

●レポート 『第2回若手共同研究進捗状況報告会』

◆日時：平成26年2月14日(金)

14:00～14:30(発表20分、質疑応答10分) 平島 正則 先生

14:30～15:00(発表20分、質疑応答10分) 堀田 耕司 先生

◆場所：千里ライフサイエンスセンター 601号室



昨年度に続いて若手共同研究助成(共同研究者：九州大学・池ノ内順一)を賜り、研究進捗状況を報告させていただきました。これまでES細胞をコントロールにして、内皮細胞に特異的な脂質分子種の同定を目指してきましたが、逆にES細胞に特異的な脂質分子種

パターンと脂質合成酵素発現を見出しました。今後は元々の狙いであった内皮細胞分化時に生じる変化を探索し続けると同時に、今回見出したES細胞特異的なものの細胞生物学的意義を明らかにして、幹細胞の維持・分化を含む管腔生物学の発展に貢献する論文にまとめて発表したいと考えています。最後になりましたが、領域代表をはじめとする総括班の先生方には、われわれの挑戦的な研究に対するご支援および的確なご助言を賜り、厚く御礼申し上げます。(神戸大学 平島 正則)



もとはといえば本新学術領域主催の国際会議や会合で永樂先生と情報交換できたことがきっかけで話が進み、若手共同研究に応募させていただきました。おかげさまで共同研究が進みつつあります。本報告会ではホヤの神経管形成過程の3次元ライブイメージング

に成功し、細胞系譜を網羅的に明らかにした後、個々の細胞のふるまいがどのように神経管形成に寄与しているかを報告させていただきました。管腔形成学という共通の学問的興味をもつ先生方より多方面から今後の研究の発展に向けて多くの熱いご意見や励ましのコメントをいただきました。発表後は大変エンカレッジされた気持ちになりました。よい論文となるように今後とも精進致します。

(慶應義塾大学 堀田 耕司)



新学術領域研究

上皮管腔組織形成 News Letter

Vol.3
Mar. 2014



第1回国際シンポジウム(2013年6月22日・23日)

Tubulology

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「上皮管腔組織形成」
ニュースレター Vol. 3

発行日 平成26年3月

発行 領域代表 菊池 章(大阪大学大学院医学系研究科 分子病態生化学)
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 TEL: 06-6879-3410 FAX: 06-6879-3419
E-mail: akikuchi@molbiobc.med.osaka-u.ac.jp

編集 上皮管腔組織形成 事務局(神戸大学大学院医学研究科 細胞生理学分野)

URL <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/tubulology/>

Tubulology

目次

Tubulology News Letter

Vol. 3, Mar. 2014

CONTENTS

領域代表挨拶	1
組織・班員紹介	2
計画研究班の研究成果	4
鈴木 淳史 (九州大学) 組織幹細胞の維持と分化の制御機構	4
大野 茂男 (横浜市立大学) 組織幹前駆細胞の極性制御と運命決定	5
菊池 章 (大阪大学) 分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構	6
大橋 一正 (東北大学) 上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の3次元イメージング解析	7
大谷 浩 (島根大学) 器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害	8
南 康博 (神戸大学) 平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移	9
佐邊 壽孝 (北海道大学) 上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換	10
公募研究班の研究成果	11
山城 佐和子 (東北大学) 上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明	11
中村 哲也 (東京医科歯科大学) 独自の正常大腸上皮幹細胞培養技術を用いた管腔形成機構の解析	12
池ノ内 順一 (九州大学) 細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明	13
谷水 直樹 (札幌医科大学) 胆管をモデルとした、管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解明	14
永樂 元次 (理化学研究所) 神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明	15
加藤 洋人 (東京医科歯科大学) 上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合 一超初期発がんメカニズムの解明一	16
西中村 隆一 (熊本大学) 細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明	17
清川 悦子 (金沢医科大学) 類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング	18
レポート	19
レポート 若手主催研究会 『第1回 Tubulology 研究会』	19
レポート 第3回技術講習会 『神戸大学メタボローム・プロテオーム解析講習会』	19
レポート 『第1回国際シンポジウム』	20
レポート 『第2回若手共同研究進捗状況報告会』	22

領域代表挨拶

Introductory Message

3年目の「上皮管腔組織形成」領域班の活動と今後の展望

平成 23 年 7 月に本領域が発足してから、2 年 8 か月が経過しました。この期間中に計画研究班 7 班と公募研究班 25 班が上皮管腔組織の形成、維持と破綻に関する研究を行い、その研究活動に関する中間評価が昨年 9 月 4 日に行われました。評価は A (研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる) であり、審査部会からは「上皮管腔というキーワードにより実績のある研究者が集結し、幹細胞誘導系の開発を世界に先駆け成功させるなど、研究は順調に進展している。領域内の連携も良好で、今後も成果が見込まれる。また、管腔組織の形成に結びつく分子 (遺伝子) レベルの解明など新たな展開によるがん研究や発生・再生研究分野への波及効果も期待される。」とコメントをいただきました。これも班員が領域の目的に沿って着実に成果を挙げた結果が評価されたものであり、領域代表としましては一安心しました。しかし、「管腔形成、上皮化、細胞極性という既存の概念の組合せからどのような新しい概念が生み出されるのか明確にする必要がある。」というコメントもいただきました。これは本新学術領域が目指すところであり、上皮管腔組織の形態は多様ですが、形成過程のパターンを極性の視点で大きく二つに分けて考えることができます。一つは、非極性化上皮細胞集団が間質へ肥厚し伸長と分岐を繰り返した後、極性化して管腔構造を構築する形式で、乳腺や唾液腺、膵臓等がこれに相当します。他の一つは、極性化上皮細胞が内腔を有したまま伸長し分岐する形式で、腸管や気管支、尿管、総胆管等が相当します。この二種類の上皮管腔形成における共通の分子基盤を解明するとともに、ちがいを明確にすることにより、多様な上皮管腔組織の形成・維持を総合的に理解し、「管腔生物学」という新たな学術領域を創出することを本領域の目的として掲げています。この目的を達成するために、審査部会からのコメントに真摯に向き合い、その問題解決のためのチャレンジをしていくことが必要と考えています。



本年度の大きな行事としましては、昨年 6 月 22, 23 日に計画研究代表者の佐邊壽孝先生のオーガナイズにより、北海道大学で第 1 回国際会議を開催しました。海外からは、乳腺上皮組織を中心とした上皮形態形成研究の第一人者である Zena Werb 教授ならびに YAP/TAZ の著名な研究者である Marius Sudol 教授に加えて新進気鋭の管腔形成に関わる若手研究者 5 名を招待して、講演をしていただきました。領域側からは計画研究者 7 名と公募研究代表者 5 名が口頭発表し、それ以外の分担研究者と公募研究者も全員ポスター発表を行いました。流石に海外からの研究者は、上皮組織構築法やイメージング解析の技術が洗練されており、極めて質の高い発表でした。ポスター発表では、若手研究者が活発に議論している様子が印象的であり、この領域の将来に可能性を感じることができました。さらに、新学術領域のメンバーでない国内の研究者にも参加していただきましたことにより、新しい考え方、知識、技術を共有することができました。このような多くの研究者と交流する場を提供することは新学術領域研究の重要な使命ですので、本当に意義のある会になったと感じています。また、11 月 20 日には、第 3 回技術講習会として質量分析技術講習会を計画研究代表者の南康博先生と評価委員の竹縄忠臣先生にオーガナイズしていただきました。質量分析法の重要性はいまさら言うまでもありませんが、精度が向上し応用範囲が広がるにつれ、いかにしてこの技術を自分たちの実験系に取り込んでいくかを考えていかなければならないと感じました。

若手研究者に活躍していただく場を提供することも新学術領域の重要な役割です。昨年度、本年度と 45 歳以下の公募研究代表者を対象として、本領域内での若手研究者間での共同研究の提案を募集し、優れた共同研究提案に対して各年度 2 課題に研究費を支援しました。また、本領域内での若手研究者によるワークショップ企画の提案をしていただき、8 月 25 日に東京大学にて第 1 回 Tubulology 研究会「肝臓における管腔構造と実質細胞の相互作用」を開催しました。平成 26, 27 年度もこのような若手支援を継続していくつもりです。

中間評価が終わり、あと 2 年間の活動を行うこととなります。これから平成 26 ~ 27 年度の公募研究班も加わり、新たな研究体制が整います。3 年弱本領域の運営に携わり、我が国の上皮形態形成研究に関わる研究者群の様子がわかってきました。また、将来に高い可能性を秘めた若手研究者が存在することにも心強さを感じています。上皮管腔組織形成の総論としての研究と個別の管腔臓器の各論の研究とを組織化し、ここにオミックス技術やイメージング技術、理論生物学の研究を組み合わせることにより、「管腔生物学」を創出していく研究者集団ができていくと期待しています。2 年後の更にはその先を見据えた研究活動を本領域として行っていく必要があり、関係者の多大なるご支援、ご協力をお願いいたします。

平成 26 年 3 月

領域代表 菊池 章

組織・班員紹介

Organization and Members

●総括班

	名 前	所 属	担 当
領域代表	菊池 章	大阪大学 医学系研究科・生化学・分子生物学講座・分子病態生化学	代表、広報担当
	南 康博	神戸大学 医学研究科・生理学・細胞生物学講座・細胞生理学分野	事務局、広報担当
	大野 茂男	横浜市立大学 医学研究科医学専攻・分子細胞生物学	若手育成担当
	佐邊 壽孝	北海道大学 医学研究科・生化学講座・分子生物学分野	集会担当
	大谷 浩	島根大学 医学部・解剖学講座・発生生物学	技術担当
	大橋 一正	東北大学 生命科学研究科・分子生命科学専攻・情報伝達分子解析分野	技術担当
	鈴木 淳史	九州大学 生体防御医学研究所・器官発生再生学分野	技術担当
	評価委員	竹縄 忠臣	神戸大学 医学研究科・質量分析総合センター
本多 久夫		神戸大学 医学研究科・細胞生物学分野	評価担当
宮島 篤		東京大学 分子細胞生物学研究所・発生・再生研究分野	評価担当

●研究項目

個体における組織構築の過程では、形成と維持が巧妙に制御され、その制御機構が破綻すれば正常組織は構築・維持できず、組織の異常をもたらす疾患に至ると考えられます。したがって、上皮管腔組織の「形成・維持」の機構の理解は、「破綻」の機構の理解に通じ、逆に「破綻」の機構の理解が「形成・維持」の機構の理解に通じると考えられますので、両者の視点からの解析を平行して進めることが上皮管腔組織形成の分子基盤を包括的に理解するために必要不可欠です。このような理由から、研究項目 A01「上皮管腔組織の形成・維持」と A02「上皮管腔組織の破綻」を設定し、上述した二種類の上皮管腔組織形成のパターンを念頭に置きながら、研究を展開します。

