

氏 名 篠塚 琢磨

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2090 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 神経管発生過程で伸長した Wnt 産生細胞は神経前駆細胞
の増殖を促進する

論文審査委員 主 査 教授 藤森 俊彦
教授 高田 慎治
教授 東島 眞一
教授 山口 良文 北海道大学
低温科学研究所

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 篠塚 琢磨

論文題目 神経管発生過程で伸長した Wnt 産生細胞は神経前駆細胞の増殖を促進する

(Wnt-producing cells stretched in the developing neural tube promotes proliferation of neural progenitor cells)

Intercellular signaling regulates proliferation and differentiation of cells as well as regionalization of tissues during development. In these processes, the mechanisms underlying secretion of signal proteins in the producing cell and intracellular transduction of signals in the target cell have been well studied. On the other hand, the distribution of signal proteins in the developing tissues still remains unclear.

One of the important points that should be considered for understanding the regulatory mechanisms of intercellular signaling is the positional relationship between cells that produce signal proteins and those receive them. Since cells often change their morphology and relative position to neighboring cells during development, these changes possibly regulate intercellular signal transduction. However, it also remains unclear whether and how morphological change of cells affects transmission of intercellular signaling proteins to target cells.

In this study, I focused on Wnt proteins, which are secreted from the roof plate cells, and their signaling during mouse spinal cord development. In the early development of vertebrate spinal cord, the roof plate acts as an organizing center. *Wnt1* and *Wnt3a*, which are specifically expressed in the roof plate, play roles in the regulation of cell proliferation and specification in the dorsal spinal cord. After mid-gestation, the morphology of the spinal cord dynamically changes with reduction of lumen. Interestingly, roof plate is stretched in zebrafish during this morphological change. This finding suggests that Wnt producing roof plate cells changes their morphology and

morphological change of signal producing cells may affect to regulation of signal target cell. However, the expression and the role of Wnt in the later development of the spinal cord remain unclear.

First, I analyzed distribution of Wnt protein during the mouse spinal cord development. To visualize the Wnt protein *in vivo*, I performed immunohistochemistry for Wnt1 and Wnt3a, and generated *egfp-Wnt3a* knock-in mice. In the early development of the spinal cord, Wnt proteins localized in most dorsal region, roof plate. Of note, in later, the distribution of Wnt protein dynamically changed and elongated along the dorso-ventral axis accompanied by reduction of lumen. With this elongation of the Wnt producing cell, activating region of Wnt/ β -catenin signaling is expanded. Interestingly, after elongation of the roof plate, Wnt/ β -catenin signaling is strongly activated in the cells surrounding reduced lumen adjacent to tip of elongated Wnt localizing area. In addition, sparsely labeled experiment of roof plate cells and observation by electron microscopy revealed that each roof plate cell extended cell protrusion and ventral tip of the cell protrusion reach to the reduced luminal surface. These results suggest that elongated roof plate maintains Wnt protein expression and these signals act in roof plate and luminal cells.

Next, to reveal the Wnt/ β -catenin signaling from the elongated roof plate cells, I specifically inhibited secretion of Wnt protein in the roof plate. I conditionally inactivated *Wls*, which is essential for the secretion of Wnt proteins. Analysis of *Wls* cKO mice revealed that Wnt proteins, which secreted from roof plate cells, are required for proper elongation of roof plate. During the elongation, each roof plate cell rearranged along the dorso-ventral axis in normal embryos, but it was disturbed in *Wls* cKO embryos. In addition, I found that activation of Wnt/ β -catenin signaling in the cells surrounding the reduced lumen is significantly reduced in the *Wls* cKO embryos. The analysis of the cell proliferation revealed that the number of proliferating cells in luminal cells is significantly reduced in *Wls* cKO embryos. These results suggest that

elongation of roof plate cells enabled Wnt/ β -catenin signaling to be transmitted from the roof plate to the luminal cells and promote cell proliferation of the luminal cells. In addition, in response to spinal cord injury in the adult mice, I found that inhibition of Wnt secretion from the roof plate causes significant decrease in the number of proliferating neural progenitors, which are located around the reduced lumen.

