

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461720

研究課題名(和文)皮膚の初期原基、表皮外胚葉の分化運命決定機序の解明

研究課題名(英文) Fate specification coupled to neural tube closure between surface ectoderm and neural ectoderm.

研究代表者

吉田 千春 (YOSHIDA, Chiharu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・病因病態部門・主任研究員

研究者番号：60360666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経管閉鎖時は一層の外胚葉シートが、将来の皮膚である表皮外胚葉と神経細胞とに分化決定され、両者が分かれて管状となり完了する。しかしながら、それら決定時に必要な分子機序について殆ど解明されていない。そこで我々は、神経管閉鎖時の表皮と神経への運命決定機構を解明することを試みた。結果、神経管が閉鎖する時期に未分化性を維持した細胞群が存在することが明らかとなり、さらにこれら未分化細胞はカノニカルWnt経路によって表皮細胞へ、逆に拮抗因子によって神経細胞へと運命決定が成されることがわかった。また、表皮細胞への運命決定にはカノニカルWnt経路の下流でGrhl3因子が働いていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During primary neurulation, the separation of a single-layered ectodermal sheet into the surface ectoderm (SE) and neural tube specifies SE and neural ectoderm (NE) cell fates. The mechanisms underlying fate specification in conjunction with neural tube closure are poorly understood. Here, by comparing expression profiles between SE and NE lineages, we observed that uncommitted progenitor cells are present in the neural plate border prior to neural tube closure. Our results also demonstrated that canonical Wnt and its antagonists, DKK1/KREMEN1, progressively specify these progenitors into SE or NE fates in accord with the progress of neural tube closure. Additionally, SE specification of the neural plate border via canonical Wnt signaling is directed by the Grhl3 transcription factor. Thus, we propose that the fate specification of uncommitted progenitors in the neural plate border by canonical Wnt signaling and its downstream effector Grhl3 is crucial for neural tube closure.

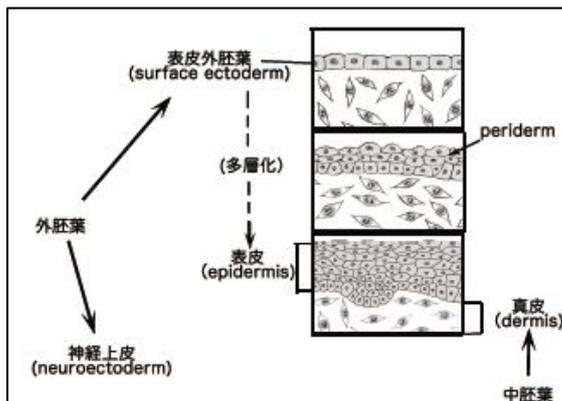
研究分野：発生生物学

キーワード：遺伝子改変マウス 表皮細胞層 神経管閉鎖 二分脊椎

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎 (spina bifida) は神経管欠損 (neural tube defects; NTDs) の一種で、脊椎裂又は脊柱の不完全癒合を意味する。この二分脊椎は尾神経孔の閉鎖不全によって発症する場合 (開放性神経管奇形) と、閉鎖した神経管が椎弓の形成不全によって二次的に膨隆し発症した場合 (閉鎖性神経管奇形) に分けられる。二分脊椎の発症要因は、遺伝的要因、環境要因など多因子性要因とかがえられている。まず、ヒトの二分脊椎発症機序に関しては、遺伝的要因の関与が示唆されつつも、発症様式がメンデル率に沿わないことから、複数のポリジーン (多因子遺伝) と環境因子の相互作用によって発症すると考えられている。一方、実験動物であるマウスを用いた遺伝子破壊 (ノックアウトマウス) の表現型解析結果から、マウスでは神経管欠損症を発症する原因遺伝子が200遺伝子以上報告されており、その発症要因も数多く提示されている。