●計画研究班

A01	01 班	鈴木 淳史（九州大学・生体防御医学研究所・教授） 組織幹細胞の維持と分化の制御機構	➡P4
	02 班	大野 茂男（横浜市立大学・医学研究科・教授） 組織幹前駆細胞の極性制御と運命決定	➡P5
	03 班	菊池 章（大阪大学・医学系研究科・教授） 分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構	➡P6
	04 班	大橋 一正（東北大学・生命科学研究科・准教授） 上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の3次元イメージング解析	➡P7
A02	05 班	大谷 浩（島根大学・医学部・教授） 器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害	➡P8
	06 班	南 康博（神戸大学・医学研究科・教授） 平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移	➡P9
	07 班	佐邊 壽孝（北海道大学・医学研究科・教授） 上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換	➡P10

●公募研究班

A01	01 班	西森 克彦（東北大学・農学研究科・教授） 新規 Wnt シグナル修飾因子 LGR4 による乳腺上皮細胞運命の決定と極性制御機構解明	
	02 班	山城 佐和子（東北大学・生命科学研究科・特任助教） 上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明	➡P11
	03 班	中村 哲也（東京医科歯科大学・歯医学総合研究科・准教授） 独自の正常大腸上皮幹細胞培養技術を用いた管腔形成機構の解析	➡P12
	04 班	松本 邦弘（名古屋大学・理学研究科・教授） 管形成過程における紡錘体配向の変換機構	
	05 班	池ノ内 順一（九州大学・理学研究院・准教授） 細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明	➡P13
	06 班	吉村 信一郎（大阪大学・医学系研究科・助教） 管腔形成における細胞内極性輸送の機能の解明	
	07 班	平島 正則（神戸大学・医学研究科・准教授） リンパ管腔形成と維持における Aspp1 の役割と分子機構	
	08 班	谷水 直樹（札幌医科大学・医学部附属フロンティア医学研究所・講師） 胆管をモデルとした、管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解明	➡P14
	09 班	芝 大（京都府立医科大学・医学研究科・講師） 腎尿細管構造の維持機構解析の基盤となる一次繊毛蛋白による細胞周期調節のしくみ	
	10 班	堀田 耕司（慶應義塾大学・理工学部・講師） 脳胞形成の4次元定量解析	
	11 班	中村 暢宏（京都産業大学・総合生命科学部・教授） 分泌経路のリモデリングが上皮管腔組織形成に果たす必須の役割	
	12 班	北舘 祐（基礎生物学研究所・助教） マウス精上皮管腔極性化機構の解明	
	13 班	永樂 元次（独立行政法人理化学研究所・副ユニットリーダー） 神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明	➡P15

A02	14 班	加藤 洋人（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教） 上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合 一起初期発がんメカニズムの解明	➡P16
	15 班	阿部 宏之（山形大学・理工学研究科・教授） 光干渉断層画像化法を応用した肺組織構築イメージングシステムの開発	
	16 班	紙谷 聡英（東海大学・創造科学技術研究機構・特任准教授） 多能性幹細胞由来肝幹・前駆細胞を用いた胆管疾患解析系の構築	
	17 班	川崎 善博（東京大学・分子細胞生物学研究所・講師） 癌抑制遺伝子産物 APC が関与する上皮管腔形成機構とその破綻による癌発症機構の解明	
	18 班	伊藤 暢（東京大学・分子細胞生物学研究所・助教） 新規可視化法を用いた、正常時と障害時における胆管3次元ダイナミクス解析	
	19 班	浅岡 洋一（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教） 器官サイズ制御シグナルによる神経管・血管系上皮組織の3次元構築機構の解明	
	20 班	鈴木 聡（九州大学・生体防御医学研究所・教授） 上皮管腔組織形成における Mob1 の役割とその破綻	
	21 班	西中村 隆一（熊本大学・発生医学研究所・教授） 細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明	➡P17
	22 班	谷口 喜一郎（学習院大学・理学部生命科学科・助教） 非再生系成体組織における異常細胞の検出・排除システム	
	23 班	佐藤 俊明（慶應義塾大学・医学部・特任講師） 大腸上皮の癌化に伴う管腔形成異常メカニズムの解明	
	24 班	清川 悦子（金沢医科大学・医学部・教授） 類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング	➡P18
	25 班	山越 貴水（独立行政法人国立長寿医療研究センター・室長） 幹細胞老化の制御機構とその破綻による上皮管腔組織機能低下メカニズムの解明	

研究成果(計画研究)

Research Progress (Programmed research project)

計画研究01 組織幹細胞の維持と分化の制御機構

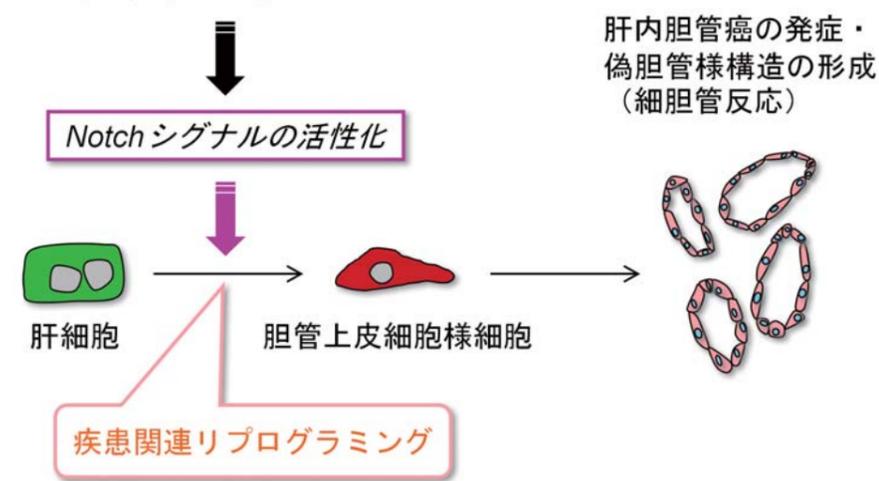
疾患に関連した肝細胞分化の破綻とリプログラミング



研究代表者 鈴木 淳史 (九州大学 生体防御医学研究所 器官発生再生学分野 教授)

肝臓は、代謝や解毒など、生命維持に必要な不可欠な役割を数多く担うだけでなく、器官レベルの再生ができる特殊な器官としても知られている。最近、我々は肝細胞への分化決定がたった2種類の転写因子によって支配的に制御されていることを発見し、線維芽細胞にこれら2種類の転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞 (iHep 細胞) へと誘導することに成功した (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011)。そこで次に、生体内における細胞の運命転換と肝臓病の関係に着目し、慢性的な肝障害によって門脈周囲に出現する偽胆管様構造 (細胆管反応) の由来を明らかにすべく、誘導型 Cre/loxP システムを用いた細胞系譜追跡実験を行った。その結果、偽胆管を形成する細胞は、胆管上皮細胞の特徴をもつにも関わらず、Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換によって、肝細胞から生じることが判明した (Sekiya and Suzuki, *Am J Pathol*, in press)。また、慢性肝炎に加え、発症原因が不明で予後の悪い肝内胆管癌についても同様の解析を行った結果、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、実は Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換から生じる腫瘍であることが判明した (Sekiya and Suzuki, *J Clin Invest*, 2012)。以上の結果は、慢性的な障害に対して再生を繰り返す肝臓では、正常な再生応答から逸脱した特殊な状況に陥ることによって肝細胞の分化状態が破綻し、肝細胞が胆管上皮細胞の特徴を有する偽胆管細胞や肝内胆管癌細胞に変化することを示している。我々は、このような現象を「疾患関連リプログラミング」と呼び、癌などの難治性疾患との関係に注目している (Suzuki, *Curr Opin Genet Dev*, 2013)。

発癌物質の投与・慢性的な炎症



●代表論文

1. Sekiya, S. and Suzuki, A. Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am. J. Pathol.*, (in press).
2. Suzuki, A. Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23: 579-584, 2013.
3. Sekiya, S. and Suzuki, A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 122: 3914-3918, 2012.
4. Sekiya, S. and Suzuki, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475: 390-393, 2011.

計画研究02 組織幹細胞の極性制御と運命決定

組織幹細胞の極性制御と運命決定

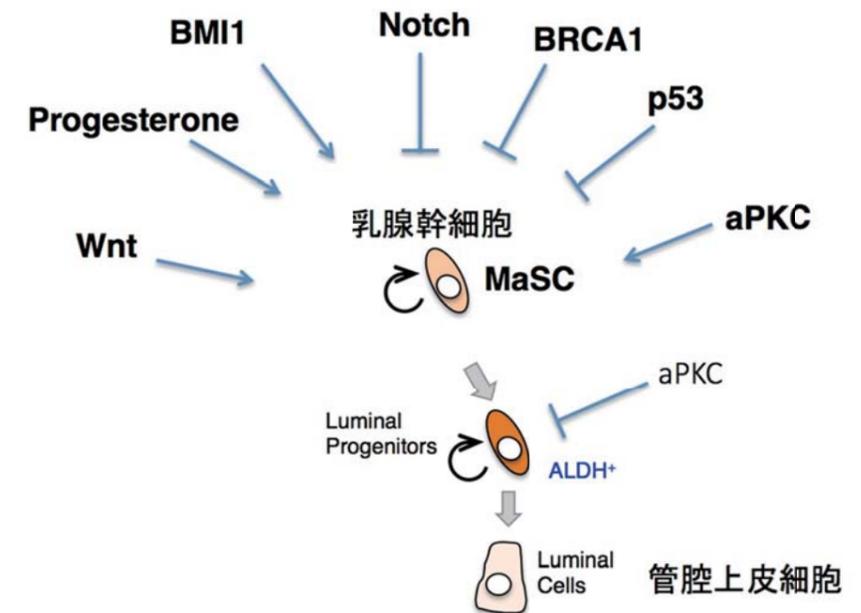


研究代表者 大野 茂男 (横浜市立大学 医学研究科 分子細胞生物学 教授)

線虫受精卵の非対称分裂に先立つ極性形成に必須の因子が、そもそもほ乳類の組織幹細胞の運命決定に関わっているのか？関わっているのだとしたらどの様に関わっているのか？他の運命決定因子とどのような関係にあるのか？さらに、細胞極性の異常ががん等の疾患と具体的にどのように関わっているのか？これらの疑問に答えることは、上皮管腔組織の形成と維持の理解に欠かせません。

マウスの乳腺組織は、乳管除去後の脂肪組織への細胞移植により、管腔組織の形成と維持を実験的に再現できる希有な実験系です。このことは、組織幹細胞や前駆細胞を個体レベルで評価できることを意味しています。さらに、様々な培養系を用いて試験管内でも幹細胞や前駆細胞を評価することができます。残念ながら幹細胞を特定できるマーカーは未だに発見されていませんが、それを濃縮できる様々なマーカーを利用することができます。

本研究では、このマウスの乳腺組織に着目し、幹細胞の自己更新と分化といった運命決定への極性因子群の役割の解析を進めています。さらに、マウスの神経幹細胞における役割についても解析を進めています。



マウス乳腺幹細胞における役割が推測されている分子群

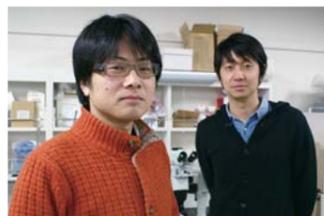
●代表論文

1. Kato, S., et al. aPKC λ /iota is a beneficial prognostic marker for pancreatic neoplasms. *Pancreatology* 13(4): 360-368, 2013.
2. Yoshihama, Y., et al. High expression of KIBRA in low atypical protein kinase C-expressing gastric cancer correlates with lymphatic invasion and poor prognosis. *Cancer Sci.* 104(2): 259-265, 2013.
3. Ishiguro, H., et al. The co-expression of aPKC λ /iota and IL-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence. *Cancer Sci.* 102(8): 1576-1581, 2011.
4. Yoshihama, Y., et al. KIBRA Suppresses Apical Exocytosis through Inhibition of aPKC Kinase Activity in Epithelial Cells. *Curr. Biol.* 21: 705-711, 2011.

