

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

生命科学研究科 基礎生物学専攻
畠山 宙大

目次

概要.....	3
序論.....	6
集団はコミュニケーションにより維持される	6
細胞間コミュニケーションの種類と方法.....	6
シグナル性分泌タンパク質 Wnt について	7
神経中胚葉前駆細胞” (Neuro-Mesodermal Progenitors : NMP) について	8
NMP 細胞を維持する分子ネットワーク	9
Wnt3a のパラクラインシグナルの重要性	10
材料と方法.....	11
マウス	11
WNT3A-FZD5 発現用プラスミドの作製.....	11
細胞培養とトランスフェクション.....	11
ウエスタンブロッティングおよびルシフェラーゼレポーターアッセイ	12
<i>Wnt3a-Fzd5</i> ノックインマウスの作製	12
<i>In situ</i> hybridization	13
免疫染色	14
DAPI 染色	14
レチノイン酸処理	14
Wntvis レポーターの検出	15
画像処理と統計処理.....	15
PCR とプライマー	15
結果.....	17
FRIZZLED5 と融合した WNT3A はシグナル伝達活性を持つがパラクライン活性はない	17
<i>Wnt3a-Fzd5</i> ホモ接合体胚では体軸の伸長が損なわれているが部分的に維持される	18
<i>Wnt3a-Fzd5</i> ホモ接合体胚の神経・体節形成の異常は Wnt 陽性前駆細胞に由来する	20
<i>Wnt3a-Fzd5</i> ホモ接合体の表現型は、パラクライン活性を失ったことに起因する	23
<i>Wnt3a-Fzd5</i> ホモ接合体胚では NMP 細胞は減少するが維持されている	26
<i>Wnt3a-Fzd5</i> ホモ接合体胚では少数のエピブラストの細胞で Wnt 活性が持続する	28
レチノイン酸は <i>Wnt3a-Fzd5</i> ホモ接合体胚の表現型を増強する	33
考察.....	35
謝辞.....	38
引用文献.....	39

概要

細胞は多細胞生物の体を構成する最小単位であり、これらの細胞は集まって集団としての性質を有するようになる。脊椎動物の胚発生の中では様々な種類の細胞集団が存在するが、これらの集団を取り巻く環境は目まぐるしく変化する。細胞はこのような変化に時には強固に、時には柔軟に対応し続けなければならない。その際、細胞は個別に状況に対応するのか、あるいはコミュニケーションを取り集団として対応するのか、また集団として対応する場合、どのように集団内でコミュニケーションを取るのか、といった問題は十分には理解されていない。

集団として対応する場合、細胞間コミュニケーションには様々な方法が想定されるが、本研究では分泌シグナルタンパク質を用いた細胞間コミュニケーションが、細胞集団内における細胞同士のコミュニケーションに関わる可能性について着目した。分泌性シグナルタンパク質を用いたコミュニケーションは古くから研究されてきたが、シグナルを出す分泌細胞とそれを受け取る細胞は区別して扱われることがほとんどであった。それに対して、集団内の各々の細胞が分泌シグナルを産生しあい、それを受容しあうことによって集団内のコミュニケーションを行うようなことも予想される。実際にそのようなコミュニケーションが起きているのか、また起きているとしたらそれは細胞集団の持つ性質にどのように反映されるのだろうか。

この問題にアプローチするため、私は細胞集団内における Wnt リガンドに着目し、体軸伸長期のマウス胚の尾側に位置するエピブラストで発現する Wnt について解析を行った。脊椎動物の胚の体軸は、体幹や尾部の組織を構成する細胞が前駆細胞から連続的に生成されることで伸長していく。このような前駆細胞は、胚の後端にあるエピブラストと呼ばれる領域に存在する。近年の系統解析の結果この前駆細胞の中には神経系と傍軸中胚葉系の両方の細胞を生み出すものがあることがわかった。このような2つの分化先を持つ前駆細胞は、“神経中胚葉前駆細胞”(Neuro-Mesodermal Progenitors : NMP) と呼ばれる。NMP 細胞は体節形成の開始直前に出現し、体軸の伸長が終了するまで維持される。重要なことは、NMP とその周辺のエピブラストの細胞は Wnt リガンドを分泌すると同時に、それを受容し Wnt シグナルが活性化されているという点である。このような場合、細胞同士がお互いに分泌シグナルの分泌と受容を行うことによって細胞非自律的に集団内のコミュニケーションが確立されている可能性がある一方で、細胞が分泌したシグナルにより自身を細胞自律的に活性化している可能性がある。そこで、本研究では細胞自律的機能と細胞非自律的機能を実験的に区別することによって、分泌シグナルを介した細胞非自律的な集団内のコミュニケーションの意義を理解することを目的とした。

そこで私は細胞自律的機能は保持するが細胞非自律的機能を失った Wnt3a リガンドを作製しマウスにノックインすることにした。そのために、膜結合型人工 Wnt リガンド(マウス Wnt3a と Wnt リガンドの膜結合型受容体であるヒト Frizzled5 を融合したもの)をデザ

インした。この膜結合型 Wnt3a は培養細胞の実験において予想通り、細胞自律的機能は保持されていたが、細胞非自律的機能を失っていた。また、培養液中にこの人工リガンドが検出できないことから、拡散することができない受容体結合型として存在していることが示唆された。この膜結合型 Wnt3a をマウスにノックインしたところヘテロ接合体胚の形態に異常は認められなかった。一方、膜結合型 Wnt3a ホモ接合体胚(Wnt3a-Fzd5 胚)は後肢より後方で形態異常を示した。後肢より後ろの神経管は閉鎖不全を起こし、尾は細く短くなっていた。また Wnt3a-Fzd5 胚において NMP を検出したところ、細く短い尾の先端に僅かに存在しており、このような NMP は尾の伸張が止まる直前のステージまで維持された。これまでの先行研究により、Wnt シグナルの強さに依存して NMP は維持されており、Wnt3a のノックアウト胚や Wnt3a 機能が低下したハイボモルフ胚では、機能低下の度合いに応じて体軸の伸長が途中で停止する。これに対して Wnt3a-Fzd5 胚では、尾の先端まで体軸を伸長させるのに十分なシグナル活性があることが培養細胞を用いた実験で示されたにも関わらず、後肢より後方の発生に大きな異常が見られた。その一方で、NMP は体軸伸長期の途中より減少するものの維持され続け、尾も細く貧弱にはなるものの体軸伸長が停止する胎生 12 日胚までは停止しなかった。以上の結果から、Wnt3a-Fzd5 胚における異常は、単なる Wnt 活性の低下では説明できないものであると考えられ、おそらく細胞非自律的機能を失ったことによることが示唆される。

この Wnt3a-Fzd5 胚の異常をさらに解析するために、次に Wnt レポーターマウスを用いて Wnt3a-Fzd5 胚における Wnt シグナルを単細胞レベルで解析した。興味深いことに NMP を含むエピブラストの領域において、野生型胚においても Wnt シグナルはある程度ばらついて検出された。このことは野生型胚においても、NMP 内で Wnt シグナルが強い細胞と弱い細胞が存在することを示した。このようなばらつきは Wnt3a-Fzd5 胚においてはさらに強く認められた。この結果から、Wnt3a の細胞非自律的機能の喪失が、NMP 細胞の集団における Wnt シグナルのばらつきを増加させること、すなわち Wnt3a の細胞非自律的機能には細胞集団内における Wnt 活性のばらつきを抑える役割があることが示唆された。

興味深いことに Wnt3a-Fzd5 胚において、NMP 領域の Wnt シグナルのばらつきは、体節形成期移行急激に増加していた。体節で合成されるレチノイン酸 (RA) はエピブラストにおける Wnt の機能を阻害することから、Wnt3a-Fzd5 胚は RA シグナルに対してより影響を受けやすい可能性が考えられる。これを確かめるために、妊娠雌マウスに RA を投与し、Wnt3a-Fzd5 胚における Wnt シグナルをモニターした。その結果、Wnt3a-Fzd5 胚では体軸の伸長およびエピブラストでの Wnt シグナル活性に対して特異的に RA の影響を受けることがわかった。以上の結果から、NMP 細胞集団における Wnt リガンドを用いた細胞間コミュニケーションは、Wnt シグナルのばらつきを減少させるとともに、RA などの外部ストレスに対して細胞集団に頑健性を与えることが示唆された。本研究により、細胞集団ないにおける分泌性シグナル伝達の分子実態が明らかになるとともに、細胞集団の維

持に対して果たす役割について新たな考え方が提示された。

序論

集団はコミュニケーションにより維持される

古代ギリシアの哲学者アリストテレスは自身の著書で「人間は社会的動物である」と述べている。我々は学校・会社・地域などのありとあらゆる場面において集団の中で社会性のある行動をとり、集団の構成因子として振る舞う。しかし、集団の種類や規模、それらを取り巻く環境などは様々であり、集団の維持と発展のためにこれらの構成因子は個別に、あるいは集団として反応してく必要がある。このとき集団の構成因子たちは、文字や言葉を用いてコミュニケーションを取り合うことでそれぞれの役割を果たし集団を維持していると考えられる(図 1A)。

一方、多細胞生物の体においては、個々の細胞は最小の構成因子でありいくつかの細胞が集まって集団を作る。これらの集団もまた種類や規模、細胞を取り巻く外部環境は様々であり、特に胚発生の中では目まぐるしく変化する。細胞からなる集団は、時には強固に、時には柔軟にその変化に対応し、それによってこれらの細胞を制御し続ける。このような場合、人間社会のように細胞もコミュニケーションを取り集団として対応するのか、またコミュニケーションを取る場合、どのようにコミュニケーションを取るのか、といった問題は十分には理解されていない。

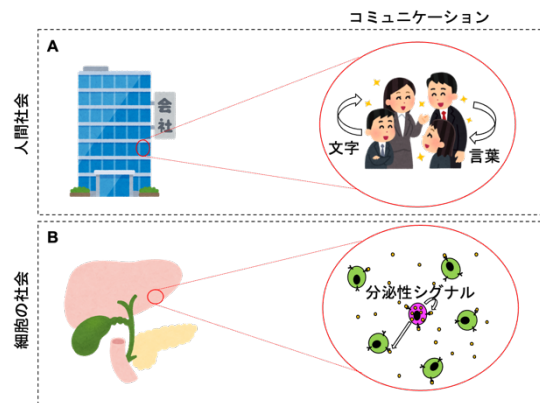


図 1. 人間社会と細胞の社会のコミュニケーション

(A)人間社会において組織は構成要因同士の文字や言葉を用いたコミュニケーションで維持される。(B)細胞の社会は細胞同士の分泌性シグナルを用いたコミュニケーションにより維持される可能性がある。

細胞間コミュニケーションの種類と方法

多細胞生物の体を構成する細胞同士は、様々な手段を用いてコミュニケーションを取ると考えられている。例えばカドヘリンに代表される細胞接着因子は、細胞同士を接着させることで相互に作用し合う物理的な力を生み出し、その力は様々な生命現象に反映されている。また、これらの細胞接着因子は単に細胞同士を接着させるだけでなく、接着を引き金として細胞内部にリン酸化のようなシグナルを伝えることがある。このような方法以外にも様々な細胞間コミュニケーションが存在することが予想されるが、本研究では分泌シグナルタンパク質を用いた細胞間コミュニケーションが、細胞集団内における細胞同士のコミュニケーションに関わる可能性について着目した(図 1B)。分泌性シグナルタンパク質は、細胞で産生された後、細胞外に分泌され、標的細胞の受容体に結合することで、標的

細胞の細胞増殖や細胞分化を制御する。分泌性シグナル分子を用いたコミュニケーションは古くから研究されてきたが、シグナルを出す細胞集団とそれを受け取る細胞集団は別であることがほとんどである(図 2A, B)。例えば生殖系などの幹細胞は、周囲に存在する幹細胞ニッチからの分泌シグナルを受け取り、未分化性の維持・自己新生と分化のバランスが決まる(図 2A)。脊椎動物の胚発生では特定の細胞から分泌シグナルが周囲に拡散していくことで濃度依存的に周辺組織の増殖や分化が制御される(図 2B)。このように、分泌細胞集団と受容細胞集団が明確に分かれている場における分泌シグナルの細胞非自律的作用(パラクライン機能)についてはよく理解されてきた。それに対して、集団内の各々の細胞が分泌シグナルを産生しあい、それを用いて集団内のコミュニケーションを行うようなことも想定できるが、実際にそのようなコミュニケーションが起きているのか、また起きているとしたらそれは細胞集団の持つ性質にどのように反映されるのか、といったことは良くわかっていない(図 2C)。

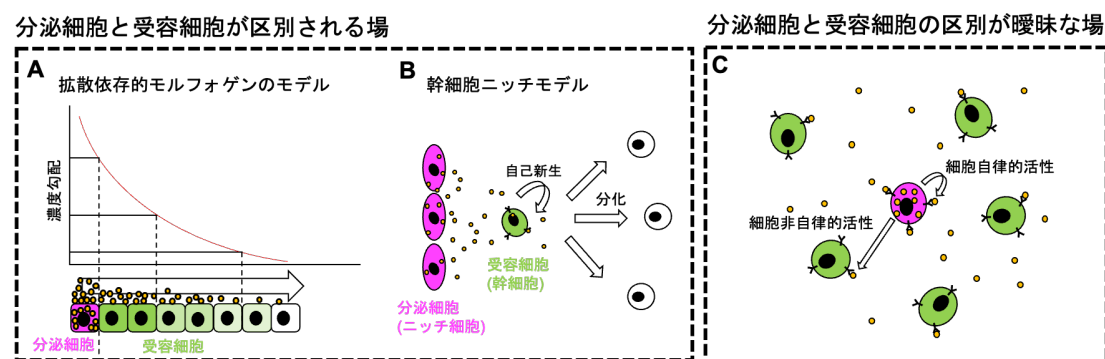


図 2. 分泌細胞と受容細胞の区別と分泌性シグナル

(A)拡散依存的モルフォゲンのモデル。分泌細胞と受容細胞は明確に区別される。(B)幹細胞ニッチモデル。分泌細胞と受容細胞は明確に区別される。(C)想定される分泌細胞と受容細胞の区別が曖昧な場。各々の細胞は分泌性シグナルを産生しあいコミュニケーションを取り合う。

シグナル性分泌タンパク質 Wnt について

細胞間コミュニケーションに使われる分泌性シグナルタンパク質は Wnt、BMP、FGF、Hh などが知られているが、ここでは Wnt に着目した。脊椎動物では 19 種類の Wnt 遺伝子が同定されており、それぞれの Wnt 遺伝子は時間的・空間的に特異な発現を示す。すべての Wnt は分泌性のタンパク質であり、小胞体内で膜結合型アシル基転移酵素 porcupine によるパルミトレイル化の脂質修飾をうけ、小胞体膜に結合した後、小胞体から輸送されて細胞外に分泌される。これらの Wnt リガンドは受容細胞の細胞表面に存在する受容体型分子 Frizzled と結合することで、受容細胞の増殖や分化、あるいは細胞の極性や移動も制御している。

Wnt によるシグナル伝達経路は β カテニン依存的なもの、 β カテニン非依存的なものが知られている。 β カテニン依存的な Wnt シグナル伝達経路は canonical 経路と呼ばれ、Wnt 非存在下だと分解される β カテニンが、Wnt 存在下だと安定的に存在できるようになり、細胞内に蓄積された後に核内に移行し、最終的には転写因子である Tcf/Lef と

複合体を形成することで標的遺伝子の転写を制御することで Wnt 受容細胞の増殖や分化を制御する。一方、 β カテニン非依存的な Wnt シグナル伝達経路は non-canonical 経路と呼ばれる。細胞の極性を制御する平面内極性 (planar cell polarity : PCP) 経路は最も良く知られる non-canonical 経路である。なお、本研究で取り上げた Wnt3a は、主に β カテニン依存的な Wnt シグナル伝達経路を活性化することが、様々な研究により示されている。細胞集団内における Wnt シグナルの役割を解析するために、本研究では体軸伸長期のマウス胚の尾側に位置するエピブラストまたは尾芽で発現する Wnt に着目した。

神経中胚葉前駆細胞” (Neuro-Mesodermal Progenitors : NMP) について

脊椎動物の胚の体軸は、前後方向に伸長するが、この伸長過程で、体幹や尾部の組織を構成する細胞は、前駆細胞から連続的に生成される (Stern et al. 2006)。これらの前駆細胞は、胚の後端にある、初期胚ではエピブラスト、後期胚では尾芽と呼ばれる領域に存在する。興味深いことに、クローン系統解析の結果、軸索伸長期を通じて、神経系と傍軸中胚葉系の両方の細胞がエピブラストや尾芽に存在する同じ前駆細胞から共通して発生することが明らかになった (Tzouanacou et al. 2009)。このような 2 つの分化先を持つ前駆細胞は、“神経中胚葉前駆細胞” (Neuro-Mesodermal Progenitors : NMP) と呼ばれる。NMP 細胞は体節形成の開始直前に出現し、体軸の伸長が終了するまで維持される。マウス胚では、NMP は原始線条領域の尾側エピブラスト (Caudal Lateral Epiblast : CLE) と尾芽の脊索神経管尾端境界 (Chord Neural Hinge : CNH) に存在する (Noemí Cambray and Wilson 2002; Noemi Cambray and Wilson 2007; Tam and Beddington 1987; Tzouanacou et al. 2009; Wilson and Beddington 1996)。集団解析やクローン解析により、これらの細胞は幹細胞のように振る舞うことが示されている (Noemi Cambray and Wilson 2007; Noemí Cambray and Wilson 2002)。重要なことは、NMP とその周辺の細胞は Wnt リガンドを発現すると同時に、それを受容し Wnt シグナルが活性化されているという点である。このことから、NMP を含むエピブラスト/尾芽の領域においては、分泌細胞自身が分泌シグナルにより自身を細胞自律的に制御するのと同時に、周囲の細胞を細胞非自律的に制御しているのではないかと考えられる。このような異なる制御はそれぞれ集団内のコミュニケーションによって細胞集団の持つ何らかの特性の制御に関わるのではないかと推察されるが、その実態は良くわかっていない。例えば、Wnt3a のノックアウト胚では NMP が減少し体軸伸長が停止することから、この Wnt リガンドが NMP の維持に必須であることはわかるものの、細胞自律的機能と細胞非自律的機能が各々どのような役割を果たしているのか、細胞非自律的を介した集団内のコミュニケーションが本当に必要なのか、もし必要だとした時にどのような役割を担うのかについては、単純なノックアウト胚の解析からでは解き明かすことができない。そこで、本研究ではこのように分泌細胞と受容細胞が明確に区別されない場に着目し、細胞自律的機能と細胞非自律的機能を区別して理解することを目的とした。

