

FGF と Wnt の協同による肺分岐のヒエラルキー構造形成

Coordination of FGF and Wnt in the construction of the hierarchical branching
structure of lung

九州大学 大学院医学研究院 生体制御学講座 系統解剖学分野

今村 寿子

Hisako Takigawa-Imamura

Department of Anatomy and Cell Biology

Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

1. 序

呼吸器は気管から気管支、細気管支、肺胞へと高度に分岐した構造を示し、これが効率的なガス交換機能の基盤となっている。気管支と細気管支の太さおよび長さ（分岐から隣の分岐までの距離）は、基部側から末端側に向かって徐々に細く短くなっており、いわばヒエラルキー構造をとっている。このような構造的特徴は、肺気道の発生過程において、上皮管腔が先端で伸長しながらより細い枝に分かれることを繰り返すために生じる。本研究ではヒエラルキー構造がどのような制御のもとに生じるのか理解するため、実験と数理モデルを併用して分岐形成のメカニズムを調べた。

2. FGF10 によるラプラシアン成長の検証とモデル化

Fibroblast growth factor 10 (FGF10) は肺上皮の成長に最も重要な拡散性分子の一つとして知られる[1]。FGF10 は肺の間葉で発現しており、拡散して肺上皮細胞上の FGFR2 に作用すると、下流の MAP キナーゼの活性化を経て上皮の成長を促す。また同時に上皮における SHH の発現を促す。SHH も拡散し間葉に作用すると翻って FGF10 の発現を抑制する[2]。このような上皮-間葉間相互作用が働くことから、FGF10 の作用は上皮の形状に依存すると考えることができ、反応拡散系の数理モデルが提案されてきた[3]。上皮近傍の FGF10 発現量を考えると、SHH の作用により、陥入した部分では FGF10 の発現量が低く、突出した部分では FGF10 の発現量が高くなる。そ

のため、突出した部分の上皮は成長が早く、陥入した部分は成長が遅い。このようなメカニズムにより成長する上皮枝の先端が分岐することは、肺に関する多くの数理モデルの基礎になっている[4,5]。

そこで、実際に肺上皮の突出部で FGF10 下流のシグナルが亢進しているのか実験的に検証した。FGFR2 を介して働く MAP キナーゼ・ERK の活性を示す FRET バイオセンサーが発現しているトランスジェニックマウスを用いた[6]。分岐形成が始まる胎生 12 日のマウス胎仔から肺を取り出し、蛍光顕微鏡下で観察して ERK 活性の分布を調べた。その結果、上皮組織の断面に沿った曲率と、ERK 活性は弱く相関していた。活性の検出感度を向上させるために間葉を取り除いて上皮を観察した場合には、より強い相関が確認され、上皮の突出した部分で成長活性が亢進していることを実験的に確認することが出来た。また興味深いことに、胎生 12, 13, 14 日の肺上皮で比較すると、発生が進むにつれて、組織曲率に応じた ERK 活性変化率が減弱することが分かった。

FGF10 への応答は分岐形成の重要な要素であるため、その違いがどのように分岐枝の構造を変化させるのか、数理モデルを用いて検討した。細胞を粒子に見立てたモデル系[7]を応用して上皮枝の断面を表した二次元のモデルを構築し、上皮組織曲率に応じて上皮が成長するという仮定を組み込むと、上皮の先端が成長しながら分岐することを表現できた。ここで、曲率に応じた成長の起こりやすさを変化させると、突出部の成長亢進が極端なほど、一次分岐と二次分岐の距離が長くなることが分かった。この結果は、マウス肺において、発生初期ほど突出した部分の ERK 活性亢進の度合いが強いことと分岐間の距離が長いことに一致した。上皮の FGF10 応答性が変化することによって分岐枝の長さが調節されているという仮説が理論的に示された。

3. Wnt による自発曲率の検証とモデル化

Wnt は FGF10 と並んで肺の形態形成に重要であることが示されてきた[8]。肺の発生において、Wnt シグナル経路を破壊したトランスジェニックマウスでは、末端側の細く短い気管支が形成されないことが知られている[8,9]。関連した新しい知見として、大阪大学大学院医学研究科の麓勝己助教は、胎生期のマウス肺の上皮を FGF10 存在下で培養する系において、Wnt アゴニストである CHIR99021 を添加すると、形成される bud が小さくなることを見出した。上皮シストを FGF10 存在下で培養して bud を形成させる系は、分岐形成の *in vitro* 実験系として扱われており、CHIR99021 の効果は Wnt が分岐形状を積極的に制御していることを示唆する。CHIR99021 により生じた bud では頂端面の細胞骨格が発達しており頂端収縮のマーカーが強く発現していた。頂端収縮を示す分子の集積は *in vivo* でも確認された[10]。