Here, I showed that Wnt-producing roof plate cells change their morphology and Wnt/ β -catenin signaling is activated and plays a role in the luminal cells, which are considered to possess a potential of neural progenitor cells, in later spinal cord development. Since the cells in the luminal cells originally exist in the ventral spinal cord, these data suggest that target cells of Wnt/ β -catenin signaling change from dorsal spinal cord to neural progenitor cells accompanied by elongation of the roof plate cells. Thus, dynamic morphological change of producing cells, which express secreted signaling proteins, can cause a shift of signal target cells and generate a new role of signal-producing cells.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 篠塚 琢磨Title
論文題目 神経管発生過程で伸長した Wnt 産生細胞は神経前駆細胞の増殖を促進する

分泌性シグナルタンパク質を介した細胞間のシグナル伝達の制御機構の解明は、発生現象を理解するうえで重要な問題である。しかし、細胞間シグナル伝達が発生過程で空間的にどのように制御されるのかについては未だ十分には理解されていない。特に、申請者が注目した脊椎動物の Wnt タンパク質の場合、組織免疫染色に成功した例はほとんどなく、Wnt シグナルの空間制御についての研究は進んでいなかった。

そこで、申請者は脊髄神経管をモデルに Wnt タンパク質の空間分布を観察する方法を検討した。発生初期の脊髄神経管では、もっとも背側に位置する roof plate で *Wnt1*, *Wnt3a* が発現し、分泌されてタンパク質の濃度勾配を形成することで背腹軸に沿ったパターン形成を行うものと考えられてきた。申請者は、免疫組織染色の方法等を検討することにより *Wnt1* と *Wnt3a* タンパク質の空間分布を再現性良く検出することを可能にするとともに、*EGFP-Wnt3a* ノックインマウスを作成し、より高感度に *Wnt3a* タンパク質を可視化することに成功した。予想された通り、発生初期では *Wnt3a* タンパク質は濃度勾配を形成して分布していた。一方で、これまで roof plate における Wnt の発現が報告されていなかった 13.5 日胚以降においても *Wnt3a* タンパク質は検出され、しかも正中に沿って腹側へと伸びるように分布していた。Roof plate 細胞をモザイク状にラベルする実験から、13.5 日胚以降では単一の roof plate 細胞が変形し、正中に沿って伸長することが明らかになるとともに、電子顕微鏡画像の解析から伸長した細胞の先端は、中心管と呼ばれる脊髄神経管の中心部にある管腔にまで達していることが見出された。このことから、発生後期の脊髄神経管では、Wnt 産生細胞である roof plate 細胞そのものが形態変化することにより、Wnt タンパク質が遠く離れた中心管の周りの細胞(上衣細胞)にも伝達されるという考えに至った。

シグナルの伝達距離が細胞の形態変化によって大きく変化するという仕組みは、シグナルの空間制御においてこれまで提唱されていなかったことから、申請者はその検証を行うことにした。まず、roof plate 細胞依存的に上衣細胞で Wnt シグナルが活性化されるかを明らかにするために、roof plate 細胞特異的に、Wnt の分泌に必須な *Wls* を欠損する *Wls* cKO マウスの解析を行った。コントロール胚では上衣細胞で Wnt シグナルが活性化されていたのに対して、*Wls* cKO 胚においては Wnt シグナルが活性化されている上衣細胞の割合が有意に減少した。これらの結果から、上衣細胞における Wnt シグナルの活性化は、伸長した roof plate 細胞から分泌された Wnt タンパク質依存的に起こることが示唆された。さらに、上衣細胞において Wnt シグナルが活性化されることの意義を明らかにするため、細胞の増殖を解析したところ *Wls* cKO 胚では上衣細胞の細胞増殖が有意に低下していた。上衣細胞は脊髄神経管の神経前駆細胞/幹細胞を含むことが知られていることから、

伸長した roof plate 細胞から分泌された Wnt 依存的に神経前駆細胞/幹細胞の増殖が制御されることが示唆された。

これらの研究結果より、発生過程の細胞間シグナル伝達において、産生細胞が変形することによって新たな受容細胞との接触が生まれ、遠く離れた細胞にまでシグナルを伝達することが可能となると結論された。この成果は細胞間シグナルの新たな伝達方法を提唱するものであり、内容の主要部分をまとめた論文は国際誌に受理されている。申請者の論文は博士論文に十分相応しいものであると審査員全員一致で結論した。

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.