

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390079

研究課題名（和文） 個体発生におけるセマフォリンの臓器形成メカニズムの解析

研究課題名（英文） Roles of semaphorins in organogenesis during development

研究代表者

豊福 利彦 (TOYOFUKU TOSHIHIKO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：60322179

研究成果の概要（和文）：本研究では、個体発生の過程で神経提細胞による心臓流出路形成、網膜の光受容体形成におけるセマフォリンの役割を解析した。クラス6セマフォリンは心臓流出路形成の細胞移動を制御すること、クラス4セマフォリンは網膜の光受容体形成を膜輸送制御を介して制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of semaphorins in the cardiac outflow tract formation and retinal photoreceptor survival during development. Class 6 semaphorins, *Sema6A* and *6B*, navigated the cardiac neural crest cells from dorsal-ventral direction, while class 4 semaphorin, *Sema4A*, regulated the endosomal sorting of anti-apoptotic prosaposin and retinoid-binding proteins in the retinal pigment cells in retina to support homeostasis of photoreceptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：発生医学

1. 研究開始当初の背景

セマフォリンは発生過程の神経軸索の反発活性或いは誘引活性をもとに同定されてきた分子群であり、神経ネットワークの構築に必須の神経ガイダンスファミリーである。しかし、セマフォリン分子の多くは、神経系以外の組織、臓器でも広範に発現しており、神経系発生以外の役割が示唆されてきた。申請者は、これまで心臓、血管、神経及び骨の発生及び組織構築におけるセマフォリンの役割を明らかにしてきた (*Genes & Dev.* 18:435, 2004, *Nat Cell Biol* 6:1204, 2004,

Nat Neurosci, 8:1712, 2005, *Nat Cell Biol.* 8:615, 2006, *EMBO J*, 26:1373, 2007)。一連の申請者による研究がきっかけとなり、現在セマフォリンは単なる神経ガイダンス因子としてではなく、組織、臓器形成から個体発生完了後のホメオスタシス維持まで関わる多機能な制御因子として捉えなおす必要性が指摘されている。

申請者は、心血管発生の制御機構の解析を行ってきたが、その過程で膜結合型セマフォリン分子 *Sema6D* と受容体である *Plexin-A1* の結合が非常に巧妙な機構で心臓の形態形

成を制御していることを見出した(**Genes & Dev.**, 18:435, 2004, **Nat Cell Biol.**, 6:1204, 2004)。心臓は、左右外側中胚葉の心臓予定領域が移動し正中線上で融合してできた心臓管が、非常にダイナミックで複雑なプロセスを経て二心房二心室の器官に形成される。申請者らは、このプロセスの中で **Sema6D** が **Plexin-A1** と受容体型チロシンキナーゼ **Off-track(OTK)** からなる複合体を介して、心室領域の形態を形成するとともに、房室管領域では **Plexin-A1** と 2 型血管内皮増殖因子受容体 (**VEGFR2**) の複合体を介して心臓内隆起 (将来の房室弁部分) の形成に寄与することを見いだした(**Genes & Dev.**, 18:435, 2004)。また **Sema6D** は受容体としても機能し、その逆行性シグナルは心室内腔への心筋細胞の増殖 (肉柱の形成) につながることも見いだした(**Nat Cell Biol.**, 6:1204, 2004) (図)。更に、**Plexin-A1** 欠損マウスを作成・解析から **Sema6D** が **PlexinA1** と結合し **Trem2**, **DAP12** というシグナル分子を介して破骨細胞の分化を誘導し骨形成とそのホメオスタシス維持に必須の役割を果たしていることも見いだしている(**Nat Cell Biol.**, 8:615, 2006) (図)。一方、可溶性セマフォリン **Sema3A** は受容体である **Neuropilin-1** と結合し共受容体である **Plexin-A1** を介して神経軸索の反発作用を起こすが、申請者らは **Plexin-A1** に特異的に **FARP2** という **GEF** (guanine nucleotide exchange factor) 蛋白が結合し、これが **Sema3A** による細胞内シグナルの引き金となることも明らかにしている(**Nat Neurosc.**, 8:1712, 2005) (図)。さらに、膜結合型セマフォリン **Sema4A** 欠損マウスの解析から **Sema4A** が **PlexinD1** を介して血管形成とそのホメオスタシス維持に必須の役割を果たしていることを見いだしている(**EMBO J.**, 26:1373, 2007)。このようにセマフォリンは、臓器、領域、或いは細胞によって異なる受容体・共受容体を使い分けることにより全く異なるシグナル伝達系を介して多様な活性を発揮し、種々の臓器形成に寄与しているということが申請者らの研究により浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

