

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：82648

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24111002

研究課題名(和文)リンパ器官形成の分子機構と制御

研究課題名(英文)Molecular mechanism and regulation of the lymphoid organ

研究代表者

高田 慎治(TAKADA, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 108,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、胸腺ストローマ細胞におけるWntの機能とシグナルの場の空間的制御の理解を目指した。その結果、胸腺皮質辺縁部に未分化な皮質細胞が存在し、Wntシグナルがその増殖を促進することが示唆されるとともに、Wntの拡散様式を規定する要因が細胞外に分泌されたWntの会合状態並びに細胞外基質におけるヘパラン硫酸鎖の修飾状態にあることが示された。さらに胸腺の初期発生機構の理解を目指し、胸腺原基が発生する咽頭嚢の形成機構を解析した。その結果、細胞外基質との接着に関わる複数のLIMドメインタンパク質とRipply3との相互作用により、咽頭上皮が秩序正しく屈曲し咽頭嚢が形成されるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：One of the goals of this study was to understand the molecular mechanism of the spatial control of the Wnt function in thymic stromal cells. Our results suggest that the Wnt signal promotes proliferation of epithelial cells in the margin of the thymus cortex. We also found that the variation of Wnt protein complexes and that of heparan sulfate proteoglycans in the extracellular space are involved in the regulation of the diffusion pattern of Wnt proteins in model systems. Another goal that we had was to understand the developmental mechanism of the thymus primordia. Our results suggest that the interaction between Ripply3 and several LIM domain proteins, which are known to be involved in adhesion to the extracellular matrix, is required for the proper morphogenesis of the pharyngeal epithelium, from which the thymus is generated.

研究分野：発生生物学

キーワード：遺伝子 細胞分化 シグナル伝達 咽頭弓 胸腺

### 1. 研究開始当初の背景

免疫を司る血液系細胞の分化には、リンパ器官という「場」からの作用が不可欠である。そのような「場」の作用を理解する上では、リンパ器官を構成するストローマ（間質）細胞の役割を明らかにすると同時に、場の作用を担う分子の実体である各種分泌性シグナル因子の機能を解明することが必要である。実際、胸腺等のリンパ器官においては、多様なストローマ細胞の実態が解明されつつあると同時に、血液系細胞の分化や増殖を促すシグナル因子が数多く同定され、それらの機能について多くの研究が進められていた。

一方、リンパ器官は組織化された三次元的な組織であり、ストローマ細胞の配置や分泌性のシグナル因子の拡散範囲も空間的に制御されているものと考えられる。したがって、リンパ器官におけるストローマ細胞の作用機作を理解するためには、多様なストローマ細胞がリンパ器官の中でどのように分布し、また分泌性シグナル因子の拡散により規定されるシグナルの到達範囲、言い換えれば「シグナルの場」、がどのように制御されるのかを明らかにすることが重要であると考えられた。

研究代表者は、発生生物学の観点から分泌性シグナル因子、中でも Wnt に特に着目して、その機能や分泌後の空間分布、さらにそれらに深く関わる翻訳後修飾や高次構造を研究してきた (Takada, et al. *Genes Dev.* 1994, Ikeya, et al. *Nature.* 1997, Muroyama, et al. *Genes Dev.* 2002, Takada, et al. *Dev. Cell.* 2006 他)。Wnt や FGF, TGF などの代表的なシグナルが動物の発生において重要な働きをすることは、すでに膨大な研究により明らかにされているが、これらシグナル因子の拡散により規定される「シグナルの場」の形成機構とその制御については、問題の重要性にもかかわらず十分には解明されていない。

このような問題と同時に、胸腺の発生機構は重要な問題である。発生学的には、胸腺は咽頭嚢と呼ばれる内胚葉と神経堤細胞に由来する。これらにより形成される細胞塊である胸腺原基は、発生に従い咽頭嚢からくびれ切れ、心臓付近まで移動する。そして、血管の進入に伴って未分化な T 細胞が入り込み、次第に成熟した胸腺へと発達していく。すなわち、胸腺は起源を異にする複数種の細胞が相互作用しながら形成される器官であり、しかもその発生過程においては胸腺原基の細胞塊のくびれ切れや位置の移動という他の器官の発生にはあまり見られない特徴をもつ。成熟胸腺の構造の構築に、このような胸腺特有の発生過程がどのように反映されるかは興味深い問題であるが、この問題に対する解答はほとんど得られていなかった。一方、DiGeorge 症候群の原因遺伝子である *Tbx1* は、咽頭嚢および胸腺原基の形成に必須であることがすでに明らかにされており、さらに研究代表者らが同定した *Ripply3* は、咽頭内胚

