

【領域番号】 3303	【領域略称名】 上皮管腔組織形成
【領域代表者（所属）】 菊池章（大阪大学・医学系研究科/医学部・教授）	
<p>研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進展しているのか</p> <p>領域全体の目的は、上皮管腔組織の形成・維持と破綻の分子機構を明らかにすることである。そのために、(i) <u>組織幹細胞の維持と幹前駆細胞からの上皮細胞への分化の機構</u>と(ii) <u>上皮細胞から管腔組織形成・維持への機構</u>を解明するとともに、(iii) <u>上皮管腔組織の形成・維持の過程が破綻した場合に生じる種々の奇形や疾患発症の機構</u>を解明することが必要であると考えている。すなわち、「<u>幹</u>」細胞と「<u>管</u>」腔、疾「<u>患</u>」の3つの「<u>かん</u>」を対象として捉え、A01では(i)と(ii)を、A02では(iii)を担当する。(i)については、鈴木（淳）が細胞外からのシグナルや転写調節機構の解析により、組織幹細胞の維持と分化の制御機構を解明する。大野は極性シグナルの視点により、組織幹前駆細胞から上皮細胞への運命決定の分子機構を解明する。(ii)については、菊池が液性因子と接着による分岐を伴った上皮細胞からの管腔組織形成の分子機構を解明する。大橋は3次元イメージング解析により上皮管腔形成における3次元組織構築機構を解明する。(iii)については、大谷が器官形成期と組織形成期における異常による奇形の形成機構を独自の数理解析法、発生工学的手法などで解明する。南は平面細胞極性シグナルや繊毛形成・維持シグナルの異常と繊毛関連症候群や癌の浸潤・転移などの病態との関連の分子機構を解明する。さらに、佐邊は上皮管腔構造の破綻をもたらす脱極性化のシグナル経路の変異やそれに関わるサイトカインを解明する。このような明確な目的のもと、各計画研究のこの2年間の進展状況は以下の通りである。</p> <p>A01(i) 上皮管腔組織の形成や伸長を伴う器官発生や再生の過程では、組織幹細胞の秩序正しい増殖や分化によって、必要な時に必要なだけ上皮細胞が供給されるシステムが必要である。そのため、上皮管腔組織形成の分子機構を理解するには、組織幹細胞の維持や上皮細胞への分化決定を制御する分子機構の解明が必須である。計画研究1（鈴木）は、肝臓における細胞分化や増殖に着目して研究を進めており、これまでの解析結果から、肝臓において肝細胞の分化決定や増殖を制御する転写因子とその分子機構を明らかにし、肝臓の組織幹細胞の未分化性と分化を制御する転写因子ネットワークやシグナル分子、マイクロRNAの役割を見出した。また、得られた成果を基盤として細胞の分化破綻による組織形成異常や発癌のメカニズム解析にも研究を進展させ、これまで胆管上皮細胞から発生すると考えられていた肝内胆管癌が、実際は肝細胞の分化転換によって生じることを明らかにした。さらに、肝臓の組織幹細胞の未分化性と分化を制御する転写因子について、それらの発現を制御するジェネティック/エピジェネティックな分子機構について研究を進めるとともに、細胞外シグナルによる肝発生制御機構との関係に着目して研究を行っている。また、同定したマイクロRNAの制御機構を解析し、それらの機能障害による幹細胞の分化や増殖の異常についても研究を進めている。</p> <p>計画研究2（大野）は、幹細胞の性質を維持しつつ分化した子孫細胞を生じる仕組みと、その前駆細胞や終末分化細胞への分化及びその制御機構について、線虫受精卵の非対称分裂の制御因子である極性タンパク質に着目して研究を進めた。乳癌の幹細胞のマーカーであるALDHが、乳腺幹細胞ではなく前駆細胞の優れたマーカーであること、乳腺上皮細胞におけるaPKCのconditional KOマウスにおいて、乳腺の形成時ではなく性成熟後に乳腺管腔組織の前癌病変が起き、この異常が乳腺前駆細胞の異常増殖に起因することを明らかにした。これを踏まえて分子機構の解析を行ない、aPKCが<i>ErbB2</i>の</p>	

転写抑制を介して前駆細胞の増殖を制御する新規のシグナル経路 (aPKC-ErbB2 軸) の存在を見出した。さらに、150 例以上のヒト乳癌検体の解析で、aPKC⁻;ErbB2⁺, ALDH⁺ の症例が存在することも確認した。現在、aPKC-ErbB2 軸の詳細の解析を進めると同時に、乳腺幹細胞における PAR-aPKC 極性因子の役割の解析を進めている。

