

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

篠塚 琢磨

博士 (理学)

総合研究大学院大学

生命科学研究科

基礎生物学専攻

平成30 (2018) 年度

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)

篠塚琢磨

目次

概要.....	3
序論.....	4
分泌性シグナルタンパク質の空間分布	4
発生過程の組織における細胞間シグナル伝達の制御	5
分泌性シグナルタンパク質の多様な輸送方法	5
分泌性シグナルタンパク質研究のモデル系となる脊髄神経管の発生.....	6
分泌性シグナルタンパク質による神経前駆細胞および神経幹細胞の制御.....	7
本研究で明らかにしたこと	7
材料および方法	8
マウス	8
固定	9
抗体染色.....	9
<i>In situ</i> hybridization	9
標識実験.....	10
系譜解析.....	10
脊髄損傷.....	10
透過電子顕微鏡.....	10
統計解析.....	10
結果.....	11
Wnt タンパク質の空間分布の解析.....	11
発生過程における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化領域の変化.....	12
発生過程において Roof plate 細胞は内腔との接触を保ちながら伸長する	13
伸長した roof plate 細胞の特徴.....	14
<i>Wls</i> cKO(Wnt1-Cre)マウスによる roof plate からの Wnt タンパク質の分泌阻害	15
Roof plate から分泌された Wnt は roof plate の正常な伸長に必要である.....	17
Roof plate から分泌された Wnt は内腔の周りの細胞での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化と細胞増殖に必要である.....	18
Wnt/ β -catenin シグナルの活性化領域は発生の進行にしたがって変化する.....	19
Roof plate 細胞の伸長は脊髄損傷後の神経前駆細胞の増殖を制御する.....	21
考察.....	23
謝辞.....	26
参考文献	26
図表.....	34

概要

細胞間シグナル伝達は細胞の増殖や分化、組織の領域化に重要であり、発生現象や成体の恒常性の維持に深くかかわっている。そのため、細胞間シグナル伝達の制御機構の理解は、発生生物学において重要な問題であり、産生細胞内での分泌性シグナルタンパク質の分泌経路や、標的細胞内でのシグナルの伝達経路および標的細胞の細胞応答に関してこれまで多くの知見が蓄積してきた。一方で、分泌性シグナルタンパク質の空間分布によってシグナルの活性化領域とシグナル強度が規定されることから、分泌性シグナルタンパク質の空間分布の解析は細胞間シグナル伝達を理解するうえで重要な課題である。しかし、産生細胞から標的細胞へ輸送される過程の分泌性シグナルタンパク質がどのような空間分布を形成しているかについてはあまり研究が進んでいない。

また、発生過程における細胞間シグナル伝達の制御機構を理解するうえでは、組織の中で細胞の相互の位置関係が、細胞の変形や移動によって時間とともに動的に変化していくことを考慮する必要がある。このような、動的な組織の中で細胞間シグナル伝達の空間情報がどのように厳密に制御されるのかということに関してはあまり議論されてこなかった。特に、発生過程において産生細胞自身が変形したときに、周りの細胞でのシグナルが時間とともにどのように変化するかということも興味深い問題である。

本研究では、マウス脊髄神経管の発生における **roof plate** から分泌される **Wnt** タンパク質とその作用に注目して研究を行った。**Roof plate** は脊髄神経管の最も背側の領域であり、受精後 (E) 8.5 から E12.5 日において *Wnt1* と *Wnt3a* を発現して、神経上皮細胞の細胞増殖と細胞分化を制御し、背側脊髄神経管の領域を制御していることが知られている。興味深いことに、**roof plate** は脊髄神経管の発生にしたがって、脊髄神経管の内腔の退縮とともに腹側へと伸長することが、ゼブラフィッシュ胚を用いた研究から報告されている。このことから、**roof plate** が形態変化を起こすことによって **Wnt/β-catenin** シグナルの標的細胞が変化し、新たな機能が現れる可能性が示唆される。しかし、発生後期の脊髄神経管における **Wnt** の発現と機能についてはほとんど解析が行われてこなかった。

そこで、まず脊髄神経管における **Wnt** タンパク質の空間分布が、発生過程をおってどのように変化していくかを解析するため、*Wnt1*、*Wnt3a* の抗体染色と *egfp-Wnt3a* ノックインマウスの作製により、**Wnt** タンパク質の可視化を行った。**Wnt** タンパク質の空間分布を発生過程をおって観察したところ、発生初期では脊髄神経管のもっとも背側の領域で **Wnt** タンパク質の局在が見られたが、発生後期の背傷神経管では内腔の退縮とともに **Wnt** タンパク質の発現領域は腹側へと伸長していた。次に、**Wnt/β-catenin** シグナルの標的遺伝子である *Axin2* の *in situ hybridization* と *ins-TOPGAL* レポーターマウスを用いた実験により、**Wnt/β-catenin** シグナルの活性化領域の可視化を行った。**Wnt/β-catenin** シグナルの活性化は、**Wnt** タンパク質の発現領域の伸長とともに腹側へと伸長した。また、伸長した **Wnt** タンパク質の発現領域の腹側の先端と隣接した内腔の周りの細胞でも **Wnt/β-catenin** シグナルの活性化がみられた。また、**roof plate** 特異的なマーカーの発現解析から、マウスにおい

