

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15133

研究課題名(和文) マウス気管平滑筋をモデルとした間充細胞極性化機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of mesenchymal cell polarity in mouse tracheal smooth muscle

研究代表者

岸本 圭史 (Kishimoto, Keishi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：70700029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、気管間充細胞が上皮組織に向かって極性化するメカニズムの解明を試みた。in vitroの上皮組織と間充細胞の共培養実験から、間充細胞が上皮に向かって移動することが分かった。上皮由来因子が、間充細胞の極性化を誘導する可能性が考えられたため、上皮由来の誘導因子と、間充細胞のシグナル伝達因子について検討を行った。その結果、上皮ではShh, Wnt4, 7bが高発現し、間充細胞のシグナルを活性化していることを発見した。また、間充細胞のWnt signalを遮断すると、極性化が阻害された。これらの結果は、上皮がWnt signalを介して間充細胞組織の極性、形態形成を調節することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正しい臓器形態の構築には、細胞の空間的位置づけ、即ち、極性が必須である。申請者はマウス気管平滑筋細胞が極性化し、平滑筋の配列や気管伸長を調節することを報告している。これまで細胞極性の研究は上皮細胞を中心に展開されてきた。上皮細胞は、頂端-基底の極性や平面内極性を保持し、組織に非対称性を与える。対して、間充細胞の方向性を定義する機構については知られていなかった。本研究結果は、これまで言及されなかった間充細胞の極性の制御機構を明らかにするものである。また、間充細胞の極性化は食道でも観察されたことから、本研究で得られた知見は、他の臓器形成機構の理解にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to elucidate the mechanism of mesenchymal cell polarity toward epithelial tissue. Co-culture system of mesenchymal cells and epithelial cells revealed the directed migration of mesenchymal cells to epithelial cell spheroid, suggested that epithelial tissue secretes the factors inducing mesenchymal cell polarity. We next explored polarizing cues from epithelium and signal pathway activated in mesenchymal tissue at the onset of cell polarization. At E12.5 mouse embryos, Sonic hedgehog, Wnt4, Wnt7b was highly expressed in epithelial tissue of the trachea. Furthermore, the analyses of reporter mouse line showed these signaling pathway was remarkably activated in mesenchyme. Most importantly, loss of Wnt activity in mesenchyme disrupted mesenchymal cell polarity. These findings indicate that epithelial Wnt induces mesenchymal cell polarity in mouse embryonic trachea.

研究分野：発生生物学

キーワード：気管 極性 間充細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の生命を支持する臓器は、臓器固有の形へと成長することにより、機能を獲得する。臓器形成の過程では、細胞が極性を獲得しながら、増殖や移動、変形を繰り返すことにより、多様な形態をもった臓器が創出される。細胞の極性化は、細胞や組織に対して位置情報や方向性を与えるプロセスであり、臓器形成に必要とされる秩序だった細胞の挙動に必須である。細胞の極性研究はこれまで、上皮組織を中心に展開されてきた。これらの研究により、形成体系における細胞極性の役割が明らかにされてきた。その一方で、極性化の分子機構や、上皮組織以外の組織における細胞極性についてはほとんど知られていなかった。申請者らは、先行研究においてマウス気管の間充細胞、特に平滑筋前駆細胞が極性化し、気管の伸長に貢献していることを発見した。そこで、本研究では、間充細胞の極性化の機構の解明に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウス気管をモデルとして、間充細胞、特に平滑筋前駆細胞が上皮組織方向に向かって極性化するメカニズムの解明を目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) Wnt5a および受容体である Ror2 の欠損マウスでは、間充細胞の極性化が阻害される。そこで、Wnt5a-Ror2 シグナルに着目し、間充細胞極性化のメカニズムの解明を試みた。ノックアウトマウスから作成した切片の免疫染色により、下流因子の免疫染色を行った。