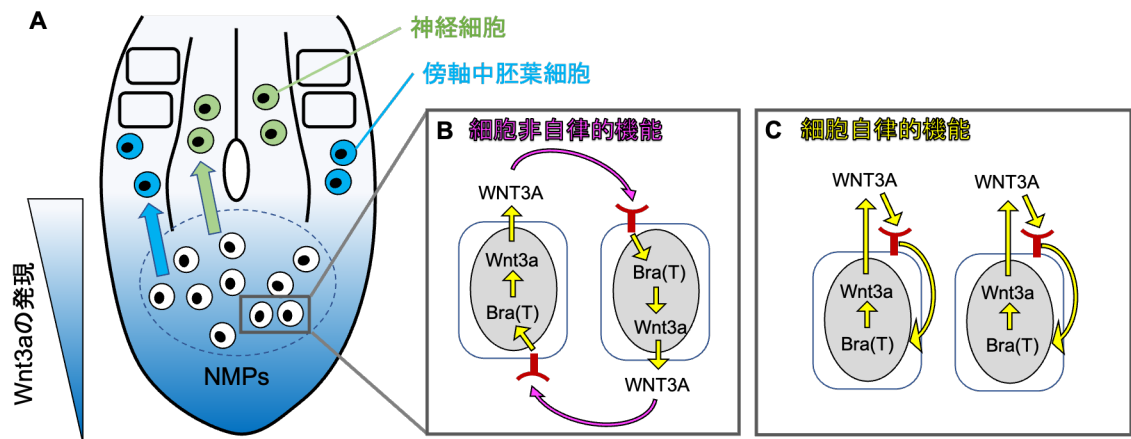


図 2. NMP 細胞における、Wnt3a の細胞自律的機能と細胞非自律的機能

(A) 神経中胚葉前駆細胞(NMP)は脊椎動物の胚の後端に存在し、神経と中胚葉両方の細胞に分化する。NMP を含む周辺の領域は勾配的に Wnt3a が発現する。(B) Wnt3a を発現する細胞は周囲の細胞に、細胞非自律的に働きかける。(C) Wnt3a を発現する細胞は分泌源である自身に対しても、細胞自律的にシグナルを伝える。

NMP 細胞を維持する分子ネットワーク

細胞シグナル分子と転写因子は、NMP を含む前駆細胞の維持することによって体軸の伸長を制御することに関与している。例えば、マウスでは、少なくとも 3 つの Wnt リガンドがエピブラストと尾芽で順次発現する (Cunningham et al. 2015; P. Liu et al. 1999; Takada et al. 1994; Zhao and Duester 2009)。Wnt3 と Wnt8a の発現は体節初期までに停止するが、Wnt3a の発現は尾部の伸長がほぼ完了する E12.5 まで継続する (Tenin et al. 2010)。これらの Wnt リガンドの発現とともに、T-box 転写因子である T/Brachyury (Bra) が Wnt3 発現の開始から終了まで同じ領域で連続的に発現している (Rivera-Pérez and Magnuson 2005)。Wnt シグナルと Bra が NMP の維持に重要であることはいくつかの証拠が示唆している。Wnt3a および Bra の欠失変異胚を用いた遺伝学的研究により、軸索伸長に重要であることが示された (Takada et al. 1994; T P Yamaguchi et al. 1999)。また、Bra を発現する細胞の系統追跡により、神経および中胚葉細胞が Bra 発現細胞から派生していることが明らかにされた (Anderson et al. 2013; Garriock et al. 2015; Imuta et al. 2013; Koch et al. 2017)。NMP の維持に加えて、Wnt シグナルと Bra は、神経系と中胚葉系の運命決定にも関与している (T P Yamaguchi et al. 1999; Yoshikawa et al. 1997)。特に、Wnt シグナルは Tcf 転写因子を介して直接 Bra の発現を活性化し、Bra は Wnt3a の発現に必要である (Dunty et al. 2008; 2014; Galceran, Hsu, and Grosschedl 2001; T P Yamaguchi et al. 1999)。このように、Wnt と Bra はポジティブフィードバックループを形成し、それぞれが NMP の維持において他方の発現を積極的に制御しているのである。同様に、ゼブラフィッシュの Bra のオーソログである wnt8 と tbxta (ntl) の間のポジティブフィードバックも報告されている (Martin and Kimelman 2008; 2010)。

Wnt3a のパラクラインシグナルの重要性

NMP 細胞の維持において、Wnt シグナルの活性化と Bra の発現は、NMP の存在する領域を含むエピブラストと尾芽で広く重複している (Rivera-Pérez and Magnuson 2005)。したがって、Wnt リガンドの中には、エピブラストと尾芽で細胞自律(オートクライン)的に作用し、それぞれの細胞で Wnt/Bra 制御ループが自己活性化されるものがあるのかもしれない。一方、NMP 細胞に隣接する細胞も Wnt リガンドを発現しており、隣接細胞から細胞非自律 (パラクライン) 的に供給される Wnt リガンドも NMP の維持に関与している可能性が考えられる。そこで、NMP を含む体軸の前駆細胞の維持における Wnt パラクライン機能の重要性を調べるために、本研究では内在性の Wnt3a をパラクライン活性を欠き、オートクライン活性を保持する受容体融合型に置き換えたノックインマウスを作製し、NMP 細胞の維持における Wnt パラクライン機能の重要性を調べた。

材料と方法

マウス

動物の飼育および実験は、自然科学研究機構の動物実験指針に準拠して行った。すべての動物実験は自然科学研究機構動物実験委員会の承認を得ている（認証番号：22A031, 21A041, 20A062, 19A047）。マウスは光と温度がコントロールされた部屋で、12時間-12時間明暗サイクルで $21 \pm 2^\circ\text{C}$ で維持した。実験に用いたマウスの系統は以下の通りである。*Wnt3a* KO (Takada et al. 1994)、*R26R-Wntvis* (Takemoto et al. 2016)、*Bra* KO (RBRC00113: C3H/HeSn-Ttf/+tf)、*Wnt3a^{fl}* (Greco et al. 1996)。胚の遺伝子型は yolk sac あるいは胚の一部から得られた DNA を用いた PCR により決定した。PCR の条件およびプライマーの配列は「プライマーと PCR」の項目に記す。*Wnt3a-Fzd5* ノックインマウスの作製については「ノックインマウスの作製」の項目に記す。

WNT3A-FZD5 発現用プラスミドの作製

マウス *Wnt3a* とヒト *Frizzled5* (*hFzd5*) を融合したプラスミドコンストラクトを作製するために、シグナルペプチドを含んだ *Wnt3a* の終止コドン直前に、シグナルペプチドを除いた *hFzd5* を 2xMyc タグ (TSEQKLISEEDLNEMEQKLISEEDLRS) を介して結合させた。これらの配列を CMV IE94 プロモータを持つ pCSf107 プラスミドベクターの *Clal* と *XbaI* 部位間に挿入した。

細胞培養とトランスフェクション

HEK293 細胞と Wnt シグナルレポーター細胞 (STF293: Tsukiyama et al. 2015) 細胞は、8.3%の牛胎児血清を含む DMEM 培地と Ham'F12 培地を 1:1 で混合した培養液を用いて 37 度で培養した。培養は 24 マルチウェルプレートを用いて 1×10^5 cell/well の濃度で開始した。遺伝子発現用プラスミドは FuGENE6 transfection reagent (Roche) を用いて HEK293 細胞あるいは STF293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションはキットのプロトコールに従った。トランスフェクション後 6 時間後に培養液を交換し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に細胞および培養液を採取し、ウェスタンブロッティングおよびルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

共培養実験では、各プラスミドをトランスフェクションした HEK 293T 細胞をトランスフェクションの 24 時間後に回収し、STF293 細胞と 1:1 で混合した。この時 24 マルチウェルプレートを用いて 1×10^5 cell/well の濃度で開始した。ルシフェラーゼレポーターアッセイは、共培養の 24 時間後または 48 時間後に実施した。

ウエスタンブロッティングおよびルシフェラーゼレポーターアッセイ

培養細胞におけるウエスタンブロッティングは「細胞培養とトランスフェクション」の項目に記述した方法で細胞を回収した。マウス胚における WNT3A-FZD5 を検出するためのウエスタンブロッティングは、8.5 日胚を用いて最も後方の体節より尾部側を切り出して回収した。SDS-PAGE は以前報告された方法(Laemmli 1970)に従って行った。全てのサンプルは 2x サンプルバッファー [4% SDS, 20% glycerol, 0.001% bromophenol blue and 0.125 M Tris HCl (pH 6.8)] と混ぜ 37°C で 1 時間加熱し、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動をした。泳動後、ゲル状のタンパク質を PVDF メンブレン(Millipore)に転写した。その後、PVDF メンブレンを一次抗体(mouse anti-mouse Wnt3a 抗体: Takada et al., Dev. Cell, 2006)を用いて 4 度で一晩処理した。続いて、二次抗体を用いて室温で 1 時間処理し、最終的に Enhanced Chemiluminescent Detection System (Amersham)を用いてタンパク質を可視化した。ルシフェラーゼレポーターアッセイは、Promega のプロトコールに従って行った (Dual-Glo Luciferase Assay System: Promega)。遺伝子導入のモザイク性を補正するために、Renilla ルシフェラーゼを内部コントロールとして用いた。ルシフェラーゼの活性は、Luminometer (Turner Designs) を用いて検出した。

Wnt3a-Fzd5 ノックインマウスの作製

Wnt3a-Fzd5 ノックインマウスでは、myc-hFzd5 をコードする DNA 断片を、マウス *Wnt3a* 遺伝子の exon4 のストップコドン直前に組み込むよう設計した (図 1A) この組換え遺伝子座から発現するタンパク質は、上述の細胞培養実験で発現されたものと同じであると考えられる。このノックイン遺伝子を作製するために、myc-Fzd5 の DNA 断片を含むプラスミド(pLSODN-3)を、受精卵に gRNA および Cas9 を発現するプラスミドと共に導入した。gRNA の配列は以下の通りである 5'- TTAGGAGCTCTCCTACTTGC-3'。この gRNA を pX330 に挿入した。遺伝子型判定の判定に使用したプライマーは「PCR とプライマー」の項目に記す。野生型 *Wnt3a* および *Wnt3a-Fzd5* の 5'-領域からは、それぞれ予想通り 2,564 bp および 3,338 bp の断片が検出された(図 4B, 4C, 4D)。一方、野生型 *Wnt3a* および *Wnt3a-Fzd5* 遺伝子の 3'領域には、それぞれ予想通り 2,368bp および 3,564bp の断片が検出された(図 4B, 4E, 4F)。

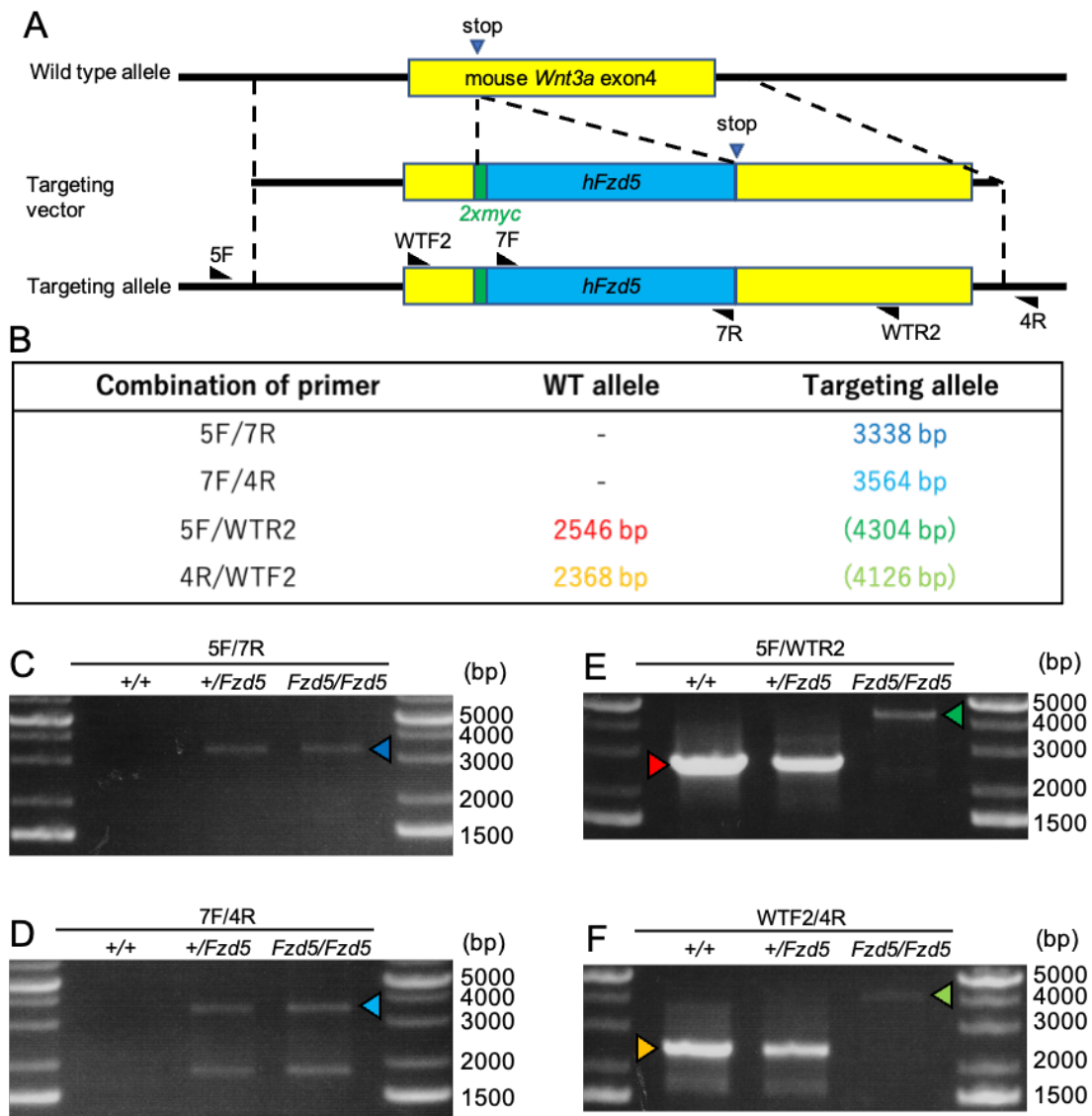


図 4. Wnt3a-Fzd5 ノックインマウスを作製する際の確認のタイピング

(A-F) Wnt3a-Fzd5 ノックインマウスを作製した。マウス Wnt3a 遺伝子座と Wnt3a-Fzd5 ノックインアレルを示す模式図を(A)に示す。ノックインアレルでは、マウス Wnt3a の C 末端にヒト Frizzled5 (青) と 2 つの myc タグ (緑) が融合したものが挿入されている。ノックインは、B に示したプライマーセットを用いた PCR 解析により確認した (C-F)。プライマーセットは各図の上側に示されている。

In situ hybridization

In situ hybridization は胚全体あるいはビブラトームで切り出された 100 μ m の切片を用いて行った。染色に用いた全てのプローブはジゴキシニンで標識されたアンチセンス RNA プローブである。各々の胚は各ステージにおいて 4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて 4 度で一晩固定し、PBS で洗浄した後に、20mg/ml のプロテイナーゼ K で 5 分間処理し、PBS で洗浄した後、再度室温で 20 分間固定した。これらの胚および切片を 55°C のハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 5 \times SSC, 1% SDS, 50 μ g/mL tRNA) で 1 時

間処理し、その後、プローブを含む新しいハイブリダイゼーションバッファーを用いて 55°Cで一晩処理した。翌日、胚 5×SSC、2×SSC、TBST で二回ずつ、各 30 分間、室温で連続的に洗浄した。その後、1%ヒツジ血清/TBST を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。これらの胚を抗ジゴキシニン AP 標識抗体(Roche)を 1%ヒツジ血清/TBST を用いて 500 倍に希釈し 4°Cで一晩処理した。翌日、胚を TBST を用いて室温で 30 分ずつ三回洗浄し、アルカリフォスファターゼバッファー [100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 0.5% Tween 20] で 10 分間処理した後、BM Purple (Roche) を用いてシグナルを可視化した。各々の実験に用いたプローブの詳細は下記の通りである。マウス *Wnt3a*(Roelink and Nusse 1991)、マウス *Brachyury* とマウス *Tbx6*(T P Yamaguchi et al. 1999)、マウス *Uncx4.1*(Mansouri et al. 1997)、およびヒト FRIZZLED5(C. Liu et al. 2008)。Sox2 プローブを作製するために、マウスゲノム DNA からマウス Sox2 の第 1 エクソンを PCR で増幅し、クローニングしてアンチセンスプローブを作製した。

