

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860211

研究課題名(和文) Wntシグナルによる細胞形態と増殖制御を介した上皮分岐管腔形成機構の解析

研究課題名(英文) Wnt signaling promotes epithelial tubulogenesis through the regulation of cell morphology and proliferation

研究代表者

松本 真司 (Matsumoto, Shinji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：20572324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット正常腸管上皮細胞株IEC6においてWnt3aとEGFによって協調的に発現し、三次元基質内での管腔形態形成を誘導する新規因子Arl4cを同定した。Arl4cは細胞骨格制御因子であるRacとRhoの活性を調節することで上皮細胞の伸長形態変化を誘導した。上皮細胞の形態変化は増殖制御因子YAP/TAZの核への移行を誘導して管腔形成にともなう細胞増殖を活性化した。Arl4cは胎生期マウス腎臓の尿管芽先端部で強く発現しており、尿管上皮の分岐管腔形成にも関与していた。さらに、Arl4cはヒト大腸がんおよび肺癌において高頻度の高発現し、がんの運動・浸潤能や腫瘍形成能に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Co-stimulation with Wnt3a and EGF induced development of tubes consisting of rat intestinal epithelial cells (IEC6) by inducing expression of Arl4c in three-dimensional culture. Arl4c expression resulted in cell morphological change (extension) through the activation of Rac and inactivation of Rho properly, which promoted cell growth by inducing nuclear translocation of YAP/TAZ in leading cells. Arl4c was expressed in ureteric bud tips in the embryonic kidney and regulated ureteric buds tubulogenesis. Furthermore, immunohistochemical analyses revealed that Arl4c was strongly expressed at high frequencies in tumor lesions of colorectal and lung cancers. Arl4c was involved in migration, invasion and proliferation capabilities both in vitro and in vivo.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Wnt EGF Arl4c YAP/TAZ 上皮管腔形成

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞集団による分岐管腔形成は肺や腎臓、腸管といった管腔臓器に加え、乳腺や唾液腺、前立腺などの外分泌腺の発生において必須の形態形成パターンである。上皮組織は間質内で伸長と分岐を繰り返し、極性化することで内腔を有した管腔構造を形成する。分岐管腔形成には細胞機能を細胞外から制御する増殖分化因子と細胞外基質 (ECM) の存在が必須である。上皮細胞集団は増殖分化因子と細胞外基質からのシグナルによって伸長先端部において動的に細胞形態を変化させ、増殖しながら分岐や伸長のパターンを決定していると考えられているが、それらの具体的な制御メカニズムは不明である。ノックアウトマウスを用いた解析から、複数の Wnt リガンドが肺や腎臓、乳腺等の多くの管腔臓器の形成に関与することは明らかであるが、Wnt シグナルが分岐管腔形成のどのようなプロセスを制御しているのかについては不明である。

正常管腔組織由来の上皮細胞を基底膜類似の細胞外基質ゲル (マトリゲル) 内で三次元培養すると上皮細胞は凝集し、頂底極性と内腔を有する球状の嚢胞 (シスト) を形成する。しかし、シストはマトリゲル内で形態を変えことなく増殖を停止し、分岐管腔構造を形成しない。

私共は最近、細胞外基質ゲル内のシストに対して Wnt3a や EGF を各々単独で作用させてもシストは形態を変化しなかったが、Wnt3a と EGF を組み合わせて (Wnt3a/EGF) 作用させると分岐管腔構造が形成されることを見出している (図 1)。上皮細胞は二次元的なディッシュ上に播種すると接着後に広く伸展して運動しながら活発に増殖するが、基底膜基質内では伸展せずにコンパクトな形態をとり運動および増殖しなかった。Wnt3a と EGF を組み合わせて作用させるとシストを構成する上皮細胞は基底膜基質内で局所的に細長く伸長した形態へと変化し、形態変化した細胞は活発に移動・増殖を繰り返し管腔構造を形成した。これらの結果は Wnt シグナルと増殖因子である EGF シグナルの協調による細胞形態と増殖制御を介した新たな分岐管腔形成機構の存在を示唆す

