

## 154. 肺上皮組織の分岐形態形成機構の解析

麓 勝己

大阪大学 大学院医学系研究科 分子病態生化学

Key words : 肺, Wnt シグナル, 分岐形態形成

### 緒 言

胎生期肺の分岐形態形成は胎生 9.5 日目から 16.5 日目までの腺様期 (pseudoglandular stage) と呼ばれる時期に誘導される形態形成運動である。この時期において、遠位前駆細胞マーカー SOX9<sup>+</sup>細胞集団が増殖し、近位方向に向かって SOX2<sup>+</sup>細胞 (近位気道細胞) の増殖を伴いながら分岐を繰り返す。これまでにフィブロネクチン (Fn) が近位気道の分岐点に沈着し分岐形態形成を制御することが報告されているが、遠位端で誘導される分岐点形成の制御機構は不明である。また、近年胎生 15 日以降の分岐形態形成において遠位端の分岐は近位気道の分岐を伴わずに誘導されることが報告され、近位気道とは独立して遠位端は分岐する能力を持つ事が示唆された。しかし、遠位端細胞群がどのようにして自律的に分岐形態形成を誘導するのか不明である。

私共はこの点を解析する手法として、マウス胎児肺の器官培養法及び肺上皮組織をマトリゲル内にて 3 次元培養する上皮単独培養法を構築している。また、本系を用いた解析から Wnt シグナルが上皮細胞の細胞間接着及び頂端収縮などの細胞機能変化を誘導することを見出している。しかし、どのような遺伝子の発現を介して制御するのか、Wnt により誘導される細胞機能変化が組織形態形成にどう影響するのかは不明である。

そこで本研究では、1) Wnt シグナルにより誘導される遺伝子群の発現、2) 得られた遺伝子群の細胞内局在解析及び分岐形態形成に対する作用、3) 本培養系の解析により得られたメカニズムの *in vivo*での役割、を明らかにする。

### 方 法

肺分岐形態形成を解析する *in vitro* のモデルシステムの構築した。胎生期 11 日目の肺をディスペーゼ処理した後、タングステンニードルを使用して物理的に間質を除去することにより上皮組織を単離し、単離した上皮組織を FGF10 存在下で、マトリゲル内にて 3 次元培養した (図 1)。

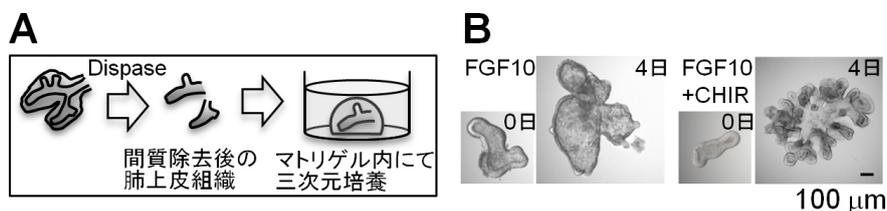


図 1. 本研究で用いた上皮組織単独培養法

A) 胎生 11 日目マウスの肺をディスペーゼ処理した後、上皮を単離し、マトリゲル内にて 3 次元培養した。B) FGF10 のみ (左) あるいは FGF10 と共に CHIR99021 (CHIR, 右) の存在下で 4 日間培養した肺上皮組織。

また、Wnt シグナルを活性化するために、アゴニストである CHIR99021 (Wnt シグナルの抑制因子 GSK-3 の阻害剤) を加えた。その後、CHIR99021 の存在下と非存在下を比較したマイクロアレイ解析を行い、細胞骨格・細胞極性を制御する因子として MARK1 (MAP-microtubule affinity regulating kinase 1) に着目した。MARK1 をノックダウンするため、MARK1 の shRNA を発現するレンチウイルスベクターを調製し、単離した上皮組織に感染させ、定量的

PCR、免疫染色による MARK1 の発現及び機能を解析した。 *In vivo* での発現を解析するため、胎児肺（胎生 14 日目）組織内における MARK1 の局在を免疫染色により解析した。また、Wnt シグナルにおいて遺伝子発現を誘導する因子である  $\beta$ -catenin に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイを行った。

## 結 果

マウス胎児肺上皮組織を FGF10 で単独培養を行うと、培養 2-3 日目までは分岐の誘導が見られたが、それ以降分岐が損なわれる一方、Wnt のアゴニストを加えることで分岐形態形成を反復・維持することが可能になることを見出している。この系において、細胞の形態を解析したところ、Wnt の活性化によりアドヘレンスジャンクション（AJ）が形成され、これにミオシン及びピンキュリン（アクトミオシン張力発生を検知するの分子センサー）の頂端膜への局在が伴っていることを見出している。この結果は、分岐形態形成において Wnt シグナルが未知のメカニズムを介して、頂端膜近傍の張力発生を調節し、AJ 形成及び頂端収縮を制御していることが考えられる。