免疫染色

免疫染色は胚全体を用いて行った。各々の胚は各ステージにおいて 4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて 4 度で一晩固定し、PBS で洗浄した後に、1%ヒツジ血清/PBST を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。その後以下の抗体を含む 1%ヒツジ血清/PBST 中にて 4°Cで一晩処理した。ウサギ抗 Sox2 抗体 (polyclonal, Millipore, AB5603, 1:200)、ヤギ抗 Brachyury 抗体 (polyclonal, Santacruz, 17745, 1:1000)。翌日、PBST を用いて 3 回、各 30 分間、室温で洗浄した。これらの胚を以下の二次抗体および DAPI を含む 1%ヒツジ血清/PBST を用いて 4°Cで一晩処理した。ゴリラ抗-rabbit IgG (Alexa fluor 647 conjugated, 1:500) and ゴリラ anti-goat IgG (Alexa fluor 647 conjugated, 1:500)。翌日、胚を PBST を用いて洗浄し、倒立共焦点顕微鏡 (Leica SP8) を用いて蛍光画像を取得した。

DAPI 染色

DAPI の染色は胚をビブラトームで切り出した 100 μ m の切片を用いて行った。各々の胚は各ステージにおいて 4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて 4 度で一晩固定し、PBS で洗浄した後にビブラトームを用いて切片を作成し、PBST を用いて DAPI (Dojindo) を 1/1000 に希釈したもので 4 度で一晩処理した。翌日、胚を PBST を用いて洗浄し、倒立共焦点顕微鏡 (Leica SP8) を用いて蛍光画像を取得した。

レチノイン酸処理

Wnt3a-Fz5 ホモ接合体の RA シグナルに対する感受性を検出するために、Wnt3a-Fz5 ヘテロ接合体同士を交配させ、E7.5 で雌マウスの腹腔内に 10mM RA あるいは DMSO を注入し、E8.5 で胚を回収した。

Wntvis レポーターの検出

各々の胚は各ステージにおいて 4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて 4 度で一晩固定し、その後、DAPI(1/2000)を含む 1% Triton X-100/PBS で数時間または一晩染色し、0.8% LMP アガロースでマウントした。倒立共焦点顕微鏡(Leica SP8)を用いて蛍光画像を取得した。核内のこのレポーターの蛍光は、photon-counting モードを用いて個々の細胞で測定された。

画像処理と統計処理

統計解析は、Excel と R ソフトを使用して行った。p 値<0.05 は統計的に有意であると思なした。グラフ中のエラーバーは、各群の標準偏差あるいは標準誤差を示す。Wntvis レポーターは倒立共焦点顕微鏡(Leica SP8)を用いて厚みを持った複数の画像を取得したのち解析を行なった。各平面の画像は重ね合わせて、厚みを持った最大値投影法 (Maximum Intensity Projection: MIP) を作製した。単細胞レベルの解析を行う際は、平面画像を使用し、特定の領域をトリミングした後、DAPI の情報を用いて各々の細胞核を定義し、明るさを測定した。各々の胚で細胞の持つ GFP シグナルの平均値および変動係数 (特定の領域内でどの程度シグナルがばらついているかの指数) を計算した。変動係数は標準偏差/平均値で計算される。ばらつき指数 (Variation index : V.I.) は上記の特定領域の画像を用いて算出した。各々の画像の各細胞の GFP 値を測定したのち、上位 10%の細胞を central 細胞と定義し、その細胞から 10 μ m 圏内に含まれる細胞を surround 細胞として定義した。central 細胞と surround 細胞の比を以下の式で計算し 1 つの central 細胞と、その周りの全ての surround 細胞の V.I.値の平均値を、そのグループの V.I.値とした。

$$\text{Variation Index} = 1/n \sum_{i=1}^n \sqrt{\left(\frac{\text{Int [Central]} - \text{Int [Surrounding]}}{\text{Int [Central]}} \right)^2}$$

PCR とプライマー

全ての Typing PCR に使用したプライマーの配列と組み合わせおよび予想されるバンドのサイズを以下に記す。

Wnt3a-Fz5 の Typing PCR

Wnt3a-Fz5 Geno 1F, 5' GAGGGAGAAATGCCACTGTG 3'

Wnt3a-Fz5 Geno 1R, 5' AGGCTGAAGGCAGAAACCGG 3

Wnt3a-Fz5 Geno 3R, 5' GCTGCGGTTGTAATCCATGC 3'

ミュータントアリル : Wnt3a-Fz5 Geno 1F + Wnt3a-Fz5 Geno 3R, 550bp

野生型アリル : Wnt3a-Fz5 Geno 1F + Wnt3a-Fz5 Geno 1R, 261bp

Wnt3aKO の Typing PCR

ST3-2, 5' CCTGTGAGCACTGAGTTCT 3'

ST5, 5' GTTGTGACGGTTCATGGCAG 3'

Neo384, 5' TGGCATCCCGTGATATTGCT 3'

ミュータントアリル : ST3-2 + Neo384, 500bp

野生型アリル : ST3-2 + ST5, 357bp

Wnt1-Cre, Wnt1-CreERT , Axin2CreERT2 の Typing PCR

Cre-F, 5' TCGATGCAACGAGTGATGAG 3'

Cre-R, 5' TTCGGCTATACGTAACAGGG 3'

Cre アリル : Cre-F + Cre-R, 482bp

R26R-Wntvis の Typing PCR

Rosa11, 5' CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA 3'

Rosa Fw1, 5' GGC TGT TTT GGA GGC AGG AA 3'

R26 7xTCF ES5-1, 5' TTG GG CTA GCA CGC GTA AGA GCT CG 3'

ミュータントアリル : Rosa11 + R26 7xTCF ES5-1, 320bp

野生型アリル : Rosa11 + Rosa Fw1, 468bp

結果

FRIZZLED5 と融合した WNT3A はシグナル伝達活性を持つがパラクライン活性はない

WNT3A のパラクライン活性をなくすために、マウス WNT3A とヒト FRIZZLED5 の N 末を 2 つの MYC タグを介して融合させ、膜結合型 WNT3A を作成した (WNT3A-FZD5 ; 図 5A)。その活性を、WNT シグナルレポーター細胞 (STF293 細胞) で、野生型の WNT3A、および GFP 融合 WNT3A (GFP-WNT3A ; 図 5A) と比較した。GFP-WNT3A の活性は、野生型 WNT3A よりも低かったが(図 5B)、in vivo で内在性 WNT3A を置き換えるには十分である (Shinozuka et al. 2019)。WNT3A-FZD5 は、トランスフェクション後 48 時間で WNT3A と同程度に、GFP-WNT3A よりも強く Wnt シグナルを活性化した。この活性はインキュベーション時間を長くしてもほぼ飽和していた (図 5B)。一方、STF293 細胞と野生型 WNT3A や GFP-WNT3A を発現する細胞との共培養では、Wnt シグナルが活性化されたが、WNT3A-FZD5 発現細胞との共培養ではほとんど Wnt シグナルが検出されなかった(図 5C)。この結果と一致して、WNT3A-FZD5 は細胞ライゼートでは検出されるが培養上清に検出されなかった (図 5D, 5E)。これらの結果から、WNT3A-FZD5 は野生型と同様にシグナル伝達活性を有しているが、パラクライン活性はほとんど有していないことがわかった。

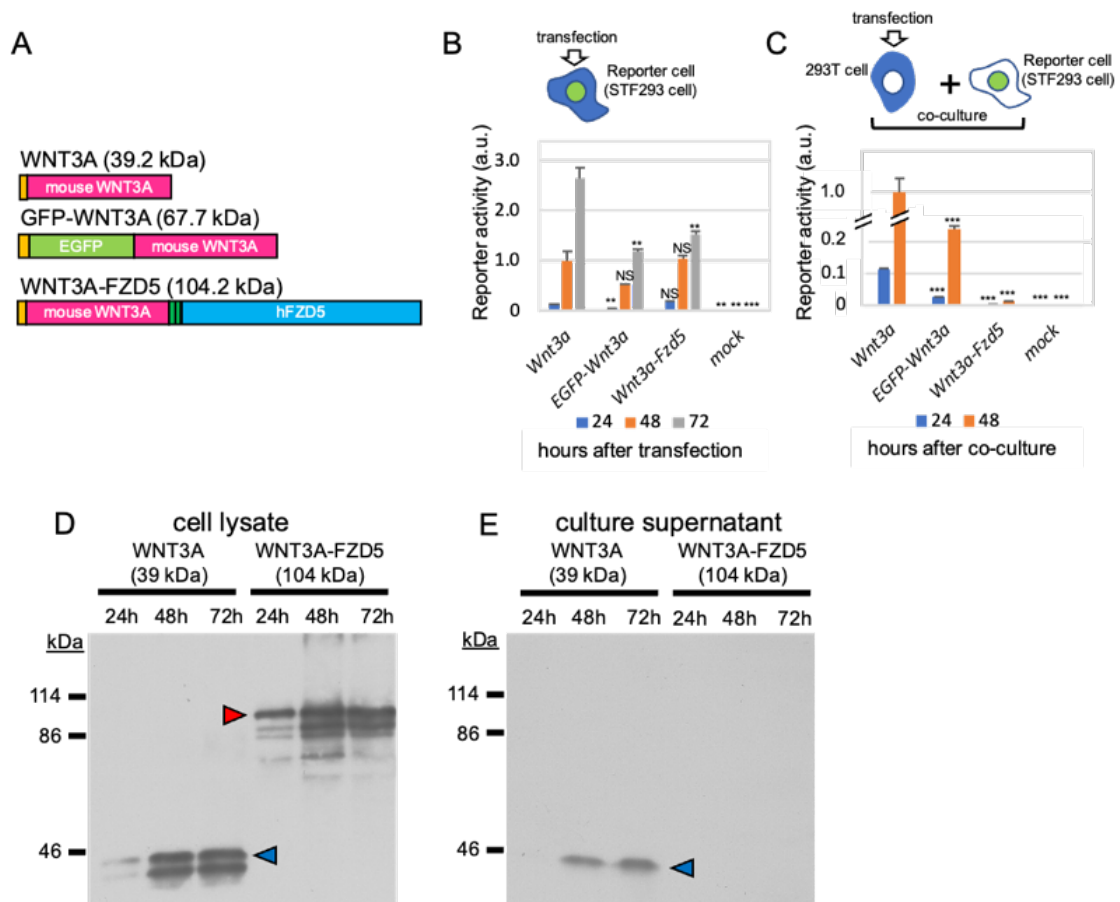


図 5. WNT リガンドの模式図と、培養細胞における Wnt 活性

(A) WNT3A-FZD5 タンパク質の模式図。(B, C) WNT3A-FZD5 と WNT3A および GFP-WNT3A との活性の比較。A に示した各コンストラクトの Wnt シグナル活性は、SuperTOPFLASH レポーターを発現する HEK293T (STF293) 細胞でモニターした。B では、STF293 細胞に各プラスミドをトランスフェクションしてから 24 時間、48 時間、72 時間後に Wnt 活性をモニターした。C では Wnt 発現 HEK293T 細胞と STF293 細胞の共培養により、トランスフェクション後 24 時間および 48 時間におけるパラクライン Wnt 活性をモニターした。差は T 検定を用いて統計的有意性を評価した; ** $P < 0.001$; * $P < 0.01$; * $P < 0.05$; $P > 0.05$; n.s. (not statistically significant)である。グラフ中のエラーバーは、各群の標準偏差を意味する。(D, E) WNT3A と WNT3A-FZD5 を発現する HEK293T 細胞から調製した細胞ライセート(D)と培養上清(E)を、トランスフェクション後 24、48、72 時間でウェスタンブロッティング解析を行った。WNT3A-FZD5 の発現量は細胞ライセートでは WNT3A とほぼ同等であったが、培養上清では WNT3A-FZD5 が検出されない。赤矢印は WNT3A-FZD5、青矢印は WNT3A の予測分子量に相当するバンドをそれぞれ示す。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では体軸の伸長は損なわれているが、部分的に維持される

次に、CRISPR/Cas9 を介したノックイン法により、内在性 *Wnt3a* を *Wnt3a-Fzd5* に置換したマウス胚を作成した (図 4)。 *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体マウスは、形態学的に正常であり、繁殖力もあった (図 6A-D, 7G)。予想通り、 *Wnt3a-Fzd5* はこれらの胚で内在性 *Wnt3a* と同一の発現パターンを示した (図 6A-D)。さらに、ウェスタンブロット解析により、 *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体およびホモ接合体胚は、後方領域で内在性 WNT3A の発現を失い、代わりに WNT3A-FZD5 タンパク質を発現していることが明らかになった (図 6E)。このように、 *Wnt3a-Fzd5* は内在性 *Wnt3a* と同じ空間パターンで発現し、内在性 *Wnt3a* に置き換わっていた。

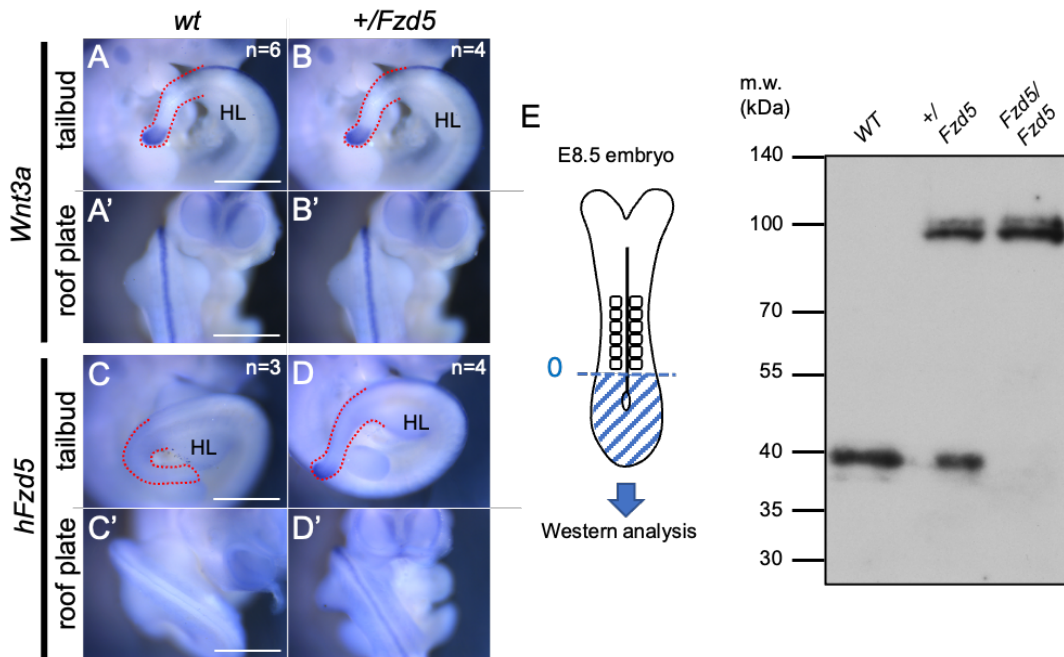


図 6. *Wnt3a-Fzd5* ノックインマウスの作製

(A-D) *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (*Wnt3a^{+/Fzd5}*) 胚におけるマウス *Wnt3a* およびヒト *Fzd5* の発現量。E10.5 の野生型 (A, C) および *Wnt3a^{+/Fzd5}* (B, D) 胚で、マウス *Wnt3a* (A, B) またはヒト *Fzd5* (C, D) のプロンプを用いてホールマウント in situ ハイブリダイゼーションが行われた。尾芽 (A, B, C, D) および神経管のルーフプレート (A', B', C', D') にハイライトをかけた画像である。染色された胚の数は画像中で「n=」で示されている。(E) E8.5 胚から調製したタンパク質を抗マウス WNT3A 抗体でウェスタンブロッティング解析した。各レーンに 2 つの胚から調製したサンプルを使用した。 *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (*+Fzd5*) およびホモ接合体 (*Fzd5/Fzd5*) 胚の両方で *Wnt3a-Fzd5* の予測分子量のバンドが検出された。

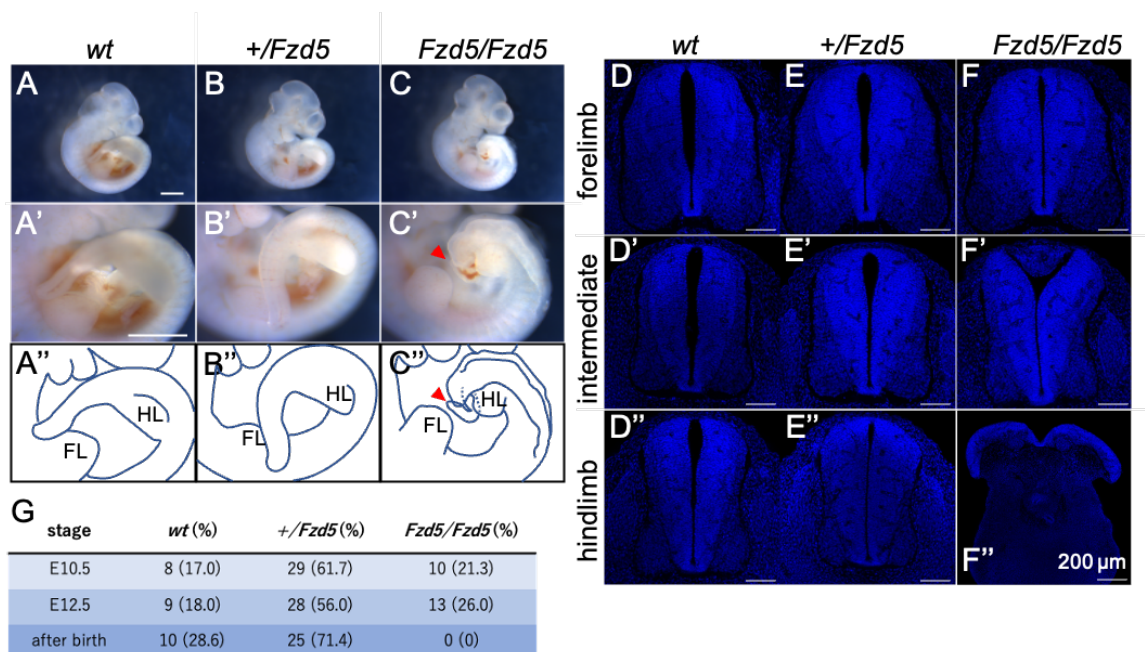


図 7. *Wnt3a-Fzd5* ノックインマウスの解析

(A-C) E10.5 における野生型 (A), *Wnt3a*^{+/Fzd5} (B), *Wnt3a*^{Fzd5/Fzd5} (C) 胚の画像。A', B', C' はそれぞれ A, B, C の拡大画像。A'', B'', C'' はそれぞれ A', B', C' の画像のトレース図である。(D-F) E11.5 における野生型 (D, D', D''), *Wnt3a*^{+/Fzd5} (E, E', E''), *Wnt3a*^{Fzd5/Fzd5} (F, F', F'') 胚の神経管の切片画像。前肢 (D, E, F)、前肢と後肢の中間 (D', E', F')、後肢 (D'', E'', F'') レベルの切片を示す。スケールバー: 1 mm (A-C), 100 μ m (D-F'), 200 μ m (F'')。HL: 後肢。FL: 前肢。(G) 胚発生時および出生直後の各遺伝子型の個体の割合。

