

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2019

課題番号：26460257

研究課題名(和文) 舌咽神経の発生を統御する分子基盤と咽頭弓分節の連関

研究課題名(英文) Molecular basis of glossopharyngeal nerve formation during pharyngeal arch development

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの咽頭弓に発現するRipply3に着目し、Ripply3の発現調節機構、Ripply3と相互作用する新規遺伝子の探索から咽頭弓分節と舌咽神経発生の連関を調べた。その結果、Ripply3 KOマウスは舌咽神経が形成不全となり舌有郭乳頭の味蕾が欠失することを発見した。レチノイン酸によるRipply3の発現調節と咽頭弓形成、Ripply3発現細胞からの舌咽神経節の分化、さらにRipply3と相互作用する因子Paxilinによる咽頭弓上皮細胞の接着性制御、Ripply3の転写抑制能を調節する新規因子Glyr1を見出した。以上、咽頭弓分節と舌咽神経発生を統御する分子機構について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の胎児期に現れる咽頭弓は、その後様々器官形成に関与する。ヒトのDiGeorge症候群ではTBX1の欠失により咽頭弓の形成不全に続く心臓、胸腺そして末梢神経の形成異常が起こる。我々は、これまでにマウスTbx1の転写抑制因子としてRipply3を同定し、咽頭弓分節に必須な遺伝子であることを報告したが、Ripply3が舌咽神経の形成に関与しているか不明であった。本研究は、Ripply3と咽頭弓分節、舌咽神経節形成との連関を明らかにし、その背後にある分子機構の一端を解明するに至った。また近年ヒトRIPPLY3にも変異が見つかっており、ヒト先天性異常の発症機構を理解する上で重要な研究といえる。

研究成果の概要(英文)：Pharyngeal arch (PA) is a transient segmental structure, and it is important for the later peripheral neurogenesis. Ripply3 is highly expressed in the developing PA of mouse. To explore the regulatory mechanism underlying between PA formation and glossopharyngeal nerve (GN) development, we focused on the involvement of Ripply3. Consequently, we found Ripply3 is required for GN development. Next, we identified retinoic acid (RA) is required for the enhancement of Ripply3 expression. Ripply3 promoter analysis revealed that RA and Ripply3 cooperatively participate in PA and GN development. We also found that Ripply3 expressing cells give rise to GN ganglia by using cre reporter system. Some candidates of Ripply3 interacting genes were identified. Among them, Paxilin is involved in morphogenesis of PA with Ripply3, and Glyr1 is a novel factor regulates the transcriptional property of Ripply3. Thus, we gained new insights into the Ripply3 function in GN formation during PA development.

研究分野：発生生物学

キーワード：舌咽神経 Ripply3 咽頭弓 味蕾形成 レチノイン酸シグナル プロモーター制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成体において無数の神経細胞が、秩序だって連結し機能するには、胎仔期に神経細胞が適切な数生み出され、適切な場所へ移動し、そして標的に軸索を伸長しネットワークを構築しなければならない。特に胎仔期は、神経系の組織以外の細胞もダイナミックに増殖、移動、分化しており、マウスでは、胎生8.5~10.5日の間に咽頭弓の分節化が起こる。その間に外胚葉の鰓上板から派生した神経前駆細胞は、脳神経節(VII, IX, X)を形成し、その軸索は各咽頭弓分節に沿うように軸索を標的組織へ投射する。例えば、舌咽神経(IX)は、舌の有郭乳頭の味蕾や頸動脈小体へ軸索を伸ばし、味覚や内臓感覚の受容に関わる。しかし、咽頭弓分節と連関する脳神経の発生・分化を制御する分子基盤は未解明な点が多い。

