

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770186

研究課題名(和文)肺の器官培養を用いたWntシグナルと頂底極性による細胞増殖制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulation of cell proliferation by Wnt signaling and apical-basal polarity in lung

研究代表者

麓 勝己(Fumoto, Katsumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40467783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではWntシグナルによる肺分岐形態形成のメカニズムを明らかにすることを目的とする。胎児肺上皮組織の3次元培養系に対し、Wnt-β-catenin経路を活性化するアゴニストCHIR99021やWnt2をレンチウイルスにて導入したところ、分岐形態形成が促進した。同時に、頂底極性制御因子aPKCの頂端膜への局在、及び頂端膜収縮が促進した。さらに、aPKC阻害剤は頂端膜収縮を阻害し、Wntシグナル依存性の分岐形態形成を阻害した。以上より、Wnt-β-catenin経路がaPKCを介した頂端膜収縮を誘導することで分岐形態形成を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to elucidate the mechanism for lung branching morphogenesis which is mediated by Wnt signaling. We have already generated three dimensional culture system of lung epithelium. By using this, we treated the epithelium with CHIR99021, an agonist for beta-catenin pathway or transduced lentiviruses that express Wnt2, a typical ligand for beta-catenin dependent pathway. CHIR or Wnt 2 promoted branching morphogenesis. Activation of beta-catenin pathway promoted apical constriction provably through enhanced localization of atypical PKCzeta (aPKCzeta), a critical regulator of apical and basal polarity, to apical membrane. In addition, aPKCzeta inhibitor showed the defect in branching morphogenesis and apical constriction. In conclusion, we found that beta-catenin pathway maintains distal progenitor and is required for branching morphogenesis provably through apical targeting of aPKCzeta and apical constriction.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：上皮細胞 頂底極性 細胞増殖 組織構築

1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質の Wnt はショウジョウバエからヒトまで保存されており、形態形成に必須である。Wnt が細胞表面の受容体に結合した後、細胞内で活性化されるシグナル伝達経路にはβ-カテニン経路とβ-カテニン非依存性経路が存在する。β-カテニン経路は Wnt1 や Wnt3a などが共役受容体 LRP5/6 及び Fz に結合することにより活性化され、β-カテニンの安定化と遺伝子発現を介して細胞増殖、分化を促進する。一方、β-カテニン非依存性経路は細胞運動や極性制御に関与していることが示されている。これまで私共の研究室において Wnt がβ-カテニン経路と非依存性経路を介して細胞運動やがん細胞の浸潤を制御する分子メカニズムを明らかにしてきた。さらに Wnt シグナルは発生生物学的に様々な臓器形成に重要な役割を果たしていることが報告されてきた。しかし、肺、唾液腺、腎臓等の器官において上皮管腔組織を形成する際の Wnt シグナル両経路の役割は明らかではない。

肺は前腸より肺芽として形成された後、腺様期 (E9.5-E16.5) と呼ばれる時期において、上皮組織が管腔側に頂上部、基底膜 (間質) 側に側底部を配向する極性状態 (頂底極性) を維持し、伸長と分岐を盛んに行

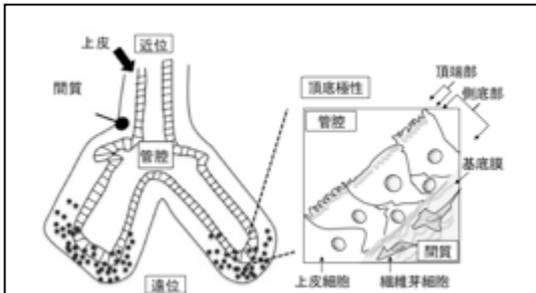


図 1

左) 発生初期の肺。「管腔」は上皮細胞の層より構成され、周囲を間質に包まれている。上皮細胞には極性があり、管腔側に頂上部、基底膜 (間質) 側に側底部を配向する。ドットは Wnt の発現領域を示す。右) 頂底極性。肺上皮細胞は管腔側に頂上部、基底膜側に側底部を配向し、極性状態にある。