A01(ii) 上皮細胞からの管腔構造形成の理解のためには、3 次元培養下での *in vitro* 実験系と器官培養系または類器官 (オルガノイド) 培養系を確立し、新規のイメージング技術等を用いて解析することが求められる。**計画研究 3 (菊池)** は、三次元培養 (マトリゲル) 下においてラット腸管上皮 IEC6 細胞が、Wnt3a と EGF または HGF の組み合わせで、効率よく管状の構造を形成する実験系を確立した。Wnt3a と EGF のシグナルの相乗的な活性化により管腔構造が形成される過程で発現する遺伝子 (因子 X) を見出した。因子 X の発現により細胞骨格の再構築が起こり、細胞伸長は管状構造の先端側の細胞で認められ、そこでは、転写活性化因子 YAP により細胞増殖が引き起こされていた。したがって、Wnt3a と EGF の相乗的シグナルにより発現する因子 X が上皮管腔形成に重要であることが示唆された (投稿中)。また、マウス胎生 12 日目の唾液腺と腎臓の原基の上皮細胞のみでオルガノイド培養すると、管状構造が誘導される実験系を確立した。その過程で因子 X は発現し、Wnt3a または EGF のシグナルを薬剤で阻害すると因子 X の発現が抑制され、唾液腺と腎臓の上皮管状構造の形成も阻害された。一方、因子 X は大腸癌組織の非腫瘍部では発現は認められなかったが、腫瘍部で 47% の症例で検出された。大腸癌細胞株 HCT116 細胞の因子 X をノックダウンすると、細胞の増殖能、運動能が抑制された。したがって、因子 X は極性化上皮細胞の管腔構造形成に重要であるばかりでなく、その発現異常は癌の発症に関与することが示唆された (投稿中)。現在、因子 X の他の上皮管腔器官における機能と種々のがんにおける発現の解析を行っている。さらに、**南と連携**することにより、Wnt5a/Ror2 シグナルが腸管炎症に関与することを明らかにしつつある。

計画研究 4 (大橋) は、細胞接着、細胞骨格、細胞極性を可視化する蛍光標識マーカー分子を恒常的に発現させた MDCK と IEC6 細胞株を樹立し、シスト形成、管腔伸長過程における頂底極性形成過程やアクチン骨格の再構築を三次元的に可視化する方法を確立した。また、細胞に作用する機械的刺激を可視化する高感度な FRET プローブの開発を行った。細胞骨格制御の視点では、乳腺上皮細胞と MDCK 細胞のシスト・管腔形成過程における細胞外基質の硬さ依存的な形質転換過程に Farp-1 を含む 5 種類の Rho-GEF が関与することを見出した。特に、Farp1 はシストを構成する細胞の極性や細胞-基質間接着の制御に関与していることを明らかにした。さらに、Farp1 に対する結合蛋白質をプロテオミクス解析によって探索し、インテグリンなどの細胞-基質間接着に関与する因子や極性形成に関与する因子を同定し、Farp1 はインテグリンの下流でストレスファイバー形成を誘導することを明らかとしている。現在、**菊池と連携**し、IEC6 細胞の管腔形成誘導における Farp1 の機能解析を進めている。

A02(iii) 上皮管腔構造の「破綻」により引き起こされる疾患の病態を明らかにするために、腸管、腎尿管、乳腺などを対象として、細胞極性と形成異常の関連につき解析し、また細胞極性と EMT の視点で、癌の浸潤転移能や尿管異常、腎線維症について解析した。

計画研究 5 (大谷) は、全身の上皮管腔組織において、発生異常を正確かつ効率よく解析するための形態学的な正常組織発生基準を確立するため、ヒト胎児およびマウス胎仔の消化器系、泌尿器系、中枢神経系、循環器系、胎盤などの細胞の極性に基づく形態・配列、総細胞数の局所的データを蓄積し、経時的変化や部位間の関係等について数理解析を含めた解析を行った。その結果、尿管の伸長に Convergent extension movement (CE; 収斂伸長運動) 機構が関与すること、腸管、尿管の上皮において Interkinetic nuclear migration (INM) が異なる様式で存在すること、腸管上皮細胞の極性形成に関与する可能性が示唆されている galectin が胎盤においても極性を持った組織形成に関与する可能性があ