研究成果(計画研究)

計画研究03 分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構

分岐を伴った上皮管腔組織構造の形成・維持の分子機構



麓 勝己(左)、松本 真司(右)

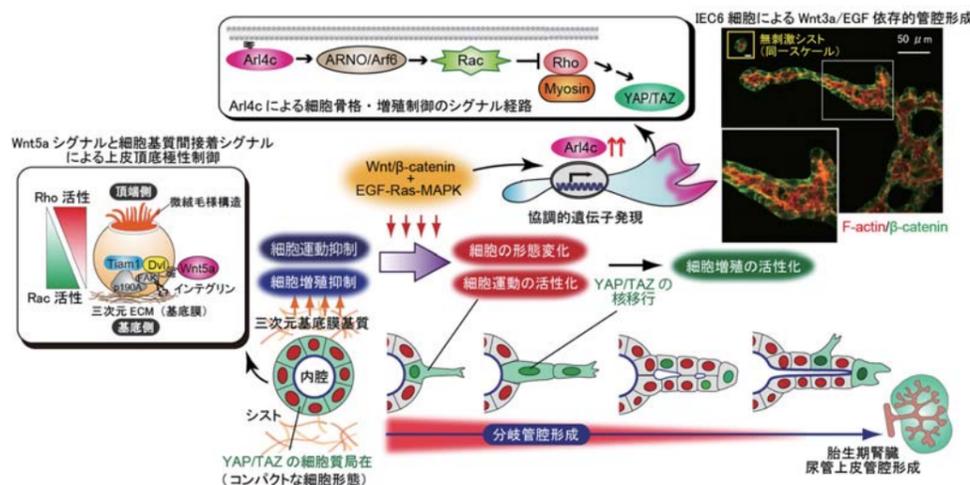
研究代表者 菊池 章 (大阪大学 医学系研究科 分子病態生化学 教授)
 研究分担者 麓 勝己 (大阪大学 医学系研究科 分子病態生化学 助教)
 連携研究者 松本 真司 (大阪大学 医学系研究科 分子病態生化学 特任助教)

私共の計画研究班では、三次元培養法や器官培養法を用いて、「液性因子」と「接着」により上皮細胞が管腔構造を形成する分子機構を「極性」の視点から明らかにする目的で研究を行っている。

本目的を達成するために、新たな *in vitro* の三次元管腔形態形成モデルを確立した。

ラット正常腸管上皮細胞 (IEC6) はマトリゲル内で三次元培養すると、頂底極性を形成して内腔を有するシストを形成する。IEC6 において、頂底極性は細胞基質間接着と液性因子 Wnt5a シグナルによる Rac と Rho 活性の質的・空間的調節により制御されていた。一方、IEC6 は Wnt3a と EGF という二つの液性因子の存在下で培養すると、伸長と分岐を繰り返して頂底極性を保持した管腔構造を形成した。この Wnt3a と EGF との協調的作用は、標的遺伝子 *Arl4c* の発現を誘導し、Rac と Rho の活性制御を介して細胞骨格と形態を調節することで、細胞の運動能を亢進した。さらに、細胞骨格の変化は転写活性化因子 YAP/TAZ によって細胞増殖シグナルへと変換された。すなわち、IEC6 は液性因子シグナルの協調的作用により管腔構造を形成する分子機構が明らかになった。*Arl4c* は胎生期マウス腎臓の尿管芽先端部で強く発現しており、マトリゲル内での尿管上皮の分岐管腔形成に関与した。これらの結果は、管腔形成における液性因子シグナルと細胞基質間接着シグナルの協調による新たな「伸長」、「分岐」および「極性化」の制御機構を明らかにしたものである。

さらに私共は、胎生期の肺、腎臓、唾液腺等、各種管腔臓器の器官培養系を確立している。現在これら実験系を用いて、液性因子と接着シグナルによる運動、増殖、分化、極性化等の細胞機能調節の解析とその実行因子群の同定を試みている。各管腔臓器間で普遍的、または特異的に働くシグナルを見出し、上皮管腔形成の原理を見出していきたい。

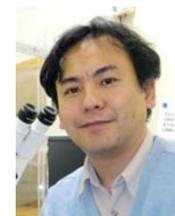


●代表論文

1. Matsumoto, S., Fujii, S., Sato, A., Ibuka, S., Kagawa, Y., Ishii, M., and Kikuchi, A. A combination of Wnt and growth factor signaling induces *Arl4c* expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J.*, (in press).
2. Kagawa, Y., Matsumoto, S., Kamioka, Y., Mimori, K., Naito, Y., Ishii, T., Okuzaki, D., Nishida, N., Maeda, S., Naito, A., Kikuta, J., Nishikawa, K., Nishimura, J., Haraguchi, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Ishii, H., Doki, Y., Matsuda, M., Kikuchi, A., Mori, M., and Ishii, M. Cell Cycle-Dependent Rho GTPase Activity Dynamically Regulates Cancer Cell Motility and Invasion In Vivo. *PLoS ONE* 8: e83629, 2013.
3. Gon, H., Fumoto, K., Ku, Y., Matsumoto, S., and Kikuchi, A. Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 24: 3764-3774, 2013.
4. Yamamoto, H., Awada, C., Hanaki, H., Sakane, H., Tsujimoto, I., Takahashi, Y., Takao, T., and Kikuchi, A. The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *J. Cell Sci.* 126: 2931-2943, 2013.

計画研究04 上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の3次元イメージング解析

上皮管腔形成過程におけるアクチン骨格の再構築制御の分子機構の解明



研究代表者 大橋 一正 (東北大学 生命科学研究科 情報伝達分子解析分野 准教授)

上皮管腔組織の形成過程では、組織を形成する個々の上皮細胞の運動能、接着性、極性、増殖能、分化能は、外環境や近隣の細胞からの様々なシグナルや3次元的位置情報によって協調的に制御されています。私たちは、アクチン細胞骨格の再構築制御機構を中心に、機械的な力(メカニカルストレス)の作用が3次元環境下の上皮管腔組織形成を制御する分子機構の解明を目指しています。その一つのモデルとして、細胞外マトリックス (ECM) の硬さ依存的な乳腺上皮細胞の形質転換機構を用いています。乳腺上皮細胞は、正常組織と同等の硬さの ECM ゲル内で3次元培養を行うと増殖と共に細胞が極性化し嚢胞 (Cyst) を形成しますが、癌組織に準ずる硬さのゲル内で培養すると増殖促進と極性消失といった上皮間葉転換様の形質転換を引き起こすことが知られています。この過程においてアクチン骨格の再構築制御が重要であり、その分子機構の解明はメカニカルストレスによる乳癌の悪性化機構とともに乳腺組織の形態形成機構を解明する手がかりになると考えられます。私たちは、アクチン骨格の再構築を制御する Rho ファミリー分子群を時空間的に制御する活性化因子 (Rho-GEF) の網羅的な発現抑制解析を行い、乳腺上皮 MCF10A 細胞の ECM の硬さ依存的な形質転換に *Farp1* と呼ばれる Rho-GEF が必要であることを見出しました。*Farp1* は、細胞 ECM への接着を促進し、接着依存的な細胞増殖に寄与します (図 1)。また、これまで研究を行ってきた Rho ファミリーの下流で働く LIM キナーゼの阻害剤を同定し、この阻害剤が細胞遊走や癌細胞の浸潤を抑制することを明らかにしました。今後、3次元環境下の上皮細胞集団の極性化や管腔の伸長におけるアクチン骨格の再構築の役割をこれらのシグナル分子、阻害剤、3次元イメージング技術を用いて解明していきます。

乳腺上皮細胞は、正常組織と同等の硬さの ECM ゲル内で3次元培養を行うと増殖と共に細胞が極性化し嚢胞 (Cyst) を形成しますが、癌組織に準ずる硬さのゲル内で培養すると増殖促進と極性消失といった上皮間葉転換様の形質転換を引き起こすことが知られています。この過程においてアクチン骨格の再構築制御が重要であり、その分子機構の解明はメカニカルストレスによる乳癌の悪性化機構とともに乳腺組織の形態形成機構を解明する手がかりになると考えられます。私たちは、アクチン骨格の再構築を制御する Rho ファミリー分子群を時空間的に制御する活性化因子 (Rho-GEF) の網羅的な発現抑制解析を行い、乳腺上皮 MCF10A 細胞の ECM の硬さ依存的な形質転換に *Farp1* と呼ばれる Rho-GEF が必要であることを見出しました。*Farp1* は、細胞 ECM への接着を促進し、接着依存的な細胞増殖に寄与します (図 1)。また、これまで研究を行ってきた Rho ファミリーの下流で働く LIM キナーゼの阻害剤を同定し、この阻害剤が細胞遊走や癌細胞の浸潤を抑制することを明らかにしました。今後、3次元環境下の上皮細胞集団の極性化や管腔の伸長におけるアクチン骨格の再構築の役割をこれらのシグナル分子、阻害剤、3次元イメージング技術を用いて解明していきます。

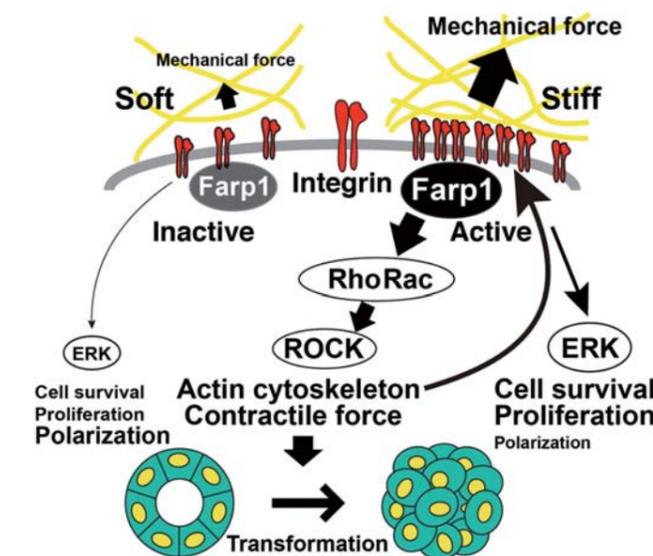


図 1. 細胞外マトリックスの硬さ依存的な乳腺上皮細胞の形質転換における *Farp1* の役割

●代表論文

1. Ohashi, K., Sampei, K., Nakagawa, M., Uchiumi, N., Amanuma, T., Aiba, S., Oikawa, M., and Mizuno, K. *Damnacanthal* inhibits cell migration and invasion via direct inhibition of LIM-kinase. *Mol. Biol. Cell*, (in press).
2. Hayashi, A., Hiattari, R., Tsuji, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. p63RhoGEF-mediated formation of a single polarized lamellipodium is required for chemotactic migration in breast carcinoma cells. *FEBS Lett.* 587: 698-705, 2013.
3. Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., and Mizuno, K. Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *Biotechniques* 52: 45-50, 2012.
4. Tsuji, T., Ohta, Y., Kanno, Y., Hirose, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. *Mol. Biol. Cell* 21: 3590-3600, 2010.

