

浸透圧勾配による上皮細胞シートおよび細胞外マトリクスの三次元形態形成

石原 すみれ¹, 芳賀 永²

1. はじめに

臓器のもつ特徴的な三次元構造が発生の過程においてどのように形作られるのか（形態形成）は生物学におけるいまだ解明されていない重要課題の一つである。多くの臓器・器官の形成過程では、上皮細胞シートの変形により管構造やひだ構造などの複雑な形が生み出される。たとえば、完全変態昆虫であるカブトムシの幼虫期では、将来角となる成虫原基で細胞シートが複雑に折りたたまれていき、それが一気に展開することで成虫の角構造になる¹⁾。また、マウス小腸の発生過程では、平滑な上皮シート構造の一部がドーム状に隆起し始めることで絨毛構造を獲得する²⁾。このように、上皮細胞シートの変形は形態形成の要となっているが、細胞シートの変形メカニズムについては多くが未解明である。

上皮細胞の形態形成は、細胞培養実験系においても盛んに研究が行われてきた。特に、イヌ腎臓上皮細胞（MDCK細胞）は上皮細胞の特徴をよく保存した細胞株であり、管腔をはじめとする三次元構造の形態形成の研究によく用いられている³⁻⁵⁾。さらに、MDCK細胞は、小腸の発生過程でみられるような平坦な細胞シートの一部がドーム型に盛り上がる変形を示すことが1969年に発見されており⁶⁾、その形成メカニズムが研究されてきた。具体的には、(1)上皮細胞が持つイオン輸送能により培養基盤側のイオン濃度

が上昇、(2)浸透圧勾配が発生し、細胞シートと培養基盤の間に水が流入、(3)静水圧により細胞シートの一部が培養基盤から剥がれ、ドーム様構造が出現、の三つのステップからなると考えられている。(1)イオン輸送能、(3)静水圧による寄与はそれぞれ調べられているが^{7,8)}、(2)浸透圧勾配の寄与については直接的な実験的検証はされていない。そこで我々は、実際に浸透圧勾配を上皮細胞シートに与えることで、ドーム形成における浸透圧勾配の寄与を直接的に検証した。本稿では、細胞シートにドーム変形をもたらす因子としての浸透圧とその変形メカニズムについて紹介する。

2. 細胞外マトリクスと形態形成

形態形成における浸透圧の寄与を調べるためには、パラメーターを限定して検証できる細胞培養系での検証が有用である。前述のとおり、MDCK細胞を用いた細胞培養系（*in vitro*）でもドーム構造は出現するが、生体内（*in vivo*）であるマウス小腸におけるドーム形成とは決定的に違う点が存在する。マウス小腸のドームは一度できた構造が維持されるが、MDCK細胞のドーム構造には安定性がなく、出現したドーム構造がすぐに潰れて平らなシート状態に戻ってしまうのである。そのため、既存の*in vitro*のドーム形成は生体内でのドーム形成を十分に模倣できているとはいえなかった。*in vivo*と*in vitro*のドーム構造の最も大きな違いとして細胞外マトリクス（extracellular matrix: ECM）の有無などがあげられる。ECMはタンパク質の三次元ネットワークで構成された非細胞性の物質であり、細胞の接着基盤になるとともに、形態形成において細胞シートの変形を構造的に支えている。*in vivo*の上皮細胞シートは厚みのあるECM上に存在し、上皮細胞シートの変形に伴ってECMも変形する²⁾。一方で、*in vitro*の上皮細胞シート下にはECMはほとんど存在せず、ドームの内部は液体で満たされているため、構造が支えられずすぐに潰れてしまうと考えられる。

ECMの物理的な性質は形態形成に変化をもたらすことが知られている。一つの例として、ショウジョウバエの卵室の発生とECMの硬さの変化がある⁹⁾。卵室は、発生が進むにつれて正円から楕円へと変形する。この変形過程では、初期には一様の硬さを持った卵室周囲のECMが、

