

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07274

研究課題名（和文）咽頭嚢からの胸腺の分離移動を制御するRipply3の機能モチーフと胚葉特異的役割

研究課題名（英文）Functional analysis of Ripply3 in the migration of thymus from pharyngeal pouch

研究代表者

大久保 直（Okubo, Tadashi）

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10450719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Ripply3は発生過程で咽頭弓の内胚葉と外胚葉に発現し、咽頭弓分節や胸腺形成への関与が示唆される遺伝子である。Ripply3がもつ進化的に保存されたアミノ酸配列WRPWとFPVQに注目し、各配列に変異を導入したマウスを解析した。その結果、WRPW変異マウス、FRVQ変異マウスともに胸腺の形成不全を呈したが、咽頭嚢からの胸腺の分離や移動の程度に顕著な差がみられた。内胚葉特異的なRipply3欠損マウスでは、欠損する時期により胸腺の形成不全の出現頻度が変化した。即ちRipply3のWRPWとFPVQ配列は胸腺形成に必須であり、また咽頭弓内胚葉での発現時期も胸腺形成に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺や心臓の形成不全を伴うヒトのDiGeorge症候群は、その欠失領域に存在するTbx1が主な原因だが、Ripply3はTbx1に対する転写抑制因子で、その転写抑制活性はRipply3がもつアミノ酸配列FPVQとWRPWに依存することが培養細胞を用いた解析により示唆されていた。本研究では、これらの配列に変異を導入したマウスを解析し、両配列の胸腺形成における重要性が個体レベルで証明された。また咽頭弓内胚葉と外胚葉に発現するRipply3のうち、内胚葉のRipply3は胸腺の咽頭からの分離・移動に必須なことを示した。これらはヒト先天性疾患の病態解明に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Ripply3 is a gene expressed in the endoderm and ectoderm of the pharyngeal arch during development and is suggested to be involved in pharyngeal arch segmentation and thymus formation. To elucidate the functions of amino acid sequences WRPW and FPVQ, which are evolutionarily conserved in Ripply3, in thymus formation, we analyzed mice with mutations of these sequences. We found that both WRPW and FRVQ mutant mice had dysplastic thymus, but there was a marked difference in the degree of separation and migration of the thymus from pharynx. Furthermore, in the endoderm-specific Ripply3-deficient mice, the frequency of thymus malformation varied greatly depending on the timing of the deletion. These results suggest that the WRPW and FPVQ sequences of Ripply3 are essential for thymus formation and that the timing of Ripply3 expression in the endoderm of the pharyngeal arch is also important for thymus formation.

研究分野：発生学

キーワード：咽頭弓分節 胸腺形成 心臓形成 Ripply3 内胚葉

1. 研究開始当初の背景

咽頭弓は脊椎動物の胎仔期に現れる分節構造で、咽頭弓派生器官(胸腺や副甲状腺)や心臓流出路の形成に重要である。胸腺原基は第3咽頭嚢に形成され、徐々に臓器として成熟しながら咽頭嚢から分離され、心臓付近まで移動する。このような胸腺の独特な形成過程は、咽頭弓を構成する三胚葉に加え神経堤細胞、鰓弓動脈の協調により起こると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。ヒトのDiGeorge症候群(DGS)は、咽頭弓の異常に起因する心臓奇形と胸腺形成異常を伴う代表的な先天性疾患として知られる。これまで申請者は、咽頭弓分節時に内胚葉と外胚葉に高発現するRipply3を発見し、Ripply3がDGSの原因遺伝子であるTbx1の転写活性を抑制する因子であることを見出している。またRipply3 KOマウスの解析から、咽頭弓や心臓流出路、胸腺など咽頭弓派生器官の形成に必須で、特にRipply3 KOマウスの胸腺は心臓付近まで下降せず、両側が頸部に残留するといった極めて特徴的な形成不全を示すことを報告している。これらの知見から、Ripply3の機能欠損により生じた第3、第4咽頭弓の形成不全が、その後続く胸腺の咽頭内胚葉からの分離や移動、心臓流出路の形成に密接に関連していると仮説を立てた。

