

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 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790213

研究課題名（和文）ニューロンとグリア産生制御における Wnt 受容体 Ror2 の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Ror2 in neurogenesis and astrogenesis

研究代表者

遠藤 光晴（ENDO MITSU HARU）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：90436444

研究成果の概要（和文）：Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ Ror2 とそのリガンドである Wnt5a は発生過程の脳に発現が認められるが、神経発生における役割は不明であった。我々は Ror2 と Wnt5a が大脳皮質神経系前駆細胞（NPC）に高発現していることを見出し、Wnt5a-Ror2 シグナルが大脳皮質の NPC において、ニューロン産生能を持った NPC の維持に働くことで持続的なニューロン産生に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Although the Ror-family of receptor tyrosine kinases, Ror2, and its ligand Wnt5a are expressed in the developing brain, little is known about their roles in the neural development. We show that Ror2 and Wnt5a are highly expressed in neocortical neural progenitor cells (NPCs) and that Wnt5a-Ror2 signaling plays essential role in maintaining neurogenic NPCs during neurogenesis of the developing neocortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：神経系前駆細胞、Wnt シグナル、Ror 受容体、未分化性維持、ニューロン産生、アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の中枢神経系を構成するニューロンとグリア細胞は共通の前駆細胞である神経系前駆細胞（NPC）から分化し産生される。胎生期の大脳皮質において、NPC の運命決定は、「自己増殖期→ニューロン分化期→グリア分化期」と段階的に変化する。

(2) ニューロン分化期において、NPC は非対称分裂を行うことで1つのニューロンと1つ

の NPC を産生する。一方、このような NPC の非対称分裂はグリア分化期ではほとんど起こらなくなる。

(3) 受容体型チロシンキナーゼ Ror2 は分泌型シグナルタンパク質 Wnt5a の受容体として機能する。Wnt5a-Ror2 シグナルは、非古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、細胞の極性化や細胞運動を制御することで、発生過程の形態形成において重要な役割を果たしている。

(4) 研究代表者は、発生過程の脳皮質において *Wnt5a* と *Ror2* が発現しており、*Ror2* の発現量はニューロン分化期で高く、グリア分化期では低いことを見出していた。

(5) 研究代表者は培養 NPC における *Ror2* の発現を抑制することによりニューロン産生が抑えられ、グリア細胞であるアストロサイトの産生が促進されることを見出していた。

2. 研究の目的

機能的な脳組織を作り上げる上で不可欠である NPC のニューロンおよびグリア細胞への分化制御における *Wnt5a*-*Ror2* シグナルの役割を明らかにすることを目的とする。特にその制御機構として細胞の極性化シグナルによる非対称分裂の制御に焦点を当てて解析を行う。

3. 研究の方法

(1) *Wnt5a*-*Ror2* シグナルによる NPC の分化制御機構を解明するために、脳皮質より単離した NPC の *in vitro* 培養系を用いて解析を行い、分化制御につながるシグナル伝達経路の解明とその分化制御機構として非対称分裂との関わりについて明らかにする。

(2) 発生時期に依存した NPC の分化能について、*Ror2* の発現量との関連性について検討する。

(3) *in vitro* 培養系を用いた解析結果を踏まえて、ノックアウトマウスや *in utero* electroporation 法によるマウス NPC への遺伝子導入を用いた *in vivo* の解析を行うことで、実際の発生過程における重要性について明らかにする。

4. 研究成果

(1) *Ror2* の発現量は、発生初期の脳皮質（ニューロン分化期）で高く、発生後期（グリア分化期）では減少する。時期依存的な *Ror2* の発現量についてより詳細に解析した結果、発生後期（生後 1 日目）においても NPC が存在する脳皮質脳室帯では *Ror2* が高発現していることが明らかになり（図 1）、脳皮質における *Ror2* 発現量の変化は NPC の量の変化に依存していると考えられた。

(2) 実際に *Ror2* が NPC に発現していることを明らかにするために、NPC に発現している細胞表面タンパク質である *CD133* に対する抗体を用いて、Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) を用いて NPC を分離し、*Ror2* の発現量について解析したところ *CD133* を高発現している NPC において *Ror2* が高発現し

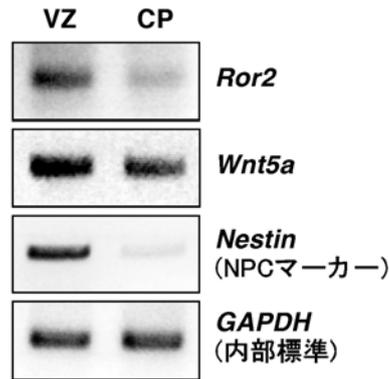


図1. 生後1日目のマウス脳皮質の脳室帯 (VZ) と皮質板 (CP) における *Ror2* と *Wnt5a* の発現

ていることが明らかになった（図 2A）。さらに、*Ror2* に対する抗体を用いて FACS により *Ror2* 高発現細胞と *Ror2* 低発現細胞を分離し、*CD133* の発現量を解析したところ *Ror2* を高発現している細胞は *CD133* を高発現していることが明らかになった（図 2B）。