(2) 力学的作用が間充細胞の極性化に与える影響を解析するため、平滑筋細胞への分化が阻害されるマウスを樹立し、間充細胞の極性が維持されるかについて検討した。

(3) 気管平滑筋前駆細胞の極性化は上皮方向に向かうため、上皮組織が極性を調節している可能性が考えられる。この仮説を直接的に証明するため、気管上皮細胞と平滑筋前駆細胞の *in vitro* での再構成実験を樹立し、極性化過程の可視化を試みた。

(4) 平滑筋前駆細胞の極性を制御する Wnt5a, Ror2 はいずれも間充細胞に発現するため、これらの遺伝子のほかに、間充細胞の極性化を誘導する上皮由来の因子が存在することが想定された。そこで、極性化に必要なシグナル伝達分子を同定するため、HH, BMP, Wnt シグナルのレポーターマウスの観察ならびに、リン酸化 Smad, Akt, ERK の免疫染色を行った。さらに、シグナル伝達経路を活性化する分泌因子について *in situ hybridization* による発現分布を検討した。

(5)  $\beta$ -catenin を間充細胞特異的に欠損するマウスを解析することにより、間充細胞極性化における Wnt signal の役割について検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) Wnt5a は、JNK のリン酸化やミオシン軽鎖のリン酸化、平面剤極性因子を介してシグナルを伝達することが知られている。これらの因子について、免疫染色をおこなった結果、Wnt5a の欠損マウスの気管間充細胞では、ミオシン軽鎖のリン酸化の減少が観察された。この結果は、Wnt5a がミオシンリン酸化を介して細胞極性を調製している可能性を示している。

(2) 平滑筋の力学的作用が極性化に与える影響を調べるため、平滑筋細胞の分化のマスターレギュレーターである Serum response factor (Srf) の間充細胞特異的 ノックアウトマウスを樹立した。このマウスの上皮近傍の間充細胞は平滑筋マーカーである Smooth muscle actin が発現していないにもかかわらず、間充細胞組織の極性や細胞形態が正常に維持されていることを発見した。これらの結果は、上皮近傍の間充細胞は平滑筋分化・収縮に依存せず、極性を獲得することを示している。

(3) 胎生 12.5 日目のマウス気管から、上皮細胞と平滑筋前駆細胞を単離し、マトリゲル中で共培養を行った。この条件下において、上皮細胞は、Sphere の 3 次元構造を形成し、平滑筋前駆細胞は底面に接着する。Live imaging を行った結果、平滑筋前駆細胞が上皮由来 Sphere に向かって移動する様子が観察された。さらに、Wnt5a 欠損細胞では移動が阻害された (図 1)。

(4) 平滑筋前駆細胞の極性化の過程において、HH シグナルと Wnt シグナルが活性化していることを発見した。さらに、こ

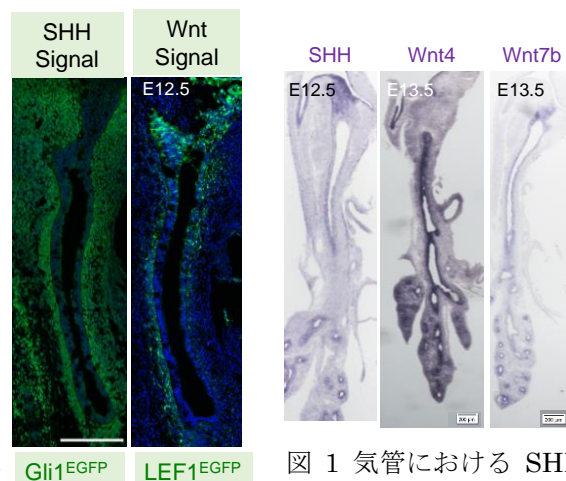


図 1 気管における SHH, および Wnt signaling

の際、上皮組織では、Sonic hedgehog, Wnt4, Wnt7b が高発現していた。すなわち、上皮由来の Shh, Wnt4 あるいは Wnt7b が間充織細胞の極性を誘導する候補因子として考えられた。

