

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570197

研究課題名（和文） Wnt/Ror2 シグナルと細胞応答、組織形成機構の解析

研究課題名（英文） Wnt/Ror2 signaling in cellular responses and tissue formation

研究代表者

大石 勲 (OISHI ISAO)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：50314472

研究成果の概要（和文）：受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は Wnt の受容体と考えられているがその機能は不明な点が多い。本研究ではゼブラフィッシュを用いて Ror2 の発生過程における役割について検討を行った。発現抑制個体の解析から、Ror2 が顔面、付属肢、色素形成に必須の役割を担うこと、一方で神経堤細胞の初期分化には影響を及ぼさないことが明らかとなり、Ror2/wnt シグナルは神経堤細胞の移動過程を主に調節することが強く示唆される。

研究成果の概要（英文）：Ror2 receptor tyrosine kinase has been shown to act as a receptor in Wnt signaling, but its roles in developmental processes remain elusive. Interfering with zebrafish Ror2 function using a specific antisense morpholino oligonucleotide results in facial abnormality, pectoral fin hypoplasia, and pigmentation defects, however neural crest cells normally differentiate in early embryos. Our data suggest that Ror2/Wnt signaling affects migration of neural crest cells rather than differentiation in zebrafish development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

分泌因子 Wnt によるシグナル伝達は生体に必須であり、細胞の増殖、分化、極性、移動を制御し、形態形成や個体の恒常性を調節している。また、多細胞生物の様々な組織再生過程においても必須の役割を担うことも明らかになってきている。Wnt シグナル伝達機構の全容の解明は、発生や恒常性維持における細胞動態を理解するとともに、その異常に

起因する癌、先天疾患、糖尿病等の病態の解明や診断、治療に繋がり得ることからも極めて重要性が高い。Wnt シグナルは多岐に渡る複雑なシグナル伝達系であり、多くのシグナル伝達因子を含んでいる。

申請者が世界に先駆けて同定、解析してきた受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は Wnt シグナル伝達因子の一つである。Wnt シグナル伝達は canonical, non-canonical の 2 つに

大別されるが、Ror2 は non-canonical Wnt シグナルを制御することや Wnt5a をリガンドとして canonical Wnt シグナルを抑制することが知られている。Ror2 を原因遺伝子とするヒト疾患には B 型短指症や Robinow 症候群といった四肢骨格形成異常を主徴とする骨疾患が知られている。また、慢性ならびに急性リンパ球性白血病や扁平上皮癌などとも密接に関わることが国内外の様々な研究室から相次いで報告されている。一方、その重要性にも関わらず Ror2 を介する Wnt シグナル伝達機構や形態形成における分子、細胞レベルでの Ror2-Wnt の機能については殆ど解明されていない。申請者はショウジョウバエやマウスを用いて世界に先駆けて Ror を同定し、遺伝子欠損個体の解析を通じて Wnt と Ror2 の相互作用を提唱し、その役割について研究を続けて来た。これまでに遺伝子欠損マウスの解析や細胞レベルでの機能解析から Ror2 が Wnt 受容体として機能することを提唱し、従来言われていた 7 回膜貫通型 Wnt 受容体 Frizzled に加え、受容体型蛋白質キナーゼによるシグナル伝達という全く新しい Wnt シグナル伝達機構を明らかにした。これら解析を受けて、国内外の研究室からもこれを支持する研究が相次いでなされており、Wnt シグナルにおける新たな研究展開に注目が寄せられている。一方、Ror2 遺伝子欠損個体は呼吸器の異常による新生時致死のため生後の解析が困難であることや、培養細胞を用いた解析では Ror2 のキナーゼ活性制御が困難であるといった問題に直面していた。そこで、これら問題を解決する為にモデル生物である小型魚類ゼブラフィッシュを用いるとの着想に至った。また、ゼブラフィッシュは組織形成や再生過程が比較的容易に解析可能なため、これらを指標として Wnt/Ror2 シグナルと共役する可能性のある分子機構について検討を行おうと考えた。