ヒトのDiGeorge症候群ではTBX1の欠失により咽頭弓の形成不全に続く心臓、胸腺そして末梢神経の異常が起こると考えられている。マウスのTbx1は咽頭弓で強く発現する転写因子で、Tbx1ノックアウトマウスでは、迷走神経の投射が異常となることが報告された。一方我々は、Tbx1の新規転写抑制因子としてRipply3遺伝子を同定し、Ripply3が咽頭弓形成に必須であることを報告した(Okubo et al.2011)。Ripply3の発現は特徴的で、主に咽頭弓の内胚葉と外胚葉で特異的に発現するが、新たな咽頭弓の分節予定領域にまず強く発現し、咽頭弓が分節し終わると、徐々に発現が消失し、マウスでは第4咽頭弓が分節するまで発現のON/OFFが繰り返される。また、Ripply3ノックアウトマウスでは、特に第3、4咽頭弓が低形成となり、続いて胸腺形成や心臓流出路の形成を示すことから、Ripply3は咽頭弓分節とその後の器官形成に必須の因子であることが分かっていた。しかしながら、Ripply3と鰓上板由来の脳神経節(VII, IX, X)形成との関係は分かっていた。

2. 研究の目的

本研究では、Ripply3を基軸に咽頭弓分節と脳神経節形成、特に舌咽神経分化との連関を遺伝子改変マウスを用いて明らかにしていくことが目的である。

3. 研究の方法

1) Ripply3 KOマウスにおける脳神経節形成の詳細な表現型解析を行う。Ripply3 KOマウス胚における脳神経節マーカーの発現、舌の有郭乳頭における舌咽神経の走行、味蕾細胞の分化を組織化学的に解析した。

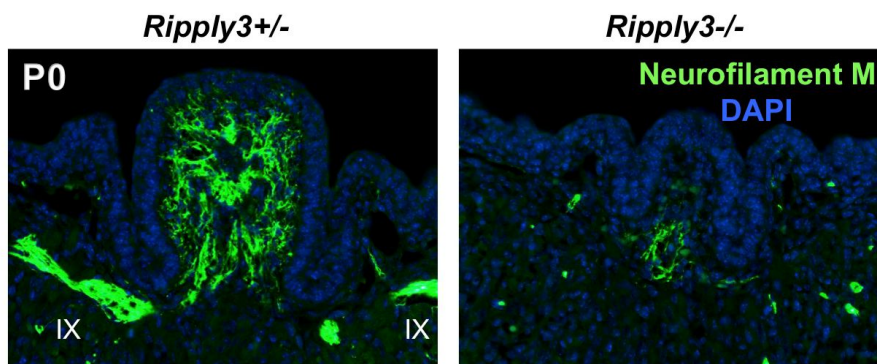
2) CreレポーターTgマウスシステムを用いてRipply3発現細胞の系譜解析を行った。

3) 咽頭弓形成と脳神経分化における、レチノイン酸シグナル(RA)とRipply3の遺伝的関係を明らかにするため、RAシグナル経路を操作した場合の表現型のRipply3の発現に制御について解析した。

4) Ripply3の作用機序を多面的に理解するため、胎生9.5~10.5日マウス胚から調整したcDNAライブラリーを用いてYeast Two-hybridシステムによりRipply3タンパク質と相互作用する遺伝子をスクリーニングし、それらの遺伝子について遺伝子改変マウスを作製し表現型を解析した。

4. 研究成果

1) 咽頭弓分節の異常を示す2つの遺伝子改変マウス(Tbx1ノックアウトとRipply3ノックアウトマウス)を用いて、脳神経の軸索伸長異常の関連性を解析した。Tbx1は、ヒトの先天性心疾患(DiGeorge症候群)の原因遺伝子で、一方Ripply3はTbx1の転写調節因子である。各ノックアウトマウスは、咽頭弓分節の表現型は異なるが、いずれも舌咽神経(IX)の軸索の伸長が大きく阻害された。特にRipply3ノックアウトマウス(新生仔:P0)の舌の有郭乳頭にはNeurofilament Mに染色される舌咽神経の軸索が投射していなかった(下図)。それが原因となり有郭乳頭の味蕾形成に異常が生ずることを明らかにし、原著論文として発表した(Okubo and Takada 2015)。