Wnt3a-Fzd5 ヘテロ接合体 (*Wnt3a*^{+/Fzd5}) は明らかな胚の異常を示さなかったが (図 6A-D, 7G)、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体 (*Wnt3a*^{Fzd5/Fzd5}) は胚性致死であり、E12.5 後に死亡した (図 7G)。しかし、この表現型は、E9.5 頃に死亡する *Wnt3a* 欠損胚の表現系よりも穏やかである (Takada et al. 1994)。このように、WNT3A-FZD5 は *in vitro* で十分なシグナル伝達活性を持っているにもかかわらず (図 5B)、内在性の *Wnt3a* を完全にではなく、部分的にしか代替できない。*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のこの不可解な表現型をより理解するために、その形態学的特徴を調べた。*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の形態は、後肢の前方では正常に見えたが、後肢の後方では際立った後述するような異常が認められる (図 7A-C)。この後肢の欠損は遅くとも E8.75 までには明らかになった (図 13A, B)。DAPI で染色した E11.5 胚の切片画像から、これらの胚では神経管形態が前後軸に沿って徐々に乱れていることがわかった (図 7D-F)。この異常は、前肢と後肢の中間領域で始まり (図 7F')、より後方の領域では顕著で、後肢レベルでは神経管が開いた状態になっていた (図 7F'')。しかし、このように後肢の形態形成に重大な欠陥があるにもかかわらず、これらの胚の後端には細くくびれた尾状の構造が見られた (図 7C-C'')。

また、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、*Sox2* 陽性の神経管が E10.5 で後肢の後方に異常に開口していることも *in situ hybridization* 解析で明らかになった (図 8I, J)。*Uncx 4.1* プロンプで染色した体節は、前駆幹では正常に形成されたが、後肢より後方ではそのサイズ

が小さくなっている (図 8L, M)。注目すべきは、正常胚の尾芽や脊索で発現している *Brachyury* (*Bra*) 陽性細胞数は減少しているものの、細くて屈曲した尾の先端で発現していたことである (図 8A, B)。さらに、この後端部では、中胚葉系での細胞で発現する *Tbx6* も発現していた (図 8G, F)。このように、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、後肢レベルでの体幹の形態形成が阻害され、尾芽のサイズが小さくなっているが、尾芽からの分化は軸伸長期を通して維持されているようであった。

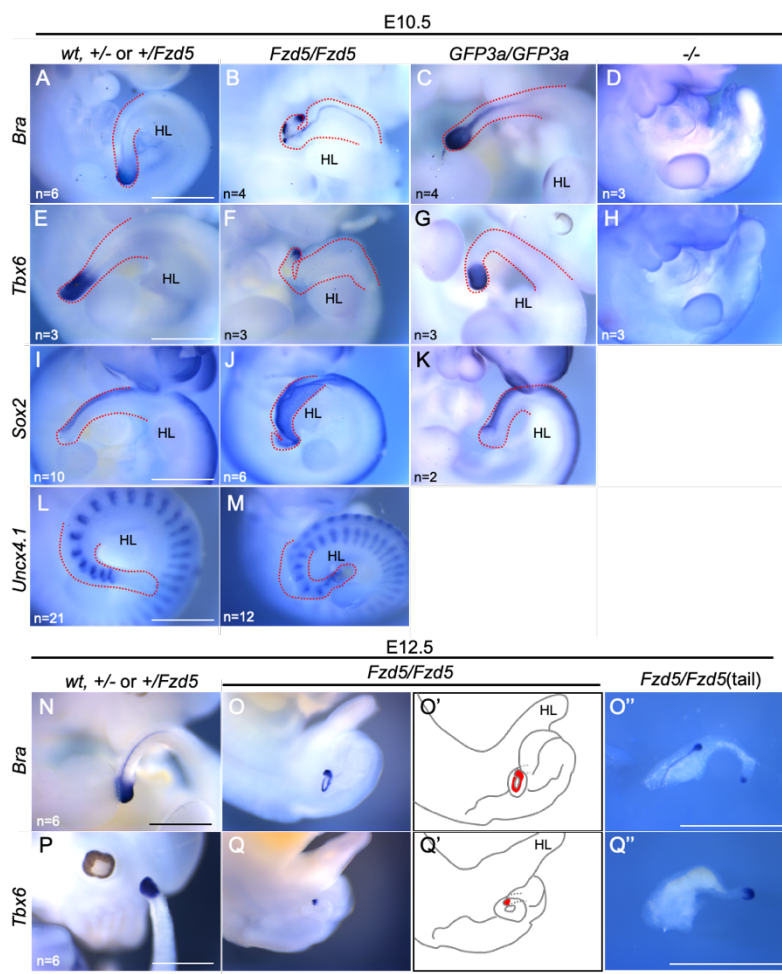


図 8. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚における中胚葉および神経マーカー遺伝子の発現

(A-M) E10.5 胚における中胚葉および神経マーカー遺伝子の発現。 *Bra* (A-D), *Tbx6* (E-H), *Sox2* (I-K), *Uncx4.1* (L, M) のプローブを用いて、E10.5 のステージで *Wnt3a^{+/Fzd5}* (A, E, I, L), *Wnt3a^{Fzd5/Fzd5}* (B, F, J, M), *Wnt3a^{GFP/GFP}* (C, G, K), *Wnt3a^{-/-}* (D, H) において *Whole-mount in situ hybridization* を行った。赤色点線は尾部領域を示す。(M-Q) E12.5 胚における中胚葉および神経マーカー遺伝子の発現。E12.5 の野生型 および *Wnt3a^{+/Fzd5}* (N, P), *Wnt3a^{Fzd5/Fzd5}* (O, Q) 胚で *Bra* (N, O), *Tbx6* (P, Q) のプローブでホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。染色した胚の尾部領域を切り出し、O' と Q' で示した。O' と Q' はそれぞれ O と Q の画像の図面である。染色された胚の数は画像中に「n=」で示した。スケールバーは 1 mm。HL: 後肢。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚の神経・体節形成の異常は Wnt 陽性前駆細胞に由来する

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚の後方の形態異常における尾芽の影響を調べるため、Wnt シグナルが活性化した細胞の系譜を調べた。Wnt シグナルはエピブラストと尾芽領域の前駆細胞で活性化される。そこで、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚に *Axin2-creERT2* および *floxed tdTomato* 対立遺伝子を導入し、Wnt シグナルを活性化した細胞を追跡することで、*tdTomato* を発現する細胞が *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の異常な後方組織にどの程度寄与するのかを調べた。妊娠した雌マウスにタモキシフェンを受精後 7.5 日目または 8.5 日目に注射し、胚を E10.5 で固定した (図 9A)。野生型と *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体胚では、タ

モキシフェン投与のタイミングに関係なく、後肢レベルのほとんどの組織で標識細胞が検出された (図 9B, B')。しかし、E7.5 ではなく E8.5 にタモキシフェンを注入すると、後肢レベルの腹側神経管にはほとんど標識細胞が検出されず (図 9J-K')、腹側神経細胞の起源が E7.5 以降 Wnt シグナルを失っていることが示された。 *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、これらのコントロールと同様に、E8.5 で標識された細胞が、神経管を除くほとんどの組織に同様に分布していた (図 9C, C')。また、体節 (図 9D) と腎管 (図 9E) の標識効率に有意な差は認められない。しかし、 *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、体節 (図 9F) および神経管 (図 9G) で標識細胞数が特異的に減少していた。このように、 *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の背側神経管と体節では、E8.5 で Wnt 陽性前駆細胞に由来する細胞の数が減少していることが明らかになった。この背側神経細胞の減少が、 *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の神経管の開大をもたらしたと考えられる。

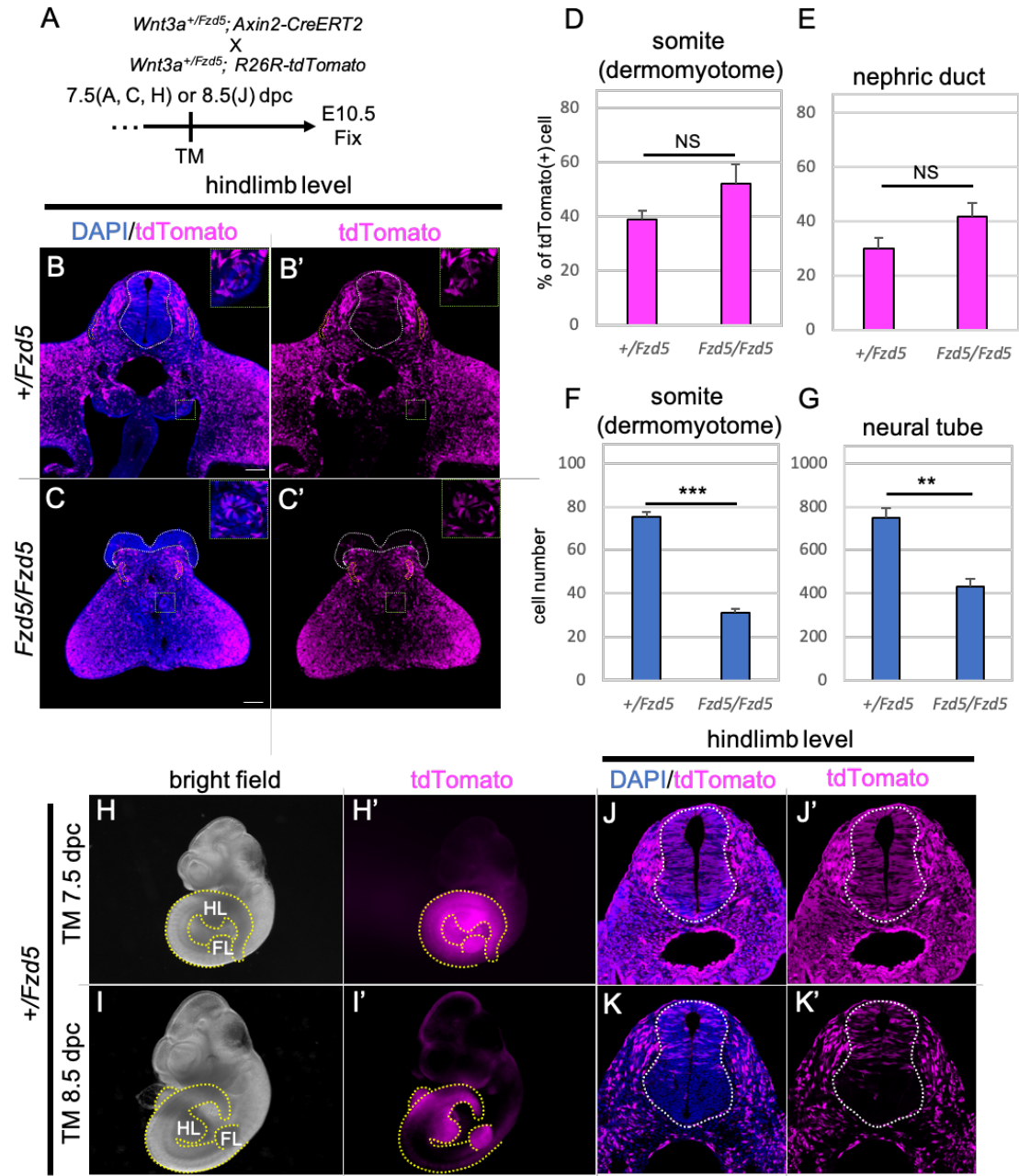


図 9. $Wnt3a-Fzd5$ ホモ接合体胚における Wnt 陽性細胞の神経および体節形成への寄与

(A)実験手順。Axin2-CreERT2 発現によってモニターされる Wnt/b-catenin シグナルによって一旦活性化された細胞は、tdTomato の発現によって標識された。タモキシフェン(TM)を 8.5dpc の妊娠雌に注射し、E10.5 の胚を固定した。(B, C) $Wnt3a^{+/Fzd5}$ (B)と $Wnt3a^{Fzd5/Fzd5}$ (C)胚の後肢レベルでの tdTomato 標識細胞の分布 E10.5 におけるものである。DAPI 染色とのマージ画像も示す(B', C')。神経管は白色点線、体節由来の皮膚筋原体はオレンジ色点線で囲んでいる。緑色の点線で囲まれた四角は腎管を示す。E10.5 における $Wnt3a^{+/Fzd5}$ および $Wnt3a^{Fzd5/Fzd5}$ 胚の後肢レベルの体節(D, F)、腎管(E)および神経管(G)における tdTomato 陽性細胞の割合(D, E)および全細胞数(F, G)。切片あたりのラベルされた細胞の数または割合(平均 ± s.d.)を示す。***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; n.s., 統計的に有意ではない($P > 0.05$)。グラフ中のエラーバーは、各群の標準偏差を意味する。7.5 dpc (H, I) または 8.5 dpc (J, K) の妊娠雌にタモキシフェン (TM) を注射し、胚を E10.5 で固定した。ホールマウント明視野画像 (H, I) と tdTomato 染色も示している (H', I')。E10.5 における $Wnt3a^{+/Fzd5}$ 胚の後肢レベルにおける tdTomato 標識細胞の分布(J, K)。スケールバー 100 μ m

前述のように、*Wnt3a* はエピブラストや尾芽に加えて、神経管のルーフプレートにも発現している (図 6A-D)。したがって、ルーフプレート領域での *Wnt3a-Fzd5* の発現が、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の形態異常を引き起こす可能性もある。*Bra* はエピブラストと尾芽の発生において *Wnt3a* と特異的に相互作用しているが、ルーフプレートでは相互作用しないため、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚への *Bra* の寄与を調べることでこの可能性を検証した。*Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (図 10A) と *Bra* ヘテロ接合体 (図 10B) は正常に見えたが、*Wnt3a-Fzd5* と *Bra* のヘテロ接合体 (*Wnt3a^{+/-}Fzd5^{+/-} ; Bra^{+/-}*) は神経管が開き、尾部が曲がっていた (図 10C)。このように、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の表現型は、エピブラストと尾芽領域における *Wnt3a-Fzd5* と *Bra* の相互作用が原因であることが明らかとなった。

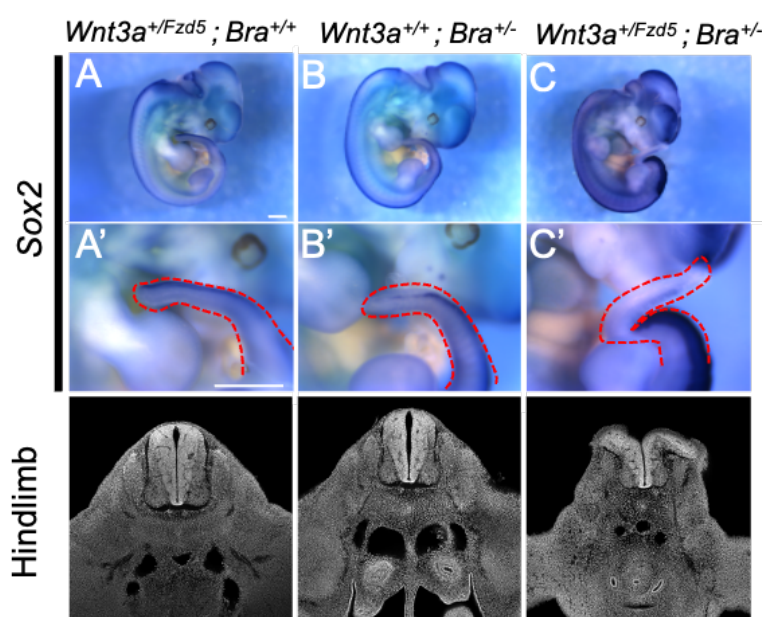


図 10. *Wnt3a-Fzd5* と *Bra* の相乗効果による体軸伸長後期発生への影響

Wnt3a^{+/-}Fzd5^{+/-} ; Bra^{+/-} (A)、*Wnt3a^{+/-} ; Bra^{+/-}* (B)、*Wnt3a^{+/-}Fzd5^{+/-} ; Bra^{+/-}* (C) 胚を Sox2 プローブを用いたホルマリンマウント *in situ* hybridization により染色したものを示す。a'、b'、c' はそれぞれ a、b、c の拡大画像である。*Wnt3a-Fzd5* と *Bra* の複合ヘテロ接合体 (*Wnt3a^{+/-}Fzd5^{+/-} ; Bra^{+/-}* (c)) は体軸伸長の後方発生が損なわれているが、どちらかのヘテロ接合体胚は正常に見えることに注意されたい。スケールバー：1 mm。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体の表現型は、パラクライン活性を失ったことに起因する