葉において *Tbx1* と協調して咽頭嚢の発生に必須な役割をはたすことが示されて来たが、その詳細な作用機能は分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、胸腺内におけるストローマ細胞の空間配置と「シグナルの場」の空間的制御に関して、(1)および(2)の目的を掲げると同時に、胸腺構造の構築に関わるしくみの理解に向け、(3)の目的を掲げた。

(1) 胸腺内で Wnt を産生する細胞の特定と、そこから分泌される Wnt シグナルの活性化領域を詳細に解析し、胸腺における Wnt の機能とシグナルの空間制御の関係を明らかにすることを旨とした。

(2) (1)と平行して、Wnt の拡散様式を規定する分子基盤についての解析を進めることとした。ここでは、拡散様式を規定する要因が Wnt タンパク質の特性と細胞外分子との相互作用の 2 点にあることを念頭におき、Wnt の高次構造の解明とその多様性の検証、物理化学的方法を駆使した Wnt の挙動の追跡、細胞外分子との相互作用の解明の 3 点を具体的に目指した。

(3) *Ripply3* が咽頭嚢において発現し、胸腺原基の発生に不可欠であることに基づき、*Ripply3* 及び関連して機能するような遺伝子の同定と機能解析により、胸腺原基の形成に関わる分子機構を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

(1) さまざまな発生段階の胸腺組織切片を用いて、各 Wnt 遺伝子の発現細胞を *in situ hybridization* により特定するとともに、Wnt シグナルを受容した細胞をレポーターマウスを用いて特定した。さらに細胞特異的に Wnt の分泌およびシグナル伝達を阻害できる変異体マウスを用い、Wnt シグナルの役割を明らかにした。また、Wnt シグナルが活性化された細胞の細胞系譜を追跡することにより、Wnt の機能についての詳細な解析を進めた。

(2) Wnt の拡散様式を規定する分子基盤についての研究は、以下のように進めた。

① 拡散様式の規定に深く関わる Wnt の高次構造およびその多様性については、生化学的方法に、分析超遠心、単粒子解析を加えて解析した。

② 蛍光相関解析、蛍光相互相関解析等の物理化学的方法を駆使して生体内での Wnt の動態の追跡を行った。

③ Wnt の拡散の制御を、複数種のヘパラン硫酸に着目して、アフリカツメガエル胚にて解析した。

(3) 咽頭嚢における胸腺原基の発生機構を理解するために、*Ripply3* と関連して機能する候補遺伝子の探索と機能解析を以下のような方法により進めた。

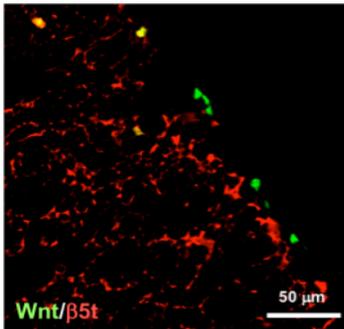
① 酵母ツーハイブリッド法により *Ripply3* 関連因子の探索を行った。

- ② ①において同定した因子の機能解析を細胞培養系や変異体の解析により進めた。  
 ③ 小型魚類を用いて咽頭嚢の発生に関わる因子の特定と機能解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胸腺における Wnt シグナルの空間分布と機能

