

氏 名 畠山 宙大

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2437 号

学位授与の日付 2023 年 6 月 30 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 Wnt リガンドを用いた細胞間コミュニケーションは、細胞の集団
における Wnt シグナルのばらつきを減少させる

論文審査委員 主 査 東島 眞一
基礎生物学コース 教授
高田 慎治
基礎生物学コース 教授
藤森 俊彦
基礎生物学コース 教授
佐々木 洋
大阪大学大学院生命機能研究科 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏 名 畠山 宙大

論文題目

Wnt リガンドを用いた細胞間コミュニケーションは、細胞の集団における Wnt シグナルのばらつきを減少させる

(Intercellular exchange of Wnt ligands reduces cell population heterogeneity)

Cells are the smallest units that constitute the body of an organism, and these cells come together to form a collective property. Various types of cell populations exist in vertebrate embryogenesis, but the environment surrounding these populations is continually changing. Cells must respond to these changes, sometimes robustly and sometimes flexibly. In such cases, cells might respond to the situation individually or they might communicate and respond collectively. However, how they communicate within the group is not well understood.

If they respond as a group, various possible ways of intercellular communication are assumed. In this study I focused on the possibility that intercellular communication using secreted signaling proteins may be involved in cell-to-cell communication within a cell population. A communication using secretory signaling proteins has been studied for a long time, but secretory and receptor cells have been separable in most cases. In contrast, in some cases when collective response takes place, individual cells in a population may communicate within the population by exchanging secreted signals from each other. Is such communication actually occurring, and if so, how is it reflected in the properties of the cell population?

To address this question, I examined intercellular communication through Wnt ligands in cell populations. To this end, I analysed Wnt-mediated communication in epiblasts located caudally in the mouse embryo during body axis elongation. The body axes of vertebrate embryos elongate through the continuous generation of cells from

progenitor cells, which are located at the posterior end of the embryo, called the epiblast. Lineage analysis has shown that some of these progenitor cells, called "Neuro-Mesodermal Progenitors" (NMPs), give rise to both neural and paraxial mesoderm cells. Importantly, NMPs and surrounding epiblast cells secrete Wnt ligands and simultaneously receive them. In such cases, non-cell-autonomous communication within the population may be established by the secretion and acceptance of secretory signals by cells to each other, while cell-autonomous activation may also occur within individual cell. Therefore, I attempted to separate cell autonomous and non-cell-autonomous functions.

For this purpose, I decided to generate knock-in mouse embryos, in which Wnt3a ligand retains cell-autonomous function but lost its non-cell autonomous function. In this study, I designed a membrane-tethered artificial Wnt ligand, by fusing mouse Wnt3a to human Frizzled5. In cultured cell experiments, this membrane-tethered Wnt3a retained its cell-autonomous function but lost its non-cell autonomous function, as expected. Membrane-tethered Wnt3a homozygous embryos (Wnt3a-Fzd5 embryos) showed morphological abnormalities. Previous studies have shown that NMP is maintained depending on the Wnt signaling, and body axis elongation is arrested depending on the degree of reduced function. In these embryos, although Wnt3a-Fzd5 fusion ligand retains full signaling activity in in vitro assay, the neural tube failed to close posterior to hindlimb and the tail was thin and short. Furthermore, in these embryos, NMP was reduced, but maintained until the stage just before tail elongation ceases. These results suggest that the phenotypes in Wnt3a-Fzd5 embryos cannot be explained by a simple reduction in Wnt activity, and are probably due to a loss of non-cell autonomous function.

To further examine this Wnt3a-Fzd5 phenotype, Wnt signaling in Wnt3a-Fzd5 embryos was analysed at the single-cell level using Wnt reporter mice. Interestingly, even in wild-type embryos, there are cells with strong and weak Wnt signaling within

the NMP. The heterogeneity of Wnt signaling was even stronger in Wnt3a-Fzd5 embryos. These results suggest that the non-cell autonomous function of Wnt3a has a role in reducing the heterogeneity of Wnt activity within a cell population.

