

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570059

研究課題名（和文） 分枝形態形成における自己分泌型シグナル分子の役割

研究課題名（英文） Roles of autocrine signaling molecules in epithelial branching morphogenesis

研究代表者

野川 宏幸（NOGAWA HIROYUKI）

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40143250

研究成果の概要（和文）：

マウス胚の肺と唾液腺を用いて、上皮から分泌され上皮に作用する自己分泌型シグナル分子が分枝形態形成に関与するかを研究した。肺上皮を用いた培養実験により、外来性の FGF10 は上皮の FGF1, FGF9 の産生を促進し、これが自己分泌型で作用して最終的に分枝を誘導することを、また、唾液腺上皮を用いた培養実験により、上皮間には反発作用が働き、その強弱が分枝パターンを規定することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The present study focused on the molecules that affected the epithelium via autocrine signaling during branching morphogenesis of embryonic mouse lung and salivary gland. It was revealed that branching morphogenesis of lung epithelium was driven by autocrine FGF1 and FGF9 upregulated by exogenous FGF10, and that there worked repulsion between salivary epithelial lobules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：マウス胚，肺，唾液腺，分枝形態形成，上皮，自己分泌，成長因子，リペラント

1. 研究開始当初の背景

分枝形態形成は哺乳動物の唾液腺，肺，膵臓，腎臓，乳腺，前立腺などの内臓器官に広く認められる基本的な形態形成パターンであり，上皮の分枝形態形成には周囲の間充織との相互作用が不可欠であるとされている。我々はマウス胚の唾液腺原基と肺原基を用いて，間充織を除去した上皮をマ

トリゲルに包埋して培養する上皮単独培養法を開発し，上皮を分枝させるには，唾液腺上皮では Epidermal Growth Factor (EGF) ファミリーの分子を，肺上皮では Fibroblast Growth Factor (FGF) ファミリーの分子を培養液に添加する必要があることを明らかにした (Nogawa & Takahashi, 1991; Nogawa & Ito, 1995)。これらの結果

は、間充織から傍分泌される成長因子によって上皮の分枝形態形成が誘導されることを示している。

その後、各種成長因子遺伝子のノックアウトマウスの表現型の解析等の研究結果の蓄積があり、肺の分枝形態形成のメカニズムについて、発生生物学の教科書には以下のように現在は記載されている。間充織では FGF10 産生部位が局在しており、そこから分泌された FGF10 に反応した上皮は成長すると同時に間充織に向かって Sonic Hedgehog (SHH) を分泌する。SHH には FGF10 の産生を抑制する作用があり、間充織の FGF10 産生部位は 2 つに分けられ、それを追って上皮も成長し 2 又に分かれるというものである。このように、これまでの研究では、上皮・間充織間相互作用を仲介する傍分泌型シグナル分子に関する研究が中心であり、上皮で産生・分泌され、上皮に作用する自己分泌型シグナル分子は全く考慮されてこなかった。

2. 研究の目的

マトリゲル包埋した上皮の単独培養実験を繰り返しおこない、培養液に添加した成長因子の影響を検証していくと、「間充織から分泌された成長因子あるいは培養液に添加した成長因子は上皮の分枝形態形成を直接的に誘導しているのか？」という疑問が生じてきた。間接的な誘導、すなわち、外来性の成長因子によって、上皮で別な成長因子の産生・分泌が誘導され、これが自己分泌型で上皮自身に作用し、分枝形態形成を直接的に誘導しているのではないかという可能性である。この可能性について検証した研究報告はこれまで無い。

研究報告が無い理由として、「誘導は間充織からの傍分泌型シグナル分子による」という概念に多くの研究者が捕われていたこと、そして自己分泌型シグナル分子の関与を証明することが難しい点が挙げられる。本研究では、自己分泌型シグナル分子が分枝形態形成へ関与していることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

上皮の分枝形態形成への自己分泌型シグナル分子の関与を明確に示した実験はこれまで無く、その実験方法の開発自体が重要なステップとなる。我々の開発した間充織を除去した上皮単独培養の系が有用であると考え、この培養系にさらに工夫を加えた培養法を考案した。自己分泌型シグナル分子には分枝を促進するものと抑制するものとの 2 種類が想定されるので、それぞれに対応した 2