研究成果(計画研究)

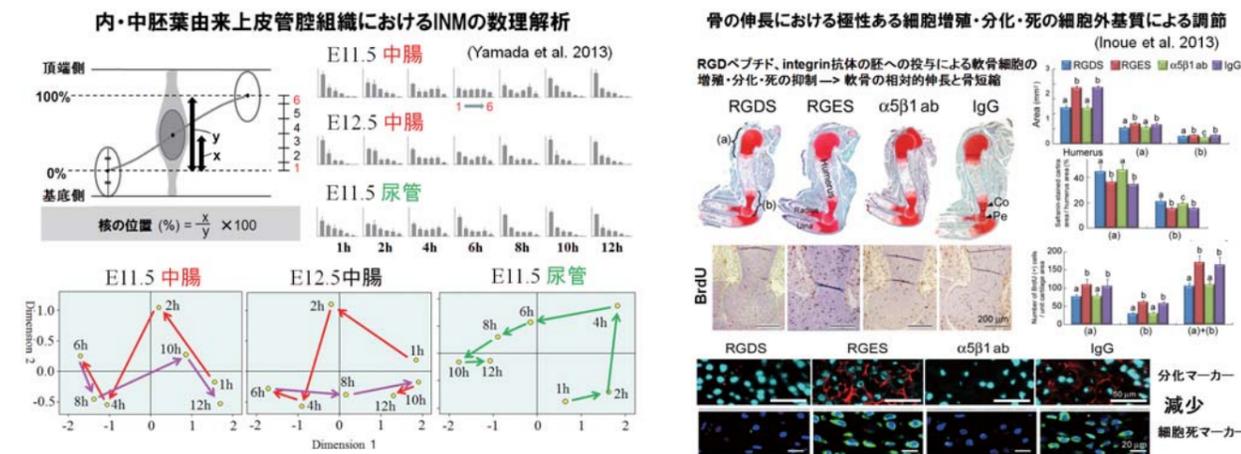
計画研究05 器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害

細胞レベルの極性現象制御と肉眼レベルの形態の連結—INM と軟骨内骨化—



研究代表者 大谷 浩 (島根大学 医学部 発生生物学 教授)

本計画研究では、細胞レベルにおける極性現象の制御機構とその蓄積による肉眼レベルの正常・異常な形態(形、大きさ、位置)との関係を明らかにすべく研究を進めています。中枢神経系の原基である神経管など外胚葉由来上皮では、細胞周期と同期して核が頂底軸に沿って極性を持って動く interkinetic nuclear migration (INM) が幹細胞と娘細胞の数の調節に関わり、したがって神経細胞数さらには最終的な臓器の大きさの調節にも関わります。INM は、内胚葉由来の上皮管腔組織である腸管とその派生物においても最近報告されるようになりました。しかし、INM が上皮管腔組織の初期発生に普遍的な現象か、また胚葉の由来、臓器・部位間における INM の異同、肉眼レベルの形態への寄与を含めた機能的意義については不明です。本計画研究では、器官形成期マウス胚個体の各種上皮管腔組織について INM の存在および臓器間の異同を検証し、機能的意義を比較検討しています。これまでに、器官形成期のマウス胚において中腸、尿管の上皮細胞核の挙動について、BrdU 免疫組織化学染色を施して調べ、さらにヒストグラムで表したその分布パターン間の類似性を多次元尺度構成法 (multidimensional scaling : MDS) によって解析することにより周期性を明らかにし、INM の普遍性を示唆しました。一方で、各組織における分布パターンの変化、周期性は異なっており、組織特異性があることも同時に示唆されました。現在さらに呼吸器系など組織、部位を拡大して解析しています。また並行して、増殖・分化・細胞死が極性を持って進行することにより骨が伸長する胎生期軟骨内骨化において、これらの全てのステップに細胞外基質 RGD 配列から特異な integrin を介して伝わるシグナルが重要な役割を果たすことを個体レベルで明らかにしました。



●代表論文

1. Yamada, M., Udagawa, J., Hashimoto, R., Matsumoto, A., Hatta, T., Otani, H. Interkinetic nuclear migration during early development of midgut and ureteric epithelia. *Anat. Sci. Int.* 88: 31-37, 2013.
2. Inoue, T., Hashimoto, R., Matsumoto, A., Jahan, E., Rafiq, AM., Udagawa, J., Hatta, T., Otani, H. *In vivo* analysis of Arg-Gly-Asp sequence/integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated signal involvement in embryonic enchondral ossification by *ex utero* development system. *J. Bone Mineral Res.*, (in press).
3. Okano, J., Udagawa, J., Shiota, K. The roles of retinoic acid signaling in normal and abnormal development of the palate and tongue. *Congenit. Anom.*, (in press).

●特許

名称：透明化生物標本作製用キット及び透明化生物標本作製方法
 発明者：八田 稔久、内芝舞実、東 伸明、島田ひろき、島村英理子 権利者：学校法人 金沢医科大学
 種類：特許権 番号：PCT/JP2013/079388 出願年月日：2013年10月30日 国内外の別：外国

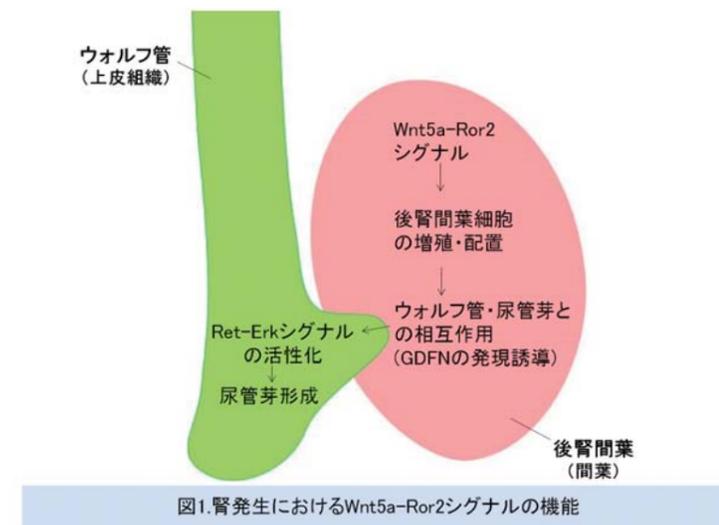
計画研究06 平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移

平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移



研究代表者 南 康博 (神戸大学 医学研究科 細胞生理学分野 教授)
 研究分担者 手塚 徹 (東京大学 医科学研究所 腫瘍抑制分野 助教)

肺、腸管、腎臓等の上皮管腔組織は、多細胞生物における恒常性維持の基盤となる構造であり、その形成・維持・破綻の仕組みを解明することは医学・生物学上の重要課題の一つであり、我々は細胞極性制御を司る平面細胞極性シグナルに着目しその謎にアプローチしています。本年度は、主に腎臓について、腎尿管上皮組織(尿管)の形成及びその破綻の分子機構について解析を行いました。腎発生では、ウォルフ管(上皮)と後腎間葉(間葉)の相互作用が尿管芽形成に重要な役割を担っています。平面細胞極性シグナル因子である Wnt5a やその受容体である Ror2 を欠損させたマウスでは、ヒトの代表的腎奇形である重複尿管・腎臓が観察されることが見出されました。腎発生では、間葉細胞から分泌される GDNF が上皮細胞表面の Ret (GDNF 受容体) に結合し惹起される GDNF-Ret シグナルが尿管芽の形成に重要であることが知られていましたが、今回、時空間的に制御された Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化が間葉における GDNF の発現を制御し、尿管芽形成過程に重要な役割を担うことが明らかになりました(図1、未発表)。一方、片側尿管結紮による腎障害実験から、腎障害に伴い尿管上皮細胞で Wnt5a-Ror2 シグナルが恒常的に活性化され、上皮間葉転換 (EMT) や MMP-2 の発現が誘導され、MMP-2 による基底膜の破壊を伴う尿管上皮組織の破綻と間質での線維化の亢進がもたらされることが見出されました。これらの結果から、腎上皮組織の形成には時空間的に制御された適切な Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化が必要であり、また恒常的かつ過剰な Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化はその破綻に繋がること示唆されます。今後も領域内での連携のもと、肺、唾液腺等の上皮管腔組織についても病態からのアプローチによる解析を行い、本領域の推進に貢献したいと考えています。



●代表論文

1. Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Minami, Y. Ror receptor family. *The Receptor Tyrosine Kinase Handbook.* (edited by Wheeler, D. L., Yarden, Y.) **Springer Science**, (in press).
2. Li, X., Yamagata, K., Nishita, M., Endo, M., Arfian, N., Rikitake, Y., Emoto, N., Hirata, K., Tanaka, Y., Minami, Y. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells* 18: 608-619, 2013.
3. Endo, M., Doi, R., Nishita, M., Minami, Y. Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. *J. Cell Sci.* 125: 2017-2029, 2012.
4. Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., Minami, Y. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends in Cell Biol.* 20: 346-354, 2010.

