

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840075

研究課題名(和文)非上皮系組織における平面内細胞極性因子の役割の解明

研究課題名(英文)The roles of planar cell polarity in non-epithelial tissues

研究代表者

橋本 昌和 (HASHIMOTO, Masakazu)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：60580496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：平面内細胞極性という上皮細胞においてよく研究されている経路を非上皮系の軟骨細胞においても機能し、その経路の因子の機能を壊したノックアウトマウスを作成すると、鼻低形成の表現系を得た。鼻の発生において、先端で分泌因子の Wnt5a が発現し、軟骨組織で平面内細胞極性因子である Prickle1 が発現していた。野生型マウスでは軟骨細胞は強い極性をもって左右に長い形態を示し収斂伸長様に鼻中隔軟骨を伸ばすが、上記ノックアウトマウスではその極性が失われ、同時に軟骨組織の伸長も失われていることがわかった。また、この極性には鼻の先端でのみ Wnt5a が発現し、勾配を形成することが大事であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We show that convergent extension-like cellular behavior in the nasal septum cartilage elongate the nasal process in proximodistal axis during the development of mice. While Wnt5a, a typical non-canonical Wnt ligand, is expressed in the distal tip of the nasal process, Prickle1, one of the planar cell polarity (PCP) core factor is expressed in the nasal cartilage. Mutant mice of these genes have short and wide snout as well as the deviated nasal septum due to the lack of the polarity of the chondrocyte of the nasal septum. Furthermore, the induced ubiquitous expression of Wnt5a also resulted in the nasal hypoplasia resulting from the chondrocyte polarity and orientation defects. These results suggest that the nasal cartilage senses the Wnt5a gradient along the proximodistal axis, and polarize the chondrocytes by a Prickle1-dependent manner for the convergent extension movement to form the long and thin nose in mammals.

研究分野：発生生物学

キーワード：平面内細胞極性 軟骨細胞 鼻 収斂伸長

1. 研究開始当初の背景

平面内細胞極性経路 PCP はハエの遺伝学によって関連分子の役割が調べられ、脊椎動物ではこれまでに左右を決定するノード繊毛の配向性も含めて、脊索伸長や神経管閉鎖などの初期発生の上皮組織において重要な役割を果たすことが明らかにされている。しかし、発生後期における役割、特に非上皮系である間葉系細胞や神経細胞における役割はまだ不明な点が多い。本研究開始までに、申請者は *in situ hybridization* 法により PCP 経路の上流に位置する Wnt5a が鼻の先端部に発現していること、ならびに Wnt5a の共受容体である Ror2 や PCP コア因子である Prickle1 (以下 Pk1) が胎生期の鼻中隔軟骨で発現することを明らかにした。哺乳動物の鼻の構造は胎生後期に形成される軟骨組織に依存している。最近、四肢の軟骨組織の伸長に PCP が関与することが報告されていた (Gao et al. *Dev. Cell* 2011)。Wnt5a ノックアウトマウス (以下、KO マウス) は既に報告されており、鼻を含めた顔面低形成を起こすことが知られているものの、その原因は詳しく解析されていない。申請者らは鼻伸長における PCP の役割を検証するため、新たに Pk1 の KO マウスを作製していた。このマウスはエクソン 6 を Cre-loxP システムによって欠損させる (以下 Pk1 Δ ex6) ことで、フレームシフトによって翻訳が 202 アミノ酸で停止する。Pk1 Δ ex6 ホモ変異 (以下、Pk1 Δ ex6/ Δ ex6) マウスはメンデル比通りに出生したが、生後間もなく死亡した。Pk1 の完全機能欠損型ノックアウトは胎生 6 日目においてエピブラストの頂端-基部極性の破綻によって原腸陥入異常が起こるため胎生期に致死となるので、この Pk1 Δ ex6 アレルは機能的に完全な欠損ではなく、ハイポモルフなアレルであることが示唆された。生後間もない Pk1 Δ ex6/ Δ ex6 マウスを詳細に解析した結果、上述の Wnt5a KO マウス同様、鼻や顎など顔面が低形成となっていることがわかっていた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで初期胚の平面内細胞極性の解析を通して得た知識や技術を活かし、間葉系組織のひとつである軟骨前駆細胞と鼻の形態形成を研究対象として解析し、細胞極性の協調による組織構築の仕組みを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

平面内細胞極性因子のひとつである Pk1 Δ ex6 ホモ変異体において形態形成に異常を示す組織を見出し、Wnt5a KO マウスなどと比較しながら、その細胞レベルでの原因を極性などに着目して解析をおこなう。

