

# 表皮前駆細胞の分化過程における Wnt シグナルの機能解析

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

吉田 千春

1) 研究目的 ; 将来の皮膚を構成する表皮前駆細胞(以後「表皮外胚葉」)は7.5日目胚(受精後7.5日)の胚性外胚葉由来の組織である。またこの時期の胚性外胚葉から、将来の神経細胞への運命決定もされる。一方、遺伝子操作技術を用いてWnt 経路を遮断させたマウスを作製したところ、表皮外胚葉の細胞系譜が減少し、代わりに神経細胞が過剰に産生される表現型が見られた。そこでこの表皮外胚葉・神経細胞の分化決定時に、Wnt 経路がどの様に関わっているのか検討を行った。ちなみに表皮外胚葉は、初期胚に一時的に見られる前駆細胞であり、また表皮外胚葉細胞自身、単層又は2層程度の細胞層であることから、その性質自身よく知られてはいなかった。そこで本研究において、マウス胚の表皮外胚葉の特性を理解し、さらにその運命決定時に関わる分子機序を明らかにすることを目標に研究を遂行した。

2) 方法;

2)-1; Dkk1, Wnt8A 遺伝子過剰発現マウスの作製; カノニカルWnt 経路拮抗因子である *Dickkopf* (*Dkk1*)遺伝子、並びにカノニカルWnt リガンドの一つである*mWnt8a*遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。具体的には、恒常的に発現するCAGプロモーター下にマウス*Dkk1* cDNA遺伝子を連結し、遺伝子改変マウスを作製した (Kimura-Yoshida *et al.*, 2005)。その際、過剰発現状態だと胚性致死となる可能性があるため、cDNAの前に loxP 配列によって挟まれた*lacZ* 遺伝子を入れることによって、Creタンパク存在下で初めて過剰発現するコンストラクトとした。同様なストラテジーによって、*Wnt8A* 遺伝子過剰発現マウスも作製した。

2)-2; 表皮外胚葉特異的な遺伝子の同定; 着床後8日目頃の表皮外胚葉特異的に発現するマーカー因子はあまり知られていない。そこで、野生型胚の表皮外胚葉と、前脳神経上皮のそれぞれの細胞から mRNAを回収し、DNAマイクロアレイを行うことによって表皮外胚葉で優位に発現する遺伝子群を同定した。これらの組織の回収には、8.25日目の野生型胚を母胎から取り出し、その後トリプシンなどの酵素処理によって、表皮外胚葉細胞と神経上皮細胞に分けた。最後に、得られた因子が表皮外胚葉特異的に発現する因子であるかどうか、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認を行った。

2)-3; Dkk1 遺伝子欠損マウスの表現型解析; *Dkk1*遺伝子欠損マウスは既に報告があり、前脳欠損、多肢などの異常により胚性致死となる (Mukhopadhyay *et al.*, 2001)。そこで、表皮外胚葉と神経上皮の運命決定時に、Wnt経路が関わっているのかどうかさらに検討を行うために、*Dkk1*遺伝子欠損マウスを用

いて検討を行った。*Dkk1* 遺伝子欠損マウスは、Christof Nihers 博士から共同研究にて分与して頂いた。

2)-4: 走査型・透過型電子顕微鏡解析 ; 8.25日目の胚を回収し、2% GA + 2% PFA/リン酸カリウム緩衝液で固定後、(株)花市電子顕微鏡技術研究所にて撮影した。