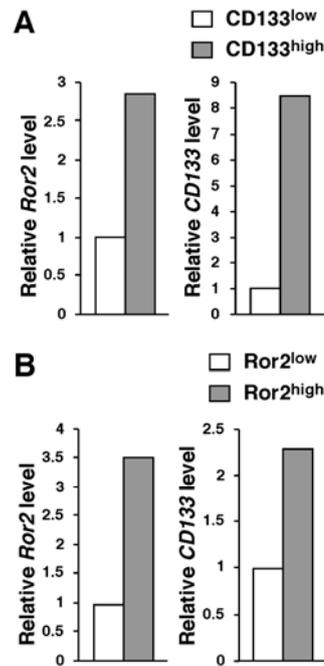


図2. A *CD133*^{low} と *CD133*^{high} における *Ror2* の発現量の比較
B *Ror2*^{low} と *Ror2*^{high} における *CD133* の発現量の比較

(3) マウス脳皮質より単離培養した NPC において、非古典的 Wnt シグナルの誘導に *Ror2* が関わるかどうかについて解析を行った。その結果、*Ror2* が *Wnt5a* 刺激により誘導される Dishevelled2 (*Dvl2*) のリン酸化に必要であり（図 3）、その際に古典的 Wnt シグナルの誘導に関わる β カテニンの細胞内蓄積および β カテニンによる転写活性の促進は伴わないことが明らかになった。この結果から、*Wnt5a*-*Ror2* シグナルは NPC において、非古典的 Wnt シグナルを誘導することが示唆された。

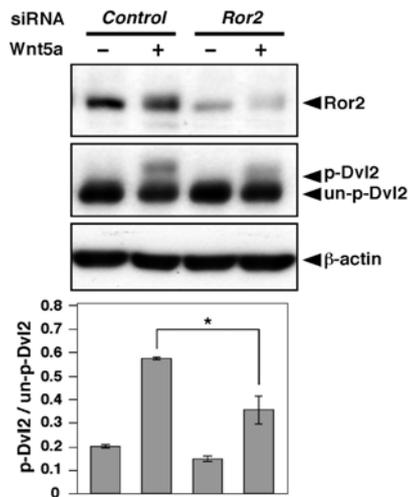


図3. Ror2はWnt5a刺激により誘導されるDvl2のリン酸化を制御する。p-Dvl2;リン酸化Dvl2、un-p-Dvl2;非リン酸化Dvl2、* p < 0.05

(4) 培養NPCを用いて、Wnt5a-Ror2シグナルのニューロン産生における役割について解析を行った。その結果、Wnt5a-Ror2シグナルはニューロン産生能を持ったNPCの自己複製能の維持に必要であり(図4)、この作用を通じて持続的なニューロン産生の促進に寄与していることが明らかになった(図5)。この結果は、Wnt5a-Ror2シグナルが、NPCの自己複製とニューロン産生をともに促進する役割を果たしていることを示唆しており、NPCの非対称分裂制御に関わると考えられた。

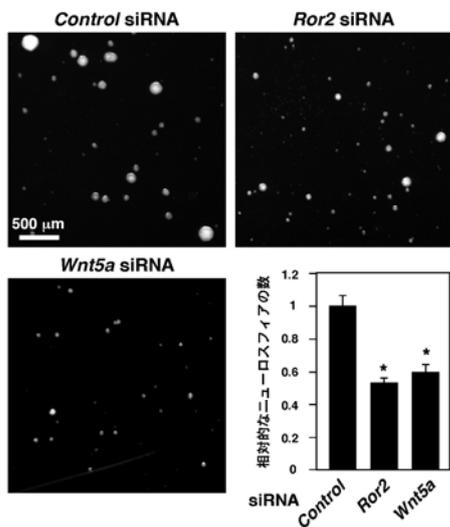


図4. Ror2またはWnt5aの発現抑制によりNPCの自己複製能に依存して形成されるニューロスフィアの数が増加する。p < 0.05

(5) 発生時期の違いにおけるWnt5a-Ror2シグナルの役割について解析するため、ニューロン産生能が高い胎生11.5日齢(E11.5)のマウス大脳皮質由来NPCとアストロサイト産生能が高い胎生14.5日齢(E14.5)のNPCをそれぞれ単離培養し、Ror2の発現抑制の影響について比較した。その結果どちらのNPCにおい

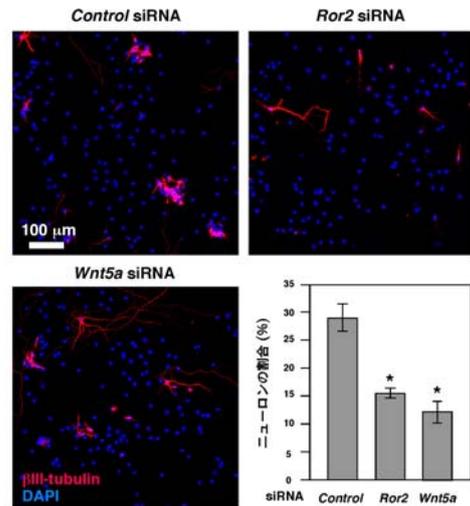


図5. Ror2またはWnt5aの発現抑制によりNPCから産生されるニューロンの割合が減少する。βIII-tubulin;ニューロン、DAPI;細胞核 p < 0.05