2. 研究の目的

(1) ゼブラフィッシュを用いた形態形成における Wnt/Ror2 シグナルの役割の解明：Wnt/Ror2 シグナルの役割について形態形成過程に焦点を当てた解析を行う。具体的にはゼブラフィッシュ Ror2 の発現動態解析や、遺伝子発現抑制個体の形態解析を行い、Wnt/Ror2 シグナルの担う役割について理解を目指す。

(2) Ror2/Wnt シグナル伝達の分子機構解析：レポーターフィッシュを用いた Ror-Wnt の相互作用解析や、Ror2 の構造と機能の連関解析を試みる。また、Ror/Wnt シグナルと密接に関わる付属肢形成や恒常性維持において機能共役する分子機構の探索、解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 形態形成過程における Wnt/Ror2 シグナルの役割の解明

① *in situ* ハイブリダイゼーション法によりゼブラフィッシュ Ror2 の発生過程における発現解析を行い、時空間的な発現動態の変化を理解することで Ror2/Wnt シグナルの形態形成における役割の理解を試みた。

② ゼブラフィッシュ *ror2* を標的としたアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (*ror2* MO) を用いた *ror2* 遺伝子発現抑制により、形態形成の異常を解析し、発生過程における Ror2/Wnt シグナルの役割について解析を行った。特に顔面形成、左右形成、色素細胞の発生を中心に研究を行った。

(2) Ror2/Wnt シグナル伝達の分子機構解析
canonical Wnt シグナルのレポーターフィッシュ (Top-dGFP fish) を用いて Ror2 発現抑制に伴う canonical Wnt シグナルへの影響について検討した。また、ゼブラフィッシュ Ror2 の構造と機能連関解析を行う目的で Ror2 全長をクローニングし、*ror2* MO と合わせて顕微注射することで解析を試みた。加えて、付属肢形成や心臓再生過程における Wnt 関連シグナルの解析を行った。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ発生過程における *ror2* の発現動態

ゼブラフィッシュ *ror2* の cRNA を作製し、whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション法により発現の時空間分布を解析した。*ror2* の発現は 50% epiboly 付近より認められるようになり、90% epiboly では胚の背側にシグナルが認められる (図 1A)。3-8SS 胚では Kupffer's vesicle を含む tail bud 部、体節、予定中脳領域に比較的強いシグナルが認められる (図 1B-D)。その後、24 時間胚では鰓弓をはじめ神経堤細胞を由来とする一部領域で顕著な発現が認められた (図 1E, F)。

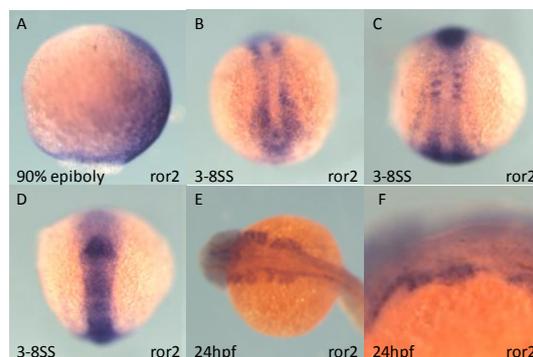


図 1 ゼブラフィッシュ *ror2* の発現

(2) *ror2* 発現抑制によるゼブラフィッシュ形態への影響

① 外観の異常：ゼブラフィッシュ 1-2 細胞期に *ror2*MO とコントロール MO (ctrl. MO) を顕

微注射し、形態の解析を行った。Ror2 発現を抑制した 24 時間胚において尾部の単色が認められ (図 2A, D)、3 日胚以降でもこの違いは顕著であった。また、頭部形成の異常 (矮小化) や付属肢の形成不全、心臓における浮腫 (cardiac edema) や浮き袋の異常、色素細胞の異常が再現性良く認められた (図 2B, C, E, F)。これらの表現型は、Ror2 変異に起因するヒト先天疾患や Ror2 欠損マウスと著しく類似しており、脊椎動物における Ror2/Wnt シグナルの役割が良く保存されていることを示唆している。