この点を明らかにするためマイクロアレイ解析を行い、候補の中から、上皮細胞の頂端側細胞骨格制御及び頂底極性に関与する細胞内因子に着目した。その中から、レンチウイルスを用いたノックダウンを用いて行い、上皮組織においてフェノタイプの得られた MARK1（MAP-microtubule affinity regulating kinase 1）に注目した。

MARK1 は微小管結合タンパク質をリン酸化することで微小管と微小管結合タンパク質の結合を負に制御するキナーゼである。MARK1 は MARK2 のホモログとして知られており、MARK2 の機能に関してはこれまで数多く報告されてきたが MARK1 に関しては不明である。MARK2 はミオシンの活性化因子として知られ、ミオシンフォスファターゼサブユニットなどのリン酸化を制御することが報告されている。

*In vivo* での肺上皮組織における発現を解析したところ、MARK1 は胎生 14 日目の肺の上皮組織において頂端側に局在した。一方、分岐形態形成が終了し、肺胞上皮細胞が分化する胎生 17 日目には上皮における発現が損なわれた（図 2A）。

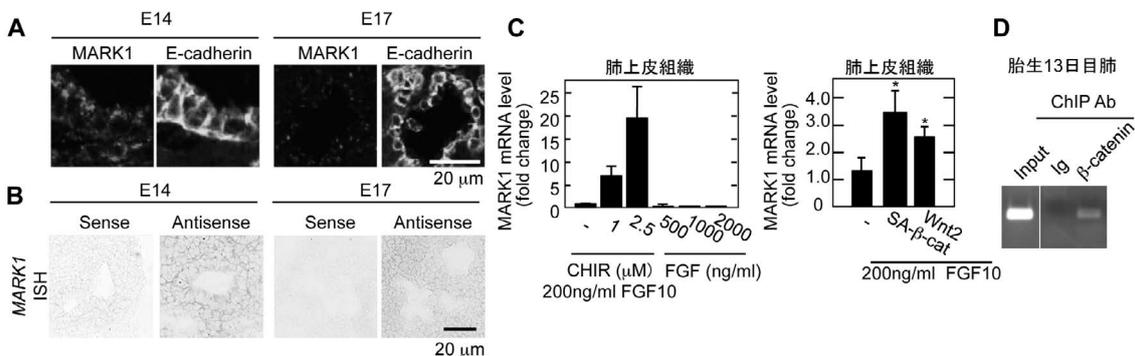


図 2. MARK1 の局在と発現解析

A) 胎生 14 日目（左）及び 17 日目（右）の肺の凍結切片を MARK1 抗体と E-cadherin 抗体で染色した。B) 胎生 14 日目（左）及び 17 日目（右）の肺の凍結切片を MARK1 に対するプローブを用いて、*in situ* hybridization (ISH) を行った。C) 肺上皮組織における MARK1 の発現を、左では異なる濃度の FGF10 及び CHIR を処理することにより、右では Wnt2 リガンドあるいは安定型  $\beta$ -catenin を発現するレンチウイルスを感染させることにより解析した。\* $P < 0.05$  (t-test)。D) 胎生 13 日目マウス肺由来のクロマチンを調製し、 $\beta$ -catenin 抗体を用いた ChIP アッセイを行った。

*in situ* hybridization を用いた解析においても同様の結果を得た（図 2B）。また、肺上皮組織を用いて発現を解析した。MARK1 は FGF 単独では発現が見られなかったが、CHIR99021 を処理した上皮組織においては発現の上昇が見られた（図 2C 左）。同様に、肺上皮組織において、Wnt シグナルを活性化する Wnt2 や安定型  $\beta$ -catenin をレンチウイルスにより発現させたと、CHIR99021 非存在下において MARK1 の発現が見られた（図 2C 右）。また MARK1 遺伝子の開始メチオニンから 5' 上流領域には  $\beta$ -catenin とともに Wnt シグナルの遺伝子発現を調節する転写因子 Tcf4 の結合領域が存在することをデータベースから見出した。そこで、胎生 13 日目の肺のクロマチンを調製し、 $\beta$ -catenin 抗体を用いた ChIP アッセイを行ったところ、予測された領域との結合が見られた（図 2D）。