Ripply3 遺伝子は脊椎動物で保存されており、進化的によく保存されたアミノ酸配列が複数存在する。培養細胞を用いた解析から、N末端側にあるWRPWモチーフとC末端側にあるFPVQモチーフは、Groucho/TLEやTbx1と相互作用することでTbx1の転写活性を制御するアダプター分子と考えられているが、実際に各モチーフがin vivoで胸腺形成に重要な働きを担っているか分かっていない。またRipply3は、咽頭弓の分節過程で咽頭弓内胚葉と外胚葉に特異的に高発現しているが、胚葉特異的な役割についてもまだ解明されていない。従って、Ripply3の生体内での詳細な機能解析は、咽頭嚢からの胸腺形成のメカニズムの一端を明らかにし、ヒトの先天性疾患の病態解明に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、胸腺の咽頭嚢からの分離と移動が、Ripply3 遺伝子のどのような配列に依存しているのか、また胚葉特異的な発現に依存した事象なのかを解明することを目的とする。まず、Ripply3が有する進化的に保存されたアミノ酸配列のうち、特にN末端側に存在するWRPWとC末端側のRipplyホモロジドメインに位置するFPVQに着目し、これらのアミノ酸モチーフそれぞれに変異を導入したゲノム編集マウスを用いて胸腺の形成過程を検証する。また、Ripply3は咽頭弓分節に伴い咽頭嚢(内胚葉)とそれに隣接する外胚葉に発現しているが、内胚葉特異的にRipply3をコンディショナルノックアウト(cKO)したマウスの表現型を通常のRipply3 KOマウスの表現型と比較解析することで胚葉特異的な役割を顕在化しようと考えた。

3. 研究の方法

Ripply3のアミノ酸配列WRPWとFPVQをそれぞれAAAA(アラニン4つ)に置換した変異マウスを作成するため、各配列をコードするexonの標的配列にCRISPR-Cas9もしくはCsa12aシステムを用いて、ノックインマウスを作成した(図1)。各ノックインマウスをそれぞれRipply3 WAマウスあるいはRipply3 FAマウスとした。

内胚葉特異的なRipply3 cKOマウスを作成するために、Ripply3 floxマウスと交配するcreマウスを当初の予定から変更しFoxa2-EGFP-creERT2マウスに変更した。これによりタモキシフェン投与の時期を変えることで、発生のステージ依存的なcKOを誘導することが可能となった。各変異マウスの胚や新生仔を所定のステージにて解剖し、形態的、組織学的な解析に供した。

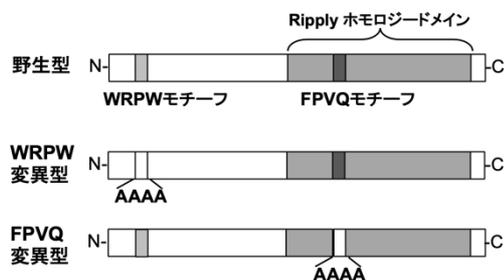


図1 野生型Ripply3の構造と各変異型

4. 研究成果

1) WRPWに変異を導入したマウスの胸腺形成
Ripply3 WA ホモマウスは、新生仔の段階でその多くが致死となった。それらの胸腺や心臓を解析すると、顕著な形成不全が観察されたが、その表現型にはかなりバリエーションが見られた。WA ホモマウスの胸腺は、Ripply3 KOマウスでみられる両側が頸部に残留するようなcervical型は少なく、片側のみ頸部残留しもう一方だけが心臓付近まで下降したunilateral型、そして両側が心臓付近まで下降しているが異常形態を示すbilateral型が大半を占めていた(図2)。また、心臓の流出路も大動脈弓離断(IAA)の割合は半分程度で、右大動脈弓起始異常(ARSA)や右側大動脈弓(RAA)の割合が増加し(図2)、心室中隔欠損(VSD)の割合は顕著に減少した。さらに、WA ホモマウスの中には生後発達期においても生存する個体がみられ、それらの胸腺の大半はbilateral型であった。また別のゲノム編集により系統化されたWRPマウス(WRPW配列のうち3つのアミノ酸配列WRPが欠失)についても解析した結果、胸腺の形成位置や心臓流出路には

Ripply3 WA マウス同様に多様な異常が観察された。これらの結果は、K0 マウスでみられる表現型とは大きく異なることから、WRPW に変異を導入すると胸腺や心臓の表現型の浸透度に差が出やすく、重篤なものから比較的軽い表現型までバリエーションがみられ、生後の生存率にも影響することが判明した。