(1) 野生型において鼻の形態が発生過程においてどのように変化するかを組織学的に詳細に解析する。鼻原器が形成されはじめる胎生 10 日目からおおよその鼻の形態が完成

する出生直前の胎生 18 日目までの様々な時期において切片を作成し、軟骨前駆細胞のマーカーである Sox9 で免疫染色を行う。また、同時に、ファロイジン染色によって、細胞の形態がどのように変化していくかを検証する。染色した切片は共焦点顕微鏡により撮影する。さらに、BrdU 染色によって、細胞分裂の起こっている組織、時期を特定し、鼻の伸長にどのように寄与しているかを検証する。細胞形態の小さな変化もとらえられるよう、形態を定量的に評価する。具体的には細胞の面積、縦横比、細胞数を ImageJ を用いて解析する。鼻組織の伸長と鼻中隔軟骨組織の形態、および細胞レベルの形態変化にどのような関係性があるかを明らかにする。

(2) これまでのアルシアンブルー染色に結果から、Wnt5a や Pk1 の KO マウスでは鼻中隔軟骨組織が遠位近位軸に沿って、組織レベルで短く太くなることが明らかになったが、その細胞レベルでの形態変化を解析する。

軟骨細胞の形態はファロイジン染色により観察する。また、軟骨細胞の分化マーカーである Col2a1 の発現を調べることにより、軟骨細胞への分化を検証する。さらに BrdU 染色を行い、細胞増殖に異常がないかを検証する。これに関しても、微妙な変化もとらえられるよう、細胞の形態などを定量的に評価する。

(3) PCP にはいくつかのコア因子が知られている。このうち、蛍光免疫染色に使用可能な抗体を選出し、鼻中隔軟骨組織におけるタンパク質の局在を調べる。市販抗体の中で蛍光免疫染色に利用可能かどうかの評価は、PCP が働くことが既に知られているノードなどの上皮組織でおこなう。その後、使用可能な抗体を用いて、野生型における様々な時期において蛋白質の局在を調べるのみならず、Wnt5a KO や Pk1 Δ ex6/ Δ ex6 マウスにおいても同様の実験を行う。

(4) Wnt5a を Tet-on システムによって時期特異的に発現させるマウス (Amerongen et al. 2012) を用いる。Rosa26-rtTA-M2 と Tet0-Flag-Wnt5A のダブルトランスジェニックマウスに、胎生 10 日目に Doxycycline を投与し、Wnt5a を全身で発現させ、鼻の遠位近位に沿った濃度勾配を壊す。発現が実際にどう変化したかを Wnt5a の勾配が重要であると考えられる胎生 11~12 日目に *in situ hybridization* 法により確認する。この Wnt5a 全身発現マウスで軟骨組織および細胞の形態がどう変化しているかを、上記同様にアルシアンブルー染色およびファロイジン染色によって検証する。細胞の形態変化についても定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) 発生期における鼻中隔の軟骨組織が収斂伸長によって伸長することによって鼻が伸びることがわかった。この軟骨伸長は平面極性によって制御される脊索の伸長とよく

似ており、発生が進むに従い、細胞分裂をさほど伴わず、細胞が高度に極性化する形態変化によってもたらされることを明らかにした。(図1)

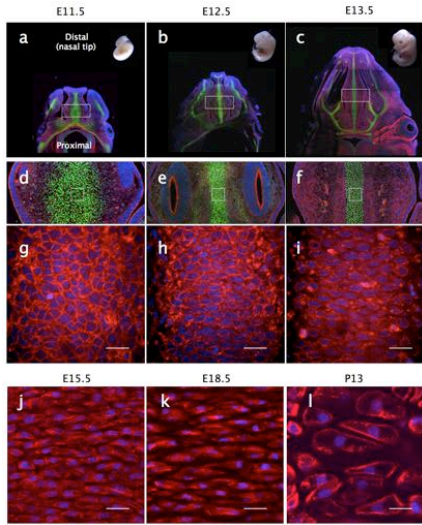
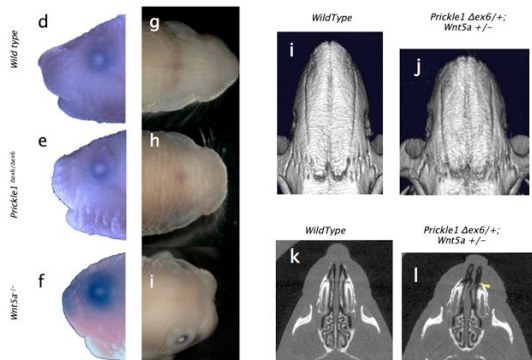