Wnt3a シグナルが減少することで、NMP 細胞を含む尾部が維持されなくなる (Garriock et al. 2015; Takada et al. 1994)。この欠損は、*Wnt3a* 活性に依存した方法で尾部伸長が損なわれることで説明される (Greco et al. 1996)。*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の表現型が *Wnt3a* 活性の低下によるものかどうかを調べるために、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚を *Wnt* シグナルが低下した変異体と比較し検討した。*Wnt3a* のハイポモルフ (vt) 対立遺伝子を 1 コピー持つ *Wnt3a^{vt/-}* (vt/-) 胚は E10.5 以降、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚と同様に後肢レベルで体軸伸長が異常になる (図 11-2)。*Wnt3a* 遺伝子の発現は E8.25 において vt/-胚では vt/+胚と変わらず発現するが、E9.0 以降に減少し E9.5 ではほとんど検出されなくなる (図 11A-F)。次に *Wnt3a^{vt/-}* 胚における *Wnt* シグナルをモニターした。*Wnt* シグナルによって発現が特異的に活性化されるヒストン H2B-GFP レポーター遺伝子を持つマウス (Takemoto et al. 2016) を交配し、得られたレポーター遺伝子を 1 コピー持つ子孫胚のエピブラストにおける *Wnt* 活性を、E8.0 および E9.0 のステージにおいて、抗 GFP 抗体を用

いたウェスタンブロッティングによって調べた。E8.0 において、*Wnt3a^{vt/-}* 胚は in situ ハイブリダイゼーションの結果と一貫しており、E8.0 のステージでは *Wnt3a^{+/vt}* 胚とほとんど同様であるが、E9.0 では著しく減少していた(図 11G, H)。

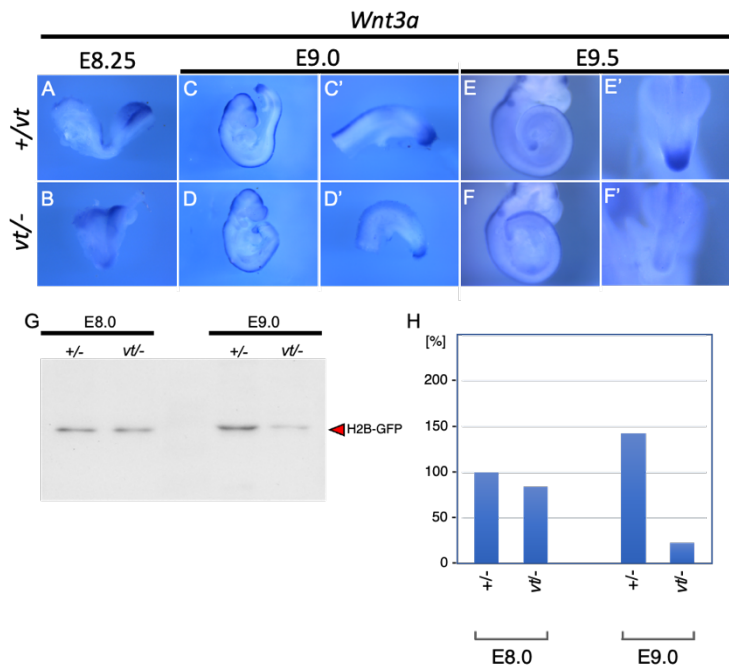


図 11. *Wnt3a^{vt/-}* 胚の特徴(1)

Wnt3a の発現は、E8.25 (A, B), E9.0 (C, D), E9.5 (E, F) の *Wnt3a^{+/vt}* (A, C, E) と *Wnt3a^{vt/-}* (B, D, F) 胚のホルマウント in situ ハイブリダイゼーションによって検出された。各胚の後方領域の拡大画像を示す(C'-F')。 *Wnt3a^{vt/-}* 胚では、*Wnt3a* の発現は E9.0 以降に尾芽で減少し、E9.5 ではほとんど検出されない。 *Wnt* シグナルによって発現が特異的に活性化されるヒストン H2B-GFP レポーター遺伝子を用いて、*Wnt* シグナル活性をモニターした。エピブラストにおける *Wnt* 活性を、E8.0 および E9.0 に、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって調べた(G, H)。H2B-GFP に対応するバンドの強度は、NIH image を用いて定量した。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体と比較して、*Wnt3a^{vt/-}* 胚は *Bra* と *Tbx6* の発現で示される尾芽を E10.5 (図 11-2D-K), E12.5 (図 11-2L, M) で維持することができない。さらに、培養細胞の実験において GFP-WNT3A は野生型 WNT3A と比較して *Wnt* 活性が低下している(図 5B)。しかし、GFP-*Wnt3a* ホモ接合体胚は *Bra*, *Tbx6*, *Sox2* の発現でモニターされるように尾芽は正常に発生する (図 8C, G, K)。これに対して WNT3A-FZD5 は培養細胞の実験において GFP-WNT3 よりも強い *Wnt* 活性を有するが(図 5B)、表現系はより重篤である (図 8B, F, J)。したがって、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体の表現型は、他の *Wnt3a* ハイボモルフ変異体と比較してユニークであり、単に *Wnt3a* 活性の低下によるものではないことがわかる。

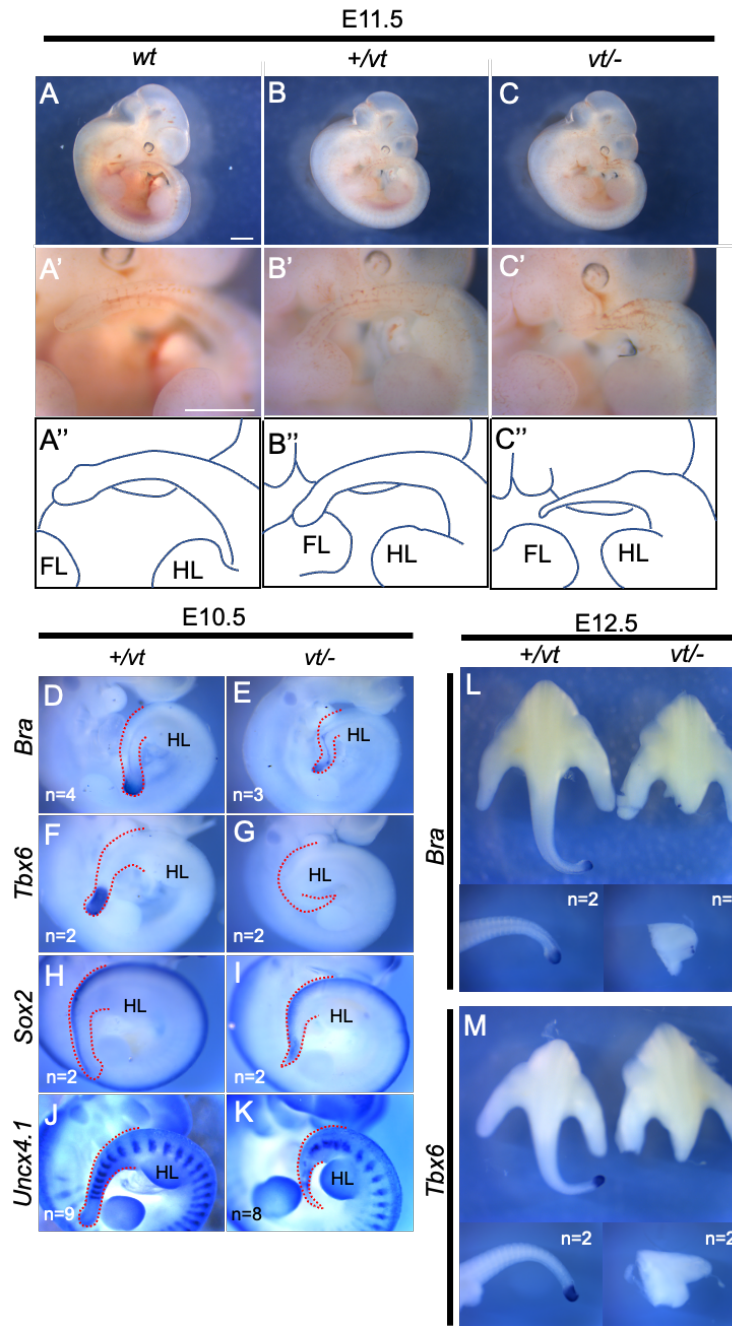


図 11-2. *Wnt3a*^{vt}/- 胚の特徴(2)

(A-C) E11.5 における wt (A), *Wnt3a*^{+/vt} (B), *Wnt3a*^{vt/-} (C) 胚。A', B', C' はそれぞれ A, B, C の拡大画像。A'', B'', C'' はそれぞれ A', B', C' の図面である。(D-K) E10.5 における *Wnt3a*^{+/vt} (D, F, H, J) および *Wnt3a*^{vt/-} (E, G, I, K) 胚における中胚葉および神経マーカー遺伝子の発現。*Bra* (D, E), *Tbx6* (F, G), *Uncx4.1* (H, I), *Sox2* (J, K) のプローブを用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。赤い点線は尾部領域を示す。(L, M) E12.5 における *Wnt3a*^{+/vt} および *Wnt3a*^{vt/-} 胚の in situ ハイブリダイゼーションで、*Bra* (L) と *Tbx6* (M) のプローブが用いられている。*Wnt3a*-*Fzd5* ホモ接合体胚とは対照的に、*Bra* および *Tbx6* の発現は *Wnt3a*^{vt}/- 胚では検出されない。染色された胚の数は画像中で「n=」で示されている。HL: 後肢。スケールバー。スケールバー: 1 mm。

Wnt3a-*Fzd5* ホモ接合体胚の特徴的な表現型(図 12B-B'', E)は、

Wnt3a^{Fzd5}/- 胚でも観察された (図 12C-C'', G)。

Wnt3a-*Fzd5* ヘテロ接合体胚 (*Wnt3a*^{+/Fzd5}) は、先に述べたように正常に見えたので (図 6A-D, 図

12A-A'', E)、*Wnt3a*-*Fzd5* は、野生型 *Wnt3a* がなくてもこの表現型を引き起こすことが示された。さらに、*Wnt3a*^{Fzd5}/- 胚の表現型は、欠失アリルを vt に置き換えることで部分的にレスキューされた (*Wnt3a*^{Fzd5/vt}: 図 12D-D'', H) ことから、*Wnt3a* の発現量によってこの表現型はレスキューできることがわかった。様々な *Wnt3a* 変異体を用いたこれらの解析結果から、*Wnt3a*-*Fzd5* ホモ接合体の特徴的な表現型は、*Wnt3a*-*Fzd5* で失われた何らかの特性、おそらくパラクリン活性によるものであると考えられる。

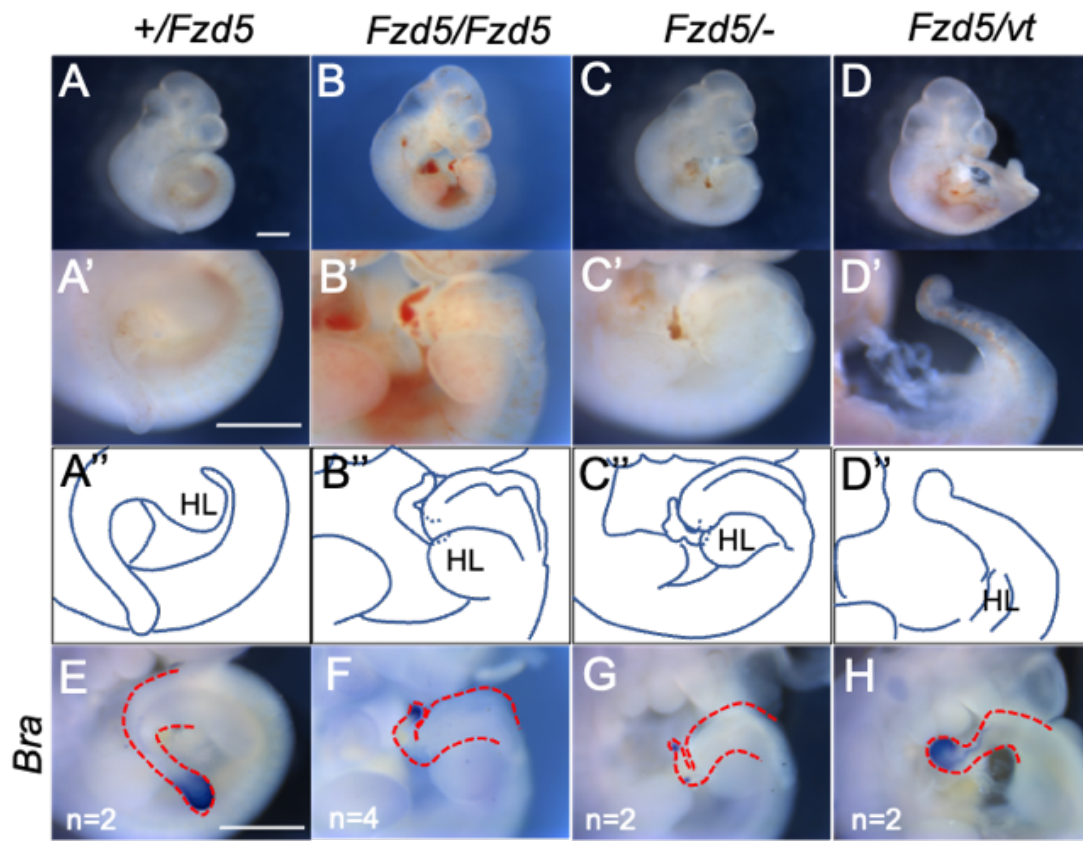


図 12. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の表現型は、*Wnt3a* の細胞間シグナリングに依存して、レスキューすることができる (A-D) E10.5 における *Wnt3a*^{+/Fzd5} (A, A', A''), *Wnt3a*^{Fzd5/Fzd5} (B, B', B''), *Wnt3a*^{Fzd5/-} (C, C', C'') および *Wnt3a*^{vt/Fzd5} (D, D', D'') 胚の図。A', B', C', D' はそれぞれ A, B, C, D の拡大画像。A'', B'', C'', D'' はそれぞれ A', B', C', D' の画像をトレースしたもの。(E-H) E10.5 における *Wnt3a*^{+/Fzd5} (E), *Wnt3a*^{Fzd5/Fzd5} (F), *Wnt3a*^{Fzd5/-} (G), *Wnt3a*^{vt/Fzd5} (H) 胚の *Bra* プローブを使用した Whole-mount in situ hybridization。赤い点線は後肢より後方の体の縁を示す。スケールバー : 1 mm。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では NMP 細胞は減少するが維持されている

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では、後部の神経管や体節の発生が不十分であるにもかかわらず、中胚葉と神経細胞の分化が部分的に維持されていた (図 6)。さらに、これらの胚の尾の後端には、*Bra* の発現によって示される尾芽が維持されていた (図 6A, B)。これらの結果は、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、少数の NMP 細胞が残存していることを示唆している。

NMP 細胞の特徴の一つは *Bra* と *Sox2* の発現である (Tsakiridis et al. 2014)。そこで、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚と同腹のコントロールの免疫組織化学を用いて *Bra* と *Sox2* 二重陽性細胞の数を比較した (E8.75 : 図 13, W12.5 : 図 14)。*Bra* と *Sox2* の二重陽性細胞の数は、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚において E8.75 で減少し始めたが (図 13.A-P)、E11.5 において少数の二重陽性細胞がまだ維持されていた (図 14)。一方、*vt*/胚では、E11.5 で二重陽性細胞は消失した (図 14D, H)。これらの結果は、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、体幹の発達が損なわれた後でも、少数の NMP 細胞が特異的に維持されているという考えを支持する。