種類の培養法を考案した。

(1) 促進因子を調査するための震盪培養

上皮単独培養では、上皮はフィルター上でマトリゲルに包埋され、培養液中に沈められる。この時、培養ディッシュを震盪すると上皮はフィルター・マトリゲルと共に培養液中で揺れ動くことになる。自己分泌型因子が拡散性の場合、震盪により培養液への拡散が促進され、上皮近傍での濃度低下を招き、その影響が現れると予想した。震盪条件は、2cm 幅の往復運動、85rpm とした。

(2) 抑制因子を調査するためのトライアングル培養

上皮 1 個を単独培養した場合、上皮は放射状に均等に成長する。そこで、3 個の上皮をそれぞれ約 150 μm ほど離して仮想正三角形の各頂点に配置し、上皮単独培養をおこなうことを考えた。各上皮が放射状に均等に成長すると、三角形の中央では互いに接近することになる。抑制的に働く因子が自己分泌されている場合は、接近した上皮間に反発行動が観察されると予想した。

4. 研究成果

(1) 分枝を促進する自己分泌型シグナル分子の研究

① 肺上皮を FGF10 添加培地で静置培養と震盪培養し、その結果を比較した。震盪培養では、分枝の頻度が低下し、成長も悪くなることが観察できた (図 1)。

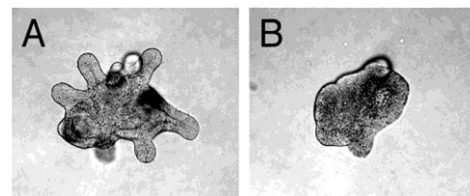


図 1 11 日胚の肺上皮を FGF10 (600 ng/ml) を含む培養液中で (A) 静置条件と (B) 震盪条件で 2 日間上皮単独培養した。

同様の実験を FGF1 添加培地でおこなったところ、両者に差が認められないことから、震盪による機械的ダメージの可能性は排除でき、差の原因は自己分泌型促進因子の濃度低下が主であると考えられる。

② 自己分泌型促進因子の候補分子として FGFs (マウスでは 22 種が現在報告されている) のどれかが考えられたので、まず、肺上皮での発現を調査した。FGF11-14 は細胞外に分泌されないため、この 4 種を除いた 18 種についてプライマーを設計し、肺原基

から単離した上皮ならびに培養した上皮について、その発現をRT-PCR法により調査した。その結果、11日胚の肺上皮ではFGF1、-5、-9、-17、-18の5種が発現していることが判明した。また、FGF10添加培養された肺上皮では、FGF1、-9、-18の3種にFGF10濃度依存的な発現上昇が認められた。

③ 上記5種のFGFsに分枝誘導能があるかを調査した。その結果、FGF1とFGF9に分枝誘導能があり、震盪培養と静置培養との間で差が無いことも判明した。

以上の結果は、外来性のFGF10が上皮に作用してFGF1とFGF9の産生・分泌を促し、これが自己分泌型で上皮に作用して分枝が誘導されるという仮説を強く支持している。

(2) 分枝を抑制する自己分泌型シグナル分子の研究

① 唾液腺上皮1個を培養する時、EGFファミリーのNeuregulin (NRG)とその補助因子であるLysophosphatidic acid (LPA)添加条件では密な分枝が観察され、FGFファミリーのFGF1添加条件では分枝よりも伸長が顕著で疎な分枝が観察される (Morita & Nogawa, 1999; Nitta et al., 2009)。そこで上皮3個をトライアングル培養したところ、NRG+LPA条件下では分枝しながら成長し、各上皮は互いに接近するのに対して、FGF1条件下では互いに避け合いながら伸長することが観察された (図2)。

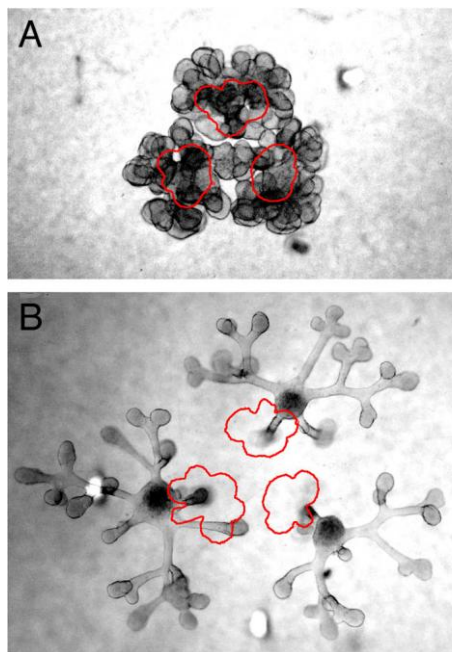


図2 13日胚の唾液腺上皮3個を離して置き、(A)NRG (20 ng/ml)+LPAと(B)FGF1(500 ng/ml)を含む培養液中で2日間上皮単独培養した。各赤線は培養開始時の3個の上皮の輪郭と位置を示す。