このような実験結果から Wnt がいかに形態を制御するか理論的に説明するため、自発曲率による変形の可能性を考えた。頂端収縮が起きると、個々の細胞の変形により、上皮組織の曲率を高める力が生じ bud 形成が起きるという仮説を考え、数理モデルを構築した。ここでは細胞形状を描出するモデルとするため、細胞形状を 4 つの頂点で表し、頂点の運動により細胞の変形と移動を、頂点の追加により細胞増殖を表現するものとした。頂端収縮は、頂端面側の頂点間で働く引力を仮定することで表現できる。

このモデルを用いて、小さい円形の上皮シストについて細胞を増殖させる計算機シミュレーションを行うと、bud の形成が再現できた。頂端収縮を仮定しない場合は、

上皮組織の座屈によって大きな bud が不規則に生じた。それに対して、全ての細胞で頂端収縮を強めていった場合、ほぼ等しい大きさの bud が多数生じ、実験で見られた CHIR99021 存在下と非存在下での bud 形状の違いを再現できた[10]。

細胞数が増えてくると、細胞の形状に対応するような高い曲率と、実際のシストの曲率に隔たりができて、形状が不安定化すると考えられる。このことを確かめるため、シストが正円形の場合と楕円状に変形した場合のエネルギーの差を計算により求めた。基底面の長さを細胞周長の $1/4$ とした場合、細胞数が 14 以下の時には正円形のエネルギーがより低く、細胞数が 15 以上の時には変形したほうが低いエネルギーを取ることが分かった。最も低いエネルギーを取る時のシストの長軸長は、計算機シミュレーションで得られる形状の長軸長とほぼ一致していた。このことから、上皮の成長する先端が大きくなると分岐が起きることが示され、細胞サイズが変われば分岐波長も変化すると考えられる。上皮枝先端部の細胞サイズは発生が進むほど小さくなることと合わせて考えると、頂端収縮と細胞サイズの制御が、分岐枝の管径を調節していることが示唆された。

4. おわりに

肺気管支のヒエラルキー構造が制御されるメカニズムについて、実験と数理モデルを組み合わせた検討により仮説を提案した。肺の構造制御研究は分子間相互作用によるモルフォゲンの発現制御に注目した研究が多い中で、本研究では上皮の自律性から調節されている可能性を示すことができた。今後は FGF10 の増殖と遊走への効果やシグナル経路、Wnt の発現などが発生過程でどのように変化するのか調べることで仮説検証を進めていきたい。

5. 参考文献

- [1] Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development*. 1997 Dec;124(23):4867-78.
- [2] Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*. 1997 Jan;124(1):53-63.
- [3] Miura T, Shiota K. Depletion of FGF acts as a lateral inhibitory factor in lung branching morphogenesis in vitro. *Mech Dev*. 2002 Aug;116(1-2):29-38.
- [4] Clément R, Douady S, Mauroy B. Branching geometry induced by lung self-regulated growth. *Phys Biol*. 2012 Dec;9(6):066006.
- [5] Guo Y, Chen TH, Zeng X, Warburton D, Boström KI, Ho CM, Zhao X, Garfinkel A. Branching patterns emerge in a mathematical model of the dynamics of lung development. *J Physiol*. 2014 Jan 15;592(2):313-24.
- [6] Komatsu T, Mizoguchi H, Sasaki M, Sakurada C, Tsuzuki M, Sakurada S, Sakurada T. Inhibition of ERK phosphorylation by substance P N-terminal fragment decreases capsaicin-induced nociceptive response. *Neuropharmacology*. 2011 Sep;61(4):608-13.

- [7] Takigawa-Imamura H, Morita R, Iwaki T, Tsuji T, Yoshikawa K. Tooth germ invagination from cell-cell interaction: Working hypothesis on mechanical instability. *J Theor Biol.* 2015 Oct 7;382:284-91.
- [8] Mucenski ML, Wert SE, Nation JM, Loudy DE, Huelsken J, Birchmeier W, Morrissey EE, Whitsett JA. beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):40231-8.
- [9] Goss AM, Tian Y, Tsukiyama T, Cohen ED, Zhou D, Lu MM, Yamaguchi TP, Morrissey EE. Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Dev Cell.* 2009 Aug 17;17(2):290-8.
- [10] 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.* 2017 Jan 1;144(1):151-162.

Department of Anatomy and Cell Biology
 Kyushu University Graduate School of Medical Sciences
 Fukuoka 812-8582
 JAPAN
 Email address: hisaima@anat1.med.kyushu-u.ac.jp

九州大学・大学院医学研究院 今村 寿子
 以上