

## 消化管平滑筋分化の分子機構の解明

The elucidation of mechanisms of differentiation of smooth muscle in gut.

研究代表者 東京都立大学理学系研究科生物科学専攻 助手 福田 公子  
Assistant Professor, Department of Biological Science, Tokyo Metropolitan  
University  
Kimiko FUKUDA

The embryonic gut of vertebrates consists of endodermal epithelium and surrounding mesenchyme derived from splanchnic mesoderm. The mesenchyme differentiates into concentric layers around the epithelium; lamina propria, muscularis mucosae, submucosa and lamina muscularis (smooth muscle layer). We tried to elucidate how this concentric organization of gut mesenchyme is established. We have isolated a gene regulates the differentiation of smooth muscle cells in the gut using differential and it was designated chicken FKBP/smooth muscle activating protein (cFKBP/SMAP). Then, we found that whole gut mesenchyme has a potency to differentiate into smooth muscle but epithelium inhibits its differentiation in adjacent mesenchyme and elucidate the molecular mechanism involved in the topographical differentiation of mesenchyme.

### 1. 研究目的

消化管は動物において食物を消化し、吸収するために特殊化した管である。脊椎動物の消化管は形成された初期には、全長にわたって内腔に面した上皮とそれを取り囲む間充織からなる。上皮はその後、消化酵素を分泌したり柔毛を発達させたりすることで、食物の消化、吸収に直接関わるようになる。一方間充織は発生の初期は一様にみえるが、発生が進むと内側から同心円状に粘膜固有層、粘膜筋板、粘膜下層、筋肉層が分化してくる。我々はこのうち平

滑筋の分化の機構について研究を行なった。我々は鳥類胚を用いて平滑筋分化の仕組を調べるに当たってまず、平滑筋の細胞に非常に早くから発現し、平滑筋の分化を調節するような因子 cFKBP/SMAP (SMAP)の単離をおこなった。この分子は平滑筋予定域に早くから発現していることから、SMAP をマーカーとして用い、消化管間充織の同心円状分化の分子機構を調べた。

### 2. 研究経過

### cFKBP/SMAP の単離および機能解析

我々は differential display 法を用いて前胃間充織には発現せず、砂嚢間充織には発現しているような cDNA を単離した。そして、得られた遺伝子断片のうちの1つをプローブにして 7.5 日胚砂嚢の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、蛋白質をコードしているクローンの単離に成功した。我々が単離した遺伝子はその構造上の特徴から、FK506 結合蛋白質 (FKBP) と考えられた。しかし後述のとおり、これまで報告のある FKBP とは発現領域および機能が全く違うため、新規 FKBP と考え、cFKBP/SMAP (平滑筋活性化蛋白質 smooth muscle activating protein) と命名した。

cFKBP/SMAP は消化管や他の組織の将来平滑筋になる細胞、および分化した平滑筋細胞に発現した。このことからこの遺伝子は平滑筋分化に関わっていると予想された。

次にこの遺伝子の機能を知るため、FKBP の機能を阻害剤、FK506 を加えた培地で消化管を培養した。6 日胚砂嚢間充織を FK506 なしで器官培養すると 13F4 陽性の平滑筋が分化するが、10  $\mu$ M の FK506 を加えると 13F4 で染まる細胞が全く現わらず、平滑筋分化が阻害されたことがわかった。

さらに cFKBP/SMAP の機能を直接確かめるため、cFKBP/SMAP を 4 日胚砂嚢間充織細胞に強制発現した。コントロール細胞は繊維芽細胞状の形のままで、平滑筋に分化しなかったが、cFKBP/SMAP 強制発現ベクターを導入した細胞は長く伸びた形になり、平滑筋に分化した。この実験から cFKBP/SMAP が間充織細胞に連続して発現することが平滑筋分化にとって必須であることが示唆される。

以上の結果より我々の単離した cFKBP/SMAP

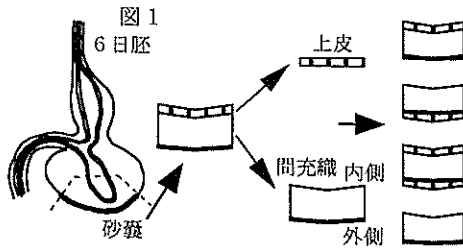
は平滑筋細胞の分化を調節する新規分子であることがわかった。骨格筋や心筋の分化に関しては bHLH 転写因子を始めとする調節因子群が数多く単離され、研究が進んでいるが、平滑筋に関しては特異的な収縮蛋白質の上流にある因子の解析は非常に遅れていた。cFKBP/SMAP は平滑筋分化の分子機構の研究に関して新たな光を投げかけることになると考えられる。

次に cFKBP/SMAP をマーカーとして用いて消化管平滑筋がなぜ消化管の最外層に分化してくるのか、その分子機構について解析を行なった。

### 平滑筋分化に対する上皮の役割

消化管平滑筋の分化に対する上皮の影響を調べるために以下のような実験を行なった (図 1)。6 日胚砂嚢を取りだし、上皮と間充織に分けた後、上皮を間充織に再結合した。このとき、間充織の内側すなわち本来上皮があった側に再結合したもの、外側すなわち本来の側と逆側に再結合したもの、内側と外側の両側を上皮ではさんだもの、上皮を再結合しなかった間充織だけのものの 4 種類を作り、器官培養を行なった。間充織の内側に上皮を再結合させた培養片では、正常発生と同様に cFKBP/SMAP 陽性の平滑筋細胞が間充織の最も外側に分化した。逆に上皮を外側に再結合させると、cFKBP/SMAP は上皮からはなれて間充織の内側の細胞に発現した。さらに間充織を上皮ではさんだ培養片では cFKBP/SMAP はどちらの上皮からもはなれた間充織のなかほどの細胞で発現した。上皮なしでは間充織のほとんどが cFKBP/SMAP を発現し、平滑筋へと分化した。この実験から全ての間充織細胞は平滑筋へ分化する能力があるが、平滑筋の分化は上皮によって阻害されていることが強く示唆された。消