図1 発生過程における鼻中隔軟骨の極性

(2) Pk1 と Wnt5a それぞれのノックアウトマウスは鼻低形成を示し、またダブルヘテロマウスでは鼻中隔湾曲の表現系を示した。これは軟骨細胞の極性化が失われていることが原因であることを明らかにした。(図2)



(図2) Pk1, Wnt5a KO の新生児鼻の形態

(3) Prickle1 や Wnt5a ノックアウトでは細胞極性が失われており、また、PCP 因子の局在が乱れていることを明らかにした。(図3)

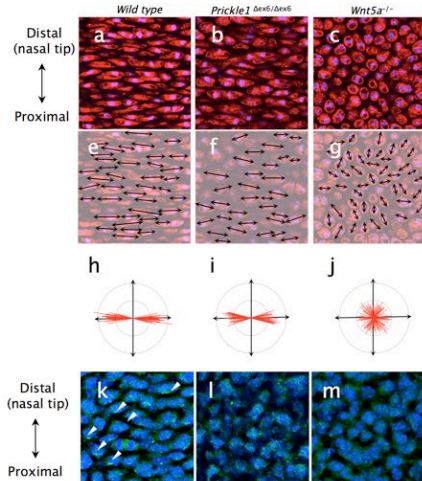


図3 WT, KO における細胞極性

(4) Wnt5a を全身で発現させた場合もノックアウトと同様に鼻中隔軟骨細胞の極性化が失われることから、Wnt5a の発現自身ではなく、その濃度勾配が重要であることを明らかにできた。(図4)

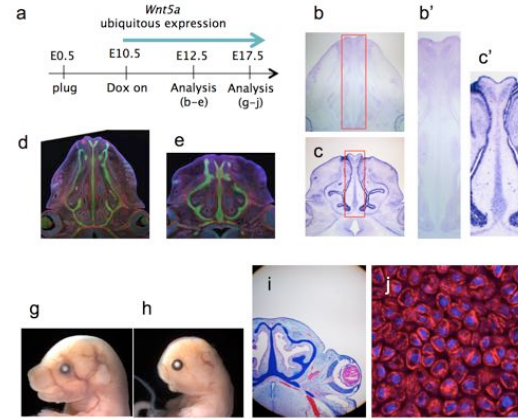


図4 Wnt5a 全身発現の表現系

以上のことから Wnt5a の勾配を受けた軟骨組織が平面極性因子依存的に細胞を極性化させ、鼻を伸長させていることを示唆している。本研究で明らかにした分子メカニズムによって、哺乳動物の様々な鼻の形態を説明することができるのではないかと期待している。

また、マウスゲノム編集を受精卵エレクトロポレーションによって簡便に効率良く行う手法も開発し、本研究のさらなる発展に寄与できる技術を確認することができた。(図5)

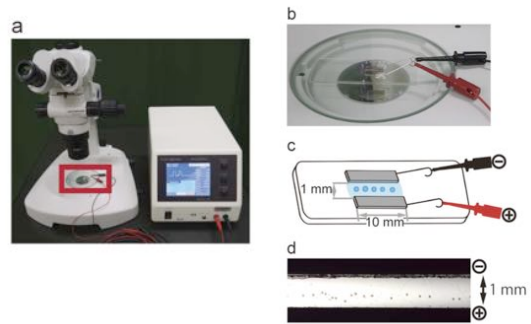


図5 受精卵エレクトロポレーション法

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)

Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome

editing

M Hashimoto, T Takemoto

Scientific reports 5, 11315, 2015, 査読有

Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse

M Hashimoto, Y Yamashita, T Takemoto

Developmental Biology 418 (1), 1-9, 2016, 査読有

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：Cas9 mRNAを哺乳動物の受精卵にエレクトロポレーションにより導入する方法

発明者：橋本昌和、竹本龍也

権利者：橋本昌和、国立大学法人徳島大学、株式会社ベックス

種類：特許

番号：特願 2015-031006

出願年月日：2015年2月19日

国内外の別：国内、国外

名称：Cas9タンパク質を哺乳動物の受精卵に導入する方法

発明者：橋本昌和、竹本龍也、音井威重、谷原史倫

権利者：国立大学法人大阪大学、国立大学法人徳島大学、株式会社ベックス

種類：特許

番号：特願 2016-074645

出願年月日：2016年4月1日

国内外の別：国内、国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 昌和 (HASHIOMOTO, Masakazu)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：60580496