セマフォリンとその受容体の多機能性はリガンド-レセプター結合の重複性、それらの発現の時空間制御だけでなく、細胞内シグナルの多様性をも反映していることが明らかになりつつある。従って、セマフォリン分子による個体発生制御の全体像を明らかにするには、複数臓器にまたがった機能の分子レベルから臓器レベルまでの解析を通してより包括的に研究する必要がある。本研究では、セマフォリンの主要なメカニズムである

(1) 細胞移動 (2) 細胞分化 (3) 細胞極

性に焦点を当て制御機構を明らかにする。

(1) については心臓流出路形成時の神経提細胞の神経管背側より腹側へのナビゲーション機構と網膜視神経細胞の神経軸索誘導機構を解明する。(2) については **Sema4A** 欠損マウスで明らかになった網膜の光受容体形成不全のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 心臓の形態形成や網膜形成におけるクラス 6 型セマフォリン分子シグナルの解析

心臓神経提細胞による左心室流出部～大動脈系の形成機構の解析

心臓の左心室流出部～大動脈系の形成には心臓神経提細胞が関与する。心臓神経提細胞は発生初期において神経板の両端部分より分離し、心臓の左心室流出部～大動脈領域へ遊走する。この神経提細胞は、神経外胚葉の形質を持つ細胞が中胚葉の形質を持つ細胞に形質転換することにより、遊走能を獲得する。このように発生学上、極めて興味深い細胞群について、**Plexin-A2** の発現が誘導されていることを見いだしている。

セマフォリンの神経提細胞移動における役割を過剰発現及び発現欠損実験を使って培養心臓神経提細胞の細胞遊走能および生体内での神経提細胞移動能を解析する。心臓神経提細胞がその遊走経路に発現するセマフォリンに対して、反発作用ないし誘導作用を有するかをストライプ・アッセイ法を用いて検討する。さらに異所性にセマフォリンを過剰発現させた実験系や受容体に対する siRNA を導入した神経提細胞の移動経路を共焦点レーザー顕微鏡を用いた time lapse イメージングにより観察する。

Sema6D の網膜視神経細胞の神経軸索の分化制御の解析

予備的な解析から、**Sema6D** は網膜の視神経細胞からの神経軸索の伸展を抑制することを見いだしている。更に詳細な組織学的解析を行い、**Sema6D** に加え種々のプレキシンの *in situ hybridization* をマウス網膜組織で行い、網膜における **Sema6D** の受容体候補を絞り込む。次に、マウス視神経細胞の培養系を用いて **Sema6D** の作用が発生段階での生理的役割を明らかにする。

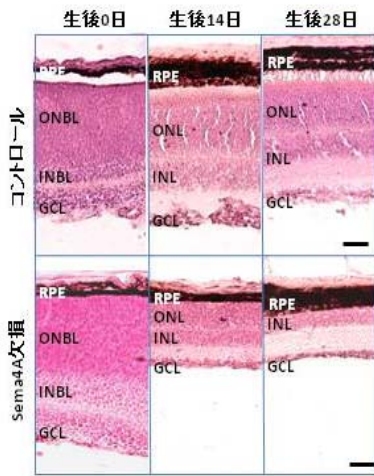
(2) クラス 4 セマフォリンの個体発生、臓器形成における役割

クラス 4 セマフォリンはセマフォリンファミリーの中でも最も大きなサブファミリーであるが、**Sema4A** と **Sema4D** の免疫制御における役割を報告がある以外は、それらの生理的役割、特に神経系を含めた臓器形成における機能は全く不明である。

Sema4A の網膜形成における役割

予備的な解析から、Sema4A 欠損マウスにおいては網膜の視神経細胞層が欠損していることを見いだしている。

図1 Sema4A欠損マウス網膜は視細胞の著明な脱落を生じる



マウス網膜組織のH&E染色

更に詳細な組織学的解析を行い、この欠損が視神経の異常によるものなのか或いは栄養血管の異常など二次的なものなのかを明らかにする。更に、Sema4A に加え種々のプレキシンの *in situ* hybridization をマウス網膜組織で行い、網膜における Sema4A の受容体候補を絞り込む。次に、マウス視神経細胞の培養系を用いて Sema4A が化学反発活性或いは化学誘引活性を有するか否かを明らかにする。