¹北海道大学大学院先端生命科学研究所生命機能科学研究部門細胞装置学研究室（〒001-0021 北海道札幌市北区北21条西11丁目）

²北海道大学大学院先端生命科学研究所先端融合科学研究部門細胞ダイナミクス科学研究室（〒060-0810 北海道札幌市北区北10西8丁目）

Three-dimensional deformation of epithelial sheets on extracellular matrix induced by osmotic gradient

Sumire Ishida-Ishihara¹ and Hisashi Haga² (¹Laboratory of Cell Machinery Science, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Kita-21 Nishi-11, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021, Japan, ²Laboratory of Cell Dynamics, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Kita-10 Nishi-8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0810, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940896

© 2022 公益社団法人日本生化学会

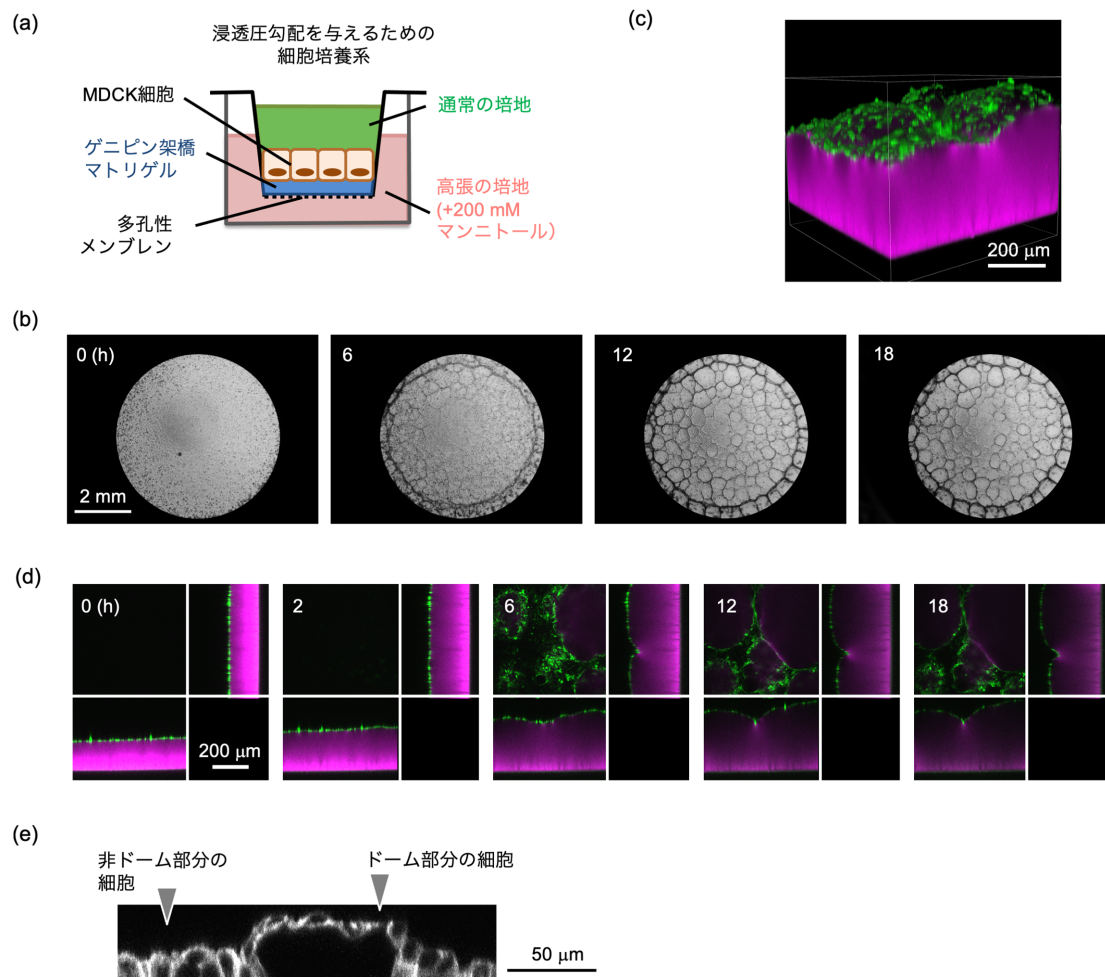


図1 浸透圧勾配によるドーム形成

(a) 浸透圧勾配を細胞シートに負荷する培養系。(b) GP-Matrigel上で浸透圧勾配を付加した細胞シートの位相差顕微鏡タイムラプス観察。(c, d) 共焦点レーザー顕微鏡による三次元形態の観察(c)および三次元ライブイメージング(d)。Green: MDCK細胞。Magenta: GP-Matrigel。(e) ECM非存在下のドーム構造のZ断面図。White: F-actin。