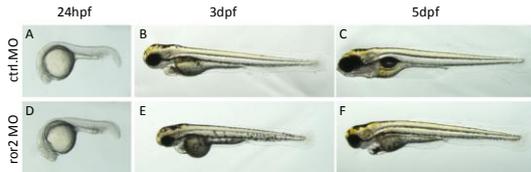


図 2 ror2 発現抑制による外観の異常

②顔面形成の異常：頭部形成の異常について fli-EGFP 個体を用いた ror2 MO による発現抑制解析を行った。その結果、ror2 発現を抑制した 3 日胚で下顎の形成異常が強く示唆された (図 3A-D)。4 日胚の頭部骨格形成についてアルシアンブルー染色による解析を行った結果、上顎骨、下顎骨のいずれも形成不全が認められるが、特に上顎に比べて下顎の異常が顕著であった (図 3E-H)。

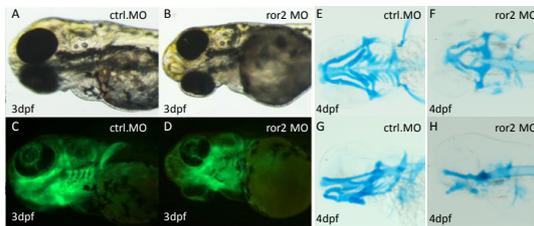


図 3 ror2 発現抑制による顔面骨格の異常

③色素細胞の異常：ゼブラフィッシュ孵化後胚の色素細胞には黒色の melanophores, 黄色の xanthophores, 反射性の iridophores が識別可能であるが、ror2 発現抑制により、iridophores と melanophores に顕著な異常が認められた。Iridophores については 3 日

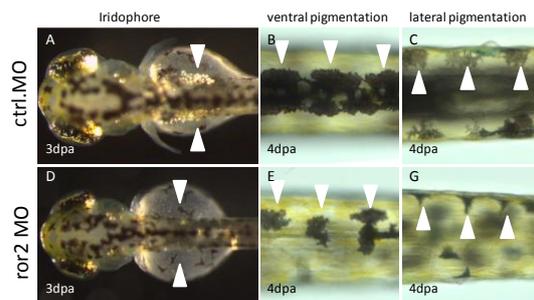


図 4 ror2 発現抑制による色素細胞の異常胚の腹側領域で顕著に減弱していた (図 4 A, D)。また、体幹部における melanophores の領域も正常個体と比較して小さく不規則なものが多く認められた (図 4 B, C, E, G)。一方、色素細胞分化について iridophores や melanophores のマーカー分子を指標に検討した所、細胞分化自体の異常は認められなかった。図 5 は melanophores のマーカーである dct の発現を 27 時間胚で解析したものであるが、ror2 発現抑制に伴う dct の発現抑制等は認められず、色素細胞の分化は正常に行っているものと考えられる。

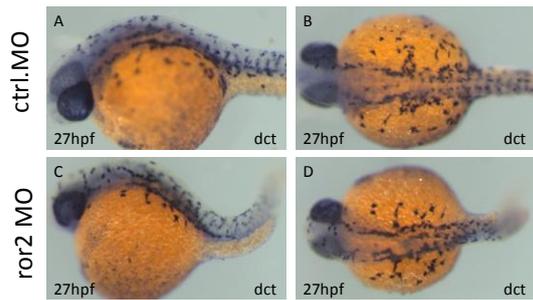


図 5 ror2 発現抑制と色素細胞マーカー発現

④ror2 発現抑制と神経堤細胞の連関：Ror2 発現抑制で異常が認められた部位の多くは神経堤細胞由来若しくは神経堤細胞の関与が知られる領域である。そこで、ror2 発現抑制に伴う神経堤細胞の分化異常について検討を行った。神経堤細胞マーカーである snail, foxD3 の発現を in situ ハイブリダイゼーション法により ror2 発現抑制胚で検討した所、上記 melanophores と同様に明瞭な異常は認められず (図 6A-D)、神経堤細胞の分化プロセスには直接に影響を及ぼさないことが強く示唆される。

