントロール以上の多数のクレフトが形成されていることが判明した。これらより、PFが上皮のクレフト形成を直接阻害するのに対して、Blebはクレフト形成に対してはむしろ促進的に働くものと判断した。

(4) 既に報告しているように、分枝形態形成時には上皮組織を構成している上皮細胞が組織内で特徴的な移動・変形をする。BlebやPFがこの細胞運動にどの様に働きかけるかをガラス底皿に培養した顎下腺原基とマトリゲルに包埋した顎下腺上皮のタイムラプス観察で検討した。Blebはこの細胞の運動にほとんど影響を与えなかった。一方、PF存在下では細胞の移動能は明瞭に低下した。

#### (5) 結果の考察

唾液腺上皮が分岐する際には、上皮細胞に形成されるアクチン線維を芯とする突起(シエルフ)が上皮細胞間への間隙(クレフト)の侵入に際して働く。同時に上皮集塊中の細胞は組織内をダイナミックに運動する(KadoyaとYamashina 2010)。本研究は、分枝形態形成における基底膜-アクチン細胞骨格系の役割を明らかにすることを最終目的とし、種々条件下で培養したマウス胎仔顎下腺(上皮)に細胞骨格系の機能阻害剤、Breb

やPF、を添加しそれぞれの効果を比較検討しようとした。

Dalayら(2009と2011)のBlebやPFを駆使した先行研究によれば、唾液腺上皮細胞の局所で生じたミオシンの活性化によるアクチン細胞骨格系の収縮が、形成初期のクレフト領域直下でのフィブロネクチン(FN)マトリックス集積を促進し、FNのシグナルを受けて起る上皮細胞のクレフト形成領域での外向きの細胞増殖がクレフトに侵入を助けるとするモデルを提唱している。これらの先行研究で検討されたBrebやPFの濃度(それぞれ25-100 μMと25-75nM)は本研究で培養顎下腺に異常を生じさせた最低濃度(それぞれ7.5-10 μMと0.4-2 μM)と大きく異なっていた。そのため本研究では、顎下腺上皮初代培養系を確立し、用いた濃度で細胞骨格と焦点結合に起きる変化を確認した。

今回の検討で、FAKのリン酸化が唾液腺分枝形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、ミオシンの活性はクレフト形成を抑制している可能性が示唆された。しかしながら、クレフト形成やその伸長機構は将来の課題として残った。

#### (6) 参考論文

Daleyら(2009) Dev Biol 336:169.  
Kadoya & Yamashina (2010) Dev Dyn239:1739.  
Daleyら(2011) Dev Dyn240:2069.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計10件)

(1) 門谷裕一:分枝形態形成における基底膜-アクチン細胞骨格系の役割. 第121回日本解剖学会総会全国学術集会. 福島県郡山市(ビッグパレットふくしま) 2016.3.

(2) 佐々木政嘉, 門谷裕一:腎組織形成における細胞の動態. 第121回日本解剖学会総会全国学術集会. 福島県郡山市(ビッグパレットふくしま) 2016.3.

(3) M. Sasaki, Y. Kadoya: Live-cell imaging of nephrogenesis. 第120回日本解剖学会総会全国学術集会・第92回日本生理学会大会. 兵庫県神戸市(神戸国際会議場・展示場) 2015.3.

(4) 門谷裕一:再生医療のブラックボックス“自己組織化”の謎に迫る. 第8回再生医療・細胞デザイン研究施設シンポジウム. 神奈川県相模原市(北里大学医療衛生学部) 2015.2.

(5) 門谷裕一:基底膜の動態から見た唾液腺

組織構築過程. 平成 26 年度生理学研究所研究会「唾液腺形態形成研究会～機能解析から器官再生へ～」. 愛知県岡崎市（生理学研究所）2014.8.

(6) 門谷裕一, 木村武俊, 二木杉子, 関口清俊: 分枝形態形成の基底膜ライブイメージング. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 栃木県下野市(自治医科大学医学部) 2014.3.

(7) 木村武俊, 二木杉子, 関口清俊, 門谷裕一: 唾液腺分枝形態形成の基底膜ライブイメージング観察. 60 回マトリクス研究会大会. 和歌山県和歌山市(和歌山県立医科大学) 2013.6.

(8) 田中由美, 竹内昭博, 門谷裕一: 分枝形態形成における集団的細胞運動の解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 香川県高松市（かがわ国際会議場）2013.3.

(9) 門谷裕一: 唾液腺分枝形態形成の細胞動態. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 「枝分かれ構造の形成原理」. 山梨県甲府市（山梨大学甲府キャンパス）2012.3.

(10) 門谷裕一: 顎下腺分枝形態形成における細胞動態とクレフト形成の機構. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 メインシンポジウム 4. 岐阜県岐阜市（長良川国際会議場）2011.8

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門谷 裕一 (KADOYA, YUICHI)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：10185887