うことが知られ、これまでその発生に関わる分子が数多く同定されている (図 1)。肺には少なくとも Wnt2、Wnt7b、Wnt5a が発現し、ノックアウトマウスの解析から肺芽形成、上皮・間質細胞の増殖に重要な役割を果たすことが報告されている (Shu W., Development, 2002; Li C., Dev.Biol, 2002; Goss M., Dev.Cell, 2009)。興味深いことに、腺様期の肺の遠位端上皮細胞は増殖活性が高く、β-カテニン依存性経路が活性化していることが Wnt レポーターゼントランスジェニックマウスの解析より報告されている (Al Alam D., Pros One, 2011)。さらに、細胞外 Wnt 拮抗因子である Dkk1 のトランスジェニックマウスにお

いて、肺上皮管腔組織の分岐が阻害される (De Langhe SP., Dev.Biol, 2005)。このように Wnt シグナルが肺の形態形成に重要な役割を果たすことは明らかであるが、Wnt の局所的活性化が細胞増殖の制御を介してどのように上皮管腔組織の分岐や伸長と関わっているのか不明である。

私共はβ-カテニン非依存性経路を制御する Wnt5a シグナルが微小管の安定化と細胞接着斑のターンオーバーを促進することを明らかにし、Wnt5a の阻害が培養細胞系における分岐形態形成に関与していることを見出ししている。さらに Wnt シグナルは運動している細胞や神経細胞の細胞極性を制御していることが知られているが、上皮管腔組織における上皮細胞の頂底極性に対する作用は不明である。

このような背景から、私共は分岐形態形成における Wnt の役割をさらに理解するため、胎生期肺を器官培養し、Wnt リガンドの分泌阻害剤で処理したところ、上皮管

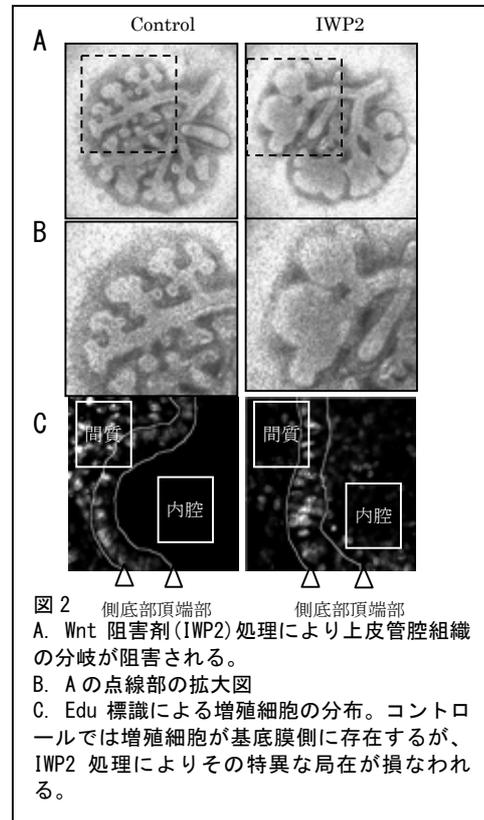


図 2 側底部頂上部 側底部頂上部
A. Wnt 阻害剤 (IWP2) 処理により上皮管腔組織の分岐が阻害される。
B. A の点線部の拡大図
C. Edu 標識による増殖細胞の分布。コントロールでは増殖細胞が基底膜側に存在するが、IWP2 処理によりその特異な局在が損なわれる。

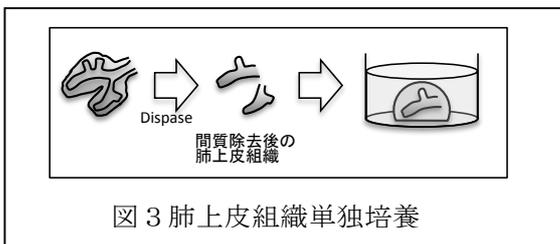
腔組織の分岐形成が阻害されることを見いだした (図 2A, B)。さらに、上皮組織内において基底膜側に増殖細胞が局在する (図 2C, El-Hashash., Development, 2011) が、同阻害剤によりその局在がランダムになることを見出した (図 2C 右)。これらのことは上皮組織内における増殖細胞の頂底極性軸上での分布が管腔組織の分岐と関連があることを示唆しているが、Wnt シグナルが増殖細胞の分布をどのように制御しているのか、さらに分岐形態形成との関係があるのかは不明である。