胎生 15 日ならびに生後直後の胸腺において複数の Wnt 遺伝子をプローブにした *in situ hybridization* により、Wnt4, Wnt5a を含むいくつかの Wnt が胸腺上皮に発現することを確認した。一方、胸腺内において Wnt シグナル伝達が活性化している細胞を同定するため、共同研究者である京都産業大学近藤寿人教授と徳島大学竹本龍也博士が開発した EGFP を用いた Wnt レポーターマウスを用いて、FACS ならびに免疫組織染色による検討を行った。その結果、Wnt シグナルは免疫細胞では全く活性化されておらず、胸腺上皮細胞においてのみ活性化が認められた。胸腺上皮細胞において特異的に Wnt シグナルの分泌を阻害したマウスを作成したところ、Wnt シグナルの活性化は完全に阻害されたことから、胸腺上皮細胞は自らが分泌した Wnt タンパク質を受容し細胞内でシグナル伝達を活性化しているものと考えられた。



**図 1 胸腺上皮における Wnt シグナルの活性化** : Wnt シグナル (緑) の活性化は未分化な細胞で強く、分化した胸腺皮質上皮細胞 (β5t 陽性: 赤) ではあまり認められない。

詳細な免疫組織学的解析から、Wnt シグナルは胸腺上皮細胞の一部のみ活性化されていることが見いだされた。細胞の形態から、Wnt シグナルの活性化は比較的未分化な胸腺皮質上皮細胞において起きていることが示唆された (図 1)。そこで、この仮説を検証するため、Wnt シグナルが一旦活性化すると継続的にマーカー遺伝子 (tdTomato) を発現するようにデザインしたマウスを用いて、Wnt シグナルが活性化された細胞の追跡を行ったところ、それらの細胞は時間経過とともにより成熟した皮質上皮細胞へ分化していくことが確かめられた。

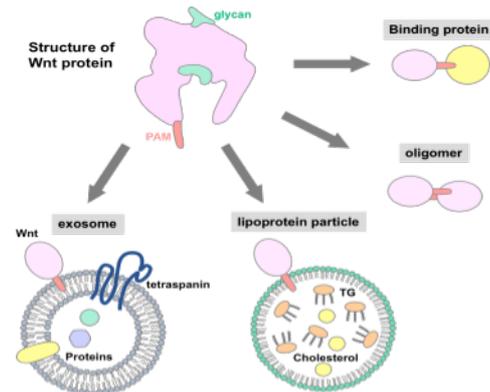
一方、コンディショナルノックアウトマウスを用いて胸腺上皮細胞で特異的に Wnt シグナルを阻害したところ、胸腺の大きさならびに細胞数が低下した。以上の結果から、胸腺においては、未分化な上皮細胞が自己が分泌した Wnt の働きにより、増殖を活性化させるものと推察された。さらに、Wnt シグナル

の活性化は胸腺内の特定の場所に多く認められたことから、胸腺上皮細胞の分化に関して、これまでに明らかにされていなかった空間的な制御機構が存在することが強く示唆された。

##### (2) Wnt の拡散様式を規定する分子基盤についての研究

##### ① Wnt の高次構造の決定とその多様性についての検証

まず、分泌された Wnt の分子的形態を複数の培養細胞と複数種の Wnt において系統的に解析した。Wnt は (A) リポ蛋白質複合体と (B) エクソソームという 2 つの異なる運搬体に乗って細胞外を移動するというモデルが異なる研究グループから提唱されているが、この両者が Wnt の運搬や拡散において主要な役割をはたすのか否かについては明確な結論が未だに得られていない (図 2)。研究代表者は、繊維芽細胞 (L 細胞)、上皮細胞 (MDCK 細胞) など複数種の培養細胞を用いて分泌された Wnt を密度勾配遠心法等を駆使して系統的に解析し、以下のことを明らかにした。(A) リポ蛋白質複合体フォームの Wnt は特定の細胞種のみから分泌される、(B) エクソソーム様フォームの Wnt は MDCK 細胞の基底側や L 細胞から分泌されるが、その量はわずか (全分泌量の 1% 以下) である、(C) 分泌される Wnt の大部分は脂質成分を含まず多量体を形成する (図 2)、(D) MDCK 細胞の頂端側からは未知の新たなフォームの Wnt が分泌される。この結果は、従来の Wnt タンパク質の細胞外運搬に関するモデルに修正が必要であることを示すと同時に、新たな運搬様式の存在を示唆している。