でも発生の進行にしたがい内腔の退縮にともなって **roof plate** が背腹軸に沿って伸長することを確認した。このことから、発生後期に内腔の退縮にともなって伸長した **roof plate** においても、**Wnt** タンパク質は発現し続けていることが示された。さらに、**roof plate** 細胞を低頻度に標識する実験と透過電子顕微鏡の観察から、それぞれの **roof plate** 細胞は背腹軸に沿って細胞突起を伸ばし、その先端は退縮した内腔に接触していることを明らかにした。加えて、これらの伸長した **roof plate** 細胞の細胞突起は中間径フィラメントに富んだ構造であることが示された。これらの結果から、発生後期の伸長した **roof plate** 細胞からの **Wnt/β-catenin** シグナルは、**roof plate** 自身と内腔の周りの細胞で作用していることが示唆された。

次に **roof plate** からの **Wnt/β-catenin** シグナルの機能を明らかにするため、**Wnt** の分泌に必要な *Wntless*(*Wls*)を **roof plate** 特異的に欠損させたマウスの解析を行った。まず、**roof plate** における **Wnt/β-catenin** シグナルの機能に注目すると、*Wls* cKO 胚では **roof plate** の適切な rearrangement が起こらずに **roof plate** の伸長が阻害されることが示された。このことから、**roof plate** から分泌された **Wnt** は **roof plate** 自身に作用し **roof plate** の伸長を制御していることが示唆された。また、E18.5 日の脊髄神経管において、内腔の周りの細胞での **Wnt/β-catenin** シグナルの活性化は *Wls* cKO 胚で有意に減少した。さらに、内腔の周りの細胞の細胞増殖の解析を行ったところ、*Wls* cKO 胚では細胞増殖を行っている細胞が正常胚に比べ有意に減少した。このことから、伸長した **roof plate** から分泌された **Wnt** は内腔の周りの細胞に **Wnt/β-catenin** シグナルを伝達し、細胞増殖を促進していることが示された。さらに、成体マウスでの脊髄損傷に応答した内腔の周りの神経前駆細胞の増殖にも、伸長した **roof plate** からの **Wnt** タンパク質の分泌が関与していることが示された。

本研究から、**roof plate** 細胞からの **Wnt/β-catenin** シグナルの標的細胞は、**roof plate** が大きく形態変化を起こし、伸長することによって、背側神経管の神経上皮細胞から、神経管中央部に位置する内腔の周りの神経前駆細胞へとシフトすることが示された。すなわち、分泌性シグナルタンパク質の産生細胞は自身の形態を変形させることにより、シグナルの標的細胞をシフトさせ新しい機能を獲得しうることが示された。

序論

分泌性シグナルタンパク質の空間分布

多細胞生物は多様な種類の細胞から成り立っており、複雑な組織を形成、維持するためには細胞間コミュニケーションが必要である。細胞間コミュニケーションを担う分子として、**Wnt**、**BMP**、**FGF**、**Hh** といった分泌性シグナルタンパク質がある。分泌性シグナルタンパク質は、産生細胞から分泌され、標的細胞の受容体に結合することで、標的細胞にシグナルを伝達し細胞増殖や細胞分化を制御することで作用する(Tabata and Takei, 2004)。したがって、分泌性シグナルタンパク質を介した細胞間シグナル伝達では、分泌性シグナルタンパク質の挙動によって、シグナルの活性化領域とシグナルの強度が規定され、標的

細胞の細胞運命決定に関わっている。

このように、分泌性シグナルタンパク質を介した細胞間シグナル伝達は、発生現象や恒常性の維持において極めて重要なシステムであるので、多くの知見が蓄積してきている。特に、産生細胞内での分泌性シグナルタンパク質の合成、修飾、分泌の経路や、標的細胞内でのシグナルの伝達経路および標的細胞の増殖や分化といったシグナルに対する細胞応答に関しては精力的に研究がなされてきた(図 1A, C; Takada et al., 2006; Clevers and Nusse, 2012)。一方で、産生細胞から標的細胞へ輸送される過程の分泌性シグナルタンパク質の空間分布についてはあまり研究が進んでいない(図 1B)。分泌性シグナルタンパク質の空間分布は、シグナルの活性化領域とシグナルの強度を規定する要因となることから、その解析は細胞間シグナル伝達の作用機構を理解するうえで重要な課題である。しかし、分泌性シグナルタンパク質の可視化が困難であったため、十分な解析がなされてこなかった。そこで、本研究では分泌性シグナルタンパク質の空間分布を可視化することで、細胞間シグナル伝達の制御機構の解明を試みた。