Interestingly, the heterogeneity in Wnt signaling in the NMP region in Wnt3a-Fzd5 embryos increased specifically after somites are developed. Since retinoic acid (RA), which is synthesised in somites, inhibits Wnt function in epiblasts, I assumed that Wnt3a-Fzd5 embryos may be more sensitive to RA signaling. To examine this possibility, pregnant female mice were treated with RA and Wnt signaling in Wnt3a-Fzd5 embryos was monitored. The results show that RA was specifically affected in Wnt3a-Fzd5 embryos for body axis elongation and Wnt signaling activity in the epiblast, suggesting that Wnt-mediated intercellular communication confers robustness to external stress, such as RA.

Taken together, these results suggest that intercellular communication using Wnt ligands in NMP cell populations reduces the heterogeneity of Wnt signaling and provides robustness to cell populations against external stresses such as RA. This study reveals the molecular basis underlying of secretory signaling in cell populations and provides new ideas about its role in the maintenance of cell populations.

Results of the doctoral thesis screening

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 島山 宙大

Title
論文題目 Wnt リガンドを用いた細胞間コミュニケーションは、細胞の集団における
Wnt シグナルのばらつきを減少させる

多細胞集団が秩序を持って発生・維持されていくためには、細胞間の情報伝達が必要であると考えられる。そのような情報伝達には、Wnt などの液性のシグナル因子が関わるものと考えられているが、集団内の個々の細胞間における Wnt の相互交換が多細胞集団の発生や維持に本当に必要なのか、必要であるとすればどのような役割を果たすのかという点は未だほとんど解明されていない。その大きな理由は、集団内におけるシグナルの機能から相互交換によって担われる機能を切り分ける方法論がこれまでに無かったことにある。

申請者はこの問題に対して、体軸伸長期の尾芽の細胞集団で発現する Wnt3a に注目し、相互交換による機能のみを欠落させた変異体マウスを作成することによりアプローチした。この細胞集団は、マウスの体幹部と尾部を将来形成する細胞のもととなる前駆細胞からなる集団であり、Wnt3a はその維持に必要であることが先行研究により明らかになっている。具体的には Wnt3a の C 末端に受容体である 7 回膜貫通タンパク質の Frizzled5 を結合させた融合タンパク質をコードする遺伝子を内在性の Wnt3a と置換したノックインマウスを作成した。この融合タンパク質は、十分な Wnt シグナル活性を有するものの、周囲の細胞に対して働きかける機能、すなわちパラクライン作用を完全に失っていた。興味深いことに、このノックインマウスにおいては体軸の伸長過程の途中から尾芽の前駆細胞の数が急激に低下したが、少数の前駆細胞は体軸伸長期を通じて維持され続け、結果として後肢より後方では尾が細長く貧弱な構造になっていた。尾芽の前駆細胞集団の個々の細胞における Wnt シグナル活性をシングルセルレベルの空間分解能を持つレポーターマウスを用いて解析した結果、ノックインマウスではコントロールに比べて細胞間での Wnt シグナル活性のばらつきが大きくなっており、Wnt3a の相互交換によって細胞間の Wnt シグナルの活性格差が緩和されていることがわかった。さらに、レチノイン酸は前駆細胞集団の外部で産生されこの集団内の Wnt シグナル活性を低下させることが知られているが、ノックインマウスの前駆細胞集団は、レチノイン酸への抵抗性が低いことが明らかになり、Wnt3a の相互交換によって前駆細胞集団は外部からのストレスに対してより頑強になるものと考えられた。

以上の研究成果は、細胞集団内部でのシグナルの相互交換が、集団の均一性並びに頑強性を高める役割を担う事を示しており、細胞集団内部におけるシグナルの相互伝達の意義を実験的に初めて明らかにしたものとして評価できる。また、本論文の主たる内容は既に国際誌に掲載されており、当該分野の研究者からも評価されている。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。