**図 2 Wnt タンパク質の構造の多様性** : Wnt はリポ蛋白質複合体やエクソソームといった運搬体により細胞外輸送されると考えられてきたが、培養細胞にて分泌される Wnt タンパク質の多くは、他の結合因子との複合体、もしくは Wnt 同士からなる複合体を形成して分泌されることがわかった。また、上皮細胞の頂端側から分泌される Wnt の一部はエクソソームとは異なる運搬体に取り込まれていることも明らかになった。

このうち、(C) で述べた多量体について、分析超遠心法により多量体の沈降係数ならびに他のタンパク質との結合について検討を加えた。その結果、Wnt 多量体の大きさが明らかになるとともに、受容体である Frizzled や分泌性の Wnt 結合タンパク質である sFRP との相互作用により Wnt 多量体が容易に解離することも示された。化学架橋剤を用いた解析ならびに、電子顕微鏡像をもとにした単粒子解析により、Wnt 多量体の高次構造も突き止められた。

### ② 生体内での Wnt の動態の追跡

①の結果を受け、生体内では Wnt がどのような高次構造をとって細胞外に分泌され、またどのように挙動するのかについて、検討を進めた。そのために、細胞が比較的大きくかつ計測がしやすいアフリカツメガエル初期胚の外胚葉をモデル系に選び、細胞間の空間に分泌された Wnt の解析を行った。まず、FCCS (蛍光相互相関分光法) による解析により、胚体内においても Wnt は多量体を形成し細胞外を移動していることが突き止められた。さらに、分泌された Wnt の挙動を FCS (蛍光相関分光法) により詳細に解析したところ、Wnt 多量体の多くは移動性が比較的低いことが明らかになった。

### ③ Wnt の拡散の制御機構

Wnt 多量体の移動度が低いことの理由の一つに、細胞外基質等との相互作用による影響が考えられる。研究代表者らは東京大学大学院理学系研究科の平良准教授らとの共同研究により、Wnt が硫酸基修飾に富むヘパラン硫酸(N-sulfoHS)に特異的に結合すること、硫酸基修飾に富むヘパラン硫酸は細胞膜上でクラスター化しておりそこに結合する Wnt も細胞膜上に局所的に集合していること、さらに硫酸化酵素である NDST1 によりこの結合が制御され Wnt のシグナル伝達が影響を受けることを明らかにした。これにより Wnt の細胞外空間分布を制御する分子機構の一端が明らかになった (図3)。

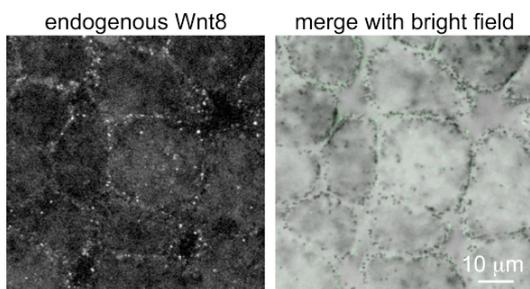


図3 Wnt タンパク質の局在化: アフリカツメガエル胚において内在性 Wnt タンパク質は細胞の周囲に不均一に集積することを発見した。さらに、この集積は、Wnt と強く結合する硫酸基に富むヘパラン硫酸鎖が細胞膜上で局所的にクラスター化していることによることを明らかにした。

### (3) 咽頭嚢における胸腺原基の発生機構の解析

① Ripply3 関連因子の探索方法を検討した結果、マウス胚より作成したライブラリーを用いて行った酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより良好な結果が得られた。そこで、この方法にて得られた4つの遺伝子に着目して研究を進めた。

② これらのうち、まず LIM ドメインタンパク質をコードする WTIP に着目した。WTIP は核内および細胞膜周辺に存在することが知られているが、培養細胞を用いて Ripply3 と共発現させたところ、興味深いことに細胞膜直下の接着装置 (接着斑) 周辺に局在することがわかった。LIM ドメインタンパク質はインテグリンとアクチン骨格を繋げる上で重要であることが知られていることから、咽頭内胚葉においては Ripply3 の局所的な発現により WTIP を介した細胞骨格系の再編がおき、それが咽頭嚢特有の屈曲構造や胸腺原基の発生に関わることが推察された (図4)。そこで、Ripply3 変異体を詳細に解析し、咽頭嚢形成過程における咽頭上皮細胞の屈曲に Ripply3 が必須であることを明らかにした。さらに、WTIP の変異体マウスならびに WTIP と構造的に類似の Ajuba の変異体マウスを作成し、咽頭嚢ならびに胸腺原基の発生を観察した。単独の変異体では大きな異常が認められなかったため、これらの2重変異体による解析を継続中である。