てもRor2を発現抑制することにより、NPCの持続的なニューロン産生が抑制され、アストロサイト産生が促進されたが、E14.5のNPCにおける影響と比較して、E11.5のNPCでは小さな影響しか認められなかった。Rorファミリー受容体は哺乳類ではRor1とRor2の2つのメンバーで構成されることから、Ror1による機能補完があるのではないかと考えて、Ror1とRor2を共に発現抑制したときの影響について検討したところ、E11.5ではRor1とRor2の両方を発現抑制することにより、Ror1もしくはRor2を単独で発現抑制した時と比較してより大きな影響が確認された。したがって、ニューロン分化期においては、Ror1とRor2が共に機能することでニューロン産生能を持ったNPCが維持され、持続的なニューロン産生が促進されるとともにアストロサイトへの分化が抑えられていると考えられた。

(6) *in utero* electroporation法を用いてニューロン産生期のマウスNPCにおけるRor1とRor2の発現を抑制し、実際の大脳皮質におけるWnt5a-Rorシグナルの役割についての解析を行った。Ror1およびRor2の発現を抑制することにより、大脳皮質の脳室帯に位置するNPCの割合が減少し、表層側に位置するニューロンの割合が増加することが明らかになった(図6)。したがって、Wnt5a-Rorシグナルはニューロン産生期の脳室帯においてNPCが維持されるために必要であり、これによって持続的なニューロン産生に寄与していると考えられた。

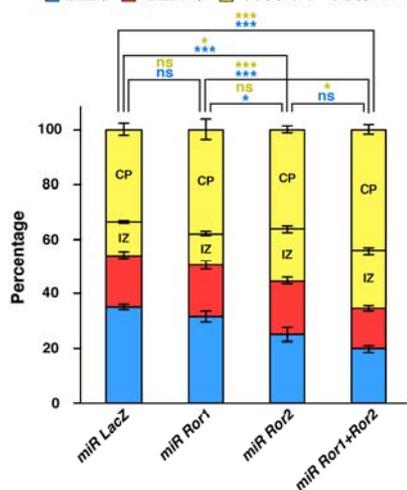
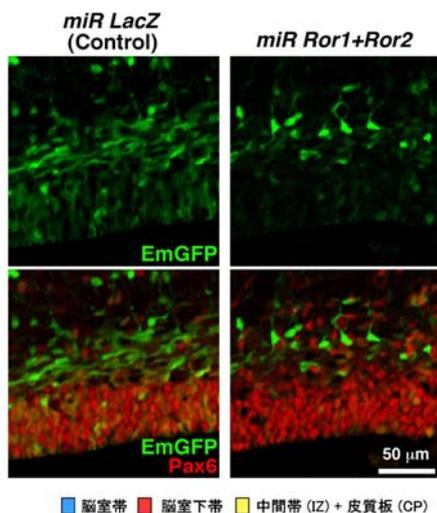


図6. miRNA (miR) を用いて *Ror1* 単独、*Ror2* 単独または *Ror1* と *Ror2* の両方を発現抑制にすることにより脳室帯に位置するNPCの割合が減少する。EmGFP:miR発現細胞、Pax6:NPCマーカー、* p < 0.05、*** P < 0.001、ns:有意差なし

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)

- ① Endo, M., Doi, R., Nishita, M., & Minami, Y. Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. *J. Cell Sci.* 査読有, 2012, in press.
- ② Endo, M., Nishita, M., & Minami, Y. Analysis of Wnt/Planar cell polarity pathway in cultured cells. *Methods Mol. Biol.* 査読無, 839, 2012, pp.201-214.

[学会発表] (計2件)

- ① 遠藤 光晴、土井 亮助、西田 満、南 康博: Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼは脳皮質神経幹細胞の維持に働く
第34回日本分生学会年会、2011年12月13日、横浜
- ② 遠藤 光晴、西田 満、南 康博: Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. 第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月28日、札幌

[図書] (計2件)

- ① 遠藤光晴、南康博: 非古典的 Wnt シグナルによる極性と幹細胞性維持の制御. *生体の科学*、医学書院、63 (3), 2012、印刷中
- ② Endo, M., Nishita, M., Doi, R., & Minami, Y. Ror receptor family. *The Receptor Tyrosine Kinase Handbook*. edited by Wheeler DL and Yarden Y. Springer Science, 2012, in press.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzoo/gyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 光晴 (ENDO MITSU HARU)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号: 90436444

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

土井 亮助 (DOI RYOSUKE)
神戸大学・医学研究科・大学院生