2) Ripply3発現細胞の分化の系譜を明らかにするため、マウスRipply3のプロモーター配列にcreをつないだトランスジェニックマウスとRosa26R-LacZマウスを交配させ、得られた胎仔において

lacZ染色を行った。その結果、epibranchial placode由来の神経節(VII, IX)および耳朶などが標識されたことから、Ripply3はpreplacode前駆細胞として初期のマーカーになることが示唆された。

3) レチノイン酸(RA)は催奇性因子として知られるが、RA シグナル関連遺伝子のノックアウトマウスの先行研究から、その表現型がRipply3 ノックアウトマウスの咽頭弓の表現型と類似することに加え、網羅的な遺伝子発現解析から、RA シグナルの下流にRipply3 が位置していることが予想された。

RAアゴニストATRAやRA受容体(RAR)の阻害剤BMS493をE7.5-9.5日に処理したマウス胚の解析を行った。その結果、ATRAやBMS493処理したE9.5日胚ではRipply3の顕著な発現変化は認められなかったが、BMS493処理により典型的な第3,4咽頭弓の分節異常と舌咽神経節の形成異常が観察された。しかしBMS493処理では、RAシグナルを完全に阻害できていない可能性があるため、レチノイン酸合成酵素Raldh2のノックアウトマウスをゲノム編集により新たに作製しRipply3の発現を解析した。その結果、E8.5-9.0日のRaldh2 KO胚では重篤な体節形成異常が観察され、咽頭弓領域ではRipply3の発現が顕著に低下することがわかった。

6kbのRipply3プロモーターにEGFPをつないだTgレポーターマウスを用いて、EGFPの発現に対するRAシグナルの影響について検討した。Pan-RAR阻害剤BMS493をE7.5日と8.5日に処理したE9.5日のレポーターマウス胚では、典型的な第3,4咽頭弓の分節異常に加え舌咽神経節の低形成が観察されたが、咽頭弓分節に伴うEGFPの発現低下はみられなかった。さらに、RA合成酵素Raldh2のKOマウスとレポーターマウスの複合変異マウスを作成し、EGFPの発現をE8.75日の同腹の野生型胚と比較したところ、Raldh2 KO胚では体節と咽頭弓形成に重篤な異常が観察されたが、EGFPの発現低下はみられなかった。以上の結果から、レポーターマウスに用いたRipply3のプロモーター領域は、咽頭弓分節に伴うRipply3の発現のON/OFFを制御する基本配列を含むが、RAシグナルの影響は受けないことが分かった。おそらくRAシグナルは未知の遠位のエンハンサーを介した制御にあると考えられた。

このように、Ripply3とRAシグナルはそれぞれ咽頭弓分節および舌咽神経節の形成に不可欠だが、マウスのRipply3の発現はアフリカツメガエルとは異なるメカニズムでRAを介した制御を受けている可能性が示唆された。本研究により、Ripply3の発現調節領域を絞り込むとともに、Ripply3とRAシグナルがそれぞれTbx1の働きを調節することで咽頭弓分節と舌咽神経節の形成を統御するという重要な知見を得た。

4) Ripply3 と相互作用する新たな因子を探索するため、Ripply3 を bait に E9.5-10.5 日胚の cDNA ライブラリーから Yeast-Two-hybrid スクリーニングを行い、いくつかの候補遺伝子が得られた。そのうち、まず Paxilin について解析を進めた。その結果、Paxilin は Ripply3 と協調し咽頭弓上皮細胞の接着性を制御している可能性が示唆された(Tsuchiya et al. 2018)。さらに、Ripply3 と相互作用する他の因子として Glyr1 の機能解析を進めた。各種生物の Glyr1 のアミノ酸配列において保存されたアミノ酸配列に対するポリクローナル抗体を作製し、培養細胞やマウス胚における局在を免疫染色により確認した。その結果、Glyr1 は核に存在することが明らかになった。また、Tbx1 の転写活性に対する Ripply3 の抑制作用を、Glyr1 は増強するが、Glyr1 単独での抑制作用は弱いことから、Glyr1 は転写調節において Ripply3 との何らかの協調的な作用があることが示唆された。