徐々に一部だけ硬くなっていき楕円へと変形する。この部分的な硬化が阻害されると、卵室の楕円変形は起こらない。また、我々は、*in vitro*においてECMの物性変化が形態形成に影響を及ぼすことを報告している。MDCK細胞のコロニーはECMの一つであるコラーゲンでできたゲルで重層すると、コロニーの外縁部が内側に折れ曲がって管腔構造を作り出す⁵⁾。この折れ曲がり、柔らかい基盤であるコラーゲングル層の一方を硬い基盤（コラーゲンコートしたガラス基盤）に変えると起こらなくなる。また、MDCK細胞のコロニーをマトリゲルという天然ECM由来のゲルの上で培養すると、細胞はマトリゲルを変形させながらチューリップハット状の立体構造を作り出す⁴⁾。このコロニーおよびマトリゲルの立体変形は、ゲニピン^{10, 11)}という架橋剤を処理してマトリゲルの物性を変えると阻害される。このように、ECMの物性変化は細胞集団の形態形成に深く関わっているが、浸透圧勾配存在下における形

態形成への寄与についてはほとんどわかっていない。

3. 浸透圧と形態形成

浸透圧勾配が生じた際、細胞や臓器は恒常性を保つためにさまざまな応答をする。たとえば、赤血球のような単細胞は、浸透圧変化が起こると細胞の体積を一定に保つために細胞内の水分量やイオン濃度を調整する。また、腎臓では上皮細胞層が半透膜として働き、浸透圧に応じた水輸送をすることにより体内の水分量を一定に保っていることが知られている。このような恒常性の維持に関する知見に比べるとわずかだが、形態形成における浸透圧の寄与もいくつか報告がある。たとえば、発生途中の線虫に高張圧ストレスを与えると排泄管の伸長が促進されることや¹²⁾、マウス胎仔の肺原基を取り出して浸透圧の異なる培養液中で培養すると高張圧ほど肺の分岐構造の形成が促進されること

などが報告されている¹³⁾。このように、浸透圧勾配が形態形成へ寄与していることが示唆されつつあるものの、その全貌や細胞シートの変形のメカニズムに関してはほとんどが未解明である。

4. 浸透圧勾配による安定なドーム形成

そこで我々は、より生体内に近い環境で浸透圧勾配が上皮細胞シートの三次元変形に及ぼす影響を調べるために、厚みのあるECM上にMDCK細胞シートを作製し、浸透圧勾配を負荷することとした¹⁴⁾。我々のこれまでの研究において、マトリゲル上のMDCK細胞のコロニーが変形する際、その細胞集団の変形に伴ってマトリゲルも変形することを見いだしている⁴⁾。そこで、浸透圧勾配によるMDCK細胞シートの変形を調べる際にもマトリゲルを使用するのが適切と考えたが、通常のマトリゲル上ではMDCK細胞は穴の空いたシート構造しか作らなかった。生体内の細胞シートでは、細胞間に隙間は存在していない。そこで、ECMの物性が細胞のコロニーの形状に影響を及ぼすことに着目し⁴⁾、マトリゲルにゲニピン架橋を施して物性を変化させ、MDCK細胞に生体内と同様の隙間のないシート構造を作らせた。このゲニピン架橋マトリゲル (Genipin treated Matrigel : GP-Matrigel) の上で細胞シートに浸透圧勾配を負荷するため、多孔性メンブレンを底面に持つセルカルチャーインサート内にGP-MatrigelとMDCK細胞シートを作製した (図1a)。その後、ECM側を200 mMマニトールを加えた培養液 (高張培養液) に交換し、MDCK細胞シートが変形するかを確かめた。位相差顕微鏡によるタイムラプス観察の結果、浸透圧勾配を与えたMDCK細胞シートにおいて丸い構造が同時多発的に出現するようすをとらえた (図1b)。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による三次元観察の結果、位相差顕微鏡で観察された丸い構造はドーム構造をとっていることがわかった (図1c)。さらに、一度できたドーム構造は潰れることなく立体構造を維持した。以上のことから、本実験系により、今までの*in vitro*培養系ではみられなかった安定性を有したドーム形成の再現に成功した。