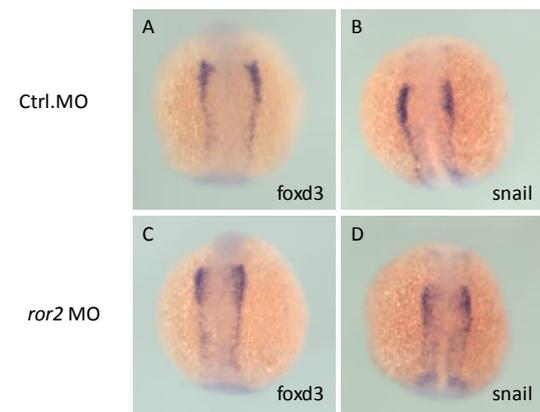


図 6 ror2 発現抑制と神経堤細胞マーカー発現

ror2 の発現抑制は神経堤細胞の分化に影響を及ぼさないが、神経堤由来の細胞で異常が多く認められる。特に、神経堤からより遠位

の部分において異常が顕著になることから、*ror2* の発現抑制個体では神経堤細胞の移動に異常が生じていることが強く示唆される。*Ror2* が細胞移動とりわけ極性制御に関わることが哺乳動物をはじめとしたこれまでの研究で明らかにされており、神経堤細胞の移動に着目した今後の研究が必要と考えられる。

⑤その他形態形成の異常：細胞移動を起因とするかは現時点では不明であるが、*ror2* 発現抑制個体において神経発生の異常並びに左右形成の異常が認められた。図7に示すように4日胚の腹側神経は *ror2* 発現抑制により顕著に減弱しており、今後の解析が待たれる。また、興味深いことに *ror2* 発現抑制個体のほぼ半数に心臓の逆位が認められた(図8A, D)。左右形成に関わる *spaw* など異所的発現を呈する個体が頻出し(図8B, E)、その原因解析を行った。*ror2* の抑制個体の Kupffer's vesicle は特異的マーカー分子(*charon*)を発現するものの、形状の異常が生じていた。また、Kupffer's vesicle 内で左右形成を司る一次繊毛形成の異常が認められ、数の減少や形成不全が生じていた(図8C, F)。これら異常が *Ror/wnt* シグナルの抑制とどのように関わるか今後の解析が必要である。

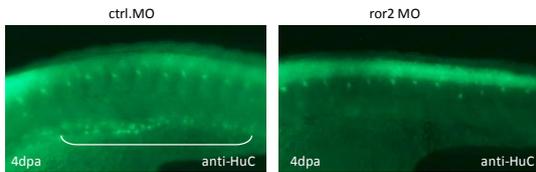


図7 *ror2* 発現抑制と神経発生の異常

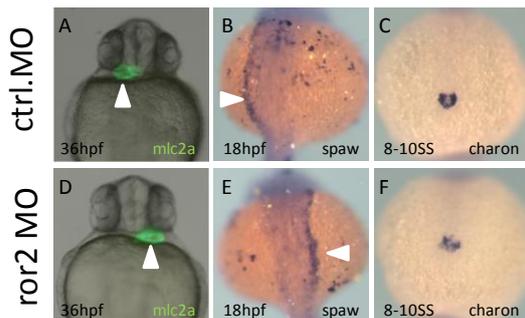


図8 *ror2* 発現抑制と左右形成の異常

(3) *Ror2/Wnt* シグナル伝達の分子機構解析
 ① *Wnt* レポーターフィッシュを用いた解析：
Wnt レポーターフィッシュ (*Top-dGFP* fish) 胚を用いて *ror2* 発現を抑制すると後局側の *Wnt* シグナルの顕著な活性化が認められる(図9)。一方、中脳領域における *Wnt* シグナルは減弱するが、組織形成不全の可能性が残される。類縁の *Ror1* の抑制では後局、中脳