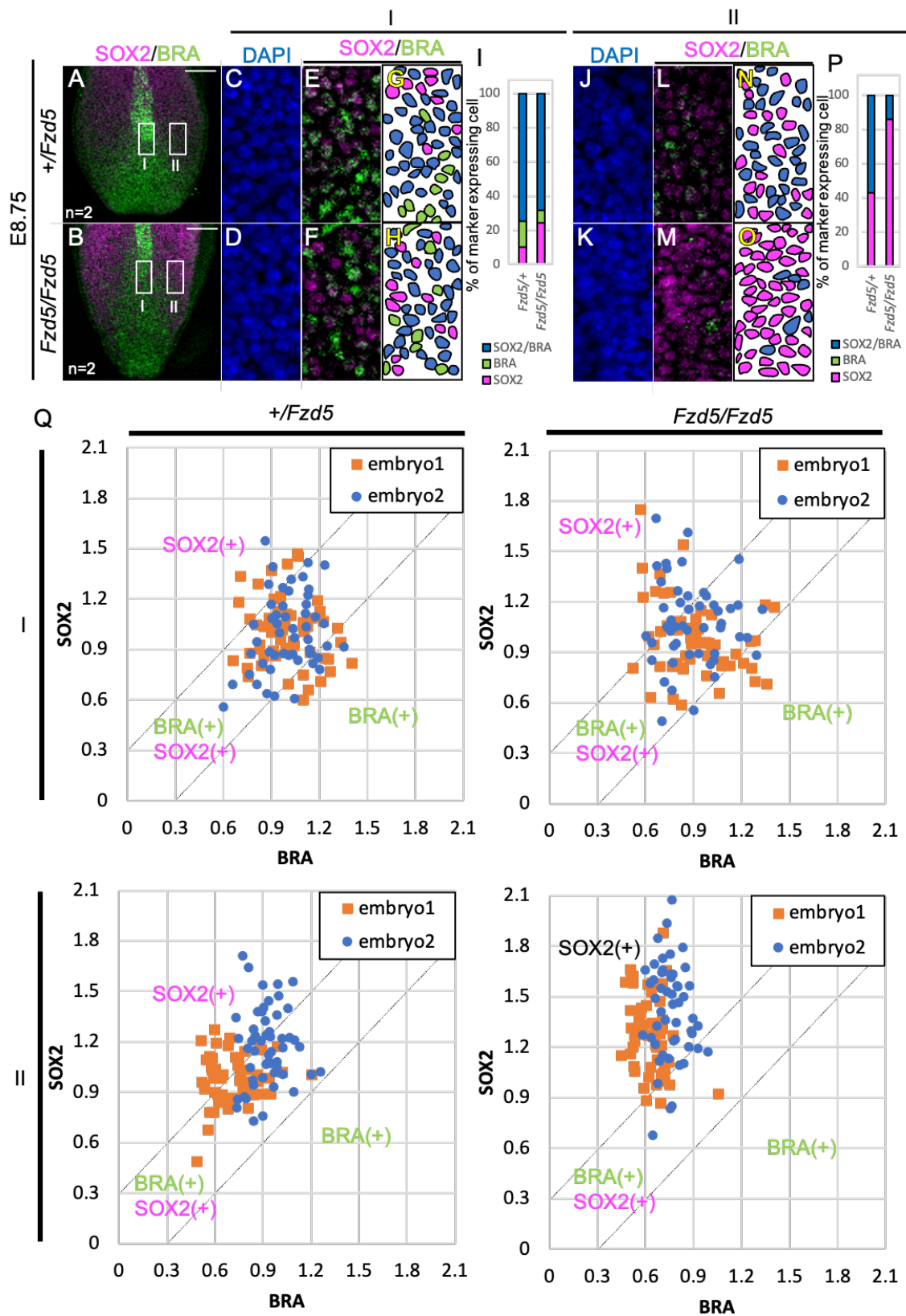


図 13. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚における NMP 細胞(E8.75)

(A-L) E8.75 における *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (A, C, E, G, J, L, N) およびホモ接合体 (B, D, F, H, K, M, O) 胚のホルマウント染色法。抗 SOX2 抗体(マゼンタ)と抗 BRA 抗体(緑)で染色した胚の後端部を A と B に示す。SOX2/BRA 二重陽性細胞の数を定量するために、原始線条の後端部の内側(I)と外側(II)の面画像を分析した(C-P)。DAPI 染色の画像(青; C、D、J、K)、および抗 SOX2(マゼンタ)および抗 BRA(緑)抗体による染色のマージ画像(E、F、L、M)を示す。模式図(G、H、N、O)およびダイアグラム(I、P)も示している。内側と外側の領域の大きさは $50 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ である。各遺伝子型について 2 個の胚を調べた。(Q)免疫組織染色で調べた Bra と Sox2 シグナル強度のプロット。*Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体およびホモ接合体胚における PS 境界の内側(I)および外側(II)領域での Bra および Sox2 シグナル強度のプロット。各遺伝子型について 2 個の胚を調べた。各細胞の測定値は、Bra(x 軸)と Sox(y 軸)のレベルに応じてプロットされている。各細胞の Bra と Sox2 のレベルは、Bra と Sox2 のレベルの平均値で正規化した。レベルの平均値で正規化した。2 本の破線の間に位置する細胞を Bra と Sox2 の二重陽性細胞として定義した。

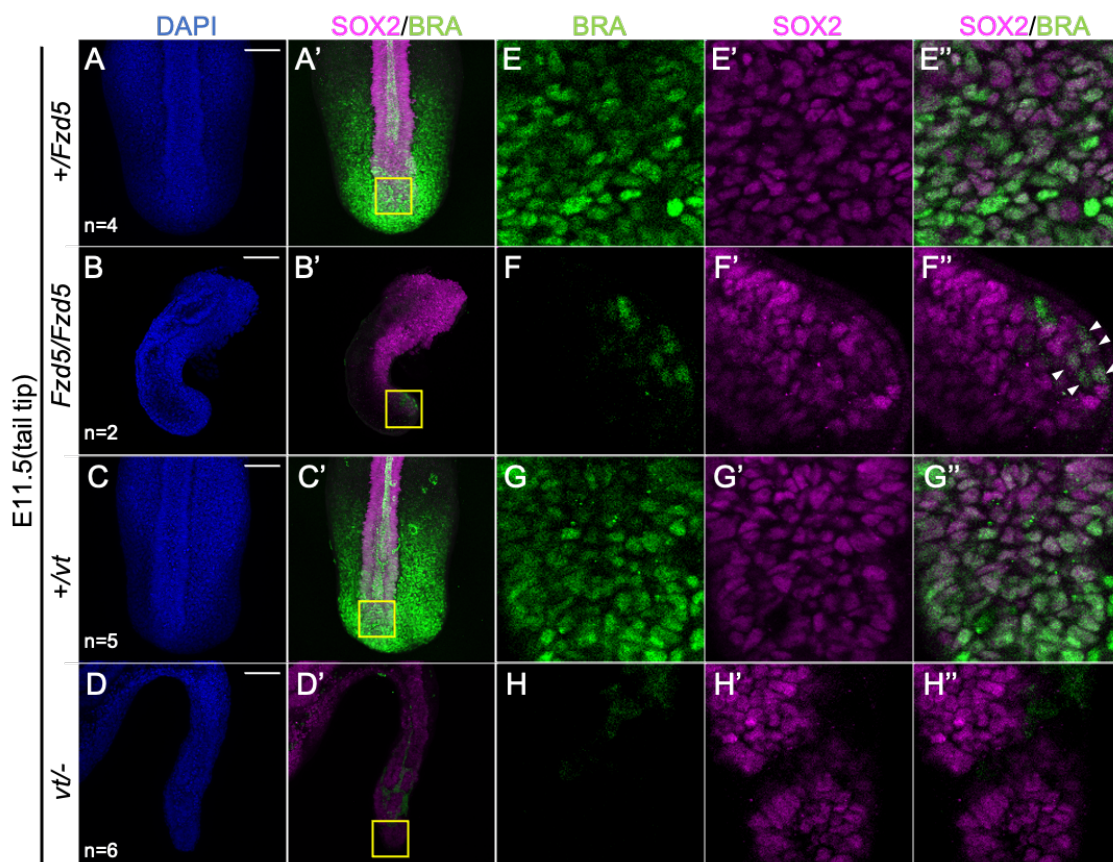


図 14. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚における NMP 細胞(E12.5)

(A-H) E11.5 における *Wnt3a*^{+/Fzd5}(A, E), *Wnt3a*^{Fzd5/Fzd5}(B, F), *Wnt3a*^{+/vt}(C, G), *Wnt3a*^{vt/-}(D, H) 胚のホルマウント染色。DAPI(青) (A-D), 抗 SOX2(マゼンタ)および抗 BRA(緑)抗体(A'-D')で染色した胚の後端部セクション画像を示す。A'-D'で黄色い枠で示した部分は、それぞれ E-H で拡大されている。抗 SOX2 抗体(マゼンタ; E'-H')および抗 BRA 抗体(緑; E-H)で染色した画像、ならびにマージした画像(E''-H'')を示す。黄色い枠は一边が $100 \mu\text{m}$ の正方形である。F''の矢印は、少数の Sox2/Bra 陽性細胞を示す。*Wnt3a*^{vt/-}(D, H)には SOX2 と BRA の二重陽性細胞は存在しない。染色した胚の数を "n=" で示す。スケールバー。 $100 \mu\text{m}$ 。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では少数のエピブラストの細胞で Wnt 活性が持続する

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚の異常をさらに調べるために、エピブラストの個々の細胞における Wnt シグナル活性を直接調べた。この目的のために、我々は *R26 WntVis* レポーターを利用した。このレポーターの発現は、*Rosa26* 遺伝子座にウイルスプロモーターと結合

した 7 量体の TCF/LEF1 結合配列によって制御されている (Takemoto et al. 2016)。このレポーターは、広範囲の Wnt シグナル強度に対して段階的に反応する。本研究では、このレポーターの蛍光を個々の細胞で測定した。

マウスエピブラストの発生過程では、*Wnt3*、*Wnt8*、*Wnt3a* という 3 つの Wnt リガンドが順次 Wnt シグナルを活性化する (Rivera-Pérez and Magnuson 2005; Takada et al. 1994; Terry P. Yamaguchi 2008; Zhao and Duester 2009)。*Wnt3* と *Wnt8* は *Wnt3a* より先に発現するため、*Wnt3a* 欠損変異胚でも early headfold (EHF) ステージ (E7.0) で Wnt 活性が検出された (Takemoto et al. 2016: 図 15A, B)。この段階において、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、予測通り Wnt 活性の明らかな変化は検出されなかった (図 16B, C)。その後、*Wnt3a* の発現が活性化され、Wnt シグナルレベルがコントロールと *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の両方で増加したが (図 16D, E)、*Wnt3a* 欠失胚では増加しなかった (図 15B, D)。Late headfold (E7.5) 段階でも *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚において Wnt シグナル伝達は適切に行われた。このように、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚においても、Wnt シグナルは *Wnt3a* 依存の初期段階において適切に活性化される。注目すべきは、これらのステージでは、コントロールと *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の両方で、エピブラスト細胞間で蛍光レポーターのレベルが異なっていることである。

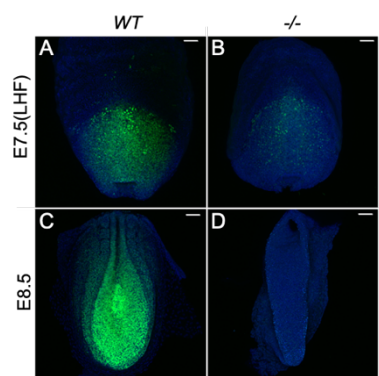


図 15. *Wnt3a* ノックアウト胚のエピブラスト細胞集団における Wnt シグナル

Wnt シグナルによって特異的に発現が活性化される EGFP レポーター遺伝子を持つマウス胚を用いて、個々のエピブラスト細胞における Wnt シグナル伝達活性を可視化した。*Wnt3a* ノックアウト (B, D) と WT (A, C) 胚で、E7.5 (A, B) および E8.5 (C, D) の Wnt シグナル活性をモニターした。*Wnt3a* ノックアウト胚では、Wnt シグナルが E7.5 で激減し、E8.5 で完全に消失することから、E8.5 エピブラスト以降の Wnt 活性は *Wnt3a* リガンドのみに依存することが示唆される。スケールバー : 100 μ m。

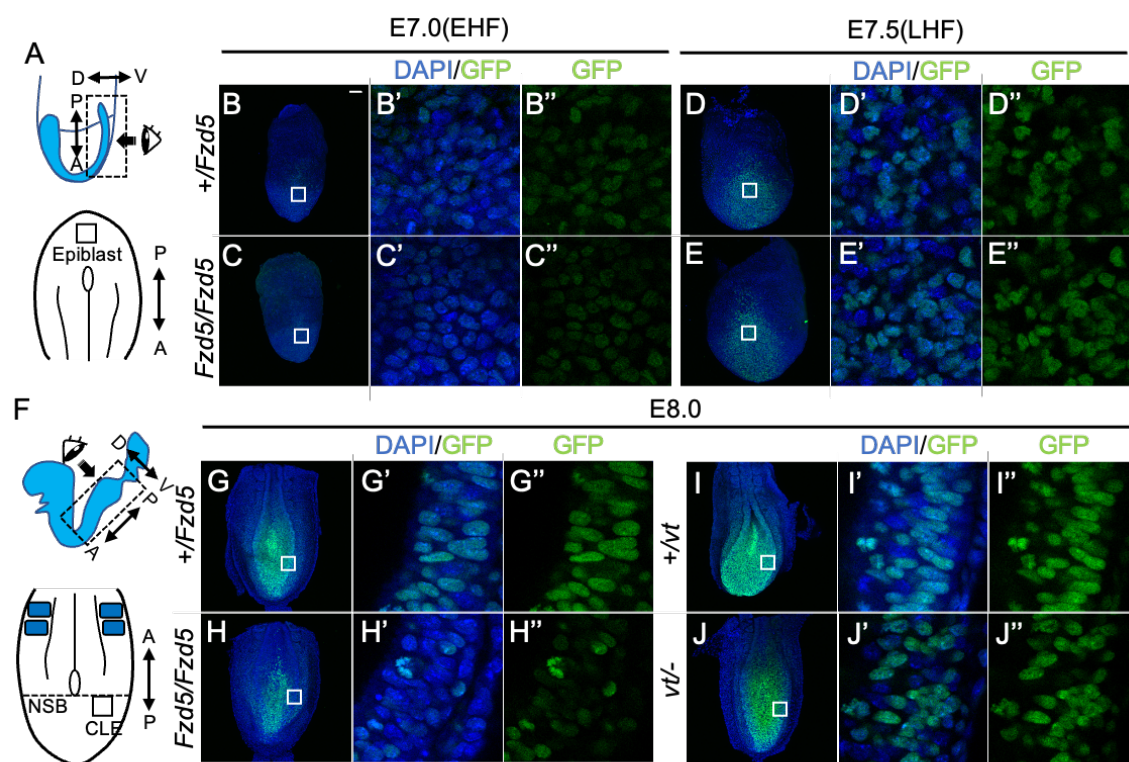


図 16. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のエピブラスト細胞集団における Wnt シグナル(E7.0-E8.0)

Wnt/b-catenin シグナルによって発現が特異的に活性化される EGFP レポーター遺伝子を持つマウス胚を用いて、個々のエピブラスト細胞における Wnt/b-catenin シグナル活性を視覚化した。*Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (B, D, G) およびホモ接合体 (C, E, H) の E7.0 (B, C), E7.5 (D, E), E8.0 (G, H, I, J) の胚で Wnt/b-catenin のシグナリング活性がモニターされた。Wnt/b-catenin シグナル活性は、E8.0 (H, I) と *+/vt* (I) と *vt/-* (J) 胚でも可視化された。E7.0 胚では、B および C のボックスで示した部位の拡大画像をそれぞれ B' および C' に示す。なお、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では、E7.0 (A', B'), E7.5 (C, D) と同様に Wnt/b-catenin シグナル活性は明らかに変化していない。E8.0 胚では、各遺伝子型において F のボックスで示される部位の拡大画像を示す。(領域の大きさは $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$)。PS : Primitive Streaks, NSB : node-streak border, CLE : caudal lateral epiblast。スケールバー。 $100 \mu\text{m}$ 。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では、初期体節期 (E8.0) から Wnt シグナル伝達が異常になり始めた (図 16G, H)。E8.0(2-3 体節期頃)において、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の前方および側方エピブラスト領域で Wnt シグナル陽性細胞の数が減少した (図 16G, H)。Wnt シグナル陽性細胞の減少は、E8.75 の *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のエピブラスト領域で顕著であり、Wnt 陽性細胞と陰性細胞がパッチワーク状に分布していた (図 17A-F'')。この減少は E9.5 で増強されたが、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の後端には Wnt 陽性細胞が残っていた (図 18A, B)。これらの後方 Wnt 陽性細胞はさらに E11.5 まで維持された(データは示さない)。E8.75 においてエプブラストの細胞のばらつきを理解するために、各々の細胞のシグナルの強さを定量し、変動係数 (特定の領域内でどの程度シグナルがばらついているかの指数 : C.V.) を測定した。その結果、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の変動係数は野生型およびヘテロ接合体に比べ大きいことがわかった。特に *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚にお

いて area2 における変動係数は非常に大きく、中心よりも側方で Wnt シグナルは大きくばらつくことがわかった。E8.75 の *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚において少数の強い Wnt シグナルを有する細胞が観察された(図 17F')。これらの細胞が周りの細胞と同調して Wnt シグナルを制御しているのかを定量化するため、ばらつき指数 (Variation index : V.I.) として明るい細胞と周囲の細胞のシグナルの比を定量化した(図 17O, P, Q)。その結果、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の V.I. は野生型およびヘテロ接合体に比べ大きいことがわかった。特に *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚において area2 における変動係数は非常に大きく、中心よりも側方で Wnt シグナルは大きくばらつくことがわかった。強い Wnt シグナルを持つ細胞の周辺細胞における Wnt シグナルは強い訳ではないということから、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚における Wnt3a を介した細胞間コミュニケーションが損なわれているということが示唆された。

一方、*wt/wt* 胚では、Wnt シグナルの減少は E8.75 で始まった (図 17G-L')。さらに、ほとんどの Wnt 陽性エピブラスト細胞で活性レベルが徐々に減少しているように見え、エピブラスト集団の Wnt 活性の変動係数およびばらつき指数(V.I.)は *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚よりも小さかった(図 17O-Q)。