この実験系を用い、我々は、浸透圧勾配に応答してドーム構造が形成されるメカニズムに迫った。3次元ライブイメージングを行いドームの形成過程をより詳細に調べた結果、浸透圧をかけた直後からECMとして用いたGP-Matrigelが不均一に膨潤してドーム構造が出現することを発見した (図1d)。マトリゲルはイオン基を含むハイドロゲルである。イオン基を持つハイドロゲルは、ゲル中のイオン強度が下がると膨潤度が上昇する。細胞が持つ水輸送タンパク質であるアクアポリン (Aquaporins : AQP) は、浸透圧勾配に応答して水を高張側に輸送するため¹⁵⁾、

AQPによってGP-Matrigelに水が輸送され、それによりゲル中のイオン強度が下がりゲルが膨潤すると考えた。そこで、AQP阻害剤である水銀イオン存在下でMDCK細胞シートに浸透圧勾配を与えた。その結果、AQP阻害下ではドーム形成およびGP-Matrigelの膨潤が阻害された。次に、ゲルへの水の流入がドーム変形を起こすのかを検証するため、細胞を播種していないGP-Matrigelを純水に浸し、ドーム形成が起こるかを検証した。その結果、ゲルの膨潤は認められたものの、ドームは出現しなかった。そのため、ドーム状のゲルの膨潤は、単に水がゲルへ流入するだけでなく、細胞によって制御された水輸送が重要であることが示された。

次に、同一の細胞の集団である細胞シートがどのように水輸送を制御し、不均一なゲルの膨潤を引き起こすかについて調べることにした。ここで我々は、浸透圧勾配を与える前の細胞シートにおいて、個々の細胞の厚みは同一ではなくばらつきが存在していることに気がついた。また、内部に液体を保持したドーム構造では、ドーム部分の細胞は非ドーム部分の細胞に比べて伸展され細胞の厚みが薄くなることが知られている⁸⁾ (図1e)。さらに、別の研究グループにより、伸展刺激がAQP-1の発現を上昇させるという報告があった¹⁶⁾。細胞は伸展刺激によって厚みが減少することから、我々は以下の仮説を考えた (図2) : 1) 浸透圧勾配が加わった際、細胞シート内の厚みの少ない細胞がより多くの水を輸送する、2) 多く水が輸送された範囲ではゲルの局所的な膨潤が生じる、3) ゲルの膨潤により直上に位置する細胞が伸展される、4) 伸展により水輸送がさらに活性化される、5) 2) ~4) のフィードバックにより不均一なゲル膨潤が引き起こされ、ドーム構造が出現する。この仮説を証明するため、まず細胞の厚みによって細胞シートの水輸送能が変わるかを調べたところ、厚みが少ない細胞の方が水の輸送能が高いことを発見した。さらに、GP-Matrigel上でドーム形成した細胞の厚みを共焦点レーザー顕微鏡による観察によって調べたところ、ドーム頭端部の細胞はドーム縁部の細胞に比べて厚みが少なかった。また、数値モデルによるシミュレーションを行い、2) ~4) のフィードバックが起こらないときは、ドームが出現しないことを突き止めた。以上の結果から、浸透圧勾配が引き起こすECM上のドーム形成は、細胞の厚み依存的な水輸送によってECMが不均一に膨潤するためであることを明らかにした。

5. おわりに

本稿では、形態形成における浸透圧の寄与に焦点を当てた我々の研究の一端を紹介させていただいた。本研究成果は、*in vitro*の実験系において、浸透圧勾配による安定な三