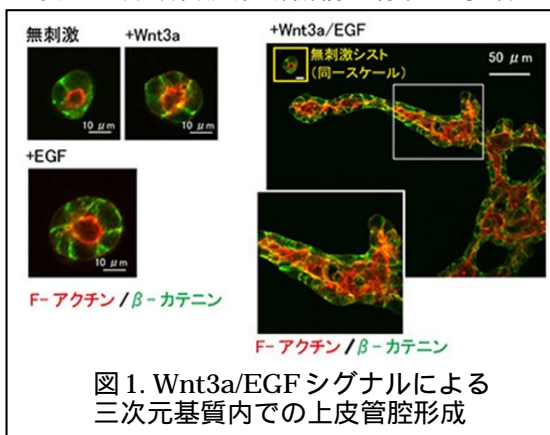


図 1. Wnt3a/EGF シグナルによる三次元基質内での上皮管腔形成

ると考えられる。

2. 研究の目的

上皮細胞集団による分岐管腔組織形成は肺や腎臓、腸管といった管腔臓器に加え、乳腺や唾液腺、前立腺などの外分泌腺の発生において必須の形態形成パターンである。Wnt 蛋白質は形態形成因子として、多くの管腔臓器の発生に関与することが明らかになっているが、その詳細な制御機構は不明である。私共は、生理活性を有する 3 種類の Wnt 蛋白質の精製に成功しており、その生理活性を解析する過程で、Wnt3a が in vitro の三次元基質内で培養上皮細胞に対して分岐管腔形成を誘導することを見出した。この結果は Wnt シグナルによる新たな上皮分岐管腔形成の制御機構の存在を示唆するものと考えられる。そこで、本研究では、Wnt シグナルによる細胞形態調節および細胞増殖制御に焦点をあてて、Wnt シグナルによる空間的分岐管腔形成制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、上皮細胞の形態と増殖の関係に着目し、増殖分化因子である Wnt と EGF が基底膜基質中でどのようにして上皮管腔形態形成を制御するのかという点を明らかにするために、下記の方法で研究を遂行する。(1) Wnt3a および EGF シグナルの協調による基底膜基質中での細胞形態制御の分子機構の解析

Wnt3a/EGF シグナルによる協調的遺伝子発現制御の解析

DNA マイクロアレイを用いて Wnt3a/EGF の下流で発現変動する標的因子の候補を同定する。候補因子について RNAi を用いた発現抑制実験を行い Wnt3a/EGF 依存的な上皮伸長を抑制するか否かを検討する。さらに候補因子の過剰発現を行い上皮細胞伸長を誘導する遺伝子を同定する。Wnt と EGF シグナルが標的因子の発現を活性化する細胞内シグナルメカニズムを明らかにする。

Wnt3a/EGF シグナルによる上皮形態伸長の分子機構の解析

上皮細胞の伸長変化に関わるアクトミオン系は上流で低分子量 G 蛋白質である RhoA と Rho キナーゼの活性によって制御されている。そこで Wnt3a/EGF シグナルおよびで同定した標的因子が RhoA の活性に与える影響を解析する。

(2) 上皮細胞形態が増殖を制御する分子機構の解析

Wnt3a/EGF 依存的な上皮伸長と細胞増殖における YAP/TAZ の役割についての解析

細胞増殖活性化因子 YAP/TAZ が伸長部上皮特異的に核内に局在することから、YAP/TAZ の発現抑制または恒常的活性化型 (非リン酸化型) YAP が Wnt3a/EGF 依存性管腔形成に与える影響を検討する。

管腔形成にともなう細胞増殖における標的因子を介した上皮形態伸長変化の役割の解析

同定した標的因子の過剰発現または発現抑制が増殖活性化因子である YAP/TAZ の細胞内局在に与える影響を検討する。また、Rho シグナルの適切な抑制による細胞伸長が YAP/TAZ の局在に与える影響も同様に検討する。