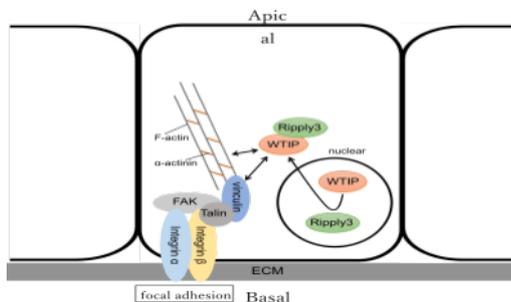
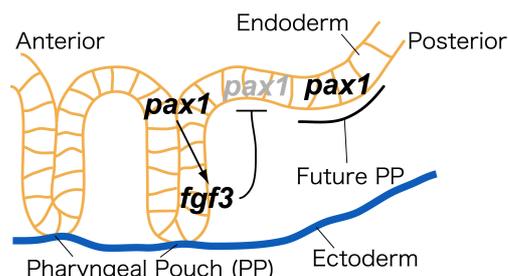


図4 上皮細胞における Ripply3 と Wtip の作用機構: Ripply3 は Wtip と結合して細胞内での局在性を変化させる。細胞膜付近においては、Wtip とともに細胞接着装置と細胞骨格の制御に関わるものと推察される。

Ripply3 は咽頭嚢にて発現する転写因子である Tbx1 の作用を制御することから、Ripply3 と Tbx1 の制御関係についても詳細に解析した。具体的には、咽頭嚢での Ripply3 の発現に必要なシスエレメントを特定し、トランスジェニックマウスを作成することにより検証した。さらに、Tbx1 変異体においては、このトランスジーンからの遺伝子発現パターンが乱れることから、生体内における

Ripply3 の発現パターンの形成には Tbx1 の発現が必要であることを明らかにした。また、咽頭嚢の形成にはレチノイン酸シグナルが重要であるが、Ripply3 の発現にレチノイン酸シグナルが重要であることも明らかにした。

③ マウスとともに分子遺伝学的研究によく用いられるゼブラフィッシュを用いて Ripply3 の機能を解析するため、ゲノム編集により変異体を作成した。しかしながら、大きな異常は観察されず、咽頭嚢発生の分子機構には動物種により違いがあることが明らかになった。一方、転写因子である Pax1a, Pax1b の 2 重変異体がマウスの Ripply3 変異体とよく似た異常を呈することを見だし、その解析を進めた。その結果、Pax と FGF シグナル、さらにレチノイン酸シグナルの相互作用が咽頭嚢形成の上で重要であることが明らかになった。同時に、内胚葉が GFP により可視化されるゼブラフィッシュを用いて、咽頭嚢の形成過程を詳細に調べた結果、第二咽頭嚢を境にして全く異なるメカニズムにより咽頭嚢形成が起きていることを明らかにした (図 5)。



**図 5 小型魚類の咽頭嚢形成機構:**ゼブラフィッシュなどの小型魚類においては、Ripply3 ではなく Pax1 が重要な役割を担っており、FGF シグナルとの相互作用により、咽頭嚢の携帯形成が進むことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 3 件, 全て査読有り)

- ① Takada S, Fujimori S, Shinozuka T, Takada R, Mii Y. (2017) Differences in the secretion and transport of Wnt proteins (Review) *J. Biochem.* 161, 1-7. doi: 10.1093/jb/mvw071.
- ② Mii, Y., Yamamoto, T., Takada, R., Mizumoto, S., Matsuyama, M., Yamada, S., \*Takada, S., & \*Taira, M. (\*Co-corresponding authors) (2017) Roles of two types of heparan sulphate clusters in Wnt8 distribution and signalling in *Xenopus*. *Nature Commun.* 8, 1973. doi: 10.1038/s41467-017-02076-0.