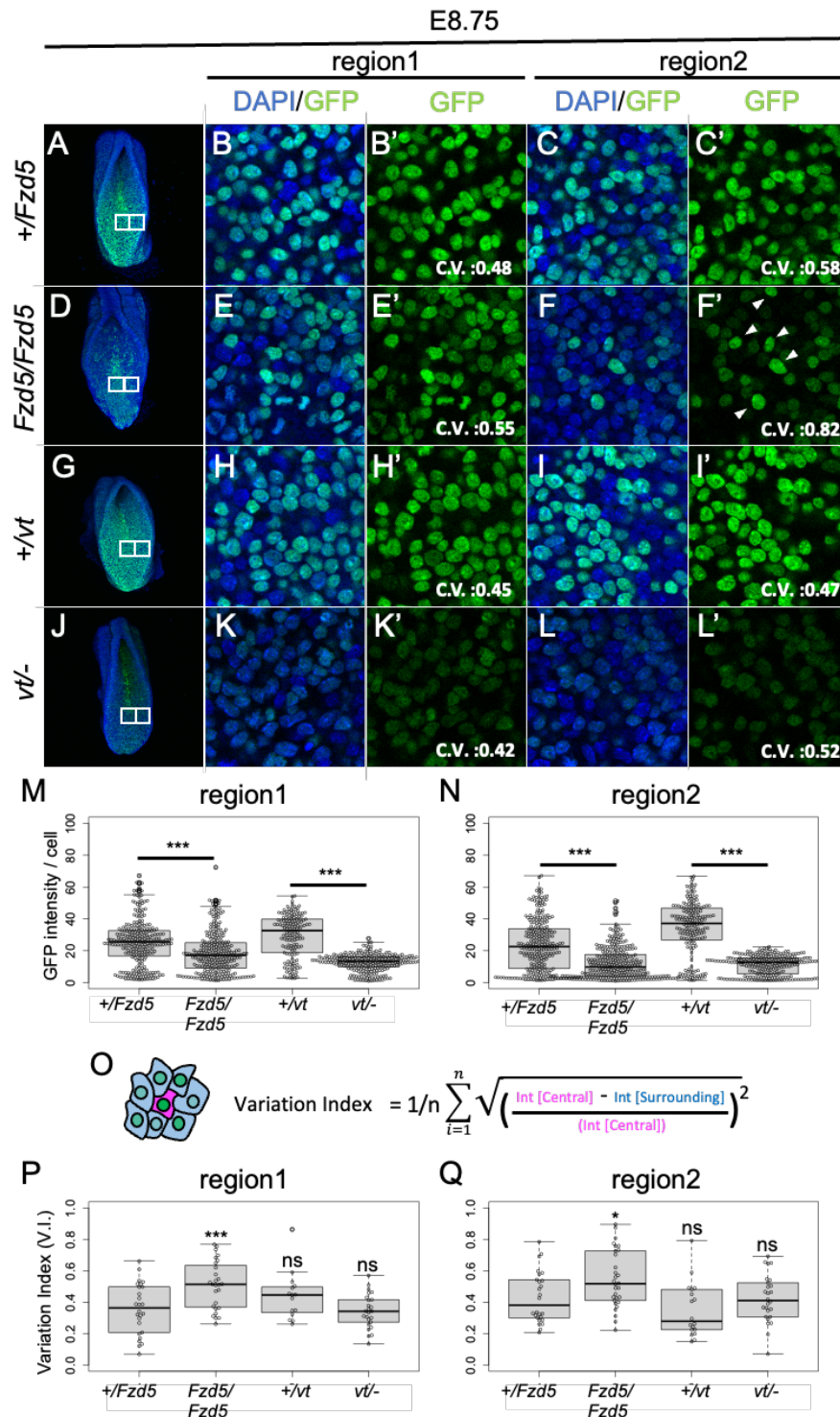


図 17. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のエピブラスト細胞集団における Wnt シグナル

Wnt シグナルによって特異的に発現が活性化される Histone2B-GFP レポーター遺伝子を持つマウス胚を用いて、個々のエピブラスト細胞における Wnt シグナル活性を E8.75 で可視化した。Wnt シグナル活性は、*Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (A、B、C) およびホモ接合体 (D、E、F) 胚、ならびに *+vt* (G、H、I) および *vt/-* (J、K、L) 胚でモニターされた。各胚において、ボックスで示された領域の拡大画像も示されている。各胚において、ノード (region1) と CLE (region2) の拡大画像を示す (A100 × 100 μm)。region1 はノードとストリークの境界を含んでいる。拡大画像は単一共焦点平面で撮影した。region1 および region2 の個々の細胞における GFP 強度は、遺伝子型を決定した各胚 (M、N) において定量した。各領域における胚間の変動係数 (CV) の平均値は、GFP 画像の下部に示した。各遺伝子型について、*+vt* を除く 3 個の胚を調べた (2 個)。箱ひげ図は、第 1、第 3 四分位と中央値を示す。隣接する細胞間のばらつきも調べた (O-Q)。ここでは、各枠

付き領域で Wnt 活性が上位 10%に入る細胞に着目し、そのような細胞と周囲の細胞との Wnt 活性の差の程度を (O) に示すように測定した。ここでは、region1 (P) と region2 (Q) について、その差の程度 (V.I.) を調べている。(P) と (Q) の各点は、Wnt 活性の上位 10%に位置する細胞の 1 つ周辺の変動指数を示している。スケールバー 100 μm。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では、Wnt 活性の低下が体節初期から起こっているが、少数の Wnt 陽性細胞は長く残存する。特に、コントロールの胚でも Wnt 活性は隣接する細胞間で変動しているように見えるが、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚ではこの不均一性が強調された (図 17)。おそらく、多くのエピブラスト細胞で Wnt 活性が低下することにより、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚では NMP 細胞の数、および NMP 細胞から作られる神経細胞や体節細胞の数が減少するのであろう。一方、他のエピブラスト細胞では、Wnt シグナルが持続的に活性化されることにより少数の NMP 細胞の維持に貢献し、その結果、細く曲がりくねった尾が形成されることが予想される。

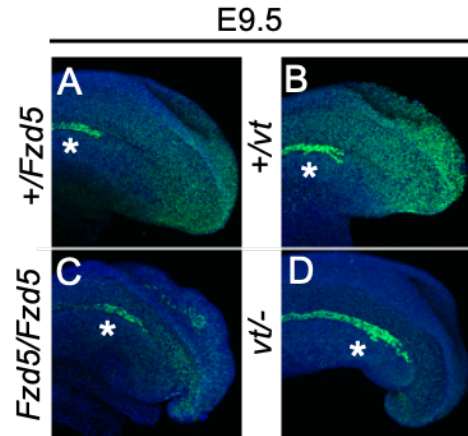


図 18. *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のエピブラスト細胞集団における Wnt シグナル (E9.5)

(A-D) Wnt/b-catenin シグナルレポーターマウスを用いて、個々のエピブラスト細胞における Wnt/b-catenin シグナル活性を視覚化した。Wnt3a-Fzd5 ヘテロ接合体 (A), Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体 (C), +/vt (B) と vt/- (D) 胚において E9.5 の胚で Wnt/b-catenin のシグナリング活性がモニターされた。矢頭はネフリックダクトの先端を示す。

レチノイン酸は *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の表現型を増強する

Wnt 活性の低下は体節形成期初期から観察されることから、体節形成が *Wnt3a-Fzd5* 特異的な Wnt 活性細胞の減少に影響している可能性がある。興味深いことに、体節細胞で合成されるレチノイン酸 (RA) は、ゼブラフィッシュ胚の *Bra* の機能を阻害する (Martin and Kimelman 2010)。また、RA を分解する酵素 (*Cyp26a*) を変異させたマウス胚は、*Wnt3a* や *Bra* 変異胚と同様に体軸が短くなる表現型を示す (S Abu-Abed et al. 2001)。そこで *Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のエピブラスト細胞は、Wnt 活性の維持において RA に対してより感受性が高いと仮定した。

この問題を解決するために、*Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体雄と交配した雌の *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体マウスに、妊娠 7.5 日で RA 処理を行い、変異体胚に対する RA の影響を検討した。RA 処理により、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚の形態の異常が特異的に増強された (図 19B-G)。さらに、Wnt レポーター解析により、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚で特異的に低下した Wnt 活性のパターンが RA 処理により増強され、前後軸の細胞位置に関係なくパッチワークパターンが増強されていることが明らかになった (図 19I-M)。この結果は、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚のエピブラスト細胞集団が、RA に対して特異的に感受性があることを示唆している。

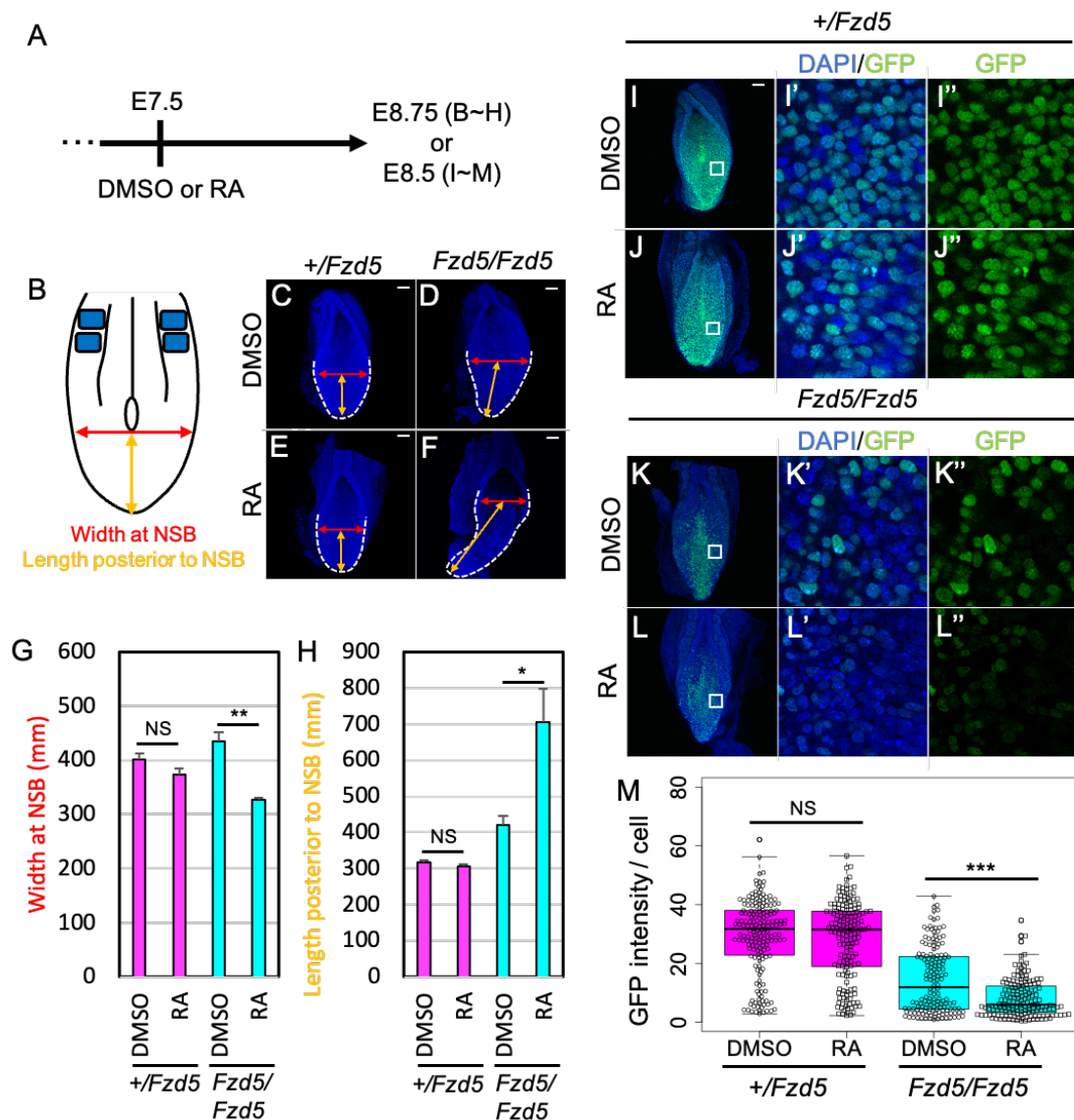


図 19. Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚のエピブラスト細胞集団におけるレチノイン酸の効果

(A-G) E8.75 のレチノイン酸(RA)処理胚の解析。実験の模式図を(A)に示す。DMSO (B, C) または 10 μ M RA (D, E) で処理した *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (B, D) およびホモ接合体 (C, E) E8.75 胚の背側画像を DAPI(青) 染色したもの。各遺伝子型における PS 後端の幅(F)と PS 後端までの長さ(G)を定量した結果を示す。RA 処理により、*Wnt3a-Fzd5* ホモ接合体胚に特に総形態の異常が増強される。赤矢印は PS 後端での幅を、橙矢印は PS 後端での長さを示す。差は T-test を用いて統計的に有意かどうかを評価した; ** $P < 0.001$; * $P < 0.01$; * $P < 0.05$; $P > 0.05$; n.s. (not statistically significant)。グラフ中のエラーバーは、各群の標準偏差を意味する。スケールバー: 100 μ m。(H-M) レチノイン酸(RA)処理胚の E8.0 での解析。実験スキームを(H)に示す。個々のエピブラスト細胞における Wnt/b-カτεニンシグナル活性は、図 5 に示すように可視化した。E8.5 の DMSO (I, K) または 10mM RA (J, L) 処理 *Wnt3a-Fzd5* ヘテロ接合体 (I, L) およびホモ接合体 (K, L) 胚の背側画像を示す。(H) の I, II, III で示される領域における単一共焦点面の画像も示す。これらの領域のサイズは 50 μ m \times 100 μ m であり、エピブラストにおける位置は図 5 に示したものと同一である。領域 I, II, III の個々の細胞における GFP 強度を、それぞれ M, N, O にまとめた。各遺伝子型について 2 個の胚を調べた。箱ひげ図は、第 1、第 3 四分位値および中央値を示す。(A)と(H)では、PS は原始線条、青枠は体節を示す。スケールバー: 100 μ m。

考察

分泌されたシグナルタンパク質は、あるときは分泌元細胞の近傍の細胞に作用し、またあるときは遠くの細胞に作用すると考えられてきた(Briscoe and Small 2015; J. B. Gurdon and Bourillot 2001)。一方、エピブラストや尾芽では、ほとんどの細胞が Wnt リガンドを産生・受容している(Christian and Moon 1993; Garriock et al. 2015; Petersen and Reddien 2009; Shimizu et al. 2005)。その結果、各細胞から細胞間隙に分泌された Wnt リガンドは、隣接する細胞の Wnt シグナルを活性化する(Christian and Moon 1993; Petersen and Reddien 2009; Shimizu et al. 2005)。このように、Wnt 産生細胞から受容細胞への一方向の伝達とは対照的に、Wnt リガンドはエピブラストと尾芽の細胞間で相互に交換されているようである。

細胞集団内での相互リガンド交換の生物学的意義を理解するために、Wnt3a を介した細胞間コミュニケーション、すなわちパラクライン機能が特異的に損なわれた Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚を作製した。これらの胚では、体節で RA が合成され始めた後、エピブラストの前方および側方から Wnt 陽性細胞が急速に減少するが、後端には NMP 細胞を含む少数の Wnt 陽性細胞が後期のステージまで残存している。Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体を調べたところ、Wnt3a を介した細胞間コミュニケーションが NMP 集団の維持に必要であるというモデルが支持された(図 20)。

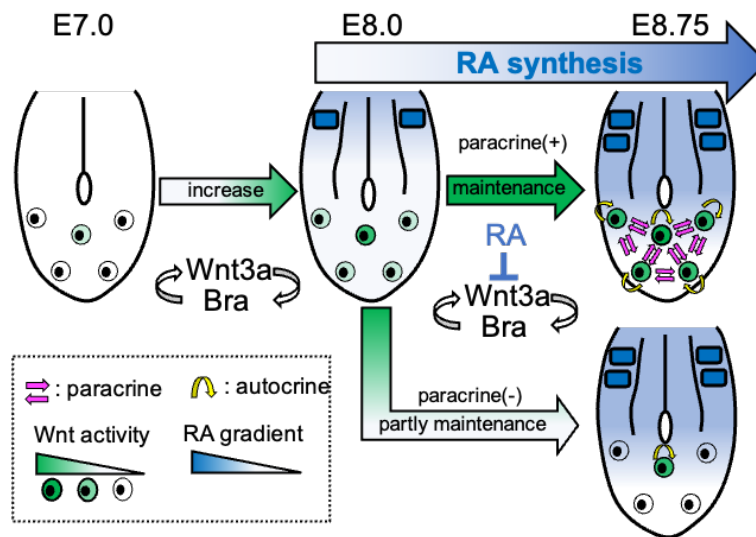


図 20. Wnt3a のパラクライン機能は、エピブラストの Wnt シグナルのばらつきを補正し、RA シグナルに対しての頑強性を獲得するために必要である。

エピブラスト細胞集団における Wnt paracrine の効果を示す模式図。体節形成前 (E7.0-E8.0)、各エピブラスト細胞における Wnt 活性は Wnt3a および Bra を介した正のフィードバック制御により劇的に上昇する。この時期には、コントロール胚とパラクライン Wnt シグナルを欠く胚 (Wnt3a-Fzd5) の間に明らかな差は見られなかった。体節形成開始後 (E8.0 以降) は、体節で合成される RA の拮抗作用により Wnt 弱細胞が増加するが、paracrine Wnt シグナルを欠損した胚 (paracrine (-)) では少数の Wnt 強細胞が長期間残存している。こ

の Wnt シグナルの不均一性の増大は、エピブラスト細胞間の Wnt リガンドの細胞間交換 (paracrine (+)) によって補われる。

本研究で作成した Wnt3a-Fzd5 タンパク質がどのように Wnt シグナルを細胞内に伝えるのかについてはよくわからない。一般的に、 β カテニン依存的な Wnt シグナル伝達経路 (canonical 経路) において Wnt3a は Frizzled と結合し、共役受容体の LRP5 あるいは LRP6 と結合することで、Frizzled と LRP5/6 の細胞内ドメインが接近し Wnt シグナルが細胞内

に伝わっていくと考えられている。このことから、Wnt3a-Fzd5 の Wnt3a 部分が LRP5/6 と結合することで、Wnt3a-Fzd5 の Fzd5 部分と結合した LRP5/6 の細胞内ドメインが物理的に接近し、Wnt シグナルを細胞内に伝えていると考えられる。