研究成果(計画研究)

計画研究07 上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換

上皮管腔組織の破綻と上皮間葉転換の研究を行って

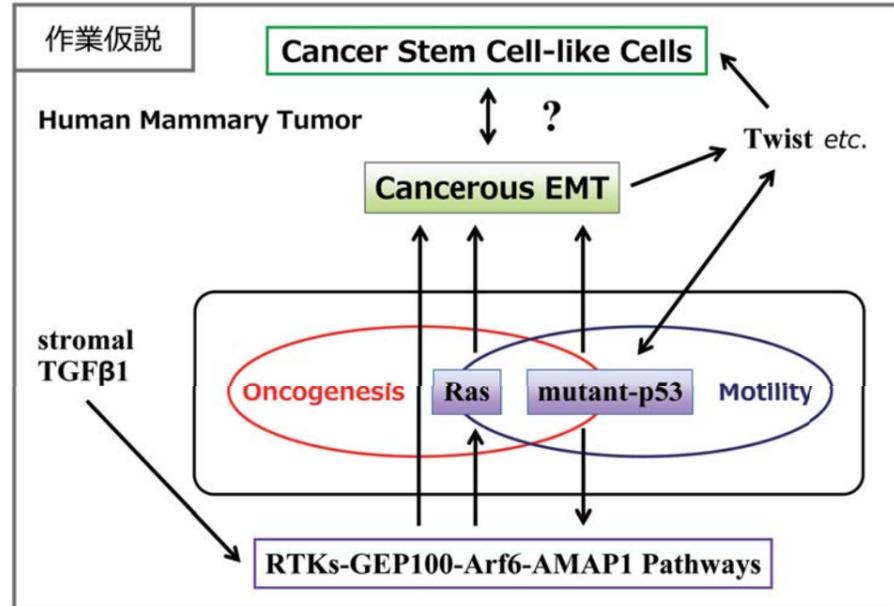
研究代表者 佐邊 壽孝 (北海道大学 医学研究科 分子生物学分野 教授)
 研究分担者 小根山 千歳 (大阪大学 微生物病研究所 発癌制御研究分野 准教授)

癌の最大の脅威はその浸潤転移形の獲得にあります。ヒト乳癌の約8割は、乳腺の内腔上皮に起因します。上皮由来の癌が浸潤形質を獲得する過程は、発生・分化過程で観察される上皮-間葉形質転換(EMT)に類似した現象を伴うことが推察されており、また、乳腺癌化細胞にEMTが起こる事は上皮管腔組織の局所的な破綻を伴います。

癌の悪性化に伴う浸潤転移形質の獲得には、細胞のゲノム変異とエピゲノムの変化にも起因します。私達は、EMTにより細胞に運動性を賦与するシグナル因子及びその経路に関し、ゲノム変異とエピゲノム変化にも着目し、研究を行っています。乳癌を対象とした解析から、EMT様進行過程にGEP100-Arf6-AMAP1経路の活性化が重要な役割を担っていること、そのシグナルの活性化にp53遺伝子の変異が必須であることを見いだしました。また、管腔構造の破綻を伴う他の癌種を用い、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構によりArf6経路を構成する分子群の発現が亢進する知見を得ています。現在、どのような分子機序により発現が亢進するのか、また悪性度進展とどのように相関しているのか解析を進めています。その事により、管腔構造の破綻機序を明らかにするとともに、臨床応用を視野に入れた研究も展開し、分子標的の提示、並びに癌の予防や治療方法の開発に貢献する知見を提示することを目指しています。



第1回国際シンポジウムの参加者と食事会にて



●代表論文

1. Kinoshita, R., Nam, J.M., Ito, Y.M., Hatanaka, K.C., Hashimoto, A., Handa, H., Otsuka, Y., Hashimoto, S., Onodera, Y., Hosoda, M., Onodera, S., Shimizu, S., Tanaka, S., Shirato, H., *Tanino, M., and *Sabe, H. Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy. *PLoS ONE* 8: e76791, 2013.
2. Onodera, Y., Nam, J.M., and Sabe, H. Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol. Ther.* 140: 1-9, 2013.
3. Onodera, Y., Nam, J.M., Hashimoto, A., Norman, J.C., Shirato, H., Hashimoto, S., and Sabe, H. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J. Cell Biol.* 197: 983-996, 2012.

研究成果(公募研究)

Research Progress (Proposed research project)

公募研究02 上皮細胞ラテラル領域におけるアクチン繊維流動“力”の機能解明

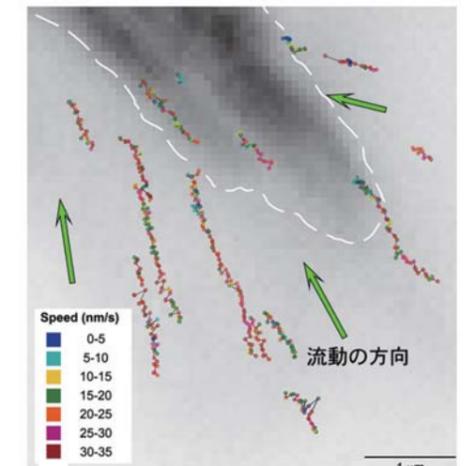
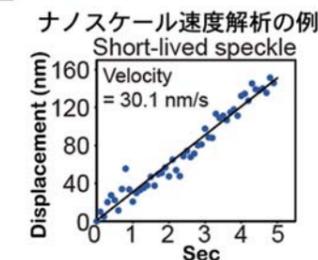
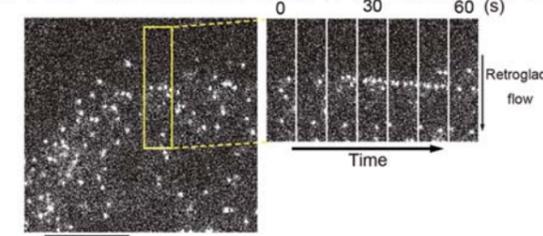
ナノスケールスペクル顕微鏡法によるアクチン流動を集める接着斑引力の可視化



山城 佐和子 (東北大学 生命科学研究所 単分子動態生物学分野 特任助教)

細胞-基質間接着(接着斑)形成と細胞仮足の伸展は、がん細胞の運動能亢進や上皮の創傷治癒に重要である。細胞は、これらの構造でアクチン細胞骨格の発生する力を利用するが、力を非侵襲的に捉えることは難しく、「力」動態は不明な点が多い。一方、培養細胞仮足では、アクチン線維が絶え間なく求心的に移動するアクチン線維流動が存在する。線維流動はアクチン重合とミオシンによる牽引で駆動され、力の作用を可視化する指標となる。本研究では、まず、単分子スペクル顕微鏡法を改良し、最高精度の時空間分解能でアクチン流動を捉える技術を確認した。この手法により、培養繊維芽細胞において、接着斑がアクチン流動の速度と方向をサブミクロンスケールで複雑に変化させることを見出した。興味深いことに、接着斑前方では、アクチン線維は接着斑に集まるように速いスピードで流動した(図)。この現象は、接着斑が周りのアクチンネットワークに作用し、自身の方向に流動を変化させていることを示唆する。細胞は、接着斑-アクチン流動相互作用を調節して、接着斑におけるメカノセンス機構の活性を制御している可能性がある。

単分子スペクル顕微鏡によるアクチン線維流動の可視化



接着斑前方のアクチン線維流動速度・軌跡マップ

●代表論文

1. Yamashiro, S., et al. New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. *Mol. Biol. Cell*, (in press).

2年間の活動を振り返って

本領域のご支援により、イメージング技術・環境を改良し、アクチンの上皮細胞3次元構造内での一分子イメージングが実現しつつあります。また1年目には、加藤洋人さんと共に若手共同研究助成に採用して頂き、正常-変異細胞の共培養系を導入して研究対象を広げることが出来ました。領域会議と国際シンポジウムでは、管腔組織形成をキーワードに、幅広い研究分野・アプローチの最新の成果を聴くことと、研究者間の交流を広げることができ、非常に有意義でした。2年間の研究の進捗や、会議等で得たアイデアが具体的な成果になるのは少し先になると思いますが、今後の成果も本領域にフィードバックすることが出来たら幸甚に思います。非常に楽しく刺激的で、短く感じる2年間でした。お世話になった先生方に、心から感謝申し上げます。ありがとうございました！

研究成果(公募研究)

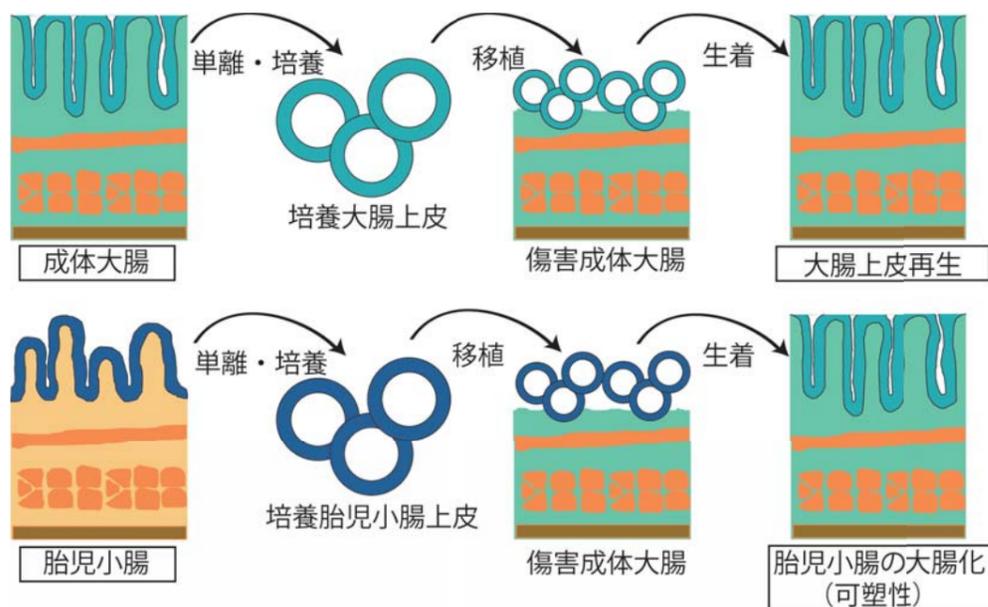
公募研究03 独自の正常大腸上皮幹細胞培養技術を用いた管腔形成機構の解析

腸管上皮幹細胞研究をおこなって



中村 哲也 (東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 消化管先端治療学 准教授)

私は腸管上皮細胞の研究をすすめています。これまでに、正常な大腸上皮細胞を、極性を保ったまま3次元的に培養する独自の技術を確立しました。また、本法を用い体外で増やした大腸上皮幹細胞、しかもただ一個から増やした幹細胞であっても、これを移植することで傷害大腸上皮を修復・再生できることを明らかにしました(1)。これを基礎とし最近では、デンマークのKim Jensen 研究室と共同し、彼らが開発した胎生期小腸上皮培養法で得た細胞を生体大腸に移植することに成功しました。興味深いことに、胎生期小腸上皮は生体内に生着するのみならず、移植先の環境に適応し一部大腸上皮形質を獲得することがわかりました(2)。私は現在さらに成体由来培養小腸上皮の移植実験も進めています。これら研究により、消化管上皮が管腔組織を構築する過程において、消化管区域で異なる上皮内因性プログラムとその可塑性、区域特異的上皮-間質相互作用の仕組みが明らかになると考えています。



●代表論文

1. Yui, S., et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat. Med.* 18(4): 618-623, 2012.
2. Fordham, RP., et al. Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell* 13(6): 734-744, 2013.