- ③ Chen, Q., Takada, R., Noda, C., Kobayashi, S., & Takada, S.\* (2016) Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells. *Sci. Rep.* 6, 35562; doi: 10.1038/srep35562 doi: 10.1242/dev.130039. PMID: 27034424
- ④ Okubo T. \*, & Takada, S. (2015) Pharyngeal arch deficiencies affect taste bud development in the circumvallate papilla with aberrant glossopharyngeal nerve formation *Dev. Dyn.* 244, 874-887. doi: 10.1002/dvdy.24289.
- ⑤ Chen, Q., Takada, R., & Takada, S. \* (2012) Loss of Porcupine impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish. *J. Cell Sci.* 125, 2224-2234. doi: 10.1242/jcs.098368

[学会発表] (計 3 3 件)

- ① Sayumi Fujimori, Izumi Ohigashi, Tatsuya Takemoto, Yousuke Takahama, & Shinji Takada "Activation of Wnt/b-catenin signaling in thymic epithelial progenitors" (口頭発表): Kyoto T Cell Conference (京都府京都市 京都大学、2017年3月13日-3月17日),
- ② Shinji Takada, Ritusko Takada, Yusuke Mii, Chan-Gi Pack, Yasushi Sako, & Susumu Uchiyama "Analytical Ultracentrifugation revealed heterogeneity of secreted Wnt proteins in the extracellular space" (口頭発表): Wnt meeting 2016, EMBO Conference (Brno (チェコ)、2016年9月14日-9月17日),
- ③ Shinji Takada "Spatial localization of Wnt proteins in vertebrate development" (招待講演): Finish-Japanese Joint Symposium on Morphogenesis and Signaling (Helsinki (フィンランド)、2014年3月4日、5日)
- ④ Yusuke Mii, Kei Nakayama, Takuma Shinozuka, & Shinji Takada "Visualization of Wnt proteins reveals their local accumulation in developing tissues" (招待講演): 第47回日本発生生物学会 (愛知県名古屋市 ウィンク愛知 2014年5月27日~30日)
- ⑤ 高田慎治、陳秋紅、高田律子 「Wnt タンパク質の脂肪酸修飾の機構と生理的意義」 (招待講演): 第85回日本生化学会、(福岡県福岡市 福岡国際会議場 2012年12月14日~16日)

[図書] (計 2 件)

- ① Tadashi Okubo "Tbx1/Ripply3/Retinoic Acid Network that Regulates Pharyngeal Arch Development" in *New Principles in Developmental Processes* eds. Hisato Kondoh & Atsushi Kuroiwa, pp97-108, Springer 2014

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/cib2/>

<http://www.oib.orion.ac.jp/Lab?Biodesign/takada.html>

[http://zfin.org/ZDB\\_LAB\\_050728\\_1](http://zfin.org/ZDB_LAB_050728_1)

メディア報道

日刊工業新聞 平成28年5月26日「生物学研と筑波大、魚のえら形成の仕組みを解明-関与遺伝子を特定」

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高田 慎治 (TAKADA, Shinji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60206753

### (2)研究分担者

大久保 直 (Okubo, Tadashi)

北里大学医学部・准教授

研究者番号：10450719

### (3)連携研究者

三井 優輔 (MII, Yusuke)

基礎生物学研究所・分子発生学研究部門・助教

研究者番号：70634129

藤森 さゆ美 (FUJIMORI, Sayumi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：20589717

### (4)研究協力者

近藤 寿人 (KONDOH, Hisato)

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tasuya)

平良 眞規 (TAIRA, Masanori)

矢部 泰二郎 (YABE, Taijiro)

陳 秋紅 (CHEN, Quihong)

高田 律子 (TAKADA, Ritsuko)

岡田 和訓 (OKADA, Kazunori)

篠塚 琢磨 (SHINOZUKA, Takuma)

土屋 凱寛 (TSUCHIYA, Akihiro)

ワングラー チムワ (WANGLAR, Chimwar)

高代 加代子 (TAKASHIRO, Kayoko)

伊藤 由紀子 (ITO, Yukiko)

鶴飼 咲枝 (UKAI, Sakie)

野畑 竜子 (NOBATA, Ryuko)