NMP を含むエピブラストや尾芽領域では、Wnt3a を発現する細胞は Bra も発現している (T P Yamaguchi et al. 1999)。Bra は Wnt シグナルの直接的な転写標的であり、Wnt3a の発現もまた Bra に依存している (Koch et al. 2017; T P Yamaguchi et al. 1999)。このように、Wnt3a と Bra は相互に活性化し、ポジティブフィードバック制御ループを形成している。ポジティブフィードバックは小さな変化を増幅するため、この制御系は細胞内の Wnt3a および Bra の量を急速に増減させることができるはずである (Mitrophanov and Groisman 2008)。

ポジティブフィードバックループの特性として、ループを構成する因子の発現は不安定になりやすい。Wnt 活性の強い細胞は Wnt シグナルは活性化し続けるが、Wnt 活性の弱い細胞は、ポジティブフィードバックによりこの活性を急速に失い、その結果、ゆらぎによって生じる格差が大きくなる。エピブラストや尾芽領域では、Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体において Wnt 活性をほとんど持たない細胞が E8.0 から急速に増加する。興味深いことに E8.0 以降は、Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体では、わずかではあるが長期間にわたって強い Wnt 活性を維持する細胞が出現した。Wnt 活性が高い細胞が存在し続ける理由は、これらの細胞における Wnt 活性の変化が、ポジティブフィードバックによる減少を引き起こす閾値以下であるためであると思われる。

一方、Wnt3a-Fzd5 ヘテロ接合体を含むコントロール胚では、Wnt3a 陽性細胞の数は徐々に減少し、軸伸長が終了する E13.5 付近で消失した。これらの胚では高い Wnt 活性を持つ細胞から供給される Wnt リガンドが、Wnt 活性の弱い細胞の Wnt 活性の低下をある程度補っていることが予想される。このように、Wnt3a リガンドの交換が、個々の細胞における Wnt 活性の急激な減少を補っているように見える。以上のことから、ポジティブフィードバック制御は細胞集団の構成細胞間の不均一性を増幅させるが、Wnt リガンドのような分泌性のポジティブフィードバックループ構成因子の共有が、この不均一性の増幅を抑制することが示唆された。

Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体のエピブラストでは、体節形成が始まる E8.0 において、多くの細胞で Wnt シグナルが急速に減少した。これらの胚では、Wnt シグナルの低下は、エピブラストの前方および側方でより顕著であった。注目すべきは、マウスの初期胚において、RA 合成にはレチナールアルデヒド脱水素酵素 2 (RALDH2/ALDH1a2) が必要であり、これは体節と側板中胚葉で活性化される (Suzan Abu-Abed et al. 2003; Niederreither et al. 1997)。RA シグナルが Wnt/Bra 活性を阻害することを示す証拠があるは豊富である (S Abu-Abed et al. 2001; Suzan Abu-Abed et al. 2003; MacLean et al. 2001; Martin and Kimelman 2010; Sakai et al. 2001)。したがって、Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体のエピブラスト細胞集団は、エピブラストの前方および側方に発達した組織から発生する RA ストレスに

敏感であると示唆された。

実際、Wnt3a-Fzd5 ホモ接合体胚では、RA 処理によってエピブラスト細胞の Wnt シグナルが特異的に減少しており、これらの胚のエピブラストの細胞集団は RA に対してより感受性が高いことが示された。おそらく、これらの胚では不均一性を減らすことができなかったため、RA が引き金となって Wnt 活性が低下すると、個々の細胞でポジティブフィードバックループを介して急速に増幅されるのであろう。したがって、エピブラストと尾芽の細胞集団の構成細胞の協調性を維持し、細胞間の Wnt シグナルの不均一性を減少させることで、細胞集団が外的ストレスに対してより強くなることが期待される。

細胞の分化を制御するためには、細胞集団内の細胞間コミュニケーションが重要であるという証拠が示されている。Xenopus の原腸胚では、筋前駆細胞は互いにコミュニケーションを取りながら分化していく。この例では、外胚葉にはさまれて移植された 100 個以上の Xenopus の筋前駆細胞は分化できるが、それ以下の数の少数の細胞集団や単一細胞は分化できない(J. Gurdon 1998; J. B. Gurdon, Lemaire, and Kato 1993)。この細胞数依存的な分化は、"コミュニティ効果 : community effect" と表現された。これは、前駆細胞間の細胞間相互作用によって引き起こされるもので、細胞が分化するためには、このような相互作用が必要である。理論的な研究により、細胞間コミュニケーションを介したポジティブフィードバックが、この細胞数依存的な分化のメカニズムであることが示唆されている(Saka et al. 2011)。

本研究では、Wnt リガンドを介した細胞間コミュニケーションが、実はエピブラストと尾芽領域における細胞集団の維持に関与していることを示した。ここでは、Wnt リガンドの細胞間交換は、Wnt3a や Bra からのポジティブフィードバックを介して増幅された格差を補うために重要である。ここで着目すべきなのは、同様の仕組みの分子ネットワークが、他の事象にも関与しているかどうかである。細胞シグナルの効率やポジティブフィードバックループの増幅効率の違いは、おそらく細胞集団の特徴の違いを生じさせる。もしそうだとすれば、今後の研究では、これらの事象をそれぞれ生み出す分子ネットワークの主要なパラメータを特定することが重要になる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました高田慎治教授に感謝いたします。基礎生物学研究所のイメージング施設の技術支援に感謝します。また、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により Wnt3a-Fzd5 ノックインマウスを作製していただいた筑波大学の高橋智教授、水野聖哉准教授、Wnt レポーターマウスを提供していただいた竹本龍也助教授、数理的な解析のご指導および解析をしていただいた斉藤稔博士と本田直樹教授、マウス提供および技術支援をいただいた NIBB の藤森俊彦教授に感謝いたします。また高田研究室の篠塚琢磨博士、三井優輔博士に感謝します。日頃から様々な議論を行い支えてくださった高田研究室の皆様に感謝します。

引用文献

- Abu-Abed, S, P Dollé, D Metzger, B Beckett, P Chambon, and M Petkovich. 2001. "The Retinoic Acid-Metabolizing Enzyme, CYP26A1, Is Essential for Normal Hindbrain Patterning, Vertebral Identity, and Development of Posterior Structures." *Genes & Development* 15 (2): 226–40.
- Abu-Abed, Suzan, Pascal Dollé, Daniel Metzger, Caroline Wood, Glenn MacLean, Pierre Chambon, and Martin Petkovich. 2003. "Developing with Lethal RA Levels: Genetic Ablation of Rarg Can Restore the Viability of Mice Lacking Cyp26a1." *Development* 130 (7): 1449–59.
- Anderson, Matthew J., L. A. Naiche, Catherine P. Wilson, Cindy Elder, Deborah A. Swing, and Mark Lewandoski. 2013. "TCreERT2, a Transgenic Mouse Line for Temporal Control of Cre-Mediated Recombination in Lineages Emerging from the Primitive Streak or Tail Bud." *PLoS ONE* 8 (4): e62479.
- Briscoe, James, and Stephen Small. 2015. "Morphogen Rules: Design Principles of Gradient-Mediated Embryo Patterning." *Development* 142 (23): 3996–4009.
- Cambray, Noemí, and Valerie Wilson. 2002. "Axial Progenitors with Extensive Potency Are Localised to the Mouse Chordoneural Hinge." *Development* 129 (20): 4855–66.
- Cambray, Noemi, and Valerie Wilson. 2007. "Two Distinct Sources for a Population of Maturing Axial Progenitors." *Development* 134 (15): 2829–40.
- Christian, J L, and R T Moon. 1993. "Interactions between Xwnt-8 and Spemann Organizer Signaling Pathways Generate Dorsoventral Pattern in the Embryonic Mesoderm of Xenopus." *Genes & Development* 7 (1): 13–28.
- Cunningham, Thomas J, Sandeep Kumar, Terry P Yamaguchi, and Gregg Duester. 2015. "Wnt8a and Wnt3a Cooperate in the Axial Stem Cell Niche to Promote Mammalian Body Axis Extension." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 244 (6): 797–807.
- Dunty, William C., Kristin K. Biris, Ravindra B. Chalamalasetty, Makoto M. Taketo, Mark Lewandoski, and Terry P. Yamaguchi. 2008. "Wnt3a/ β -Catenin Signaling Controls Posterior Body Development by Coordinating Mesoderm Formation and Segmentation." *Development* 135 (1): 85–94.
- Dunty, William C., Mark W.L. Kennedy, Ravindra B. Chalamalasetty, Kenneth Campbell, and Terry P. Yamaguchi. 2014. "Transcriptional Profiling of Wnt3a Mutants Identifies Sp Transcription Factors as Essential Effectors of the Wnt/ β -Catenin Pathway in Neuromesodermal Stem Cells." *PLoS ONE* 9 (1): e87018.
- Galceran, J, S C Hsu, and R Grosschedl. 2001. "Rescue of a Wnt Mutation by an Activated

- Form of LEF-1: Regulation of Maintenance but Not Initiation of Brachyury Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15): 8668–73.
- Garriock, Robert J., Ravindra B. Chalamalasetty, Mark W. Kennedy, Lauren C. Canizales, Mark Lewandoski, and Terry P. Yamaguchi. 2015. "Lineage Tracing of Neuromesodermal Progenitors Reveals Novel Wnt-Dependent Roles in Trunk Progenitor Cell Maintenance and Differentiation." *Development* 142 (9): 1628–38.
- Greco, T L, S Takada, M M Newhouse, J A McMahon, A P McMahon, and S A Camper. 1996. "Analysis of the Vestigial Tail Mutation Demonstrates That Wnt-3a Gene Dosage Regulates Mouse Axial Development." *Genes & Development* 10 (3): 313–24.
- Gurdon, J B, and P Y Bourillot. 2001. "Morphogen Gradient Interpretation." *Nature* 413 (6858): 797–803.
- Gurdon, J B, P Lemaire, and K Kato. 1993. "Community Effects and Related Phenomena in Development Minireview." *Cell*. Vol. 75.
- Gurdon, JB. 1998. "A Community Effect in Animal Development." *Nature* 336 (6201): 772–74.
- Imuta, Yu, Hiroshi Kiyonari, Chuan Wei Jang, Richard R. Behringer, and Hiroshi Sasaki. 2013. "Generation of Knock-in Mice That Express Nuclear Enhanced Green Fluorescent Protein and Tamoxifen-Inducible Cre Recombinase in the Notochord from Foxa2 and T Loci." *Genesis* 51 (3): 210–18.
- Koch, Frederic, Manuela Scholze, Lars Wittler, Dennis Schifferl, Smita Sudheer, Phillip Grote, Bernd Timmermann, Karol Macura, and Bernhard G. Herrmann. 2017. "Antagonistic Activities of Sox2 and Brachyury Control the Fate Choice of Neuro-Mesodermal Progenitors." *Developmental Cell* 42 (5): 514-526.e7.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85.
- Liu, Chunqiao, Yanshu Wang, Philip M. Smallwood, and Jeremy Nathans. 2008. "An Essential Role for Frizzled5 in Neuronal Survival in the Parafascicular Nucleus of the Thalamus." *Journal of Neuroscience* 28 (22): 5641–53.
- Liu, P, M Wakamiya, M J Shea, U Albrecht, R R Behringer, and A Bradley. 1999. "Requirement for Wnt3 in Vertebrate Axis Formation." *Nature Genetics* 22 (4): 361–65.
- MacLean, G, S Abu-Abed, P Dollé, A Tahayato, P Chambon, and M Petkovich. 2001. "Cloning of a Novel Retinoic-Acid Metabolizing Cytochrome P450, Cyp26B1, and Comparative Expression Analysis with Cyp26A1 during Early Murine Development." *Mechanisms of Development* 107 (1–2): 195–201.

- Mansouri, A, Y Yokota, R Wehr, N G Copeland, N A Jenkins, and P Gruss. 1997. "Paired-Related Murine Homeobox Gene Expressed in the Developing Sclerotome, Kidney, and Nervous System." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 210 (1): 53–65.
- Martin, Benjamin L., and David Kimelman. 2008. "Regulation of Canonical Wnt Signaling by Brachyury Is Essential for Posterior Mesoderm Formation." *Developmental Cell* 15 (1): 121–33.
- Mitrophanov, Alexander Y, and Eduardo A Groisman. 2008. "Positive Feedback in Cellular Control Systems." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 30 (6): 542–55.
- Niederreither, K, P McCaffery, U C Dräger, P Chambon, and P Dollé. 1997. "Restricted Expression and Retinoic Acid-Induced Downregulation of the Retinaldehyde Dehydrogenase Type 2 (RALDH-2) Gene during Mouse Development." *Mechanisms of Development* 62 (1): 67–78.
- Petersen, Christian P., and Peter W. Reddien. 2009. "Wnt Signaling and the Polarity of the Primary Body Axis." *Cell* 139 (6): 1056–68.
- Rivera-Pérez, Jaime A., and Terry Magnuson. 2005. "Primitive Streak Formation in Mice Is Preceded by Localized Activation of Brachyury and Wnt3." *Developmental Biology* 288 (2): 363–71.
- Saka, Yasushi, Cédric Lhoussaine, Celine Kuttler, Ekkehard Ullner, and Marco Thiel. 2011. "Theoretical Basis of the Community Effect in Development." *BMC Systems Biology* 5 (April): 54.
- Sakai, Y, C Meno, H Fujii, J Nishino, H Shiratori, Y Saijoh, J Rossant, and H Hamada. 2001. "The Retinoic Acid-Inactivating Enzyme CYP26 Is Essential for Establishing an Uneven Distribution of Retinoic Acid along the Anterio-Posterior Axis within the Mouse Embryo." *Genes & Development* 15 (2): 213–25.
- Shimizu, Takashi, Young Ki Bae, Osamu Muraoka, and Masahiko Hibi. 2005. "Interaction of Wnt and Caudal-Related Genes in Zebrafish Posterior Body Formation." *Developmental Biology* 279 (1): 125–41.
- Shinozuka, Takuma, Ritsuko Takada, Shosei Yoshida, Shigenobu Yonemura, and Shinji Takada. 2019. "Wnt Produced by Stretched Roof-Plate Cells Is Required for the Promotion of Cell Proliferation around the Central Canal of the Spinal Cord." *Development* 146 (2): dev159343.
- Stern, Claudio D., Jeroen Charité, Jacqueline Deschamps, Denis Duboule, Anthony J. Durston, Marie Kmita, Jean François Nicolas, Isabel Palmeirim, Jim C. Smith, and Lewis Wolpert. 2006. "Head-Tail Patterning of the Vertebrate Embryo: One, Two or

- Many Unresolved Problems?" *Int J Dev Biol* 50 (1): 3–15.
- Takada, S, K L Stark, M J Shea, G Vassileva, J A McMahon, and A P McMahon. 1994. "Wnt-3a Regulates Somite and Tailbud Formation in the Mouse Embryo." *Genes & Development* 8 (2): 174–89.
- Takemoto, Tatsuya, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Kazuki Nakao, Yasuhide Furuta, Hitomi Suzuki, Shinji Takada, Toshihiko Fujimori, and Hisato Kondoh. 2016. "R26-WntVis Reporter Mice Showing Graded Response to Wnt Signal Levels." *Genes Cells* 21 (6): 661–69.
- Tam, P P, and R S Beddington. 1987. "The Formation of Mesodermal Tissues in the Mouse Embryo during Gastrulation and Early Organogenesis." *Development (Cambridge, England)* 99 (1): 109–26.
- Tenin, Gennady, David Wright, Zoltan Ferjentsik, Robert Bone, Michael J. McGrew, and Miguel Maroto. 2010. "The Chick Somitogenesis Oscillator Is Arrested before All Paraxial Mesoderm Is Segmented into Somites." *BMC Developmental Biology* 10: 24.
- Tsakiridis, Anestis, Yali Huang, Guillaume Blin, Stavroula Skylaki, Filip Wymeersch, Rodrigo Osorno, Costas Economou, et al. 2014. "Distinct Wnt-Driven Primitive Streak-like Populations Reflect in Vivo Lineage Precursors." *Development* 141 (6): 1209–21.
- Tsukiyama, Tadasuke, Akimasa Fukui, Sayuri Terai, Yoichiro Fujioka, Keisuke Shinada, Hidehisa Takahashi, Terry P. Yamaguchi, Yusuke Ohba, and Shigetsugu Hatakeyama. 2015. "Molecular Role of RNF43 in Canonical and Noncanonical Wnt Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 35 (11): 2007–23.
- Tzouanacou, Elena, Amélie Wegener, Filip J. Wymeersch, Valerie Wilson, and Jean François Nicolas. 2009. "Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis." *Developmental Cell* 17 (3): 365–76.
- Wilson, V, and R S Beddington. 1996. "Cell Fate and Morphogenetic Movement in the Late Mouse Primitive Streak." *Mechanisms of Development* 55 (1): 79–89.
- Yamaguchi, T P, S Takada, Y Yoshikawa, N Wu, and A P McMahon. 1999. "T (Brachyury) Is a Direct Target of Wnt3a during Paraxial Mesoderm Specification." *Genes & Development* 13 (24): 3185–90.
- Yamaguchi, Terry P. 2008. "Genetics of Wnt Signaling during Early Mammalian Development." *Methods Mol Biol* 468: 287–305.
- Yoshikawa, Y, T Fujimori, A P McMahon, and S Takada. 1997. "Evidence That Absence of Wnt-3a Signaling Promotes Neuralization Instead of Paraxial Mesoderm Development in the Mouse." *Developmental Biology* 183 (2): 234–42.
- Zhao, Xianling, and Gregg Duester. 2009. "Effect of Retinoic Acid Signaling on

Wnt/ β -Catenin and FGF Signaling during Body Axis Extension." *Gene Expr Patterns* 9 (6): 430–35.