ることが明らかになった。これらの成果をもとに、**菊池、南と連携し**、細胞極性に関与するとされている Wnt11, Wnt5a, Ror2 が消化管上皮細胞の部位特異的な極性や頂底極性に沿った核移動を介して形態形成に関与していることを見出した。現在、同様の手法を用いて呼吸器系や泌尿器系について解析を進めている。

計画研究 6 (南) は、平面細胞極性 (PCP: planar cell polarity) シグナル制御因子、繊毛シグナル制御因子及びアダプター分子群に焦点を当て、片側尿管結紮による腎線維症モデルの解析から、尿管上皮細胞の EMT に伴い Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化され MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) が誘導されることにより尿管上皮基底膜が破壊されること、及び EMT を起こした上皮細胞が腎線維化に関与することを明らかにした。また、上皮様癌細胞の EMT に伴い Wnt/PCP シグナルが恒常的に活性化される結果、MMP-2 の発現が誘導され、癌細胞の浸潤能が顕著に亢進することを見出した。さらに、Dok ファミリー分子群の多重遺伝子改変マウスの解析から、Dok ファミリーアダプター分子が病的な気道リモデリングや気道過敏性の亢進による気流障害の抑制に必須の役割を担い、これらの分子群の異常が病的な気道リモデリングや気道過敏症の一因となることを示した。

計画研究 7 (佐邊) は、上皮細胞の癌的 EMT 進行に着目して、主に乳腺上皮細胞と腎尿管上皮細胞を対象とし、その癌的 EMT 進行に関わる根幹的経路が GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 経路であること、この経路は E-カドヘリンのエンドサイトーシスと $\beta 1$ インテグリンのリサイクリングとを担うことを明らかにした。その過程で、p53 変異やそれに伴う epigenetic 変異が、本経路の活性化に必須であることも明らかにした。また、gain-of-function 型の p53 変異による特定の細胞内代謝経路の変化が、Arf6 活性に関与しており、EMT 進行に必要であり、代謝経路阻害によって乳癌の浸潤活性を抑制できる可能性を見出した。**大野と連携して**乳腺再構成実験系を用いて、この成果をマウスにて確認している。

応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したか

本領域では、申請時に 2. 「異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。」、3. 「多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの。」、4. 「当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの。」を研究対象とした。

研究対象 2

菊池—大谷、南—大谷の共同研究は、同一分子(Wnt11 や Wnt5a, Ror2)を細胞生物学的手法と形態学的数理的手法を用いて解析することにより、個々の細胞の極性異常が個体における器官形成(腸管、腎臓等)の形態形成にどのように関わるかを明らかにしたことで、2. に該当する。形態形成に重要な Wnt5a や Wnt11 の KO マウスの表現型に関する報告は存在するが、上皮管腔組織の極性に焦点をあてた大谷の新規の解析手法によりこれまでにない知見が集積しており、本取り組みは 3. にも通じるものである。

研究対象 3

菊池—大橋の共同研究は、上皮管腔組織の形成過程を解析する多様なツールを開発するとともに、細胞生物学とメカノバイオロジーを融合することにより、上皮管腔構造形成の分子機構の理解に貢献し、3 に該当する。公募研究班の**加藤—山城による共同研究**は、自家蛍光の影響が少ない近赤外領域で励起する新規アクチン蛍光プローブを開発して、MDCK 細胞における単分子アクチン観察手法を確立し、細胞競合に関するアプローチも行っており、4. の他の研究領域にも波及効果が及ぶことが期待される。

研究対象 4

鈴木、大野、菊池、南、佐邊が対象としている分子は、いずれも発癌や癌の悪性化と関連することが示唆されており、これらの研究を推進することが癌研究の進展に寄与すると期待され、4. に該当する。

例えば、鈴木は、肝内胆管癌が胆管上皮細胞から発生するのではなく、肝細胞の分化転換によって生じることを見出したが、この知見は癌の発生母地に関する新たな考え方を示す。大野の成果は aPKC が乳腺前駆細胞の増殖制御を通じて、乳腺組織の維持の過程に関わることを意味しており、今回見出した aPKC-ErbB2 枢軸は、ヒト乳癌の一群 (aPKC⁻, ErbB2⁺, ALDH⁺) における異常を説明する。菊池が同定した上皮管腔形成を制御する因子 X の過剰発現が、ヒト大腸癌の 47% に認められたという知見も、新たな発癌遺伝子の同定に繋がる可能性がある。また、**菊池と南**による Wnt5a/Ror2 シグナルが腸管炎症に促進的に作用するという知見は、免疫・炎症領域における新たなシグナル伝達機構の存在を示すものである。