発生過程の組織における細胞間シグナル伝達の制御

細胞間シグナル伝達を理解するうえで、もう一つ大きな問題となるのが、生体内における発生過程では、細胞間の相互の位置関係が時間的に変化していくということである。発生過程の組織においては、細胞増殖により細胞集団が拡大したり、収斂伸長運動などにより細胞の並べ替えが起こったり、あるいは、神経堤細胞のように非常に長い距離を移動することで、細胞は相互の位置関係を変えながら移動している。これと同時に、細胞は形態の変化も起こしている。例えば、ラジアルグリアは非常に長い細胞突起を伸ばして細長い形態をとり、アストロサイトは多数の細胞突起を形成し複雑な形態をとる。あるいは、フィロポディアのように動的な細胞の形態変化も起こる。

このように、細胞の移動や細胞の変形によって発生過程の組織においては細胞間の相互の位置関係が時間的に変化していく。このような、動的に変化する組織の中で細胞間シグナルの活性化領域がどのように厳密に制御されるのかということに関してはあまり議論されてこなかった。さらに、発生過程における細胞の移動や変形というのは分泌性シグナルタンパク質の産生細胞でも起こりうる現象である。分泌性シグナルタンパク質の産生細胞が変形、移動したときに、それに応じてシグナルの標的細胞がどのように変化するのかということも興味深い問題である。

分泌性シグナルタンパク質の多様な輸送方法

分泌性シグナルタンパク質の細胞外での輸送については様々な方法が示されている(Yan and Lin, 2009; Takada et al., 2017)。一般的に分泌性シグナルタンパク質は産生細胞から細胞外に分泌され、拡散により産生細胞を起点とした濃度勾配を形成して分布していると考えられてきた。このとき、分泌性シグナルタンパク質の濃度勾配によって作られた、シ

グナルの活性勾配に応じて細胞運命が決定されると考えられている。このような、分泌性シグナルタンパク質の拡散は、自由拡散に限られず、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどを足場として拡散していくことも知られている。また、エンドサイトーシスと再分泌を繰り返すことでトランスサイトーシスにより、分泌性シグナルタンパク質を輸送するモデルも考えられている。さらに、近年の様々な研究から細胞突起の伸長が分泌性シグナルタンパク質あるいはその受容体を離れた細胞へと輸送するのに関わっていることが示されている。

分泌性シグナルタンパク質の輸送に関わる細胞突起として cytoneme や MT-nanotube が知られている。Cytoneme は filopodia-like なアクチン依存的な構造で、隣接する細胞から long range なシグナルまで伝達する (Fairchild and Barne, 2014; Kornberg and Roy, 2014; Ramírez-Weber and Kornberg, 1999)。一方の MT-nanotube は微小管依存的な構造で、シグナルの伝達範囲は隣接細胞に限られる (Eom et al., 2015; Inaba et al., 2015; McKinney et al., 2011)。このように、分泌性シグナル分子の細胞間輸送において細胞突起の重要性が示唆されているが、発生過程において細胞突起を介したシグナル伝達がどのように制御されるかは明らかになっていない。

分泌性シグナルタンパク質研究のモデル系となる脊髄神経管の発生

分泌性シグナルタンパク質による細胞間シグナル伝達の空間的制御を理解するためのモデル系として、発生初期の脊髄神経管を用いて多くの研究が行われてきた。脊髄神経管は脊椎動物の発生過程に共通して存在する脊髄の原基である。脊髄神経管は背腹軸に沿って明確に領域化されている。脊髄神経管の最も背側の領域は roof plate、最も腹側の領域は floor plate と呼ばれ、それぞれ Wnt と BMP、Shh といった分泌性シグナルタンパク質を発現してオーガナイジングセンターとして働き、脊髄神経管における神経前駆細胞の背腹軸に沿った領域形成を制御している (図 2A; Chizhikov and Millen, 2005; Lee et al., 2000; Muroyama et al., 2002)。

一方で、神経前駆細胞の領域形成が完了したあとで、脊髄神経管は発生の進行とともにその形態を大きく変化させていく。神経細胞の分化、グリア細胞の産生をともなって、脊髄神経管全体の大きさを拡大させながら、細胞体を含んだ灰白質と神経線維からなる白質に分かれていく。このとき、背腹軸方向に細長く開いていた内腔が、時間とともに背腹軸方向に徐々に退縮していき、最終的に脊髄の中央部で中心管を形成する (図 2B)。興味深いことに、roof plate を標識したゼブラフィッシュ胚の観察から、内腔の背腹軸方向の退縮にともなって、roof plate が腹側へと伸長することが報告されている (Kondrychyn et al., 2013)。また、成体の脊髄では背側正中領域に正中中隔と呼ばれる構造が形成されること、ネコ胚を用いた電子顕微鏡による組織学的な観察から発生後期の脊髄神経管の背側正中領域に roof plate 様の構造が存在することが報告されている (Böhme, 1988)。これらの知見から、発生後期における脊髄神経管の形態変化にともなって、roof plate が形態変化を起こし、