多様な研究者の方々から刺激をもらいました

公募研究班の一員として参加させていただいた本新学術領域研究では、様々な研究者が最新の成果を共有し、活発な議論を通して全体の進展を目指す「班研究」の意義を再認識するとともに、たいへん貴重な経験をさせていただきました。私はこれまで臨床医としての立場で腸管上皮細胞研究に従事してきましたが、本研究班では異なる視点と最先端のアプローチに基づく多くの基礎研究・応用研究を学ぶことができ、このような機会を与えていただいたことに深く感謝いたします。日々の研究活動ではつい発想や情報収集パターンが固定化しこれを打破するのはなかなか難しいですが、幅広い分野の研究者が一堂に会する研究班の会議・シンポジウムでの熱い議論は、私にとって非常に刺激的で得難い経験でした。本研究班で出会えた方々とも連携しながら、今後はできるだけ個性的な研究を目指していきたいと考えています。

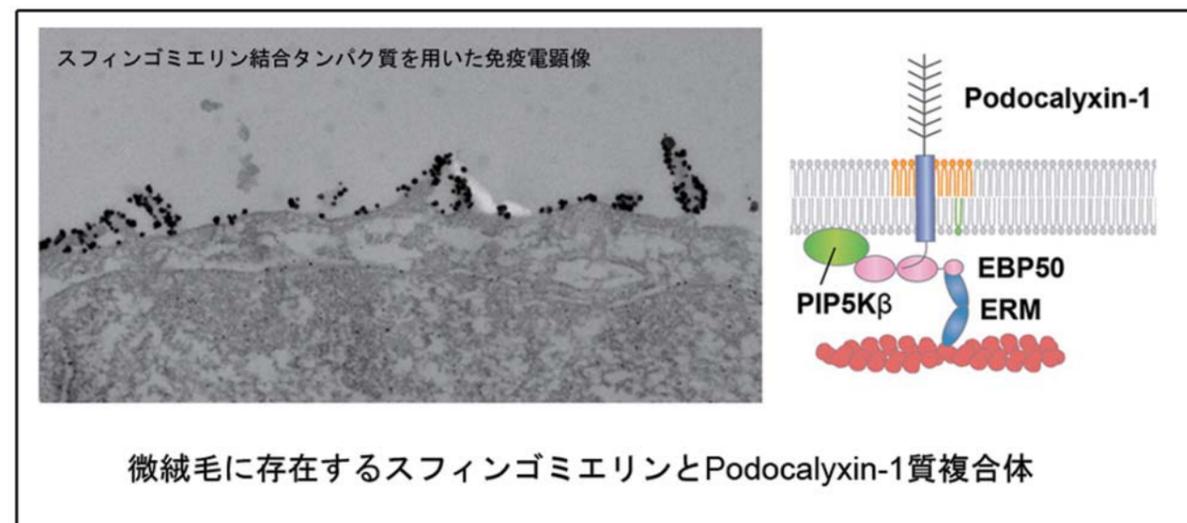
公募研究05 細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明

細胞膜脂質が上皮管腔構造形成において果たす役割の解明



池ノ内 順一 (九州大学 理学研究院 代謝生理学研究室 准教授)

私は上皮極性や上皮管腔構造を形成するために、細胞膜脂質が関与しているのかについて研究を行った。上皮細胞のみならず出芽酵母の分裂など、自然界には細胞が極性化する例を見ることが出来る。近年、Par/Crumb/Scribble 複合体など上皮細胞の極性形成に寄与する分子群の同定が進んだ。しかし、これらの中で例えば出芽酵母に於いても明確なホモログが存在するのはLglとCdc42だけである。私は、進化的に高度に保存された細胞膜の構成要素である多様な脂質が極性形成に寄与するのではないかという仮説を立て、実験を行った。その結果、上皮細胞のアピカル膜の微絨毛にスフィンゴミエリン(SM)が高度に集積していることを免疫電顕により明らかにした。また既に極性を獲得した上皮細胞でSMを消失させると極性を維持したまま微絨毛のみが失われることを見出した。更にSMと特異的に共役して微絨毛を形成する膜タンパク質複合体(Podocalyxin-1-EBP-50-PIP5Kbeta)を同定した。また三次元培養の開始時からSMを消失させると異常な管腔を持つシストが形成された。この結果より三次元培養時にSMが極性形成に関与することが明らかになり、目下その分子機構を解析中である。



●代表論文

1. Ikenouchi, J., Hirata, M., Yonemura, S., Umeda, M. Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. *J. Cell Sci.* 126: 3585-3592, 2013.

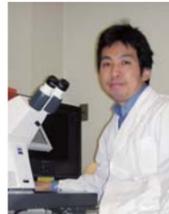
本領域における2年間の活動を振り返っての感想

上皮細胞が複雑な管構造やOrganoidを構築する過程や、それらを可能にするために細胞内部で多様な分子機構が同時並列的に働き、細胞内で統合されていく過程は、多くの研究者が取り組んでも依然わからないことだらけである。本領域の領域会議や国際会議への参加を通して、私は「上皮管腔構造形成の理解」という研究テーマの奥深さを改めて認識した。また上皮細胞に関する基礎的な知見が、上皮細胞の破綻によって生じる様々な病態の理解のみならず、様々な幹細胞から上皮組織や臓器の再生を目指す分野においても重要性を増していると感じた。領域会議では、上皮細胞を様々な角度から研究されている方々と交流の機会があり、大いに刺激を受けた。

研究成果(公募研究)

公募研究08 胆管をモデルとした、管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解明

「胆管をモデルとした、管腔構造の発達とチューブ構造形成を制御するメカニズムの解明」の研究を行って



谷水 直樹 (札幌医科大学 医学部附属フロンティア医学研究所 組織再生学部門 講師)

肝臓、肺、腎臓などの上皮細胞が形成するチューブ状の組織構造は、適切な内腔サイズを形成・維持することで、臓器の生理的な機能発現に寄与している。本研究では、肝前駆細胞が胆管上皮細胞に分化して管腔構造を伴うシストを形成する培養系を用いて、上皮細胞が形成する管腔サイズの調節機構について解析を行った。

まず、前駆細胞から分化した胆管上皮細胞が発現する転写因子として grainyhead-like 2 (Grhl2) を同定した。肝前駆細胞に Grhl2 を強制発現すると、管腔形成が促進された。Grhl2 は、密着結合の構成分子である Cldn3 (Cldn3) と Cldn4 の発現および Rab25 を介した Cldn4 の密着結合への局在を制御することによって密着結合の成熟化を促し、管腔形成を促進していた(図1)。Grhl2 は、胆管以外のチューブ構造にも広く発現していることから、様々な上皮管腔構造形成を制御している可能性がある。

また、Grhl2 は、胆管上皮細胞の成熟化に伴って発現が上昇し、成体においては肝細胞への分化転換を抑制していた。すなわち、上皮細胞の機能的分化を促進する一方で、分化可塑性も制御する因子であることが明らかになった。

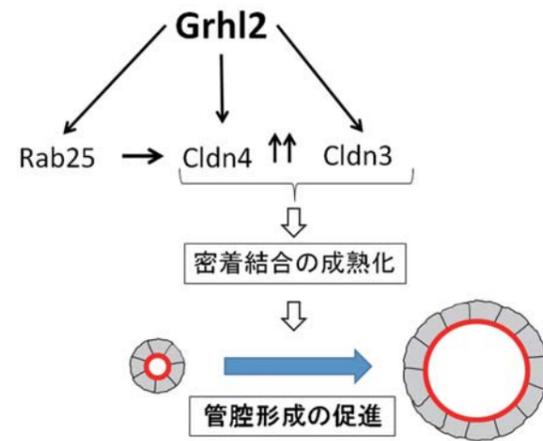


図1. 転写因子Grhl2による上皮細胞の管腔構造形成の制御

●代表論文

1. Tanimizu, N., Nakamura, Y., Ichinohe, N., Mizuguchi, T., Hirata, K., Mitaka, T. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. *J. Cell Sci.* 126: 5239-5246, 2013.
2. Senga, K., Mitaka, T., Mostov, KE., Miyajima, A., and Tanimizu, N. Grhl2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through upregulation of Cldn3, Cldn4, and Rab25. *Mol. Cell. Biol.* 23: 2845-2855, 2012.

2年間の活動を振り返って

私は3次元培養を用いて上皮細胞の形態形成を研究していたので、本領域の公募があり採択されたことは、非常に幸運であった。2年間の研究で、上皮細胞の管腔形成において重要な機能を担う Grhl2 を同定し、その機能を分子レベルで解明することができた。また、上皮細胞の成熟化に伴う分化能の限定という、一見当たり前の現象についても、その分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。領域会議や国際会議での領域内外の研究者との交流を通じて、分野横断的な、質の高いディスカッションをできたことが、研究発展において大きな力となった。上皮細胞の形態形成は、生涯取り組んでいきたいと考えている研究テーマであるので、今後は、細胞培養で得られた基礎データを、いかにして生体内の現象や疾患の機序を理解するための研究へと発展させられるか、という視点も大切にして、本領域の発展に貢献したいと考えている。

公募研究13 神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明

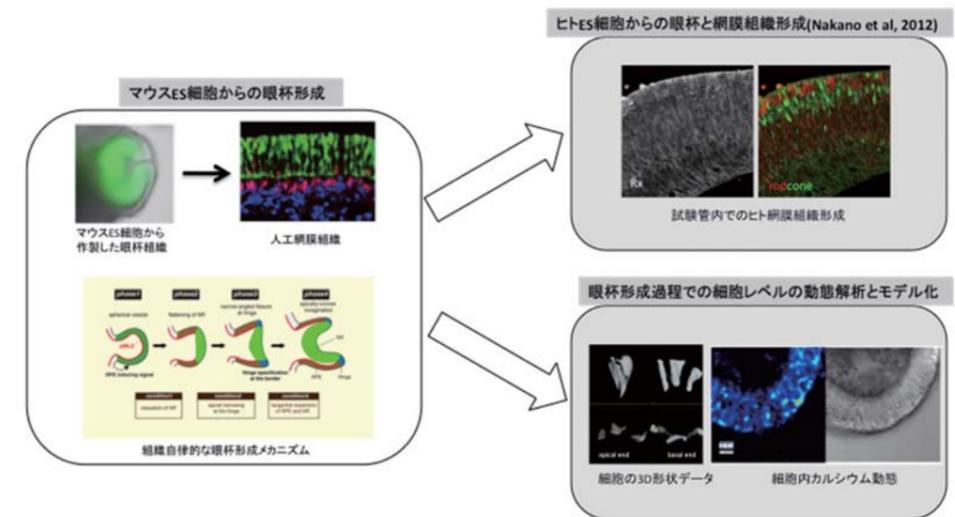
神経上皮組織の自己組織的な形態形成の基盤となる細胞骨格動態の解明の研究を行って



永楽 元次 (独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 立体組織形成解析ユニット 副ユニットリーダー)

本研究ではES細胞からの立体組織培養系と3次元イメージング技術を組み合わせ、眼杯形成についての分子・細胞・組織の各階層をまたいだ解析を行うことで、上皮組織の形態形成制御機構について新たな知見を得ることを目的とした。二光子顕微鏡を用いて眼杯形成過程における個々の細胞動態やアクチンや微小管などの細胞骨格動態を長期にわたってイメージング出来る実験観察系の構築を行った。また同時に細胞内カルシウム動態を観察することで、眼杯形成過程における領域特異的な細胞形態変化と自発的な細胞内カルシウム動態との相関関係を明らかにした。こういった実測データを三次元上皮組織の力学的特性を検証するための数値シミュレーションモデルと組み合わせることで眼杯形成の基本原理解についてより厳密に検討することが可能になった。本モデルにより自発的な揺らぎといった個々の細胞動態と組織変形の関係についての階層を超えた理解がさらに深まることが期待される。同時に、ヒトES細胞から in vitro でヒトの眼杯組織および大脳組織を構築することにも成功し発表した。これらの研究により、将来のヒト網膜組織を用いた、網膜色素変性症などの眼疾患の移植治療の実現化に大きく近づくことができた。

同時に細胞内カルシウム動態を観察することで、眼杯形成過程における領域特異的な細胞形態変化と自発的な細胞内カルシウム動態との相関関係を明らかにした。こういった実測データを三次元上皮組織の力学的特性を検証するための数値シミュレーションモデルと組み合わせることで眼杯形成の基本原理解についてより厳密に検討することが可能になった。本モデルにより自発的な揺らぎといった個々の細胞動態と組織変形の関係についての階層を超えた理解がさらに深まることが期待される。同時に、ヒトES細胞から in vitro でヒトの眼杯組織および大脳組織を構築することにも成功し発表した。これらの研究により、将来のヒト網膜組織を用いた、網膜色素変性症などの眼疾患の移植治療の実現化に大きく近づくことができた。



●代表論文

1. Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., Sasai, Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 20284-20289, 2013.
2. Okuda, S., Inoue, Y., Eiraku, M., Sasai, Y., Adachi, T. Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance. *J. Biomech.* 46: 1705-1713, 2013.