2) FVPQ に変異を導入したマウスの胸腺形成

Ripply3 FAホモマウスは、新生仔の段階で全てが致死となった。それらの胸腺や心臓を解析すると、胸腺はほとんどが両側ともに頸部に残留し心臓まで下降しないcervical型で、心臓流出路はほとんどがIAAを呈し、VSDを有していた(図2)。即ち、FVPQに変異を導入するとほぼ Ripply3 K0 マウスの表現型と類似した結果になることが判明した。

以上の結果を踏まえると、WRPWとFVPQの両配列はRipply3の機能発揮に必須であるが、各配列を介して相互作用する分子の違いが胸腺の表現型の浸透度の差として表れている可能性が示唆された。今後は、Ripply3のGrouchoやTbx1に対する生化学的な作用機序についても検討が必要である。

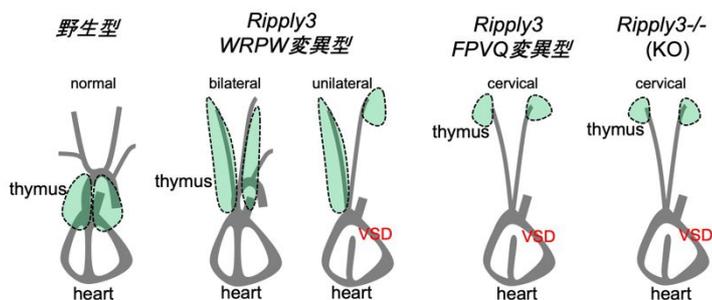


図2 Ripply3変異マウスの胸腺と心臓の表現型

3) 内胚葉特異的な Ripply3 cK0 マウスの胸腺形成

Ripply3 を第1咽頭弓の形成前にcK0するためタモキシフェンをE6.5日投与し、E18.5日のcK0マウス胚の組織学的解析を行った。その結果、対照群のflox/+胚やcreER:flox/+胚の胸腺や心臓は全て正常に形成されていた。しかしcreER:flox/flox胚では、全ての個体において両側または片側の胸腺の頸部残留が観察され、ほとんどの個体で心臓流出路はIAAを呈し、多くの個体でVSDも観察された。

一方、Ripply3 を第3咽頭弓が形成される前後からcK0するためタモキシフェンをE8.5日投与した後、E18.5日のcK0マウス胚の組織学的解析を行った。その結果、creER:flox/flox胚における胸腺の頸部残留の出現頻度は顕著に減少し、IAAのような心臓流出路における異常やVSDの出現頻度も顕著に減少した。

以上の結果から、内胚葉のRipply3は胸腺の分離や移動に必須であるが、発生時期に依存的な機能があると示唆された。即ち第1咽頭弓形成前の内胚葉のRipply3は胸腺形成に必須であり、咽頭弓ができる前の段階から胸腺分離のために内胚葉上皮の地盤を整えるのに必要だと考えられた。ところが、第3咽頭弓が形成される時期以降の内胚葉のRipply3は胸腺形成にあまり影響を与えない可能性が示唆された。さらに、咽頭弓内胚葉のRipply3の発現に依存した何らかの細胞非自律的な作用が、鰓弓動脈の形成とリモデリング(消失と残存)そして心臓神経堤細胞の移動には重要で、心臓流出路の形成に深く関与することを示している。今後は、外胚葉特異的なRipply3 cK0マウスなどの解析からより詳細な胚葉特異的なRipply3の機能を解明し、ヒトの先天性疾患の病態解明に貢献したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tadashi Okubo, Keiko Hara, Sadahiro Azuma, Shinji Takada	4. 巻 250
2. 論文標題 Effect of retinoic acid signaling on Ripply3 expression and pharyngeal arch morphogenesis in mouse embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1036-1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.301.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Narita, Ryusuke Ishizuka, Yosuke Kajiyama, Yudai Yabe, Shinji Takada, Tadashi Okubo
2. 発表標題 Phenotypic analysis of mice with mutations in two evolutionarily conserved amino acid motifs in Ripply3
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Sendai. Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryusuke Ishizuka, Yosuke Kajiyama, Yudai Yabe, Daisuke Narita, Shinji Takada, Tadashi Okubo
2. 発表標題 Phenotypic analysis of mouse embryos with mutations in two evolutionarily conserved amino acid motifs in Ripply3
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadashi Okubo, Keiko Hara, Sadahiro Azuma, Shinji Takada
2. 発表標題 The effect of retinoic acid signaling on the expression of Ripply3 gene in pharyngeal arch development
3. 学会等名 第52回 日本発生生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------