(3) マウス生体内での管腔形成における標的因子シグナルの役割の解析

胎生期マウスの組織標本を用いて、管腔形成過程の臓器における同定した標的因子の発現を免疫組織学的に検討する。発現を認めた臓器について器官培養を行い、標的因子シグナルの抑制が管腔形成に与える影響を検討する。

(4) 上皮性悪性腫瘍における標的因子の発現と腫瘍形成への関与の解析

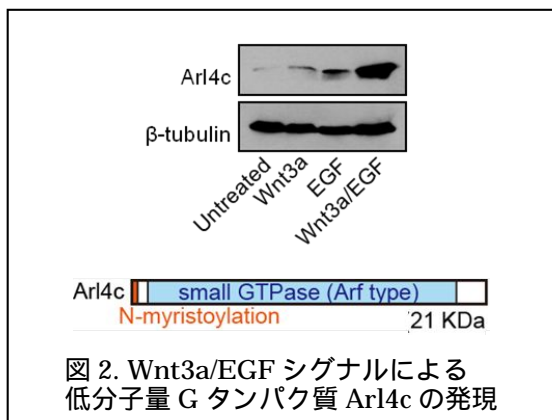
Wnt または EGF シグナルの過剰活性化が腫瘍化に関与することが報告されているヒト大腸がんおよび肺がん組織における標的因子の発現を免疫組織学的に検討する。高発現を認めたがん種の細胞株を用いて標的因子の発現抑制が *in vitro* での細胞運動・浸潤能や増殖能、または *in vivo* での腫瘍形成能に与える影響を検討する。

4. 研究成果

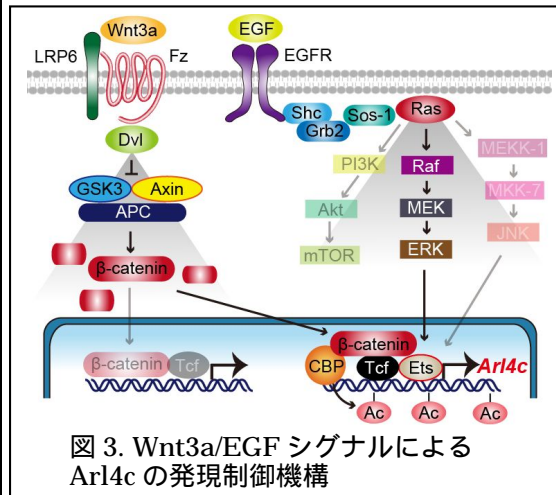
(1) Wnt3a および EGF シグナルの協調による基底膜基質中での細胞形態制御の分子機構の解析

Wnt3a/EGF シグナルによる協調的遺伝子発現制御の解析

DNA マイクロアレイを用いた解析から、Wnt3a および EGF の同時刺激によって強く発現が誘導される標的遺伝子として Arl4c (ADP-ribosylation factor-like 4c) を同定した (図 2)。Arl4c は Arf ファミリーに属する低分子量 G タンパク質で、これまでにコレステロールやトランスフェリンの細胞内輸送に関与することが報告されているものの、上皮形態や管腔形態形成への関与については全く報告されていない。IEC6 における Arl4c の発現抑制は Wnt3a/EGF 依存的な管腔形成を抑制し、過剰発現は EGF 単独存在下で

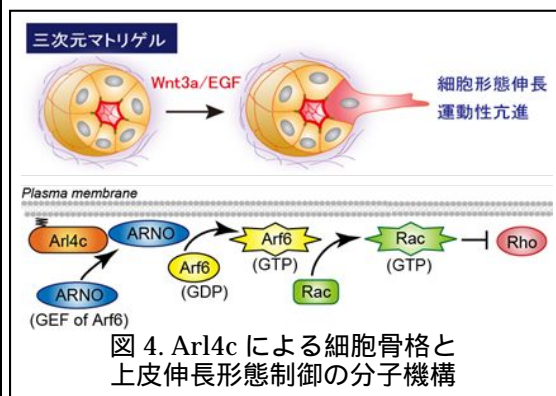


管腔形成を誘導した。Arl4c は Wnt3a/EGF 依存性的に発現が誘導された。Wnt3a/EGF 刺激によって -カテニンシグナルの下流転写因子 Tcf-4 が Ras-MAPK シグナルの下流転写因子 Ets と複合体を形成し、Arl4c 遺伝子の Ets 結合領域にリクルートされる結果、ヒストンのアセチル化が促進して Arl4c 遺伝子の転写が活性化した (図 3)。