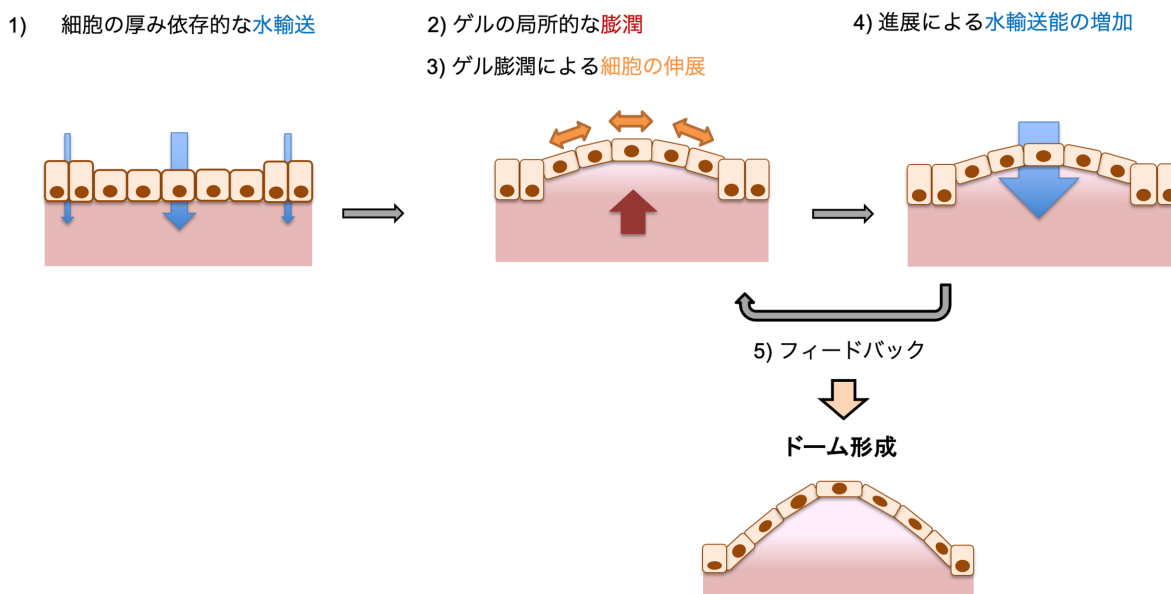


図2 ECM上における浸透圧勾配によるドーム形成のモデル

次元構造の形成を再現した初めての報告である。浸透圧は生体内に普遍的に存在している現象であるにもかかわらず、形態形成への寄与はほとんどわかっていない。生体内で形態形成が起こる際に浸透圧変化が起こっているのか、また、生体内での浸透圧変化が形態形成を制御しているのかについては、我々が調べた限りではあるが、これまでに知見は得られていない。そのため、実際の形態形成において浸透圧勾配の寄与があるかについては明らかでないが、少なくとも線虫やマウスの肺原基を用いた研究によって浸透圧刺激によって臓器の形態が変化することは報告されている。さらに我々も、浸透圧勾配がECMの膨潤による変形を引き起こすことで安定なドーム構造を構築することを示した。本研究成果は浸透圧勾配が生体内における形態形成に寄与している可能性を引き上げるものである。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、富山大学 秋山准教授、福井工業大学 古澤教授、東京大学 名黒准教授、ならびに、サレジオ工業高等専門学校 須志田先生をはじめ、多くの共同研究者の方々のご指導・ご協力によるものであります。深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Matsuda, K., Gotoh, H., Tajika, Y., Sushida, T., Aonuma, H., Niimi, T., Akiyama, M., Inoue, Y., & Kondo, S. (2017) Complex furrows in a 2D epithelial sheet code the 3D structure of a beetle horn. *Sci. Rep.*, **7**, 13939.
- 2) Walton, K.D., Freddo, A.M., Wang, S., & Gumucio, D.L. (2016) Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development*, **143**, 2261–2272.
- 3) O'Brien, L.E., Zegers, M.M., & Mostov, K.E. (2002) Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 531–537.
- 4) Imai, M., Furusawa, K., Mizutani, T., Kawabata, K., & Haga, H. (2015) Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate. *Sci. Rep.*, **5**, 14208.
- 5) Ishida, S., Tanaka, R., Yamaguchi, N., Ogata, G., Mizutani, T., Kawabata, K., & Haga, H. (2014) Epithelial sheet folding induces lumen formation by Madin-Darby canine kidney cells in a collagen gel. *PLoS One*, **9**, e99655.
- 6) Leighton, J., Brada, Z., Estes, L.W., & Justh, G. (1969) Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science*, **163**, 472–473.
- 7) Leighton, J., Estes, L.W., Mansukhani, S., & Brada, Z. (1970) A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer*, **26**, 1022–1028.
- 8) Latorre, E., Kale, S., Casares, L., Gómez-González, M., Uroz, M., Valon, L., Nair, R.V., Garreta, E., Montserrat, N., Del Campo, A., et al. (2018) Active superelasticity in three-dimensional epithelia of controlled shape. *Nature*, **563**, 203–208.
- 9) Chen, D.Y., Crest, J., Streichan, S.J., & Bilder, D. (2019) Extracellular matrix stiffness cues junctional remodeling for 3D tissue elongation. *Nat. Commun.*, **10**, 3339.
- 10) Sundararaghavan, H.G., Monteiro, G.A., Lapin, N.A., Chabal, Y.J., Miksan, J.R., & Shreiber, D.I. (2008) Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **87**, 308–320.
- 11) Tsai, C.C., Huang, R.N., Sung, H.W., & Liang, H.C. (2000) In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation. *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 58–65.
- 12) Kolotuev, I., Hyenne, V., Schwab, Y., Rodriguez, D., & Labouesse, M. (2013) A pathway for unicellular tube extension depending on the lymphatic vessel determinant Prox1 and on