背腹軸方向に伸長することは脊椎動物に共通した現象であることが予測される。このように、脊髄神経管では、分泌性シグナルタンパク質の産生細胞である **roof plate** が発生過程において形態変化を起こす可能性が示唆される。したがって、脊髄神経管は分泌性シグナルタンパク質の産生細胞と標的細胞の関係が時間的にどのように変化していくのかを解析するのに興味深い系となっている。

分泌性シグナルタンパク質による神経前駆細胞および神経幹細胞の制御

発生初期の脊髄神経管では、内腔の周りの神経上皮細胞が神経前駆細胞として働き、ニューロン新生とグリア新生を行っている。これらの神経前駆細胞は *Wnt* シグナルによって、細胞増殖および細胞分化が制御されることが知られている。発生後期になると、脊髄神経管での神経新生は見られなくなり、退縮した内腔の周りの細胞ではグリア新生が行われるとともに、上衣細胞へと分化していく。成体マウス脊髄ではニューロン新生は行われていないが、中心管と呼ばれる退縮した内腔の周りに存在する上衣細胞が、神経前駆細胞および神経幹細胞として機能し、背傷損傷に応答して、細胞増殖、細胞分化が誘導されることが知られている(Hamilton et al., 2009; Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008; Weiss et al., 1996)。このように、脊髄においては内腔の周りの細胞が神経前駆細胞および神経幹細胞として機能し、これらの制御には *Wnt* シグナルなどの分泌性シグナルタンパク質の関与が示唆されている。

一方で、成体の脳におけるニューロン新生は、前脳の側脳室前方上衣下層(SVZ)と海馬のSGZ(海馬歯状回顆粒細胞下層)という限られた領域で起こっている。これらの領域でも、神経前駆細胞および神経幹細胞としての機能は脳室と呼ばれる中心管からつながる内腔の上衣細胞が担っている(Lois and Alvarez-buylla, 1993; Morshead et al., 1994; Weiss et al., 1996)。さらに、脳においても神経前駆細胞および神経幹細胞の細胞増殖と細胞分化は *Wnt* などの分泌性シグナルタンパク質によって制御されることが知られている(Adachi et al., 2007; Chenn and Walsh 2002; Hirabayashi et al., 2004; Kuwabara et al., 2009; Lie et al., 2005; Machon et al., 2007; Munji et al., 2011; Toledo et al., 2008; Varela-Nallar and Inestrosa, 2013; Wrobel et al., 2007)。このことから、脊髄と脳における神経前駆細胞および神経幹細胞は同様の制御を受けている可能性が示唆される。しかし、これらの神経前駆細胞および神経幹細胞を制御するシグナル分子が生体組織内で実際にどこから由来しているかについては脳、脊髄ともに明らかになっていない。したがって、伸長した **roof plate** が神経前駆細胞および神経幹細胞を制御するシグナルのソースとして働くかどうかは興味深い問題である。

本研究で明らかにしたこと

発生初期の脊髄神経管の **roof plate** では *Wnt1* と *Wnt3a* が特異的に発現している(Parr et al., 1993)。これらの *Wnt* は背側脊髄神経管において細胞増殖および介在神経の神経前駆細胞

胞の領域化を制御していることが示されている(図 3A; Muroyama et al., 2002)。このように、発生初期の脊髄神経管の roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルの機能については研究が進んでいる。一方で、E13.5 日以降、神経前駆細胞の領域形成が完了し、脊髄神経管が大きく形態変化を始める時期になると、*Wnt1*、*Wnt3a* の発現は失われると考えられてきた。さらに、*Wnt1* と *Wnt3a* の二重欠損変異胚は E12.5 日までに致死となり、また、*Wnt1* あるいは *Wnt3a* のそれぞれ欠損変異胚は roof plate 依存的な表現型を示さないため、これまで、発生後期の脊髄神経管における *Wnt1*、*Wnt3a* の機能は議論されてこなかった(図 3B; Ikeya et al., 1997)。

本研究では、発生後期のマウス脊髄神経管においても roof plate の Wnt が機能していることを明らかにした。まず、*Wnt1*、*Wnt3a* の発現が発生後期の脊髄神経管においても維持されていることを見出した。また、これらの Wnt 発現細胞は roof plate 細胞であり、発生の進行とともに形態を大きく変化させ、細胞突起を伸長させることを見出した。さらに、Wnt タンパク質の分泌に必要な *Wls* を roof plate 特異的に欠損させ、伸長した roof plate からの Wnt の分泌を阻害することで、発生後期における roof plate の Wnt の機能を明らかにした。伸長した roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルは roof plate に作用し、roof plate の伸長を制御していた。加えて、伸長した roof plate からの Wnt/ β -catenin は、伸長した roof plate の細胞突起の先端に位置する内腔の周りの細胞にも作用し、神経前駆細胞および神経幹細胞の細胞増殖を促進していた。さらに、roof plate からの Wnt タンパク質の分泌の阻害により、成体マウスにおいて脊髄損傷に応答した神経前駆細胞および神経幹細胞の増殖が正常に促進されないことが明らかになった。したがって、本研究により、発生過程において分泌性シグナルタンパク質の産生細胞が形態変化を起こすことによって、シグナルの標的となる細胞を変化させ新たな機能を獲得しうることを示された。