領域とも顕著な異常は認められなかった。これら知見に基づき、*Wnt* シグナルの過剰活性や上述の形態形成の異常を指標としてゼブラフィッシュ *ror2* 野生型、ならびに各種変異体発現による *ror2* の構造と機能関連解析系の構築を試みたが、統計上有意な差を検出する系が構築されず、今後の検討が必要である。



図9 *ror2* 発現抑制による *Wnt* シグナルの過剰応答

②四肢形成、再生応答時の *Wnt* シグナルと関連するシグナル伝達制御機構の探索、解析：
 canonical *Wnt* シグナルの制御に関わるクロマチン因子 *HMGB1, 2* と形態形成について解析を行った。*ror2* とは逆に *HMGB1, 2* の抑制により *Wnt* レポーターフィッシュは *Wnt* シグナルの顕著な抑制が認められる(図10)。

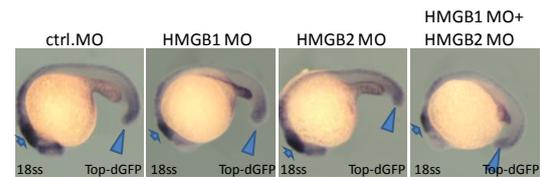


図10 *HMGB1, 2* 発現抑制による *Wnt* シグナルの抑制

更に、*HMGB1, 2* の抑制により体軸形成の異常や付属肢の形成不全が認められる。付属肢の形成不全についてはロックアウトマウスの解析から *Hmgb1-/-; Hmgb2+/-* 個体で前肢の第5指が欠損する *shh* シグナルを介したメカニズムを見出した。ゼブラフィッシュにおいても *shh* の発現領域の現象が認められ、広く哺乳類の付属肢形成に関わるシグナル系と考えられる。

また、ゼブラフィッシュ心臓の部分切除や穿刺による損傷時に *Wnt* シグナルが活性化することを見出した。これを受けて、心臓損傷後の再生応答に関わる *Wnt* 関連シグナルについて明らかにする目的で、心臓の損傷後に損傷部位に発現誘導される新たな分子の探索を試みた。その結果、ケモカインである *CXCL12b* とその受容体 *CXCR4a* が損傷部位に発現誘導されることを見出すとともに、これらケモカインシグナルが心筋再生時の細胞移動に必須の役割を担う事を明らかにした。一方、*Wnt* シグナルの抑制では心筋細胞の増殖自体が阻害され、ケモカインシグナルの抑制とは完全には合致しなかったが、両者が協調的に心

臓器再生過程を制御する可能性は残されており、今後の解析が待たれる。

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件)

①Itou Junji, Oishi Isao, Kawakami Hiroko, Glass Tiffany J., Richter Jenna, Johnson Austin, Lund Troy C, Kawakami Yasuhiko, Migration of cardiomyocytes is essential for heart regeneration in zebrafish, Development, 査読有、Vol.139, Issue 22, 2012, pp.4133-4142
DOI: 10.1242/dev.079756.

②Itou Junji, Taniguchi Noboru, Oishi Isao, Kawakami Hiroko, Lotz Martin, Kawakami Yasuhiko, HMGB factors are required for posterior digit development through integrating signaling pathway activities. Developmental Dynamics, 査読有、Vol. 240, 2011, pp.1151-1162
DOI: 10.1002/dvdy.22598.

[学会発表] (計2件)

①大石 勲、伊東潤二、川上泰彦、mlc2a-Kaedeゼブラフィッシュを用いた心筋再生可視化と定量化の試み、日本小型魚類研究会、2010/9/19、浦和市プラザイースト(埼玉県)

②伊東潤二、大石 勲、吉井京子、Jenna Richter 川上弘子、川上泰彦、The role of cxc chemokine in zebrafish heart regeneration、日本生化学会、2011/9/22、京都国際会館(京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 勲 (OISHI ISAO)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学・主任研究員

研究者番号：50314472