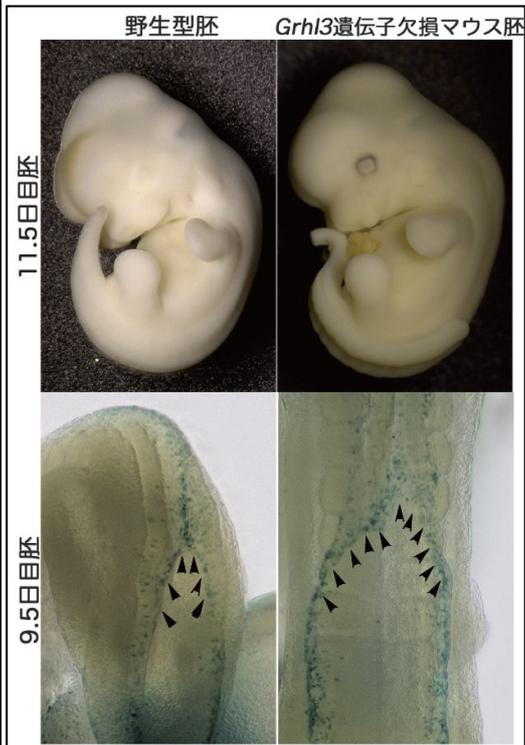
ここで表皮 (将来の皮膚) の発生について概説する。ヒト発生第3~8週 (器官形成期) には原腸形成の結果、三胚葉、すなわち外胚葉、中胚葉、内胚葉が形成される。皮膚はこれら三胚葉の中でも外胚葉と中胚葉から構成され、皮膚の真皮と表皮ではそれぞれ、中胚葉、外胚葉由来であることが知られている (下図参照)。表皮外胚葉は、ヒトでは胎生



40日目以前で見られる単層の上皮細胞層として知られており、その後、最上層の periderm とその下の基底細胞層との2層構造となる。この periderm の出現により、表皮の特徴的な構造が認められるようになる。また外胚葉由来の組織には、表皮外胚葉以外にも中枢神経系となる神経上皮が派生する (上図)。これら表皮外胚葉と神経上皮の運命制御がどのように行われているかは、哺乳動物においてほとんど知られていない。

2. 研究の目的

申請者らは、遺伝子欠損マウスにおいて、開放性神経管奇形を発症する *Grainyhead3* (*Grhl3*) 遺伝子の機能に注目して、二分脊椎発症分子メカニズムの解明を目指している (下図、上段)。

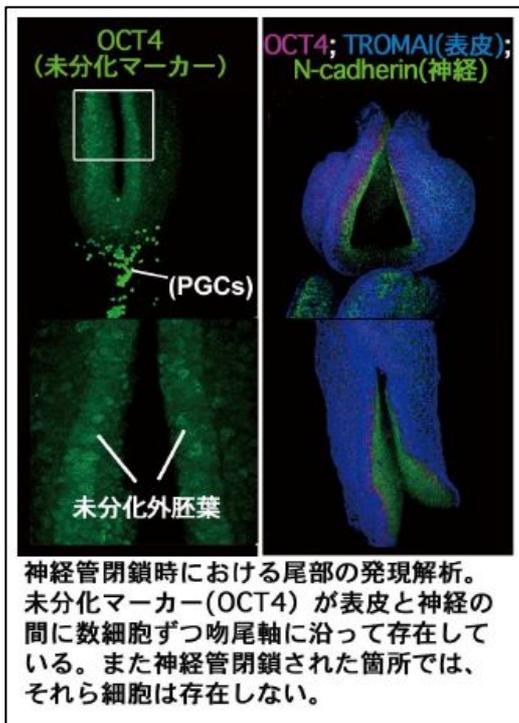


3. 研究の方法

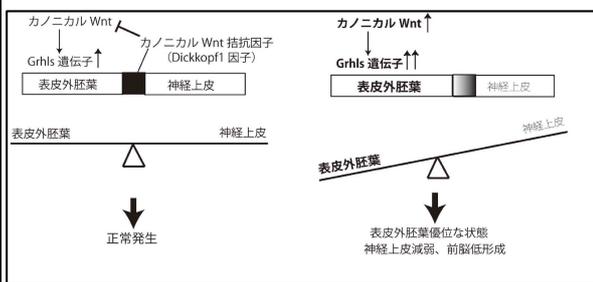
まず、*Grhl3* 遺伝子がマウス発生期にどのような組織で発現するのか検討した。その結果 *Grhl3* 遺伝子は、神経管閉鎖不全を発症するにも関わらず、神経組織やその周りの間葉細胞では全く発現せず、表皮 (将来の皮膚) に強く発現が認められなかった (上図、下段)。そこで、申請者らは *Grhl3* 遺伝子が表皮で働くことによって、正常な神経管閉鎖に関わっているのではないかと仮説を立て、研究を進めた。