### 3) 結果

3)-1; *Dkk1* 遺伝子過剰発現マウスの解析; *Dkk1*遺伝子過剰発現マウスでは、前脳領域のみが拡大し、さらにその後四肢形成不全が見られ胚性致死となることがわかった (Mukhopadhyay *et al.*, 2001)。四肢の形成不全に関しては、*Dkk1*遺伝子変異胚で多肢となる報告もあることから、今回作製されたトランスジェニックマウスが*Dkk1*遺伝子の過剰状態であることを示唆している。さらに組織学的解析により、神経上皮細胞と表皮外胚葉に形態的な異常が見られることがわかった。具体的には、野生型胚の表皮外胚葉では単層若しくは2層で構成されているのに対し、*Dkk1*遺伝子過剰発現マウスの表皮外胚葉層では多層化し、かつ、神経マーカーが異所的に発現していることがわかった。さらに、電子顕微鏡にて観察を行った結果、*Dkk1*遺伝子過剰発現胚の表皮外胚葉と神経上皮細胞層の境界が不明瞭となり、また境界付近には神経上皮と表皮外胚葉との中間的な細胞群が存在していることも明らかとなった。このことから*Dkk1* 遺伝子過剰発現マウスでは、表皮外胚葉の細胞運命決定が、より神経上皮細胞へと転換していることが示唆された。

3)-2; *Wnt8A* 遺伝子過剰発現マウス胚と*Dkk1* 遺伝子欠損マウス胚の表現型の解析; 先ほどの*Dkk1* 遺伝子過剰発現マウスの表現型をさらに確認するために、逆にカノニカルWnt経路のリガンドである*Wnt8A* 遺伝子の過剰発現、さらに*Dkk1*遺伝子欠損マウスを用いた表現型解析を行った。ちなみに、これらのマウスではいずれもカノニカルWnt経路が過剰に入力されている状態である。まずこれらのマウスの外見上の異常では、前脳領域が欠損していることがわかった。さらに、これらマウスに対して表皮外胚葉のマーカー (*Ap2.2*遺伝子)で発現解析を行った結果、発現レベルが亢進しており、逆に神経マーカーの発現低下が見られた。

これまでの結果から、カノニカルWnt経路を過剰にするとより表皮外胚葉細胞へ、またカノニカルWnt経路を遮断すると神経細胞へと運命決定が傾くことが示された。

3)-3; 表皮外胚葉特異的な遺伝子、*Grainyhead-like (Grh)*ファミリー遺伝子の発現解析; 野生型胚の表皮外胚細胞と前脳神経上皮細胞とのマイクロアレイによって、表皮外胚葉組織でより優位に発現していると予測される、396遺伝子が同定された。これらの遺伝子の中で、既に報告されている文献と、遺伝子欠損マウス等の報告、さらに進化上表皮 (epidermis)の発生に関与していることが知られている因子などを優先的にクローニングし、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって発現解析を行った。結果、ショウジョウバエの *Grainyhead*遺伝子のマウス相同遺伝子 *Grhl-2, -3* 遺伝子に着目した。この *Grhl2*遺伝子を用いて発現解析を行うと、7.8日目胚のより吻側の表皮外胚葉と神経上皮細胞層の境界領域に強い発現が

見られた。一方で、*Grhl-2*遺伝子のファミリー遺伝子である*Grhl-3*遺伝子は、先ほどの*Grhl-2*遺伝子とは違い、より尾側の表皮と神経の境界領域で発現が見られた。さらに、これら遺伝子を上記に示した遺伝子改変マウス(*Dkk1*遺伝子過剰発現マウス、*Wnt8A*遺伝子過剰発現マウス、*Dkk1*遺伝子欠損マウス)に対して発現解析を行った結果、*Grhl-2*遺伝子においてはいずれの変異胚でも発現に変化は見られなかったが、*Grhl-3*遺伝子の発現は*Wnt8A*遺伝子過剰発現胚、さらに*Dkk1*遺伝子欠損マウス胚において、吻側まで異所的に発現していることがわかった。このことは、より表皮へと優位に分化転換している理由は、*Grhl-3*遺伝子の発現がより亢進しているからかもしれない。