2年間の活動を振り返って

この研究領域の特徴はやはりなんといっても、上皮管腔組織という生命現象の至る所で登場する興味深い生体組織の振る舞いに魅せられた人たちの集まりという点でしょう。そんな「上皮管腔組織マニア」の集まりである本領域の班会議で、共通の構造を持つ上皮組織が多彩な形態や機能を発現する様子を見ると、細胞の持ついまだ解き明かされていない様々な問題を意識することが出来ました。幹細胞からの in vitro での立体組織形成技術は現時点では未熟なものでありその形成原理が解き明かされた分野はほとんどありません。今後も上皮管腔組織という生命の基本単位の性質を明らかにしていくことで将来的に機能的な立体組織を人為的にデザインする技術の獲得に近づくと考えています。この研究領域に参加させていただいて得られた多くの貴重な出会いにもたいへん感謝しています。

研究成果(公募研究)

公募研究14 上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合 - 超初期発がんメカニズムの解明 -

「上皮管腔形成における変異細胞と正常細胞の競合」に関する研究を行って

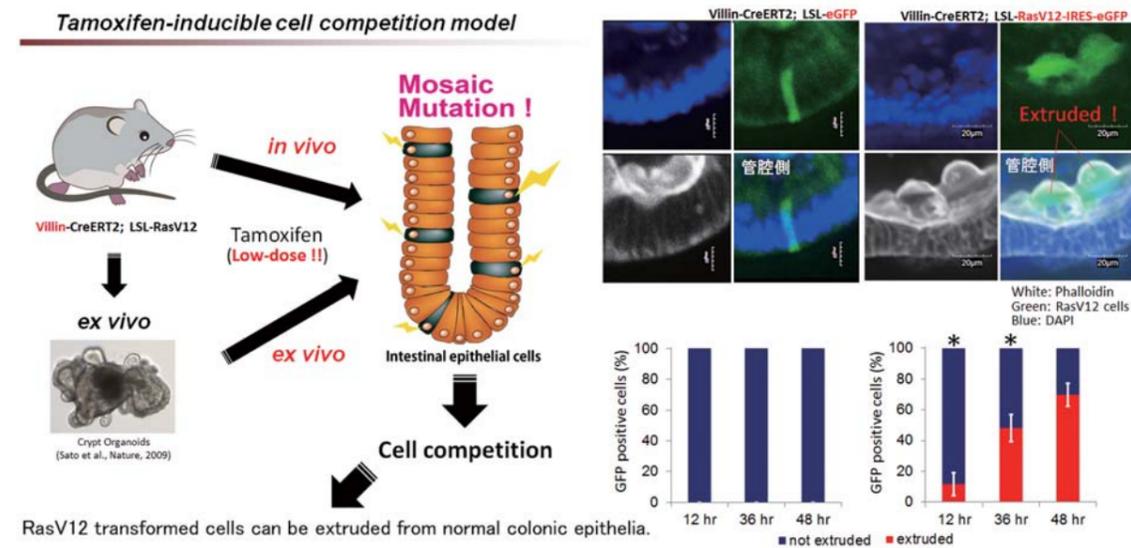


加藤 洋人 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム病理学分野 助教)
(北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野 客員研究員(兼任))

そもそも「癌」とは、上皮組織に1個の変異細胞が発生し異常な増殖を開始することから生じる。培養細胞では、正常上皮シートに少数の変異細胞 (Ras, Src, Scribble 等の遺伝子変異を有する細胞) を生じさせると、変異細胞と周囲正常細胞との間に競合的相互作用が生じ、それによって変異細胞に細胞死が起こるか、あるいは上皮シートから積極的に排除されるという事実が示された(北海道大学藤田恭之ら)。

この現象は、ショウジョウバエでは「細胞競合」として知られていたが、哺乳動物の生体において「細胞競合現象」が存在するか否かについては、適切なマウスモデルが存在しないために、明らかでなかった。

本研究によって、この「細胞競合現象」をリアルタイムに観察しうる初めてのマウスモデルが樹立され、腸上皮に発生させた少数モザイク状の RasV12 変異細胞の多くが、発生後 48 時間以内にクリプト管腔側へと積極的に排除されていくのが観察された。つまり、哺乳動物生体内においても、確かに「細胞競合現象」は存在し、発がんに対する生理的防御反応としての上皮細胞間インタラクションの存在が示された。今後、初期発がんメカニズムの解明及びがん予防・治療薬開発を志し、研究を進展させたい。



●代表論文

1. Kato, H., Fujita, Y. Epithelial homeostasis: elimination by live cell extrusion. *Curr. Biol.* 22(11): R453-455, 2012.
2. 他：投稿準備中

新学術領域「上皮管腔組織形成」で過ごした2年間を振り返って。

縁あって新学術領域「上皮管腔組織形成」公募研究に採択され、研究を進めることが出来た。この新学術領域は、上皮管腔を軸としながらも公募研究員のテーマが多岐に亘っているのが特徴だ。シンポジウムや研究会では、異分野の第一人者の方々と有益な情報を共有することが出来た。佐藤俊朗氏には、私の研究に不可欠なクリプト培養をご教示頂いた。中村哲也氏には学内で度々私の話を聞いて頂いた。山城佐和子氏との若手共同研究が採択され、双方の研究に新しい思想的次元を得ることが出来た。池ノ内順一・平島正則両氏には度々お目にかかる機会があり、その度に有意義な討議が出来た。菊池章先生はじめ総括班の先生方には大変お世話になり、感謝しております。また、公募研究班のみならず、今後も良き共同研究者として、あるいは良きライバルとして、管腔学 Tubulology の発展のために頑張っていきたいと思います。

公募研究21 細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明

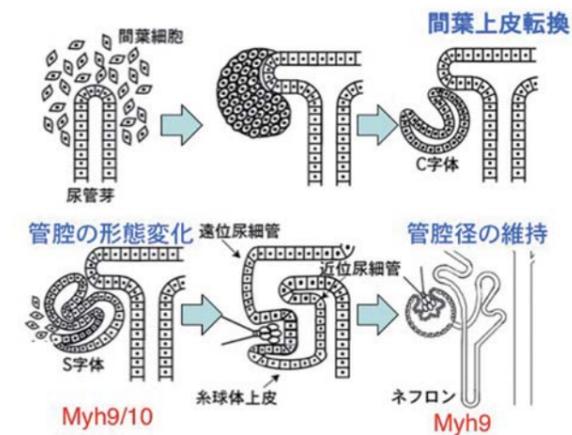
細胞骨格制御による腎臓上皮形成機構の解明



西中村 隆一 (熊本大学 発生医学研究所 腎臓発生分野 教授)

腎臓は後腎間葉と尿管芽という2つの組織の相互作用によって発生します。間葉は上皮化して管腔を形成し(間葉上皮転換)、尿管芽由来の管腔と接続して、一続きの機能単位ネフロンを形成します。我々は新規キネシン Kif26b が腎臓発生に必須であること、それに non muscle myosin heavy chain II (Myh9/10) が結合することを見いだしました。本計画では、腎臓で Myh9/10 を欠失させることにより、細胞骨格系の破綻が腎臓の管腔形成に及ぼす影響を解析しました。まず尿管芽特異的にミオシンを欠失するマウスを作成しましたが、Myh9、Myh10、あるいは両方の欠失のいずれでも腎臓の異常は認められず、意外な結果でした。次に間葉特異的なミオシン欠失マウスを作成したところ、Myh9 の欠失で尿細管の拡張と腎機能不全が認められました。さらに Myh9/10 の欠失では、ネフロンの消失によってすべてのマウスが出生直後に死亡し、発生過程でネフロンの形態異常と細胞死が認められました(未発表)。現在、上皮の極性等について詳細な解析を行っているところです。

非筋肉型ミオシン(Myh)が欠失すると腎臓の管腔形成と維持が破綻する



●代表論文

1. Taguchi, A., Kaku, Y., Ohmori, T., Sharmin, S., Ogawa, M., Sasaki, H., and Nishinakamura, R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14(1): 53-67, 2014.