osmoregulation. *Nat. Cell Biol.*, **15**, 157–168.

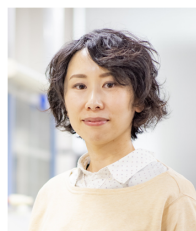
- 13) Nogawa, H. & Hasegawa, Y. (2002) Sucrose stimulates branching morphogenesis of embryonic mouse lung in vitro: a problem of osmotic balance between lumen fluid and culture medium. *Dev. Growth Differ.*, **44**, 383–390.
- 14) Ishida-Ishihara, S., Akiyama, M., Furusawa, K., Naguro, I., Ryuno, H., Sushida, T., Ishihara, S., & Haga, H. (2020) Osmotic

gradients induce stable dome morphogenesis on extracellular matrix. *J. Cell Sci.*, **133**, jcs243865.

- 15) Verkman, A.S. (2011) Aquaporins at a glance. *J. Cell Sci.*, **124**, 2107–2112.
- 16) Baetz, N.W., Hoffman, E.A., Yool, A.J., & Stamer, W.D. (2009) Role of aquaporin-1 in trabecular meshwork cell homeostasis during mechanical strain. *Exp. Eye Res.*, **89**, 95–100.

著者寸描

●石原 すみれ (いしはら すみれ)



北海道大学大学院先端生命科学研究院助教。博士（生命科学）。

■略歴 2012年北海道大学理学部卒業。日本学術振興会特別研究員を経て、20年学位（生命科学）取得。21年より現職。

■研究テーマと抱負 生体内で生じる様々なストレスを細胞培養系で再現して、分裂異常細胞のストレス応答を追跡しています。ストレス応答が形態形成や

病態など様々な生命現象に及ぼす影響を分子レベルで明らかにすることを目指しています。

■ウェブサイト <https://life.sci.hokudai.ac.jp/fa/staff/ishihara-sumire-2>

■趣味 料理、編み物。

●芳賀 永 (はが ひさし)



北海道大学大学院先端生命科学研究院教授。博士（理学）。

■略歴 1989年北海道大学理学部卒業。95年同大学大学院にて学位（理学）取得後、米国マサチューセッツ工科大学にて博士研究員。97年北海道大学助手を経て、2013年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞を取り囲む環境の物理的な性質（硬さ、粘性、空間的制限）に着目して、発生における細胞集団の三次元形態の形成メカニズム、およびがん悪性化のメカニズムを理解することを目指している。

■ウェブサイト https://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/member/haga_hisashi/

■趣味 ロープクライミング、登山、演劇鑑賞。