#### 4) 考察

これまで哺乳動物における胚性外胚葉から神経細胞と表皮外胚葉への運命決定に必要な分子機序は全く解明されていなかった。しかし以上の結果から、マウス胚におけるこれら運命決定にカノニカルWntシグナルのバランスが重要であることが示唆された。さらにマイクロレイによって同定された遺伝子、*Grhl*遺伝子ファミリーがこの運命決定にWnt 経路の下流で働いている可能性が考えられる。ちなみに*Grhl-3*遺伝子は、野生型胚で表皮外胚葉・表皮で強く発現するにも関わらず、遺伝子欠損マウスでは神経の形成不全により神経管閉鎖不全を起こす原因遺伝子とされている (*curly tail*遺伝子変異マウス; Ting *et al.*, 2003; Gustavsson *et al.*, 2008)。このことは*Grhl-3*遺伝子欠損によって生じた表皮の何らかの異常が隣接する神経上皮の形態異常を引き起こしているのかもしれない。また、この可能性を支持する報告として、ニワトリを用いた除去実験では、表皮をはがした胚では神経管閉鎖不全を起こすことが知られている。

さらに、今回は表皮外胚葉と神経上皮との運命決定は、カノニカルWnt経路の伝達によって制御されており、このシグナルのバランスが崩れることによっていずれかの細胞系譜へと決定されることが予想された。このWnt経路の下流で働く因子として*Grhl*ファミリーが候補として考えている。*Grhl*ファミリー遺伝子はCP2モチーフを持った転写因子であり、マウスでは*Grhl-1*から*-3*まで存在している (Traylor-Knowles *et al.*, 2010; Auden *et al.*, 2006)。これら遺伝子が哺乳動物の初期胚でどのような機能を持っているのか依然不明な点が多い。今後、表皮外胚葉の運命決定にこの*Grhl*遺伝子群が関わっているのか、またそうであるならばどの様に働いているのか検討を行う予定である。現在行っている実験としては、*Grhl*遺伝子群の過剰発現マウスを作製することを予定している。もしこれら*Grhl*遺伝子過剰発現マウスで、表皮外胚葉優位となるような表現型が見られるのであれば、*Grhl*遺伝子群はマウス胚における表皮外胚葉への分化決定をする「マスター遺伝子」のような働きを持つことを意味する。また、カノニカルWnt 経路の下流でこれら遺伝子らが制御されているのかどうか転写制御領域の解析も行う予定である。

今後、以上に示した研究を進めることにより、未分化状態から表皮への運命決定に必須なプログラムを同定し、将来的にはiPS細胞から表皮へと運命決定に必須な因子を同定出来ることを期待している。

#### 5 参考文献

Auden, A., J. Caddy, T. Wilanowski, S. B. Ting, J. M. Cunningham, and S. M. Jane. (2006). Spatial and temporal expression of the *Grainyhead*-like transcription factor family during murine development. *Gene. Exp. Patt.* **6**, 964-970.

Gustavsson, P., A.J. Copp, and N.D.E. Greene. (2008) Grainyhead genes and mammalian neural tube closure. *Birth Defects Research (partA)* **82**, 728–735.

Kimura–Yoshida C., H. Nakano., D. Okamura., K. Nakao, S. Yonemura, J. A. Belo, S. Aizawa, Y. Matsui, and I. Matsuo. (2005) Canonical Wnt Signaling and its antagonist regulate anterior–posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm. *Dev. Cell*. **9**, 639–650.

Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, C. Rosriguez–Esteban, L. Chen, T, Tsukui, L. Gomer, D.W. Dorward, A. Glinka, A. Grinberg, S.P. Huang, et al. (2001) Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* **1**, 423–434.

Ting S.B., T. Wilanowski, A. Auden, M. Hall. A. K. Voss, T. Thomas, V. Parekh, J. M. Cunningham and S. M. Jane. (2003) Inositol–and folate–resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial–specific factor Grhl–3. *Nat. Med.* **9**, 1513–1519.

Traylor–Knowles, N., U. Hansen, T. Q. Dubuc, M. Q. Martindale, L. Kaufman, and J. R. Finnerty. (2010) The evolutionary diversification of LSF and Grainyhead transcription factors preceded the radiation of basal animal lineages. *BMC Evo. Biol.* **10**.