材料および方法

マウス

EIIa-Cre (Lakso et al., 1996)、*ins-TOPGAL* (Moriyama et al., 2007)、*R26R-Confetti* (Snippert et al., 2010)、*R26R-tdTomato* (Madisen et al., 2009)、*Wls flox* (Carpenter et al., 2010)、*Wnt1 KO* (McMahon and Bradley, 1990)、*Wnt1-Cre* (Danielian et al., 1998)、*Wnt1-CreERT* (Zervas et al., 2004)、*Wnt3a KO* (Takada et al., 1994) マウスを用いて実験を行った。*egfp-Wnt3a* ノックインマウスを作製するため、*FLAG-egfp* を *Wnt3a* の exon1 のシグナルペプチドの後ろに融合し、DT-A-pA/loxP/PGK-Neo-pA/loxP ベクター (<http://www.cdb.riken.go.jp/arg/cassette.html>) に挿入した。ネオマイシンは *EIIa-Cre* マウスと掛け合わせることで取り除いた。ジェノタイプングは次のプライマーを用いて PCR により行った。*Wnt3a-E1F*, 5'-ATGGCTCCTCTCGGATACCT-3'; *Wnt3a-I1R*, 5'-ACTTTCACCTGCCCTCCCTTC-3'; GFP-R1, 5'-TCACGAACTCCAGCAGGACCATG-3. 290-bp のバンド、756-bp のバンド、両方のバンドはそれぞれ、野生型、ホモ変異体、ヘテ

ロ変異体マウスを示す。

固定

E13.5日までの胚は3.5%パラフォルムアルデヒドを用いて4°Cで30分またはオーバーナイトで固定した。E15.5日以降の胚は4%パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。8週齢マウスをペントバルビタールナトリウム(70 mg/kg)による深麻酔下で経心臓的にPBSで灌流後、4%パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。灌流固定後に脊髄神経管を取り出し4%パラフォルムアルデヒドを用いて4°C、オーバーナイトで後固定した。

抗体染色

抗体染色は凍結切片を用いて行った。次にあげる一次抗体を4°C、オーバーナイトで用いた。anti- β -galactosidase (PM049, MBL; 1:400)、anti-Ezrin (ab4069, abcam; 1:400)、anti-GFP (598, MBL; 1:500)、anti-Gpr177 (ab176376, abcam; 1:400)、anti-Ki67 (ab16667, abcam; 1:1000)、anti-Mash1 (556604, BDP Pharmingen; 1:400)、anti-Nestin (60051A, BD Pharmingen; 1:500)、anti-phospho-Histone H3(Ser10) (06-570, upstate; 1:400)、anti-RFP (PM005, MBL; 1:500)、anti-Tubulin acetylated (T6793, Sigma; 1:1000)、anti-Vimentin (V2258, Sigma; 1:500)、anti-Wnt1 (ab15251, abcam; 1:200)、anti-Wnt3a (1:10 dilution; Takada et al., 2006)。次にあげる二次抗体を室温、2時間、500倍希釈で用いた。goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (A-11029, Invitrogen)、goat anti-mouse IgM Alexa Fluor 488 (A-21042, Invitrogen)、goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 647 (A-21235, Invitrogen)、goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555 (A-21429, Invitrogen)。組織切片はDAPI (Dojindo)により核染色を行った。Wnt1 シグナルはTSA plus kit (PerkinElmer)を用いて増感した。Wnt3a シグナルを得るために3.5%パラフォルムアルデヒドを用いて4°C、30分固定し、凍結切片を作製したのち、Antigen Unmasking Solution (VECTOR LABORATORIES)を用いて95°C、15分で抗原賦活化を行った。蛍光画像は倒立共焦点顕微鏡(Nikon A1Rsi)で取得した。

In situ hybridization

In situ hybridization は凍結切片を用いて行った。凍結切片は4%パラフォルムアルデヒドを用いて、室温で15分再固定し、PBSで洗浄した。その後、6 μ g/ml プロテイナーース K で37°C、20分処理し、PBSで洗浄した後、再度室温で10分再固定した。PBSで洗浄した後、0.2 M HCl で10分処理した。PBSで洗浄した後、0.1 M triethanolamine、0.25% acetic anhydride 10分処理した。組織切片は、プローブを入れた hybridization buffer (50% Formamide, 5X SSC, 1% SDS, 50 μ g/ml tRNA, 50 μ g/ml Heparin) で55°C、オーバーナイトで反応させた。プローブはアルカリ加水分解処理により、およそ300baseに分解して