(5) 間充織特異的に Wnt signaling の間充織極性化における役割を調べるため、間充織特異的に  $\beta$ -catenin を欠損するマウスを樹立、解析した。その結果、間充織細胞の上皮組織向かう極性が正常に形成されず、平滑筋組織の配向性が顕著に乱れることが分かった (図 2)。これらの結果は、上皮由来の Wnt が平滑筋前駆細胞の極性を誘導している可能性を強く示している。

以上の研究結果から、間充織細胞の極性化は、上皮間充織の相互作用によって誘導されることがわかった。さらに、上皮由来の Wnt ligand が極性化の過程において重要な役割を担う可能性が示された。

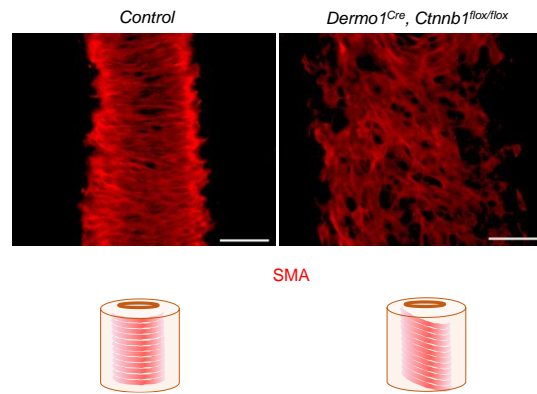


図 2 Wnt signal の欠損による平滑筋の配列異常

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

【査読有】

- 1) Kishimoto K, Tamura M, Nishita M, Minami Y, Yamaoka A, Abe T, Shigeta M, and Morimoto M, Synchronized polarity and differentiation of mesenchymal cells shape the trachea and esophagus. *Nature communications*, 9, 2816, (2018) doi: 10.1038/s41467-018-05189-2
- 2) Yin W, Kim HT, Wang SP, Gunawan F, Wang L, Kishimoto K, Zhong H, Roman D, Preussner J, Guenther S, Graef V, Buettner C, Grohmann B, Looso M, Morimoto M, Mardon G, Offermanns S and Stainier DYR, The potassium channel KCNJ13 is essential for smooth muscle cytoskeletal organization during mouse tracheal tube formation. *Nature communications*, 9, 2815 (2018) doi: 10.1038/s41467-018-05043-5

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Kishimoto K, Synchronized mesenchymal cell polarization and differentiation shape the trachea, Joint Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 51<sup>th</sup> and the Japan Society for Cell Biology 70<sup>th</sup>, 2018
- 2) 岸本 圭史, 気管の形態形成における間充織極性化の重要性, 日本呼吸器学会, 2018年
- 3) Kishimoto K, Orientated mesenchymal cell polarization and differentiation shape the trachea, Keystone Symposia Endoderm Development and Disease: Cross-Organ Comparison and Interplay, 2018
- 4) Kishimoto K, Mesenchymal cell polarity and differentiation shape mouse airway, Consortium of Biological Sciences 2017, 2017
- 5) Kishimoto K, Oriented mesenchymal cells drive tracheal tubulogenesis, 18th International Congress of Developmental Biology, 2017
- 6) Kishimoto K, Oriented mesenchymal cells drive tracheal tubulogenesis, 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017

[図書] (計 2 件)

- 1) 岸本 圭史, 森本 充 (2019) 羊土社, 呼吸器オルガノイド, 実験医学別冊 決定版オルガノイド実験スタンダード開発者直伝! 珠玉のプロトコール集, 272-280

- 2) 岸本 圭史, 森本 充 (2018) 平滑筋と軟骨による管腔臓器の長さ と太さの段階的な調節,  
実験医学, Vol. 36, 3120-3123

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

理化学研究所 生命機能科学研究センター 筋肉の隊列と軟骨の出現が気管を長く太くする  
<https://www.bdr.riken.jp/jp/news/2018/research005.html>

理化学研究所 管腔臓器の長さ と太さが決まる仕組みを解明 -筋肉と軟骨が気管のサイズを決  
定していた-  
[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180726\\_3/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180726_3/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。