Wnt3a/EGF シグナルによる上皮形態伸長の分子機構の解析

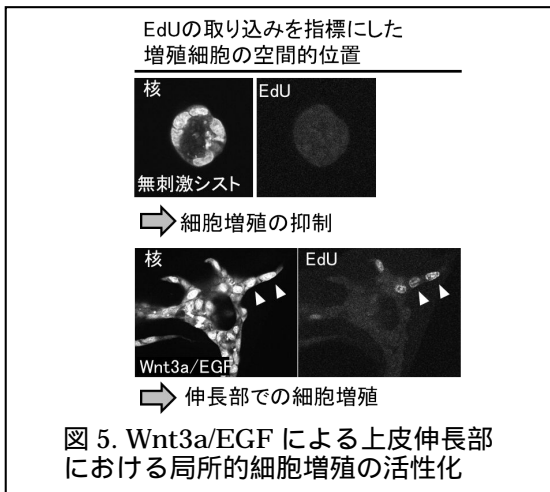
Arl4c の発現抑制は、Wnt3a/EGF 依存的な上皮細胞伸長を抑制し、Arl4c の過剰発現は EGF 存在下で上皮細胞の伸長変化を誘導した。Arl4c は細胞骨格の制御に関わる Arf6 の活性化因子 ARNO と結合し、Arf6 の活性化に関与することが報告されている。IEC6 において Arl4c は ARNO/Arf6 を介して細胞骨格制御因子の Rac を活性化し、Rho を抑制する結果、上皮細胞の伸長形態変化を誘導した (図 4)。



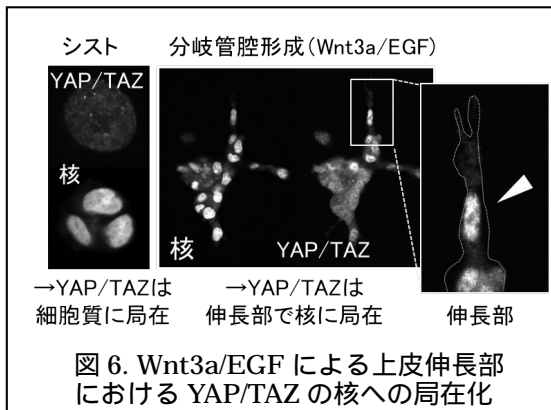
(2) 上皮細胞形態が増殖を制御する分子機構の解析

Wnt3a/EGF 依存的な上皮伸長と細胞増殖における YAP/TAZ の役割についての解析

Wnt3a/EGF 依存的に管腔形成するには上皮の伸長部において特異的に細胞増殖が活性化していた (図 5)。増殖の活性化している細胞は形態的な伸長変化を認めたので、細胞の伸展や形態を感知して細胞増殖や分化を制御するシグナルとして近年注目されている YAP/TAZ の局在を検討した。その結果、基底膜基質中で細胞の伸展が抑制された上皮



シストでは YAP/TAZ は細胞質に局在したが、Wnt3a/EGF によって局所的に伸長した細胞では YAP/TAZ が核に局在していた (図 6)。YAP/TAZ の発現抑制は Wnt3a/EGF 依存的な管腔形成を強く抑制し、恒常活性型 (非リン酸化型) YAP 変異体の発現は管腔形成を促進したことから、YAP/TAZ が Wnt3a/EGF 依存的な上皮形態変化による細胞増殖活性化に関与していると考えられた。