4. 研究成果

まず、神経管閉鎖時のマウス胚を用いて、詳細にマーカー解析を行なった。すると、神経堤細胞 (外胚葉、中胚葉、内胚葉に続く、第四の胚葉とも言われる未分化性を持った細胞群のこと) がまだ生じていない時期に、表皮と神経上皮の間に未分化な細胞 (*Oct4*, *Klf5*, *SSEA4* などの未分化マーカー因子が発現する) が存在していることがわかった (下図)。そこで、先ほどの未分化細胞の分化運命決定に関与する因子を抽出するため、神経管閉鎖後の表皮と神経外胚葉の総 RNA を抽出してマイクロアレイを行なった。その結果、分泌性因子ではカノニカル Wnt 経路が、他のシグナル経路と比較して、優位に変動が見られた。実際、カノニカル Wnt 経路の因子を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫組織学染色で発現解析を行なうと、表皮と神経上皮間で局所的に強く発現していることがわかった。さらに、マイクロアレイで得られた因子の中で、転写因子に注目して検証を行



なうと、*Grhl* ファミリーが表皮組織により強く発現していることがわかった。マウス *Grainyhead-like3* (*Grhl3*) 遺伝子はショウジョウバエの *grainyhead* のマウス相同遺伝子で、これまでの研究報告から、planar cell polarity (non-canonical Wnt) 経路と協調して、皮膚創傷後の治癒などの表皮形成に働いていることが報告されている。さらに、*Grhl3* 遺伝子欠損マウスでは、尾部における神経管閉鎖不全(二分脊椎)を発症する(Ting *et al.*, 2003)。そこで、この *Grhl* ファミリーと神経管閉鎖に注目することにした。まず、神経管閉鎖時の *Grhl3* 遺伝子の発現を転写・翻訳レベルで検討を行なうと、表皮で特異的に発現が見られ、さらに興味深いことに神経管が閉鎖しつつある表皮側で強く発現していることがわかった。またこれら発現は、カノニカル Wnt 経路の抑制因子である、*Dickkopf1* (*Dkk1*) 遺伝子と相反するように局在していることがわかった。そこで、*Dkk1* 遺伝子ノックアウトマウス胚と、*Grhl3* 遺伝子ノックアウトマウス胚を用いて神経と上皮細胞のマーカー解析を行なった。結果、*Dkk1* 遺伝子欠損マウス胚では表皮優位となり、一方 *Grhl3* 遺伝子欠損マウス胚では表皮となる細胞が神経細胞へ運命転換していることがわかった。このことはカノニカル Wnt/*Grhl3* 経路が優位になると表皮細胞へ、逆に抑制されると神経へと運命決定がなされることを意味している。これら研究により、神経管閉鎖時には表皮と神経への細胞運命決定がバランス良く行なわれることが、最終的に神経管閉鎖が完了することに必須であることが示唆された。これらの研究報告は *EBioMedicine* に掲載された。



近年、分子生物学をはじめとする基礎研究により、ヒト疾患の発症メカニズムや、病態の詳細な解析が進み、多くの成果が得られている。これまでに、前述した通り、マウスで神経管閉鎖不全を発症する遺伝子改変マウスだけでも、とても多くの症例が報告されている。現在、これらマウスを用いて多くの研究者が発症要因を検討することにより、膨大な検証の蓄積がなされている段階である。今後、蓄積された知見を体系的に理解し、神経管閉鎖プロセスに必要な形態変化や分子機序の全体像を明らかにすることが強く望まれる。