用いた。翌日、切片を 2X SSC/ 50% Formamide で洗浄し、10 µg/ml RNaseA in TNE で 37°C、30 分処理した後、2X SSC、0.2X SSC、TBST で洗浄した。1% Blocking reagent (Roche)、TBST で 1 時間ブロッキングした後、500 倍希釈した anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche) で 4°C、オーバーナイトで反応させた。翌日、TBST と NTMT で洗浄後、BM purple (Roche) を用いて発色を行った。次のプローブを実験に用いた: *Axin2* (Jho et al., 2002)、*Gdf7* (Muroyama et al., 2002)、*Math1* (Muroyama et al., 2002)、*Ngn1* (Muroyama et al., 2002)、*Wnt1* (Parr et al., 1993)、*Wnt3a* (Roelink and Nusse, 1991)。

標識実験

R26R-Confetti マウスと *Wnt1-CreERT* マウスを交配して実験に用いた。Cre を介した相同組換えを誘導するため、ethanol、dimethyl sulfoxide、sesame oil に溶解した 1mg の 4-hydroxytamoxifen (4OH-TM) を妊娠後 11 日または 13 日の母親マウスに腹腔内注射した。誘導 2 日後に E13.5、E15.5 日胚をそれぞれ取り出し脊髄神経管を取り出した。脊髄神経管はビブラトームを用いて 400 µm の切片を作製した。画像は二光子顕微鏡(Leica TCS SP8 MP)により取得した。

系譜解析

R26R-tdTomato マウスと *Wnt1-Cre* あるいは *Wnt1-CreERT* マウスを交配して実験に用いた。Cre を介した相同組換えを誘導するため、ethanol、dimethyl sulfoxide、sesame oil に溶解した 2mg の 4-hydroxytamoxifen (4OH-TM) を妊娠後 13 日の母親マウスに腹腔内注射した。E18.5 日胚を経心臓的に灌流固定し脊髄神経管を取り出した。画像は倒立共焦点顕微鏡(Nikon A1Rsi)により取得した。

脊髄損傷

8 週齢マウスは腹腔内注射により medetomidine (0.3mg/kg)、midazolam (4mg/kg)、butorphanol (5mg/kg) で麻酔した。T13 領域で椎弓切除を行った。メスを用いて脊髄の右側半分に傷をつけた。手術後、マウスを atipamezole (0.3mg/kg) の腹腔内注射により覚醒させた。損傷 1、2、6 日後にパラフォルムアルデヒドによる灌流固定を行い実験に用いた。

透過電子顕微鏡

経心臓的に 2% パラフォルムアルデヒド、2.5% グルタルアルデヒド、100mM カコジル酸緩衝液により灌流固定を行った。解剖後、脊髄神経管を室温で 2 時間、後固定した。

統計解析

統計解析は Excel と R(version3.5.1)を用いて行った。t 検定を行い、* $P < 0.05$ を有意水準とした。エラーバーは標準誤差を示した。箱ひげ図では、ひげの長さを四分位範囲の 1.5 倍

を上限とし、超えるものは外れ値として扱った。

結果

Wnt タンパク質の空間分布の解析

脊髄神経管における Wnt タンパク質の空間分布を解析するため、マウス胚を用いて Wnt1 と Wnt3a の抗体染色を行った。E10.5 日胚における内在の Wnt タンパク質の局在を観察すると、*Wnt1*、*Wnt3a* の mRNA の発現から期待されるように Wnt1、Wnt3a とともに背側脊髄神経管の roof plate とその周りの領域で背腹軸に沿った濃度勾配を形成するようなシグナルが確認された(Parr et al., 1993)。興味深いことに Wnt 産生細胞である roof plate においても Wnt タンパク質の局在は一様ではなく apical 側に強い集積が見られた(図 4A, C)。さらに、背側脊髄神経管の外縁領域でも Wnt タンパク質の集積が見られた。これらの Wnt タンパク質のシグナルは、*Wnt1*、*Wnt3a* ホモ欠失変異体でそれぞれ検出されなかったことから、Wnt1、Wnt3a の特異的なシグナルであることが示された(図 4B, D)。したがって、Wnt タンパク質は産生細胞である roof plate 細胞から単純な濃度勾配を形成しながら拡散しているだけでなく、局所的にも集積して存在していることが明らかになった。