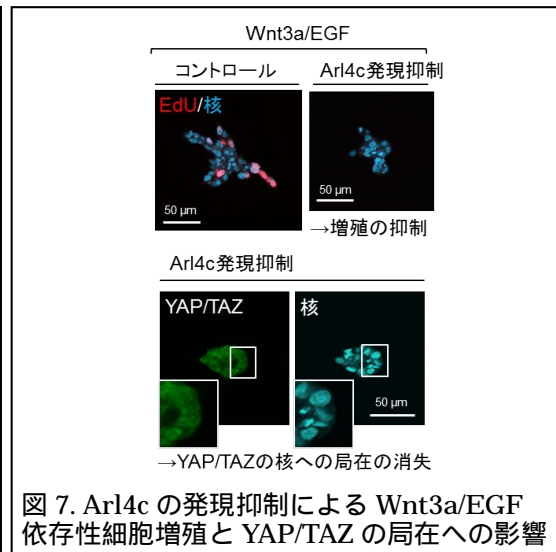


管腔形成にともなう細胞増殖における標的因子を介した上皮形態伸長変化の意義の解析

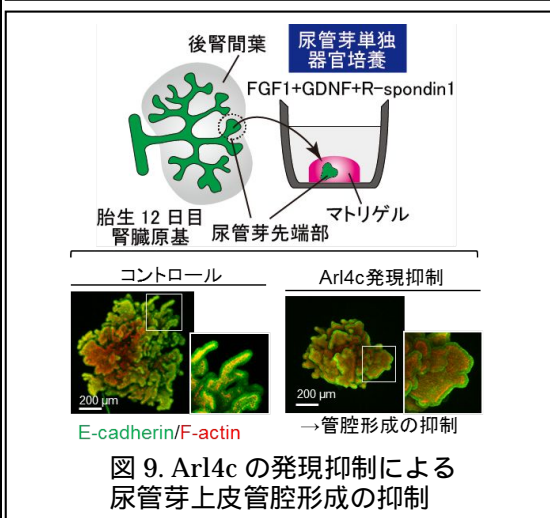
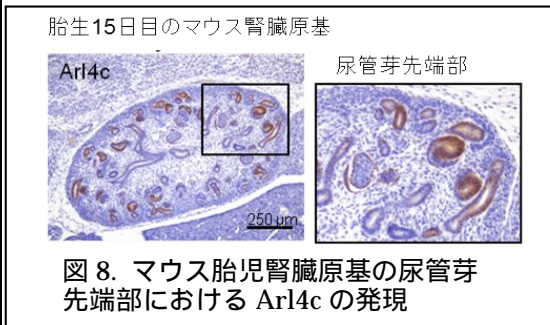
標的因子 Arl4c を発現抑制したところ、Wnt3a/EGF 依存的な上皮伸長と細胞増殖の活性化が抑制された。また、Arl4c の発現抑制により伸長部上皮での YAP/TAZ の核への局在も消失した (図 7)。一方で、Arl4c の過剰発現は上皮伸長をともなう管腔形成を誘導するが、この時伸長部上皮特異的に YAP/TAZ が核に局在していた。さらに、阻害剤を用いた適切な Rho シグナルの抑制による管腔形成においても同様に YAP/TAZ が核内への局在が認められた。これらの結果から、Arl4c を介した Rho シグナルの抑制による細胞形態制御 (伸長) が YAP/TAZ の核へ局在を誘導する結果、管腔形成にともなう細胞増殖が活性化されることが明らかになった。

(3) マウス生体内での管腔形成における標的因子シグナルの役割の解析

多くの管腔臓器の器官形成期にあたる胎



生 15 日目マウス胎児における Arl4c の発現を免疫組織学的に検討したところ、Arl4c は腎臓原基の尿管芽先端部の上皮において強く発現していた (図 8)。阻害剤を用いた解析から、胎生期の腎臓原基において Arl4c は Wnt- カテニンシグナルと FGF-Ras-MAPK シグナルに依存して発現していた。尿管芽上皮の管腔形成における Arl4c の役割を明らかにするために、増殖因子として FGF1 と GDNF に加えて Wnt 活性化因子 R-spondin1 の添加による尿管芽上皮単独の器官培養法を確立した。尿管芽上皮において Arl4c を発現抑制したところ、管腔形成が抑制されたことから、胎生期腎臓における尿管上皮の管腔形成にも Wnt/増殖因子-Arl4c シグナルが関与することが明らかになった (図 9)。