また、マウス胎児以外にも、これまでニワトリ胚を用いて神経管閉鎖不全の研究がなされている。マウス胚とニワトリ胚では、後部神経管の形成過程に若干の違いがあり、ヒトの疾患モデル動物として、どちらの種が適当であるか、検討が必要といえる。裏を返せば、動物種によって神経管閉鎖過程が多少なりとも違いがあり、ヒトの神経管閉鎖過程とマウス、ニワトリ胚のそれとは全く一致する訳ではない。このような種による発生機序の違いは、神経管閉鎖過程のみならず、様々な器官形成でもいえることであり、そのため、研究結果の解釈や、動物選択には十分な注意が必要となる。しかしながら遺伝学的解析や、胎児期の形態・病理画像が容易に検証できる疾患モデル動物は、神経管閉鎖不全を理解する上で極めて有用であることは間違いない。今後、神経管閉鎖不全の発症原因、予防、治療のためのさまざまな知見が、これら疾患モデル動物の研究から得られることが期待される。

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5件)

1) Coordinately co-opted multiple transposable elements constitute an enhancer for *wnt5a* expression in the mammalian secondary palate. Hidenori Nishihara, Naoki Kobayashi, Chiharu Kimura-Yoshida, Kuo Yan, Olga Bormuth, Qiong Ding, Akiko Nakanishi, Takashi Sasaki, Mika Hirakawa, Kenta Sumiyama, Yasuhide Furuta, Victor Tarabykin, Isao Matsuo, Norihiro Okada. *PLoS Genet.* 14

12(10). (2016) doi:
10.1371/journal.pgen.1006380.

2) Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and *Grhl3* is crucial for neural tube closure. **Chiharu Kimura-Yoshida**, Kyoko Mochida, Kristina Ellwanger, Christof Niehrs, Isao Matsuo. *EBiomMedicine*. **18**, 513-527. (2015) doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.012.

3) Extracellular distribution of diffusible growth factors controlled by heparin sulfate proteoglycans during mammalian embryogenesis. Isao Matsuo and **Chiharu Kimura-Yoshida**. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **369** 20130545 (2014). doi: 10.1098/rstb.2013.0545.

4) External Mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. Ryuji Hiramatsu, Toshiki Matsuoka, **Chiharu Kimura-Yoshida**, Sung-Woong Han, Kyoko Mochida, Taiji Adachi, Shuichi Takayama and Isao Matsuo. *Developmental Cell*. **28**. 131-144. (2013). doi: 10.1016/j.devcel.2013.09.026.

5) Extracellular modulation of fibroblast growth factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. Isao Matsuo and **Chiharu Kimura-Yoshida**. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**. 399-407. (2013). doi: 10.1016/j.gde.2013.02.004.

〔学会発表〕(計5件)

1) **Kimura-Yoshida C.**, Mochida K., Ellwanger K., Niehrs C., and Matsuo I. Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and *Grhl3* is crucial for mammalian neural tube closure. 第39回日本分子生物学会年会 2016.11.30 横浜シンポジウム

2) Matsuo I., **Kimura-Yoshida C.** and Hiramatsu R. External mechanical forces from the maternal tissues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in the early mouse embryo International Symposium on Mechanobiology 2014, 2014.5.22 Okayama

3) 松尾 勲、下川 佳代、平松 竜司、**木村-吉田 千春** 細胞外マトリックス分子を介したマウス初期胚の細胞運命・動態の制御機構」 第87回日本生化学学会年会 2014.10.16 京都

4) Matsuo I., Shimokawa K., Hiramatsu R., and **Kimura-Yoshida C.** The extracellular microenvironment modulates biological activity of diffusible growth factors during early mouse embryogenesis” 47rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists 2014.5.30

5) 爪 麻美、**木村-吉田 千春**、松尾 勲 マウス胚発生過程における *Brd2* 遺伝子の役割 第86回日本生化学学会年会 2013.9.13

発表

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 千春 (YOSHIDA, Chiharu)

大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・病因病態部門・主任研究員

研究者番号: 60360666