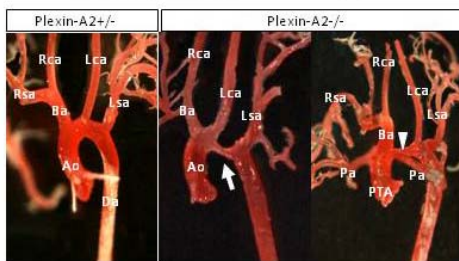
4. 研究成果

(1) 心臓の形態形成や網膜形成におけるクラス6型セマフォリン分子シグナルの解析

心臓神経堤細胞による左心室流出部～大動脈系の形成機構の解析

Sema6A, 6B は神経堤細胞の遊走経路周囲に発

Plexin-A2欠損マウスは大血管奇形を示す

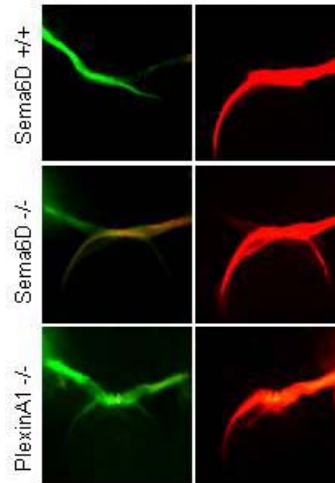


現し、Sema3C は心臓流出路に発現していた。神経堤細胞には Sema6A, 6B に対する受容体 plexin-A2 があり、反発作用により背側部分からの移動を促進していた。Plexin-A2 欠損マウスは心臓流出路に発生異常を示した。また Sema3C に対する受容体 Neuropilin/plexin-D1 は誘導作用により、神経堤細胞の遊走を促進した。以上の相反した

作用機序が部位特異的に働くことにより、細胞の心臓流出部への移動を制御することを明らかにした。

Sema6Dの網膜視神経細胞の神経軸索の分化制御の解析

Sema6DおよびPlexinA1欠損マウスは視交叉異常を示す



Sema6D は視神経の経路周辺に分布し、視神経に発現する plexin-A1 を介する反発作用により、視神経の脳の視覚野への投射を制御した。

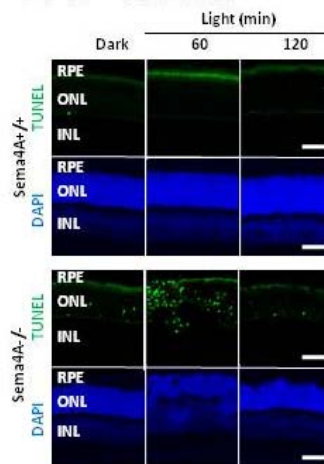
視神経の走行を DiI, DiO により染色した結果、Sema6D および Plexin-A1 欠損マウスでは視交叉に走行異常を認めた。さらに plexin-A1 を介する新規 GTP 結合キナーゼがミトコンドリア輸送を制御する機構を見出した。

(2) クラス4セマフォリンの個体発生、臓器形成における役割

Sema4A の網膜形成における役割

Sema4A 欠損マウスは生後早期に光刺激を受

Sema4A欠損マウスは光刺激によりアポトーシスを起こす



けた視細胞がアポトーシスにより死滅する。光刺激によるアポトーシスは色素上皮細胞より分泌されるプロサポリンにより防げるが、このプロサポリンの分泌に Sema4A の膜輸送機構が重要であることを

見出した。

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 4 件)

- 1 Nogi T, Yasui N, Mihara E, Matsunaga Y, Noda M, Yamashita N, Toyofuku T, Uchiyama S, Goshima Y, Kumanogoh A, Takagi J. 2010 Structural basis for semaphorin signaling through the plexin receptor **Nature** 467:1123-1127, 査読有
- 2 Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A. 2010 Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. **Nature Immunology** 11: 594-600, 査読有
- 3 Takegahara N, Kang S, Nojima S, Takamatsu H, Okuno T, Kikutani H, Toyofuku T, Kumanogoh A. 2010 Integral roles of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclast podosome rearrangements. **FASEB J** 24: 1-10. 査読有
- 4 Toyofuku T, Yamamoto M, Yoshida J, Sugimoto T, Makino N, Takamatsu H, Takegahara N, Suto F, Hori M, Fujisawa H, Kumanogoh A, and Kikutani H, 2008 Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the long-range navigation of cardiac neural crest cells **Dev. Biol.** 321: 251-262, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

豊福利彦、反発性及び誘引性セマフォリンによる心臓神経提細胞の遊走制御機構、第 61 回 日本細胞生物学会大会、2009, 6, 2、名古屋

[図書] (計 1 件)

豊福利彦 羊土社 実験医学: 心血管ネットワーク形成のダイナミクス (2009)
心臓発生におけるガイダンス分子の役割
129

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊福 利彦 (TOYOFUKU TOSHIHIKO)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号: 60322179