(4) 上皮性悪性腫瘍における標的因子の発現と腫瘍形成への関与の解析

Wnt と EGF-Ras-MAPK シグナルの異常活性化は各種ヒトがんの発がんおよび悪性化に密接に関与することが知られている。管腔形成と腫瘍形成の過程は、上皮が活発に増殖しながら周囲の間質組織へと進展するという共通点を有していることから、Arl4c のヒトがんにおける発現を免疫組織学的に検討した。その結果、肺(腺)がんでは約7割、大腸がんでも約5割の症例でArl4cが腫瘍細胞特異的に高発現していた(図10)。

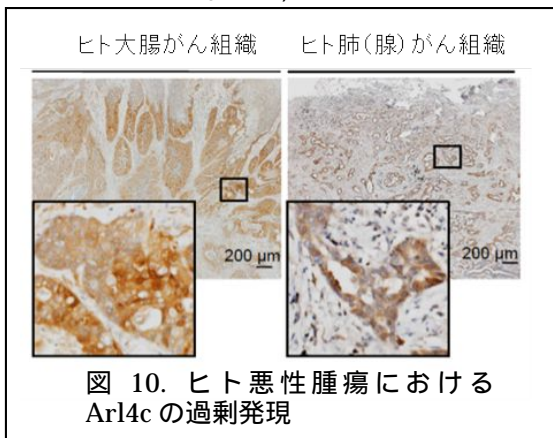


図 10. ヒト悪性腫瘍における Arl4c の過剰発現

Arl4c が高発現しているがん細胞株において、Arl4c は Wnt/ -カテニンおよび Ras-MAPK シグナルに依存して発現していた。また、Arl4c の発現抑制を行うと、これらのがん細胞の運動・浸潤能が抑制されるとともに、ヌードマウス皮下における腫瘍形成能が著しく阻害された(図11)。これらの結果から、Wnt/増殖因子-Arl4c シグナルの異常活性化が腫瘍形成の過程にも関与するが明らかになり、Arl4c がヒトがんにおいて有用な分子標的となりうる可能性を示すものである。



図 11. HCT116 細胞における Arl4c の発現抑制によるヌードマウス皮下腫瘍形成能の抑制

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

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): 1051-1063, 2015. (査読あり)

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*, (in press). (査読あり)

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: 702-718, 2014. (査読あり)

Kikuchi, A., Matsumoto, S., Fumoto, K., and Sato, A. Modulation of Wnt Signaling by Endocytosis of Receptor Complexes. *Wnt Signaling. Chapter 8 in Wnt signaling in Development and Disease*, edited by Stefan Hoffer and Randol Moon, John Wiley and Sons, Inc. 2014. (査読あり)

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: e83629, 2013. (査読あり)

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: 3764-3774, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

松本 真司: Wnt/ -カテニンシグナルは外分泌腺上皮の分岐と導管形成を制御する: 第87回日本生化学会 京都 2014年10月18日

〔図書〕(計 4 件)

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 79-100, 2014

松本真司, 菊池 章: Invitro 実験系を用いた上皮管腔組織形成の分子基盤の確

立：G. I. Research「消化管の再生医療」22
巻5号，450-456，2014

松本真司、菊池 章： Wnt5a シグナルに
よる細胞の極性と遊走・接着の制御：生体の
科学 64 巻3号，226-231，2013

松本真司、菊池 章： Wnt と増殖因子の
協調的シグナルによる上皮管腔組織形成：細
胞工学「Wnt 協奏曲」32 巻4号，435-441，
2013

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：Ar14c 遺伝子の発現を抑制する物質又
はタンパク質の活性を抑制する物質を含む、
癌の治療の為に医薬組成物（核酸を含む）

発明者：菊池 章、松本 真司、藤井 慎介
権利者：同左

種類：特許 (Patent)

番号：2014-99735

出願年月日：2014 年 5 月 13 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbio
bc/](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbio
bc/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 真司 (Shinji Matsumoto)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20572324

(2) 研究分担者

なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号：