2. 研究の目的

局所的な細胞増殖の制御が上皮管腔構造の形成に重要であるが、Wnt がどのように関与しているのか不明である。また Wnt シグナル及び頂底極性と増殖細胞の分布との関係は不明である。これらを踏まえ、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- 1) β -カテニン依存性と非依存性の両経路が上皮管腔組織形成に与える影響
- 2) Wnt シグナルが頂底極性軸上での増殖細胞の分布を調節するメカニズムと上皮管腔組織の分岐や伸長との関係
- 3) 上皮管腔組織形成において、Wnt シグナルが頂底極性を制御する機構

3. 研究の方法

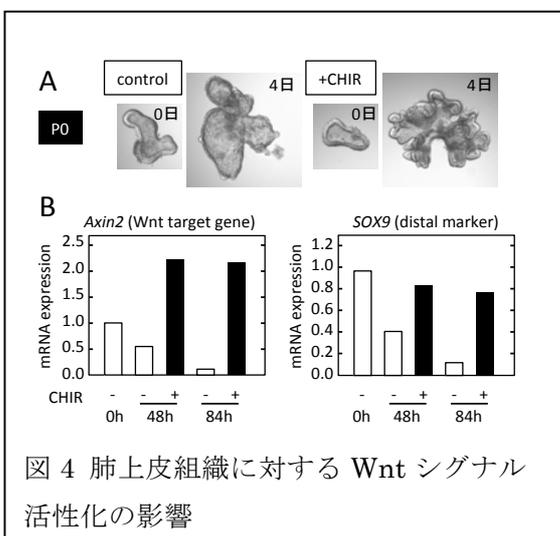


胎生期 11 日目の ICR マウス胎児肺を摘出し、ディスペパーゼ処理したものをタングステンニードルを用いて間質を除去する。単離した上皮組織をマトリゲルに封埋し、FGF10 を加えた無血清培地にて培養した（上皮組織単独培養）。またレンチウィルスは X293T 細胞にウィルスベクター及びパッケージング遺伝子を共発現させ、培養上清より回収し、超遠心にて濃縮した。濃縮後、HBSS に再懸濁し、単離した上皮に感染させた。培養した上皮組織はパラホルムアルデヒドあるいはメタノール固定し、染色した。