化管の平滑筋分化が上皮からの影響を受けているという報告はこれまでなく、上皮間充織相互作用が消化管において今まで考えられていたよりも広く細胞分化に関わっていることが示唆された。



#### 平滑筋分化を阻害する因子の探索

以上の結果を踏まえ、平滑筋分化に関わる分子機構を探るため、今まで報告のある分子のなかから、分泌因子であり、しかも上皮もしくは平滑筋に分化しない内側の間充織の発現するものを探索した。その結果 sonic hedgehog (Shh) が消化管上皮に発現していることがわかった。Shh は消化管上皮全体に発現しており、体の他の部分では誘導や形態形成に深く関わる重要な分子である。また、内側間充織に発現する分泌蛋白質に BMP4 が見つかった。BMP4 は上皮と平滑筋細胞の間の間充織に発現しており、消化管間充織の各部分で同様の発現が見られた。また一般に BMP4 は Shh によって発現が誘導されることがわかっている。

そこで上皮と平滑筋の間にあり平滑筋にならない間充織のマーカースとして BMP4、平滑筋のマーカースとして cFKBP/SMAP、上皮のマーカースとして Shh を用いて、前述の実験を行ない、それぞれのマーカースの発現を調べた。全ての培養片で上皮には Shh が発現していた。間充織の内側に上皮を再結合させた培養片では、正常発生と同様に上皮の直下の間充

織では BMP4 が発現し、cFKBP/SMAP は間充織の最も外側に発現した。逆に上皮を外側に再結合させると、cFKBP/SMAP は上皮からはなれて間充織の内側の細胞に発現し、上皮に近い外側の間充織に BMP4 が発現した。さらに間充織を上皮ではさんだ培養片では cFKBP/SMAP はどちらの上皮からもはなれた間充織のなかほどの細胞で発現し、外側の間充織では BMP4 が発現した。上皮なしでは BMP4 は全く発現せず、間充織のほとんどが cFKBP/SMAP を発現した。このことから上皮はその周りに内側の間充織を誘導することで、平滑筋分化を阻害しているという可能性が強まった。

上皮に発現する分泌因子 Shh が平滑筋分化を阻害するかどうかを確かめるために、Shh を発現する株細胞が上皮と同様に平滑筋分化に影響を与えるかどうか確かめた。6日胚砂嚢間充織の外側、すなわち本来上皮がある側と逆側に Shh を恒常的に発現するような細胞株を乗せ、培養した。すると Shh 細胞の周りに BMP4 の発現が誘導され、その場所では平滑筋分化が阻害された。

以上の実験より、消化管平滑筋分化に関して以下のようなモデルをたてた(図2)。消化管上皮は Shh を発現する。別の実験で上皮での Shh 発現には間充織が必要であるとの結果が得られている。その Shh は今度は間充織に働きかけ、本来はすべて平滑筋に分化するコンピテンスがある間充織に対して内側の粘膜固有層、粘膜下層などになる部分を誘導し、BMP4 発現を誘導する。そして cFKBP/SMAP の発現を阻害する。間充織の外側では cFKBP/SMAP が発現し、それによって平滑筋特異的遺伝子が誘導され、平滑筋細胞へと分化する。

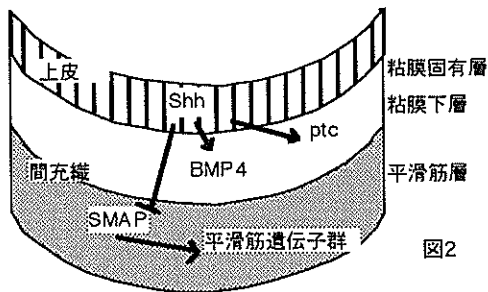


図2

### 3. 研究成果

本研究は消化管の上皮を中心とした間充織の同心円状分化に上皮の Shh が重要な役割を果たしていることを示した初めての報告である。上皮間充織相互作用はいままではもっぱら上皮の分化に関わる機構が調べられてきたが、今回は逆に間充織の分化パターンが上皮によって決まっているという新しい切り口の結果が得られた。

### 4. 今後の課題と発展

間充織の中には筋肉の運動をコントロールする神経が存在する。この神経細胞の分化は上皮によってどのように分化が調節されているのか、さらにその分子機構について調べてゆきたい。また、発生過程だけでなく、消化管の再生の過程において、今回同定した分子が関わっているのかも調べたい。本研究は将来的に、発生生物学の分野だけでなく人工臓器や、消化管疾患といった医学、生物工学の分野においても将来応用されることが期待される。

### 5. 発表論文リスト

1. Fukuda, K., Tonegawa, Y., Fujii, G., Yasugi, S. and Hirohashi, S. (1998) cFKBP/SMAP; a novel molecule involved in the regulation of smooth muscle

differentiation. Development 125 (18), 3535-3542

2. Akiko Sukegawa, Tomohiro Narita, Takashi Kameda, Kanako Saitoh, Tsutomu Nohno, Hideo Iba, Sadao Yasugi and Kimiko Fukuda. The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. (投稿中)