腎臓に魅せられて

最近、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からのネフロン前駆細胞の試験管内誘導に成功し、そこから MET を経て糸球体や尿細管という三次元の腎臓組織の一部を作ることができました(上記論文参照)。これは私の 20 年近い研究の結晶ですが、このシステムを使えば、ヒトのネフロン形成過程を顕微鏡下に見ることが出来ます。ヒトでも Myh9 変異による疾患が知られていますが、マウスとは症状が少し異なっています。この違いが何に起因するのか、ノックアウト iPS を使って解いてみるつもりです。細胞の塊に過ぎない前駆細胞から管腔形成によって様々な形をしたネフロンができるのが腎臓発生の醍醐味です。本領域に参加して細胞生物学、生化学、画像解析など異分野の方々と交流することによって、新たな視点を得ることができました。それを糧に腎臓の不思議を今後も解いていきたいと思っています。

研究成果(公募研究)

公募研究24 類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング

類器官培養における癌浸潤モデルの構築と蛍光イメージング

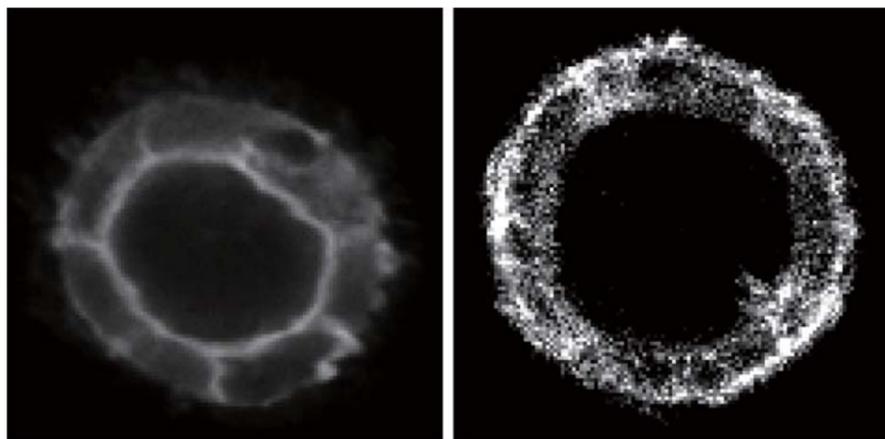


清川 悦子 (金沢医科大学 医学部 病理学 I 教授)

バゾ・ラテラルという言葉を知ると「女・子供」という言葉が頭に浮かぶ。両者の共通点は、違うものなのに一緒にされていることである。昔は、密に培養した上皮細胞にフィルターをのせてはがれてくる膜をアピカル膜として取ってきて、残りをバゾ・ラテラルとするという方法しか分ける方法がなかった故である。

Lyn のミリストイル化信号をつけた蛍光蛋白質は類器官のアピカルとラテラル膜に局在した(図・左)ので、その場での信号伝達の操作が出来たが、良性腫瘍の形態を模するものであった。悪性腫瘍の特徴である浸潤とは基底膜でのイベントなのだから、基底膜に局限した分子操作をする、というのが申請課題だった。

蛍光蛋白質に細胞接着斑への信号を付加すると基底膜に局在した(図・右)。現在は、機能分子を基底膜に発現すべく、力技でプラスミド構築をしている。私は 2011 年の 8 月に独立したが、まとまった額の研究費はラボの立ち上げを助けてくれた。もう一つ注目しているのは類器官の回転である。Ras の活性化によって回転することを見出したが、これも基底膜と基質との相互作用によって生まれると考えているので、上記の系を利用しながら、この回転が浸潤・転移に果たす役割を追求していきたいと考えている。



●代表論文

1. Yagi, S., Matsuda, M., Kiyokawa, E. Chimaerin suppresses Rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. *PLoS ONE* 7(12): e52258, 2012.
2. Sakurai, A., Matsuda, M., Kiyokawa, E. Activated ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby canine kidney cystogenesis. *J. Biol. Chem.* 287(38): 31703-31711, 2012.

楽しかった！国際会議@札幌

なんといっても思い出深いのが、6月に北海道で開催された国際会議である。運よくホスト(ホステス?)役に当たり、Keith Mostov 研でポスドク後、スペインで独立した Fernando Martin-Belmonte 博士を呼ぶことになった。論文は全て読んでいるが面識はなく、恐る恐るメールを出してみたが、返事は1週間待っても来ない…。そんな不安だらけのスタートだったが、Mostov 研出身の谷水さんの絶大なサポートもあり日本を好きになって帰って行った。予想通り、我々の類器官論文はあのあたりに査読に回っていたようだ。帰国後もプラスミドを送り合い、コラボが始まった。海外の学会でその他大勢として会うのと、このような日本での会でゲストとして迎えるのでは絆の深さが異なってくる。素晴らしい機会をありがとうございました。



会議終了後、大倉山ジャンプ競技場にて。左から Martin-Belmonte, 清川, 谷水

レポート

Reports

●レポート 若手主催研究会 『第1回 Tubulology 研究会』

◆日時：平成 25 年 8 月 25 日(日)

◆場所：東京大学・弥生キャンパス 中島董一郎記念ホール

◆概要

本新学術領域での若手育成事業の一環である「若手研究会開催助成」による支援のもと、去る 8 月に「第 1 回 Tubulology 研究会」が開催されました。領域内からは、オーガナイザーである紙谷(東海大)・伊藤(東大分生研)に加えて川崎博士(東大分生研)、谷水博士(札幌医科大)、平島博士(神戸大)から臓器形成における上皮組織や管腔構造の重要性、また上皮管腔と内皮管腔の類似性や相互作用に注目した研究成果の報告が行われました。さらに、招待講演として森本博士(理研 CDB)の呼吸器上皮組織の研究、また向山博士(NIH, USA)の血管・神経ネットワークに関する最新的话题を提供していただきました。50 名近くの参加者を集めて盛んな質疑応答が繰り広げられ、活発な意見交換や交流が研究会後の情報交換会でも続けられました。



◆感想 「管腔生物学を志向した若手研究会の開催について」

“管腔”をキーワードとした本研究会では、研究領域内からは胆管や消化管、リンパ管など多様な管腔の発生や機能に関する最新成果が発表され、活発な討論に加え領域内の協力体制の確立に向けた相互理解が進んだのではと思います。また領域外から呼吸器や血管・神経といった様々な臓器での管腔生物学につながる新たな知見をご講演いただき、領域内にとどまらない共同研究等への進展が期待できると思います。今後、このような研究会の定期的な開催によって“管腔生物学”という新しい学問の確立に貢献できればと考えています。最後に、本研究会の開催にあたり多大な支援を頂きました新学術領域「上皮管腔組織形成」の諸先生方に心から感謝申し上げます。(東海大学 紙谷 聡英、東京大学 伊藤 暢)

●レポート 第3回技術講習会 『神戸大学メタボローム・プロテオーム解析講習会』

◆日時：平成 25 年 11 月 20 日(水)

◆場所：神戸大学大学院医学研究科 共同会議室(講演)、質量分析総合センター(実習)

◆概要

平成 25 年 11 月 20 日、神戸大学大学院 医学研究科において、本新学術領域研究 第 3 回技術講習会として「メタボローム・プロテオーム解析講習会」を開催致しました。神戸大学医学研究科質量分析総合センターのセンター長および講師陣(入野先生、波多野先生)より生体分子の質量分析についての概説、GC-MS 分析計を用いたメタボローム解析のための試料作製と分析ならびに取得データの解析法についての実技講習を指導していただきました。また、メタボローム解析により得られた知見を発展させるためのプロテオーム解析についても、具体例を挙げて解説していただきました。講習・実習後には、参加者に質量分析総合センター内の見学や同センターとの質量分析計を用いた今後の領域内での共同研究等について活発に意見交換が行われました。



◆感想

代謝産物やタンパク質の網羅的解析には以前から興味があり、今回メタボローム・プロテオーム解析講習会に参加させて頂きました。座学と実習の組み合わせにより、解析の原理から実際のサンプル処理方法まで、幅広く知る非常に良い機会となりました。今後、研究を進めるにあたりメタボローム・プロテオームを選択肢の一つとして考えたいと思います。ご教授頂きました神戸大学質量分析総合センターの竹縄教授をはじめ、各先生方に厚く御礼申し上げます。(神戸大学 土井 亮助)

レポート

●レポート 『第1回国際シンポジウム』

2013年6月22、23日北大学術交流会館で、第一回 epithelial tubulology 国際会議を開催しました。国内外から約80名の参加がありました。口頭発表に加え、若手を中心としたポスターもあり、たいへん活発な議論が行なわれました。この分野は私達が新学術研究として新しく命名し立ち上げました分野ですが、今回の会議は、その学問的重要性と医学的応用も含めた将来的発展を強く感じさせ認識させるものとなりました。懇親会や会議後の会食では、札幌の美しい景観とおいしい食文化にも支えられ、より深い議論と研究者間の交流を深める事が出来ました。第二回会議の開催が楽しみです。

The First International Meeting for Epithelial Tubulology

22nd–23rd June, 2013
Conference Hall, Hokkaido University (N8W5 Kitaku, Sapporo)

The 22nd, June

Opening Remarks: A. Kikuchi

Direct reprogramming of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells.

鈴木 淳史 (九州大学 生体防御医学研究所・器官発生再生学分野)

Apical polarity and tube formation in the endoderm.

H. Lickert (Helmholtz Zentrum München German Research Center for Environmental Health (GmbH) Institute of Stem Cell Research)

aPKC suppresses the growth of mammary luminal progenitors through a novel mechanism involving ErbB2.

大野 茂男 (横浜市立大学 医学研究科医学専攻・分子細胞生物学)

Regulation of RhoGTPase signalling during epithelial differentiation.

Karl Matter (Department of Cell Biology UCL Institute of Ophthalmology University College London)

Formation of epithelial tubular structures by growth factor signaling in three-dimensional culture.

菊池 章 (大阪大学 医学系研究科・生化学・分子生物学講座・分子病態生化学)

The role of recycling in epithelial tubulogenesis.

F. Martin-Belmonte (Epithelial polarity group (lab 325) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC)

Identification of Rho-GEFs involved in extracellular matrix stiffness-dependent transformation of mammary epithelial cells.

大橋 一正 (東北大学 生命科学研究所・分子生命科学専攻・情報伝達分子解析分野)

Epithelial regeneration by cultured colonic cells expanded from a single adult Lgr5+ stem cell.

中村 哲也 (東京医科歯科大学 医歯学総合研究科・消化管先端治療学)

Asp1 plays a crucial role in lymphatic vascular fusion and lymph-venous connection during mouse embryogenesis.

平島 正則 (神戸大学 医学研究科・血管生物学分野)

Self-formation of optic cup from mouse and human pluripotent stem cells in vitro.

永楽 元次 (独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・立体組織形成解析ユニット)

Development of a novel imaging technique in a respiratory system diagnosis using optical coherence tomography.

黒谷 玲子 (山形大学 理工学研究所・バイオ化学工学分野)

A novel 3D imaging technique reveals dynamic behavior of the biliary tree and liver progenitor cells in regenerating mouse livers.

伊藤 暢 (東京大学 分子細胞生物学研究所・発生・再生研究分野)

Establishment of patient-derived colorectal cancer/adenoma organoid culture system: an application to tubulology.

佐藤 俊朗 (慶應義塾大学 医学部・消化器内科)

Microenvironmental regulation of mammary branching morphogenesis.

Zena Werb (Department of Anatomy, UCSF Co-Leader, Cancer, Immunity, and Microenvironment Program, UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center)

The 23rd, June

Cell polarity-associated mechanisms in normal and abnormal organogenesis and histogenesis of epithelial tubular structures.

大谷 浩 (島根大学 医学部・解剖学講座・発生生物学)

Cell and tissue mechanics in zebrafish gastrulation.

Carl-Philipp Heisenberg (Institute of Science and Technology Austria)

Roles of Wnt/PCP signaling in pathological conditions of epithelial tubular tissues.

南 康博 (神戸大学 医学研究科・生理学・細胞生物学講座・細胞生理学分野)

How do cells escape epithelial tissues?

Andrew J. Ewald (Departments of Cell Biology and Oncology Johns Hopkins University School of Medicine)

Mutant-p53 generates GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 pathway externally activated to promote mesenchymal invasion.

佐邊 壽孝 (北海道大学 医学研究科・生化学講座・分子生物学分野)

The role of the WW domain in Golabi-Ito-Hall syndrome and Hippo tumor suppressor pathway.

Marius Sudol (Weis Center for Research Geisinger Clinic)