しかし、抗体染色による Wnt タンパク質の検出は感度が低かったので、Wnt タンパク質の空間分布をより詳細に解析するため、*egfp-Wnt3a* ノックインマウスを作製し、内在の Wnt3a を EGFP により標識することを試みた。マウス *Wnt3a* 遺伝子の exon1 のシグナルペプチドの後ろに *egfp* を挿入したターゲティングベクターを作製し、それを ES 細胞に導入して *Wnt3a* 遺伝子座に相同組換えが起きたクローンを選別し、そこからノックインマウスを作製した。これにより EGFP に Wnt3a が融合したタンパク質がつくられる(図 5A, B)。このマウスを用いて、まず、*egfp-Wnt3a* の空間分布を内在の Wnt3a と比較した。E9.5 日胚において、野生型マウスの内在の *Wnt3a* の発現パターンと同様に *egfp-Wnt3a* ノックインマウスでは、背側正中領域と tail bud での GFP 蛍光が観察された(図 5F-H; Parr et al., 1993)。さらに、E10.5 日胚のノックインマウスにおいて抗 GFP 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、野生型胚を抗 Wnt3a 抗体により染色した場合とよく類似したパターンを示した(図 5I, J)。また、野生型胚では GFP のシグナルは検出されなかった。この結果から、*egfp-Wnt3a* は内在の Wnt3a と同様の局在を示すことが確認された。また、*Wnt3a* KO 胚では前肢より後ろの体幹部が欠失する表現型を示し、胚性致死となることが報告されているのに対して(Takada et al., 1994)、*egfp-Wnt3a* ノックインマウスではホモ変異体においてもこのような異常は観察されず(図 5C-E)、正常に発生し成体まで成長した(図 5K)。さらに、Wnt/ β -catenin シグナルの活性を Wnt/ β -catenin シグナルの一般的な標的遺伝子である *Axin2* の *in situ* hybridization により確認すると、E10.5 日胚において野生型胚と *egfp-Wnt3a* ホモ変異胚との間でシグナルに差は見られなかった(図 5L, M; Jho et al., 2002)。これらのことから、EGFP を付加しても Wnt3a の機能には大きな影響はなく、*egfp-Wnt3a* は発生に十分な活性を有していることが確認された。以上のことより、内在の Wnt3a の挙

動を解析するのに *egfp-Wnt3a* ノックインマウスは有用であると考えられる。

そこで、この *egfp-Wnt3a* ノックインマウスを用いて *Wnt3a* タンパク質の空間分布の時間的変化の解析を行った。E10.5 日胚では脊髄神経管のもっとも背側の roof plate 領域でのみ GFP のシグナルは検出された(図 6A)。興味深いことにその後 E13.5、E15.5 と発生の進行にしたがい、脊髄神経管の内腔の退縮にともなって GFP のシグナルは腹側へと領域を伸長するように背側正中で検出された(図 6B, C)。E18.5 日胚においてもわずかながら背側正中での GFP シグナルが検出された(図 6D)。これは、これまで考えられてきた roof plate における *Wnt1*、*Wnt3a* の発現は E13.5 日以降消失するという結果と矛盾する(Shimizu et al., 2005)。そこで、*in situ* hybridization により確認を行った。胚に対して灌流固定を行い、より強い固定条件で切片 *in situ* hybridization を試みたところ、E15.5 日胚においても *Wnt1*、*Wnt3a* の発現が脊髄神経管の背側正中領域で確認された(図 6E-H)。これらの結果から、*Wnt1* および *Wnt3a* は E13.5 日以降も正中領域で発現していることが明らかになった。このように、*Wnt3a* タンパク質の空間分布は発生過程において、脊髄神経管の内腔の退縮にともなって、ダイナミックに変化し、E13.5 日以降では背側正中領域に局在していることを見出した。したがって、*Wnt1*、*Wnt3a* は背側神経管のパターニングが完了した後の後期の神経管においても発現し、細胞間シグナル伝達に関わっていることが示唆された。

発生過程における *Wnt/β-catenin* シグナルの活性化領域の変化

これまでの研究から、脊髄神経管では E10.5 日までの発生初期の段階において、背側領域で *Wnt/β-catenin* シグナルが活性化され、脊髄神経管の背腹軸に沿ったパターニングに寄与していることが示されている(Muroyama et al., 2002)。しかし、それ以降の発生後期の脊髄神経管における *Wnt/β-catenin* シグナルの活性化領域および機能については、これまでほとんど解析されてこなかった。そこで、*Wnt/β-catenin* シグナルの活性化領域の解析を標的遺伝子の *in situ* hybridization と *Wnt* レポーターマウスの解析という、2つの方法を用いて行った。まず、*Wnt/β-catenin* シグナルの標的遺伝子である *Axin2* の *in situ* hybridization を行った(図 7A-D)。E10.5 日胚では *Axin2* は脊髄神経管の背側領域で roof plate を起点として背腹軸に沿った濃度勾配を形成して発現している(図 7A; Jho et al., 2002)。一方で、E13.5 日以降では *Axin2* の発現は *Wnt3a* タンパク質の局在と同様に、背側正中領域に検出された(図 7B, C)。しかし、この背側正中領域での発現は E18.5 日になると減少した(図 7D)。加えて E15.5 日以降では、脊髄神経管全体にまだらにシグナルが観察された(図 7C, D)。これらのまだらなシグナルは発生中の血管における *Wnt/β-catenin* シグナルを反映していると考えられる(Stenman et al., 2008)。つづいて、*ins- TOPGAL* レポーターマウスの解析を行った(図 7E-H)。*ins- TOPGAL* は、*Wnt/β-catenin* シグナルのレポーターで、TCF 結合配列の制御下に核移行シグナルのついた *LacZ* が挿入されている(Moriyama et al., 2007)。このため、*Wnt/β-catenin* シグナルが活性化された細胞では核において β-gal が検出される。E10.5 日胚では TOPGAL のシグナルは roof plate を含む脊髄