5) 以上本研究では、マウスの咽頭弓に特異的に発現する Ripply3 が舌咽神経節の形成に必須であること、さらに Ripply3 の咽頭弓特異的な発現調節機構、Ripply3 発現細胞の分化の系譜、Ripply3 と相互作用する新規遺伝子の機能を明らかにし、咽頭弓分節と舌咽神経発生の背後にある分子機構の一端を明らかにすることができた。近年ヒトの先天性心疾患において RIPPLY3 遺伝子に loss of function の変異が見つかってきており、DiGeorge 症候群を含めた先天性異常スペクトラムの発症機構や病態を遺伝子レベルで理解する上で、本研究成果はで重要な研究といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tadashi Okubo, Shinji Takada	4. 巻 244
2. 論文標題 Pharyngeal Arch Deficiencies Affect Taste Bud Development in the Circumvallate Papilla With Aberrant Glossopharyngeal Nerve Formation	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 874-887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/DVDY.24289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Osipovich AB, Long Q, Manduchi E, Gangula R, Hipkens SB, Schneider J, Okubo T, Stoeckert CJ, Takada S, Magnuson MA.	4. 巻 141
2. 論文標題 Insm1 promotes endocrine cell differentiation by modulating expression of a network of genes that includes Neurog3 and Ripply3	5. 発行年 2014年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 2939-2949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.104810.	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 -

1. 著者名 Tsuchiya Y, Mii Y, Okada K, Furuse M, Okubo T, Takada S	4. 巻 60
2. 論文標題 Ripply3 is required for the maintenance of epithelial sheets in the morphogenesis of pharyngeal pouches	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth, Differentiation	6. 最初と最後の頁 87-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12425	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9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Okubo T, Hara K, Kajiyama Y, Takada S
2. 発表標題 WRPW motif of Ripply3 is essential for the outflow tract formation
3. 学会等名 Weinstein 2018 Cardiovascular development and regeneration conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okubo T, Hara K, Kajiyama Y. Takada S
2. 発表標題 WRPW motif of Ripply3 is essential for the outflow tract formation
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuchiya Y, Okubo T, Mii Y, Takada S
2. 発表標題 Adapter protein Ripply3 is required for epithelial morphogenesis in the mouse pharyngeal pouch. 18th International Congress of Developmental Biology
3. 学会等名 The 18th congress of the International Society of Developmental Biologist (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okubo T, Hara K, Kano M, and Takada S
2. 発表標題 Ripply3 expressing cells give rise to epibranchial placode derived ganglia and vestibulocochlear ganglia
3. 学会等名 日本発生生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土屋凱寛、大久保直、三井優輔、高田慎治
2. 発表標題 Adaptor protein Ripply3 is required for epithelial morphogenesis in the mouse pharyngeal pouch
3. 学会等名 日本発生生物学会秋期シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tadashi Okubo, Shinji Takada
2. 発表標題 Lineage analysis of Ripply3 expressing cells during the mouse development
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 大久保直、土屋凱寛、高田慎治
2. 発表標題 咽頭弓分節化と胸腺形成の分子基盤の解明に向けて
3. 学会等名 第34回 日本胸腺研究会 ミニシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 土屋凱寛、大久保直、三井優輔、高田慎治
2. 発表標題 咽頭弓の分節化におけるscaffoldタンパク質WTIPの解析
3. 学会等名 第37回 日本分子生物学会総会
4. 発表年 2014年

1. 発表者名 Okubo T, Hara K, Azuma S, 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 日本発生生物学会年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----