次に MARK1 の分岐形態形成に対する影響を解析するため、MARK1 をノックダウンしたところ、CHIR99021 存在下にも関わらず分岐形態形成が損なわれた (図 3A、B)。タイトジャンクションのマーカである ZO-1 に対する抗体を用いて染色したところ、ZO-1 はコントロールでは頂端側に局在するがノックダウンした肺上皮組織においては側底部に見られた。同様に、ミオシン軽鎖に対する抗体で染色したところ、コントロールではミオシンが頂端側に局在したが、ノックダウンした上皮組織においては細胞質中にディフューズした (図 3C) <sup>1)</sup>。

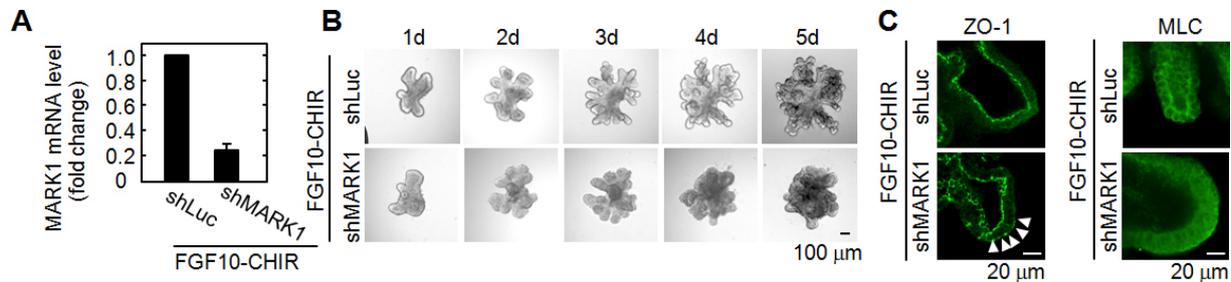


図 3. MARK1 の機能解析

A) 肺上皮組織に対し、shRNA を発現する MARK1 をレンチウイルスにより導入し MARK1 の発現レベルを解析した。shLuc: ネガティブコントロールとして用いた Luciferase に対する shRNA。B) MARK1 に対する shRNA を導入した肺上皮組織の経時的な変化。C) MARK1 に対する shRNA を導入した肺上皮組織における ZO-1 (タイトジャンクションマーカー、左)、MLC (ミオシン軽鎖、右) の局在。FGF10-CHIR: FGF10、CHIR99021 を共に加えた条件下で培養した。

## 考 察

Wnt シグナルのレポーターマウスを用いた解析が過去に報告されており、胎生期肺の遠位端において Wnt シグナルの活性が発生初期 (胎生 9.5 日 - 16.5 日) において高く後期 (胎生 16.5 - 18.5 日) には消失することが知られている。今回、MARK1 が分岐形態形成期である発生初期において発現が見られ、後期で発現が消失したことから、MARK1 の発現が Wnt シグナルと相関していることが示唆される。上皮組織を用いた解析から MARK1 の発現が Wnt シグナル依存的事であることが示された。Wnt シグナルは FGF 受容体の発現を介して FGF シグナルを増強することが過去に報告されており、実際私共も上皮単独培養系において CHIR99021 処理により FGF 受容体の発現とその下流因子群の発現が誘導することを確認している。この点で MARK1 の発現は Wnt による FGF シグナルの増強の結果誘導されたものではないことを示唆している。ChIP アッセイによって MARK1 の 5' 上流領域に  $\beta$ -catenin が結合することをが確認されたことから、MARK1 は Wnt シグナルによって直接的に発現が制御されていると考えられる。

MARK1 をノックダウンした際に頂端に局在する ZO-1 の局在が側底部近傍に見られた。このことは細胞間接着が十分に発達していないことを意味し、細胞の形態が円柱形から球形あるいは扁平な形状へと変化していることを示唆する。また MARK1 のノックダウンにおいて頂端側でミオシンの局在が減弱することから、頂端収縮が抑制されていることを示唆する。課題として細胞形態変化が組織形態変化にどのように影響するのかが不明である。現在この点を明らかにするべく数理モデルの観点から解析を行っている。

## 文 献

- 1) Fumoto K, Takigawa-Imamura H, Sumiyama K, Kaneiwa T, Kikuchi A. Modulation of apical constriction by Wnt signaling is required for lung epithelial shape transition. *Development*. 2016 Dec 2. pii: dev.141325. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27913639.