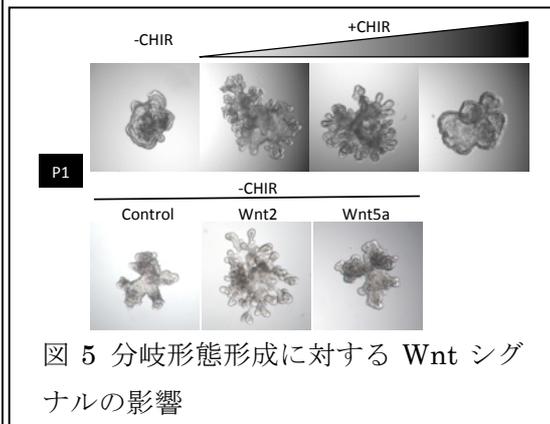
4. 研究成果

本研究期間内で次の成果を得た。

- 1) β -カテニン依存性と非依存性の両経路が上皮管腔組織形成に与える影響

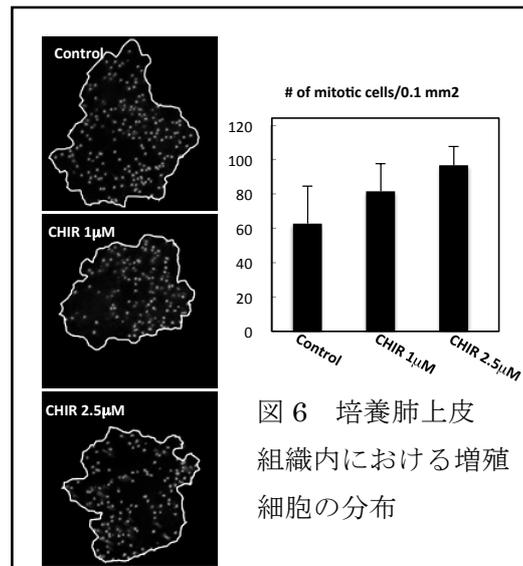


FGF10 単剤での上皮組織単独培養では、培養 4 日後 (P0 培養) に組織は不整形のシスト(内腔を有する単層上皮組織の細胞塊)となる。一方、Wnt のアゴニストである CHIR99021 (CHIR) を処理すると distal progenitor マーカー SOX9 の発現が増加し、84 時間後まで分岐を繰り返した (図 4, A,B)。その後、5-6 分岐を切り取り再びマトリゲルの中で培養する (P1 培養) と CHIR 依存的に分岐し、濃度依存的に分岐径が上昇した (図 5)。 β -カテニン経路を活性化する Wnt2 をレンチウィルスによって導入したところ、同様の結果を得た。一方、 β -カテニン非依存性経路に関わる Wnt5a では分岐が誘導されなかった (図 5)。



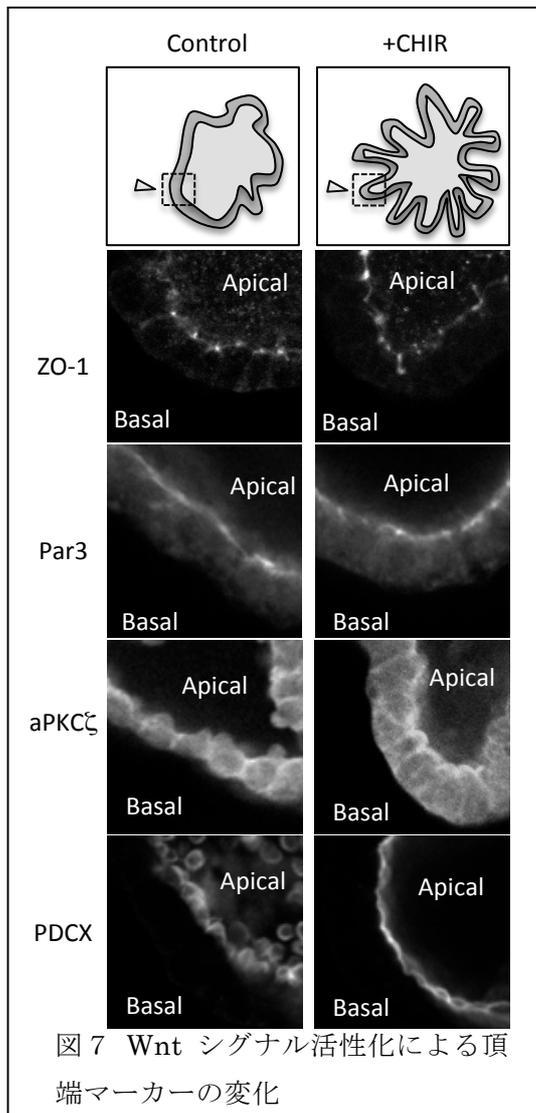
2) Wnt シグナルによる細胞増殖制御

P1 培養を用いて、分裂期染色体をリン酸化 HistonH3 で染色した。CHIR の存在、非存在下に関わらず分裂細胞は組織内で一様に分布し、増殖細胞数 (0.1mm²あたり) も変化が認められなかった (図 6)



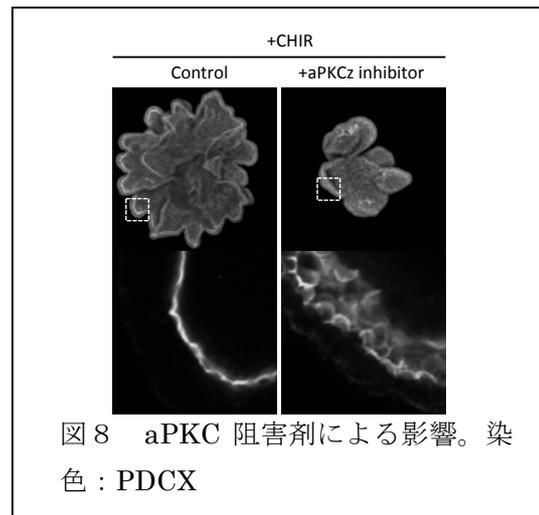
3) 上皮管腔組織形成において、Wnt シグナルが頂底極性を制御する機構

Wnt シグナルは細胞極性形成に関与することが知られている。そこで、CHIR や Wnt リガンド発現レンチウィルスを用いて Wnt



シグナルを活性化し、肺上皮組織における頂底極性に対する影響を解析した。Tight junction マーカーである ZO-1 の局在及び Par3 の局在には変化がなかった (図 7)。atypical PKC (aPKC) は頂端側に局在する極性形成因子であり、tight junction においては Par3 と、apical 膜では Crumbs/Cdc42 と複合体を形成すること知られている。aPKC の一つ aPKC ζ の局在を観察したところ、aPKC の tight junction への局在は変化がなかったが、apical 膜への局在が損なわれていた。また、頂端極性マーカーである podocalyxin (PDCX) により apical 膜の性状を解析すると、CHIR 存在下では apical 膜は収縮していたが、Wnt 非活性化状態の場合、頂端膜が expand していた (図 7)。さらに CHIR 存在下で aPKC の阻害剤を加えたところ、分岐は抑制され、apical 膜は expand し、CHIR 非存在下の phenocopy となった (図 8)。

以上より、肺上皮単独培養系を用いて Wnt- β -カテニン経路が気管支遠位端前駆細胞を維持し、分岐の形成・維持に重要であることを明らかにした。興味深いことに、Wnt シグナルは aPKC の頂端膜への局在



を制御することによって、頂端膜収縮を誘導することを見出した。今後、Wnt シグナルによる aPKC 局在調節機構、及びそれに伴う分岐形態形成機構を解析する。また aPKC による増殖細胞の基底部側への局在調節のメカニズムを明らかにする予定である。

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 3 件)

1. Gon H, Fumoto K, Ku Y, Matsumoto S, Kikuchi A. Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, 査読有, 23, 2013, 3764-7374.

2. Groen EJ, Fumoto K, Blokhuis AM, Engelen-Lee J, Zhou Y, van den Heuvel DM, Koppers M, van Diggelen F, van Heest J, Demmers JA, Kirby J, Shaw PJ, Aronica E, Spliet WG, Veldink JH, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. ALS-associated mutations in FUS disrupt the axonal distribution and function of SMN. *Hum. Mol. Genet.*, 査読有, 22, 2013, 3690-3704.

3. Fumoto K, Kikuchi K, Gon H, and Kikuchi A. Wnt5a signaling controls cytokinesis by positioning ESCRT-III to the proper site at the midbody. *J. Cell Sci.*, 査読有, 125, 2011, 4822-4832

[学会発表] (計 3 件)

1. 麓 勝己, Regulation of lung branching morphogenesis by growth factor signaling. 第一回 epithelial tubulology 国際会議, 2013 年 06 月 23 日, 北海道大学

2. 麓 勝己, Regulation of lung branching morphogenesis by Wnt signaling and mitotic

cells. 第1回若手研究フォーラム, 2013年09月26日, 大阪大学

3. 麓 勝己, 肺分岐形態形成におけるWntシグナルによる分裂軸制御機構及び生理的意義、第36回日本分子生物学会、2013年12月4日

[図書] (計 1 件)

Kikuchi A., Matsumoto S., Fumoto K., Sato A. John Wiley and Sons, Inc., Wnt signaling. 2014, 472

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麓 勝己 (Fumoto Katsumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40467783

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：