接近した部位での上皮の増殖をBrdUの取り込みで調べたところ、増殖の低下が観察された。

これらの結果は、FGF1添加培養された上皮は、NRG+LPA添加培養された上皮と比較して自己分泌型抑制因子を多く分泌しており、上皮どうしが接近すると抑制因子の濃度が高まり増殖が抑えられ、上皮は濃度の低い方向へ増殖・伸長することで分枝が疎な形態をとることを示唆している。

② 反発作用を担っている分子(リペラント)の候補を探索した。TGF β には上皮の増殖を抑制する作用があることがこれまで多く報告されているので、有力な候補分子の1つと考えられる。その阻害剤SB431542を培養液に加えてみたところ、反発作用の低下は観察されなかった。残念ながら、研究期間内にリペラントの解明には至らず、現在も継続研究中である。なお、反発作用は震盪培養の影響を受けないことから、リペラントはマトリゲルと強く結合して拡散し難い性質を持った分子と考えられる。

(3) まとめ

以上の結果は、肺上皮の分枝形態形成への自己分泌型FGFsの関与と唾液腺上皮の分枝形態形成への自己分泌型リペラントの関与を、高い確実性をもって証明したものと考えている。材料を入れ替えての唾液腺上皮での促進因子と肺上皮での抑制因子の関与の研究を現在進めており、今後論文にまとめて公表する予定である。自己分泌型シグナル分子の関与はこれまで考慮されてこなかったシグナル経路であり、分枝形態形成において自己分泌型シグナル分子は脇役どころでなく、主導的な役割を演じていることを本研究結果は強く示唆している。

肺、唾液腺以外の分枝器官(膵臓、腎臓、乳腺、前立腺など)についても、この視点に立ってその発生機構を解明することは興味深く、また実り多い成果が期待できると思われる。さらには、近年注目されている再生医療においても、そこでは成体幹細胞なりiPS細胞を出発材料として移植可能な3次元臓器をインビトロで作製することが研究開発途上にあるが、自己分泌型シグナル分子の関与を考慮しておくことは、インビトロ培養条件を確立する際に多に役立つはずである。したがって、今回の研究結果は一部の器官の発生過程の研究だけに留まるものではなく、他の器官への波及効果、ならびに再生医療といった応用面への波及効果も大きいものと思われる。

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2件)

- ① Okada K., Noda M. and Nogawa H.
Autocrine growth factors are involved in branching morphogenesis of mouse lung epithelium. Zoological Science, Vol.30, pp.1-6. 2013, 査読有 (DOI:10.2108/zsj.30.1)
- ② Okamoto K., Kikuchi-Handa T. and Nogawa H. Evidence of interlobular repulsion during branching morphogenesis in mouse salivary glands. Developmental Dynamics, Vol.239, pp.2208-2218, 2010, 査読有 (DOI:10.1002/dvdy.22354)

[学会発表] (計3件)

- ① 岡田貴美子, 後藤麻美, 野田真継, 野川宏幸. マウス胚肺上皮の分枝形態形成への自己分泌型成長因子の関与. 日本動物学会第83回大会, 大阪大学豊中キャンパス, 2012年9月13日.
- ② 野川宏幸. マウス胚唾液腺の分枝パターンを規定する上皮間の反発作用. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 長良川国際会議場, 2011年10月2日.
- ③ 岡本克也, 半田智美, 野川宏幸. マウス唾液腺の分枝形態形成における上皮間の反発作用. 日本動物学会第81回大会, 東京大学教養学部, 2010年9月25日.

[その他]

ホームページ

<http://life.s.chiba-u.jp/nogawa/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野川 宏幸 (NOGAWA HIROYUKI)
千葉大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 40143250

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし