

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840066

研究課題名(和文) 分裂期細胞とWntシグナルによる分岐形態形成制御のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of fetal lung branching morphogenesis through mitotic cells and Wnt signaling

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期肺に見られる分岐形態形成は、管腔臓器形成に必須のプロセスである。Wnt シグナルは肺分岐形態形成に関与することが報告されているが、どのような細胞機能を制御するのかは不明であった。本研究では胎児肺より単離した上皮組織の培養系をもちいて、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。その結果、Wntシグナルは頂端部細胞骨格の発達と頂底極性に制御することによって、分裂期細胞依存的な上皮組織屈曲を制限しbudの形成を調節することを明らかにした。本研究は形態形成制御における増殖因子シグナルによる細胞機能調節のコンセプト並びに解析手法を提案するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Branching morphogenesis in lung is critical tissue morphogenesis to generate the epithelial tubular structures. Although Wnt signaling has been known to regulate lung branching morphogenesis, the role of Wnt signaling in the regulation of cellular function has been unclear. In this study, by using the cultured lung epithelium, I aim to study the cellular processes in branching morphogenesis regulated by Wnt signaling. I found that Wnt signaling regulates the apical cytoskeletal organization and apical-basal polarization, thereby modulating the bud formation by restricting the mitotic cell dependent tissue bending. This study proposes the concept and analytical methodology for cellular function regulated by the growth factor signaling pathways in tissue morphogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Wntシグナル 分岐形態形成 肺 発生 細胞骨格 細胞極性

## 1. 研究開始当初の背景

胎生期における分岐形態形成は、肺、腎臓、乳腺などの器官において共通に見られる管腔臓器形成の必須のプロセスである。マウス肺において分岐形態形成は、胎生9.5日目から16.5日目までに見られる現象で、上皮組織が規則性のある出芽(bud形成)を繰り返すことが知られている。これまでに、胎生期肺の増殖、分化、ならびに形態形成に必須のシグナル伝達が数多く報告されている。分岐形態形成についてもノックアウトマウスの解析によって、どのような遺伝子群が関与するのかが明らかにされてきた。しかし、組織切片などを用いた解析では各遺伝子が分岐形態形成に関与するのかが否かを明らかにするにとどまり、分岐を誘導する細胞の振る舞いを詳細に明らかにするものではなかった。Wntシグナルも発生過程や幹細胞維持、並びに肺分岐形態形成に関与することが報告されているが、どのような細胞機能制御を介して分岐形態形成を制御するのかが不明であった。

胎生期肺の分岐形態形成のメカニズムを解析する手法として上皮単独培養法が用いられてきた。この系では摘出した胎生期肺の間質を除去し、肺上皮組織のみをマトリゲルに封

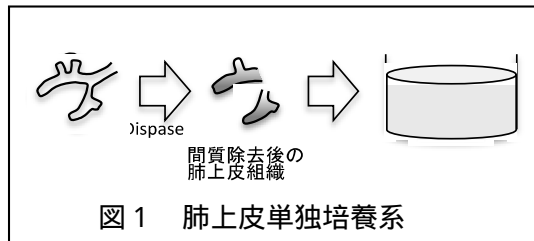


図1 肺上皮単独培養系

埋し、FGF10を添加し培養するもので、各種薬剤処理や遺伝子導入による個々の増殖因子の役割や下流因子の機能を解析することができる(図1)。これまでWntシグナルは遺伝子発現を介して遠位端に存在するSOX9+前駆細胞の維持と近位側のSOX2陽性前駆細胞の抑制に関与することが知られている。そこで私はWntシグナルを活性化する目的で低分子化合物CHIR99021(CHIR、GSK-3βを阻害することでβ-カテニンの蓄積を促す)を本培養系に加えることで、SOX9陽性遠位端細胞を維持し、増殖能と分岐能を保持した状態で、長期間維持する培養法を確立した。そこで本系を分岐形態形成のモデル実験系として、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。

私はこれまでWntシグナルによる細胞骨格制御を介する細胞分裂制御機構を明らかにしてきた経緯から、上皮組織における細胞分裂制御機構に注目した。その過程で、分裂期細胞自身の上皮組織内での局在と上皮組織屈曲点との空間的位置関係について興味深い所見を得た。分裂期細胞をリン酸化ヒストンH3抗体(pHH3)にて染色したところ、分裂期細胞はbudの先端及び基部

に見られる組織の屈曲点に局在する傾向があった。また、CHIRの濃度を高くすることによってWntシグナルを活性化すると、分裂期細胞と屈曲点との相関が見られなくなった。すなわち、分裂期細胞は上皮組織の屈曲に関与し、Wntシグナルはその作用を調節することが考えられる。そこで、分裂期細胞による上皮組織屈曲作用がbud形成に関与するのか、そしてWntシグナルによる分裂期誘導性の上皮組織屈曲作用の調節機構を明らかにするという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では肺上皮組織培養系を用いて分裂期細胞による上皮組織屈曲とbud形成との関係を明らかにする。研究開始当初、ショウジョウバエにおいて球形の分裂期細胞が気管支形成時に上皮組織の屈曲を誘導する事が報告された(Kondo T., et al., Nature)。本研究を通じて得られる知見はほ乳類肺の分岐形態形成過程においても、組織内に分裂期細胞が生じることが組織屈曲を介してbud形成のトリガーとなることを示唆しており、種を超えたメカニズムを提案できる点で意義深い。また、分裂期細胞が誘導する上皮屈曲作用をWntシグナルはどのように調節するのかを解明する。近年、幹細胞を用いた網膜、腸管や肝臓などの臓器の*in vitro*での作製が再生医療の場において注目されているが、より形態的に正確で機能的なものを作製するためには細胞レベルの特性を理解することが必須である。本研究ではWntシグナル伝達経路の活性化レベルによる細胞特性変化及びその機序を明らかにし、発生工学分野における基礎的理解の一助となることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 分裂期細胞による上皮組織屈曲を介するbud形成の解析

肺上皮組織培養系を用いて、ThymidineやHydroxyureaによる細胞周期同調系を用いて、分裂期細胞の出現とbud形成との相関関係を解析する。

mCherry標識したHiston H2Bタンパク質を上皮組織に導入し、タイムラプス観察することによって分裂期細胞の出現と上皮組織屈曲との関係を明らかにする。

2) Wntシグナルによる分裂期誘導性の組織屈曲作用に対する影響を解析する。そのため、組織内の細胞骨格の状態を各種マーカーの抗体を用いた染色によって解析する。また細胞骨格のダイナミクスを解析するために、ミオシンの活性化状態をミオシン軽鎖のリン酸化抗体で免疫染色し、その局在がWntの活性のとともに変化するか否かを解析する。

3) Wnt シグナルによって発現する下流因子を同定し、bud 形成及び上皮組織屈曲に対する影響を解析する。

#### 4. 研究成果

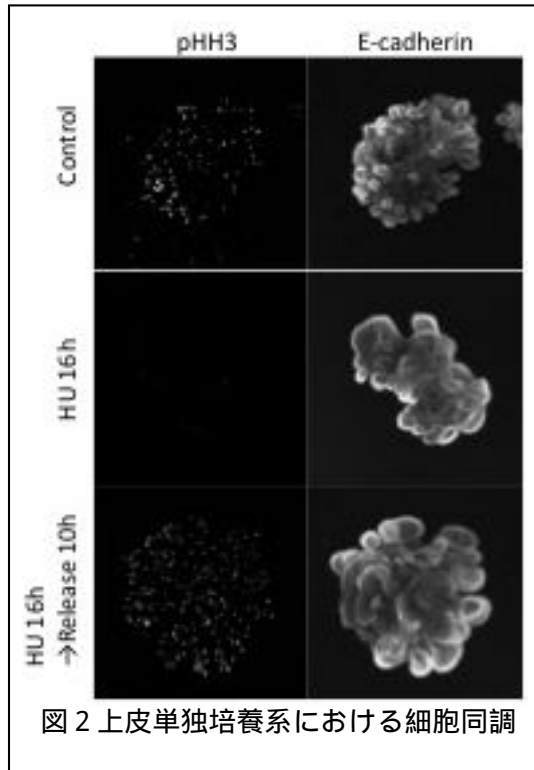


図2 上皮単独培養系における細胞同調

分岐形態形成における分裂期細胞と上皮組織屈曲との相関関係を解析するため、上皮組織培養系においてヒドロキシウレア (HU) 処理することにより細胞周期を S 期に同調させ、その後 release し、bud 形成の頻度を解析した。0.2 mM HU を 10 時間処理したところ上皮組織は S 期に同調し、リン酸化ヒストン H3 (pHH3) によって染色される分裂期細胞は消失した (図 2 上段、中段)。この際、無処理群 (control、図 2 上段) と比較して、bud の形成も阻害された (図 2 中段)。次に HU をウォッシュアウトし、S 期からリリースしたところ分裂期細胞が生じる時期において bud 形成が誘導された (図 2 下段)。

次に、培養上皮組織に対して、mCherry 標識した Histon H2B をレンチウイルスにより導入し、タイムラプス観察を行った。FGF10 単独で培養した場合、38.75% (n=18 mitotic cells) の細胞が組織屈曲と相関した (図 3 上段)。一方、FGF10 存在下で、CHIR 処理により Wnt シグナルを活性化した上皮組織においては、観察された分裂期細胞のうち 8.3% (n=24 mitotic cells) のみが組織の屈曲を伴っていた (図 3 下段)。これまで bud 形成は上皮細胞の増殖と集団的運動により制御されると考えられてきた。今回の結果から、bud 形成に影響を与える要因として分裂期細胞による上皮組織屈曲作用が関与することが明らかになった。また、Wnt シグナルの活性化は、分裂期細胞依存的な上皮組織屈曲を

制限することを示唆している。

Wnt シグナルが上皮細胞の性状に与える影響を明らかにするため、アクチン細胞骨格及

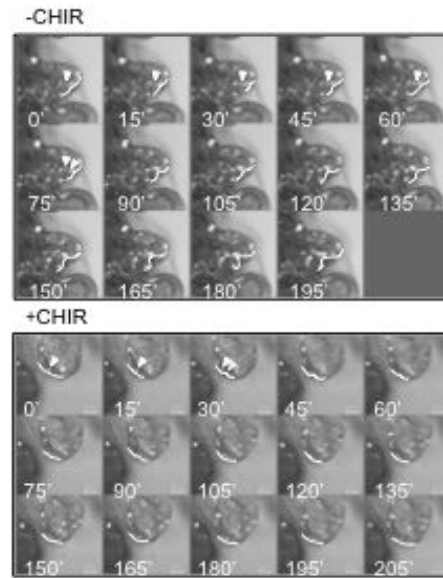


図3 分裂期細胞の出現と組織屈曲誘導

上段: CHIR 無処理群、下段: CHIR 処理群。  
矢頭、分裂期細胞。

び細胞形態変化を解析した。上皮単独培養系において FGF 存在下で CHIR を処理したところ、上皮組織の頂端部においてアクチン骨格を細胞膜にアンカーする因子

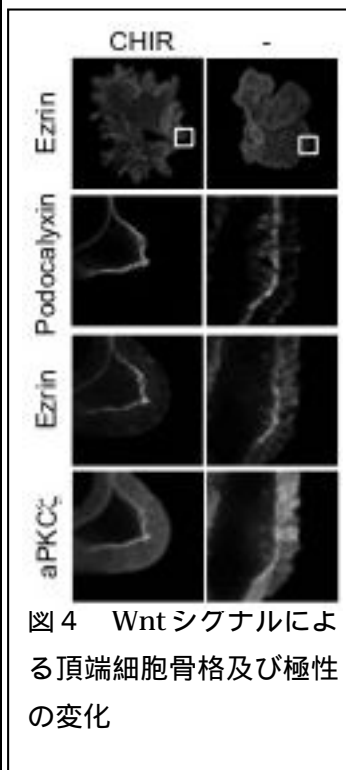


図4 Wnt シグナルによる頂端細胞骨格及び極性の変化

Podocalyxin と Ezrin は頂端部に局限していた (図 4 左)。また、頂底極性マーカーである aPKC も頂端部に特異的に局在していた (図 4 左)。一方、FGF 単独の培養系においてはすべてのマーカーの局在が損なわれ細胞質に拡散、あるいは側底部に散見された (図 4 右)。すなわち、Wnt シグナルの活

性化は肺上皮組織において頂端部細胞骨格の発達と頂底極性に関与することが判明した。さらに、細胞の形態を詳細に解析したところ、CHIR の濃度依存的に頂端部が収縮する

こと、さらに細胞が頂底方向に伸長することを見出した。これらのことから、Wnt シグナルが頂端部細胞骨格を制御することによって細胞形態変化を誘導することを見出した。

次に、*in vivo*での細胞骨格変化と Wnt シグナル構成因子の発現レベルとの関係を解析した。マウス胎生期の肺において分岐形態形成は腺様期（胎生 9.5 日目-16.5 日目）までに盛んに見られる。これ以降出生するまでの期間は管状期-終末小嚢期（胎生 16.5-生後 5 日目）として知られ、この時期には分岐形態形成運動は完了し、肺胞上皮細胞が分化し、生後の肺胞形成の準備期となる。そこで、胎生 14.5 日目と胎生 17.5 日目の肺上皮組織を比較し、細胞骨格を観察した。アクチン骨格を phalloidin 染色によって観察したところ胎生 14.5 日目では頂端部において発達していたが、胎生 17.5 日目においては減弱して

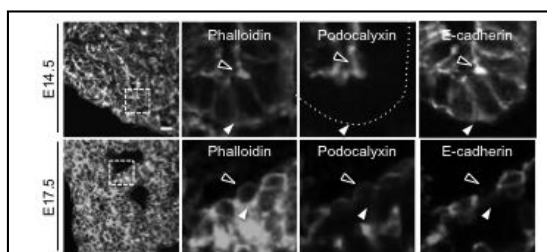


図 5 胎生 14.5 日目 (E14.5) と 17.5 日目 (E17.5) 肺の頂端膜タンパク質の局在。黒矢頭：頂端部、白矢頭：側底部

いた (図 5、phalloidin)。同様の傾向は Podocalyxin で観察した際においても見られ、胎生 14.5 日目では podocalyxin が頂端部のみに特異的に局在した。一方、胎生 17.5 日にはその傾向が損なわれ細胞膜全周性に見られ、かつ細胞質にもシグナルが検出された (図 5 podocalyxin)。管状期-終末小嚢期には I 型及び II 型肺胞上皮細胞が分化する。これらに特異的なマーカー (I 型肺胞上皮細胞マーカー: podoplanin、II 型肺胞上皮細胞: SP-C) と podocalyxin との二重染色を行ったところ、いずれのマーカーが陽性の細胞においても、podocalyxin が頂端部から損なわれていた。また、リン酸化ミオシン抗体 (Thr18/Ser19 リン酸化ミオシン: ppMLC) にて染色したところ、胎生 14.5 日目に上皮細胞のアドヘレンスジャンクションにおいてそのシグナルが特異的に検出されたが 17.5 日目には消失した (図 6A)。また、ミオシンによって張力が発生しているか否かを検出するため、 $\alpha$ 18 抗体にて染色した。この抗体はミオシンによる張力によって構造変化した  $\alpha$ -catenin を特異的に検出することができる。 $\alpha$ 18 抗体の染色は胎生 14.5 日目では頂端部のアドヘレンスジャンクションにおいて高く、胎生 17.5 日目において消失していた (図 6B)。これらの結果は、分岐形態形成期において頂

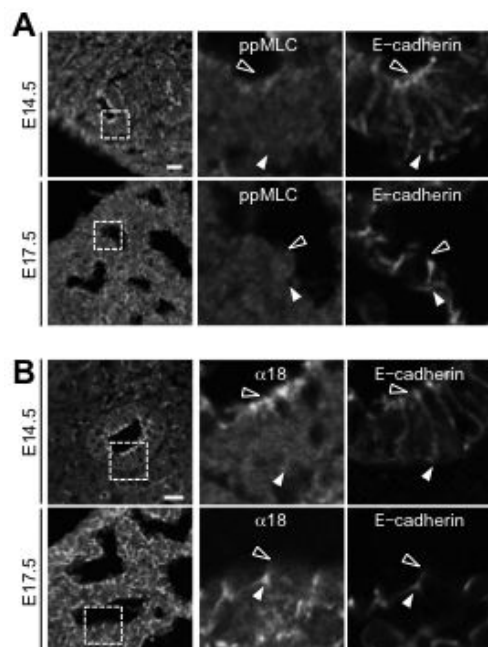
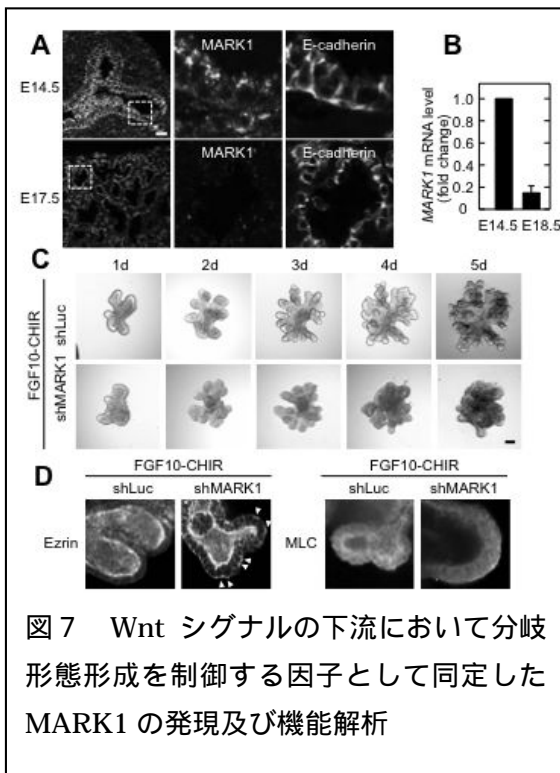


図 6 胎生期肺組織切片を用いた ppMLC (A) および  $\alpha$ 18 (B) の染色。黒矢頭：頂端部、白矢頭：側底部

端部細胞骨格が発達し、細胞形態形成を調節していることを意味する。

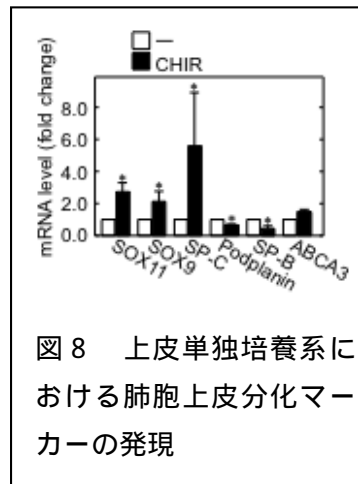
Wnt シグナル構成因子の発現レベルを検出するため、胎生 14.5 日目と胎生 18.5 日目の胎児肺辺縁を単離し、定量的 PCR 法により Wnt シグナル構成因子 (Wnt リガンド: Wnt2、Wnt7b、Wnt 受容体: Fz1、Fz4、Fz7、Fz10、Wnt 標的遺伝子: Dkk1、LEF1) の発現を解析したところ、胎生 14.5 日目に比べ、胎生 18.5 日目では有意に減少した。しかし、他の増殖因子群 (FGF9、FGF10、BMP4) などではその発現レベルに変化が見られなかった。また過去の文献においても Wnt シグナルレポーターマウスを用いた解析により Wnt シグナルは分岐形態形成を盛んに起こしている時期では肺遠位端において活性化していることが報告されている。以上より、*in vivo*において、分岐形態形成期においてアクチン細胞骨格が頂端部において発達し張力を発生すること、並びに Wnt シグナル構成因子の発現が頂端部細胞骨格の発達と相関することが明らかになった。

そこで、Wnt シグナルによって発現が誘導される遺伝子をマイクロアレイ解析によって探索した。その中から、MAP/microtubule affinity regulating kinase-1 (MARK1) に注目した。MARK1 は MARK ファミリータンパク質のひとつで、これまで MARK2 の機能を中心に解析されてきた。MARK1 は微小管結合タンパク質 (MAPs) をリン酸化することで MAPs 微小管との結合を制御する因子として同定された因子であるが、他にも myosin を直接的あるいは間接的に制御し、アクチン細胞骨格を制御することが報告されている。また MARK1 は Par1c としても知られており、上皮細胞の頂底極性に関与することが知られて



いる。さらに培養上皮細胞 MDCK 細胞においては細胞間接着の制御を介して、細胞形態変化に関与することが報告されている。そこで、MARK1 の発現及び局在を解析した。E14.5 日目の肺においては MARK1 が頂端部に局在していたが E17.5 日目では発現がみられなかった (図 7A)。また mRNA 発現レベルを解析したところ、MARK1 は E18.5 日目に比べ E14.5 日にて高発現していた (図 7B)。さらに、上皮単独培養系において MARK1 は CHIR 依存的に発現していた。分岐形態形成における MARK1 の機能を解析するために MARK1 を上皮単独培養系にてノックダウンしたところ、bud 形成が損なわれ、その形状も一定しなかった (図 7C)。また、頂端部アクチン細胞骨格タンパク質 Ezrin の局在を観察したところ、MARK1 のノックダウンによって頂端部特異的な局在が損なわれた (図 7D 左)。さらに、myosin の局在を解析すると、頂端部における局在が損なわれた (図 7D 右)。

肺胞上皮細胞は胎生 16.5 日目以降に細気管支末端に存在する肺胞前駆細胞から分化する。胎生初期においてこの前駆細胞は Wnt シグナルによって維持されていることが知られている。背景で記載した通り、本研究で用いた上皮単独培養系に対して CHIR を添加し、Wnt を活性化すると前駆細胞マーカーである SOX9, SOX11, SP-C の発現が認められた (図 8)。一方、CHIR 非存在下で培養した上皮組織の性状を調べるために、上述のマイクロアレイデータを解析したところ、CHIR 処理群に対して無処理群では肺胞上皮細胞マーカー (一型肺胞上皮: Podoplanin, ABCA3、二型肺胞上皮: SP-C, SP-B) の発現が認められた (図 8)。すなわち、本上皮単独培養系において CHIR 処理によって腺様期肺を、CHIR 非存在下での培養では管状期-終末小囊期肺を *in vitro* で再現していると考えられ、培



養上皮組織を用いて得られた結果は生理的環境下で起こる現象を反映していると考えられる。

以上の結果から、分岐形態形成期には Wnt

シグナルが活性化し、分裂期細胞による貫入を適切に調節することを明らかにした。また、Wnt シグナル及び下流で機能する MARK1 が頂端部細胞骨格の発達と極性を誘導することが必要であることを見出した。

本研究では分岐形態形成のメカニズムに注目して解析を行った。近年、管状期-終末小囊期において I 型、II 型の肺胞上皮が共通の前駆細胞によって分化することが報告された。しかし、どのようなメカニズムによって肺胞上皮が分化するのかは判然としない。今回用いた上皮組織培養系では CHIR 存在下で腺様期を、CHIR 非存在下で管状期-終末小囊期を再現できる。今後、CHIR 存在下と非存在下で変動する遺伝子群を詳細に解析することによって肺胞分化の分子機構を解明したいと考えている。

## 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. Kimura H, Fumoto K, Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, Eguchi H, Shintani Y, Endo H, Inoue M, Doki Y, Okumura M, Morii E, Kikuchi A. CKAP4 is involved in tumor progression as a Dickkopf1 receptor. *J. Clin. Invest.* (in press), 2016
2. Blokhuis A, Koppers M, Groen EJ, van den Heuvel DM, Modigliani SD, Anink JJ, Fumoto K, van Diggelen F, Snelting A, Sodaar P, Verheijen BM, Demmers JA, Veldink JH, Aronica E, Bozzoni I, den Hertog J, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Comparative interactomics analysis of different ALS-associated proteins identifies converging molecular pathways. *Acta Neuropathol.* (in press), 2016.
3. Gon H, Fumoto K, Ku Y, Matsumoto S, Kikuchi A. Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2013 Dec;24(23):3764-74.

〔学会発表〕(計 3 件)

Fumoto, K. 肺上皮管腔組織の分岐における頂底極性制御機構とその意義 The role of apical-basal polarity in lung branching morphogenesis. 平成 27 年 12 月 2 日、神戸

Fumoto, K. Possible involvement of Wnt signaling in lung branching morphogenesis through apical-basal polarization、平成 27 年 8 月 23 日、北海道

Fumoto, K. Wnt シグナルによる肺分岐形態形成制御機構 Regulation of lung branching morphogenesis by Wnt signaling、平成 26 年 12 月 2 日、神戸

〔図書〕(計 1 件)

Kikuchi, A., Matsumoto, S., Fumoto, K., and Sato, S. 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

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔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