神経管ではほとんど検出されず、roof plate から遊離した神経堤細胞で検出された(図 7E)。E15.5 日以降になると、脊髄神経管の内腔の周りの細胞で TOPGAL の強いシグナルが検出された(図 7G, H, G', H')。このように、発生後期の脊髄神経管の背側正中領域での *Wnt1*、*Wnt3a* の発現と一致して、この領域での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が *Axin2* の発現により検出された。また、脊髄神経管の内腔の周りの細胞での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が TOPGAL のシグナルによって検出された。興味深いことに、この内腔の背側領域は、発生の進行にともなって腹側へと伸長した *Wnt3a* の発現領域に隣接する(図 6C', D')。これらの結果から、発生後期の脊髄神経管では、背側正中領域の *Wnt3a* が内腔の周りの細胞に作用し、Wnt/ β -catenin シグナルを活性化している可能性が示唆された。

発生過程において Roof plate 細胞は内腔との接触を保ちながら伸長する

Egfp-Wnt3a マウスの解析から *Wnt3a* は発生後期の脊髄神経管においても背側正中領域で発現し続けていることが明らかになった。そこで、この *Wnt3a* を発現している細胞がどのような種類の細胞であるかを確かめた。これまでのゼブラフィッシュ胚を用いた研究から、発生の進行とともに、roof plate は形態を変化させ、脊髄神経管の正中領域を腹側へと伸長していくことが報告されている(Kondrychyn et al., 2013)。このことから、マウス脊髄神経管においても roof plate が発生の進行とともに形態を変化させており、*Wnt3a* を発現している細胞は伸長した roof plate であることが予測された。そこで、発生過程におけるマウス脊髄神経管における roof plate の形態変化を明らかにするため、*Ezrin* の抗体染色を行った。*Ezrin* は細胞膜とアクチンフィラメントと相互作用するタンパク質で上皮細胞の apical 側に局在する。そして、E10.5 日の脊髄神経管において *Ezrin* は roof plate 特異的に発現している(図 8A; Saotome et al., 2004)。E13.5 日以降になると、*Ezrin* のシグナルは脊髄神経管の内腔の退縮にともなって背腹軸に沿って腹側へと伸長していくことを見出した(図 8B-D)。この結果は、ゼブラフィッシュ胚を用いた研究の結果と一致しており、マウスの脊髄神経管においても発生過程をおって、roof plate 領域が大きく形態を変化し、背腹軸にそって腹側へと伸長することが確認された。さらに、*Ezrin* 陽性の roof plate は伸長にともなって細胞の rearrangement が起こり、roof plate の核が背腹軸に沿って正中線上に一列に並ぶことを見出した(図 8B')。このことから、マウス神経管において roof plate は rearrangement を起こしながら腹側へと伸長していくことが示された。またこのとき、伸長した roof plate の腹側先端は脊髄神経管の内腔表面まで到達していることを見出した(図 8D')。

しかし、*Ezrin* の発現解析からでは roof plate 領域の伸長が、それぞれの細胞の形態変化をともなって起こるのか、あるいは、細胞の並び替えが起こった結果によるものであるかを区別することができなかった。そこで、roof plate 細胞それぞれの細胞形態を解析するため、roof plate の細胞を低頻度で標識する実験を行った。この目的のため、*Wnt1-CreERT* マウスと *R26R Confetti* レポーターマウスをかけ合わせ、母親マウスへのタモキシフェン

の腹腔内注射により胚での遺伝子発現を誘導した(図 9A)。 *Wnt1-CreERT* は roof plate 特異的に発現し、タモキシフェン投与により時期、濃度依存的に発現を誘導することができる(Zervas et al., 2004)。 *R26R Confetti* は RFP、YFP、GFP、CFP の 4 種類の蛍光タンパクを確率的に発現する(Snippert et al., 2010)。 これらマウスのかけ合わせにより、roof plate 細胞が低頻度で標識され、それぞれの roof plate 細胞の形態の解析が可能になった。妊娠 11 日、13 日の母親マウスにタモキシフェン投与を行い、それぞれ 2 日後に解剖し、E13.5、E15.5 日胚で、細胞膜に発現する CFP と細胞質に発現する YFP の観察を行った。 E13.5 日胚では Ezrin の発現解析で見られた結果と同様に、細胞体が背側正中領域に整列する像が観察された(図 9B-D)。 さらに E15.5 日になると roof plate の細胞体は、より腹側に移動し正中線上に一直線に並ぶようになることが見出された。興味深いことに E13.5、E15.5 日胚の標識された roof plate 細胞は、細胞体から背側と腹側の両方向に、それぞれ長い細胞突起を伸ばしていることが明らかになった(図 9B-G)。 これらの細胞突起の先端は、背側は脊髄神経管の外縁領域まで、腹側は内腔表面まで到達していることを見出した(図 9E-G)。 さらに、E15.5 日胚を用いた透過電子顕微鏡による観察から、伸長した roof plate 細胞の腹側の細胞突起の先端は、脊髄神経管の内腔に接触していることが確認された(図 9H)。 これらの結果から、それぞれの roof plate 細胞は細胞突起を背側と腹側に伸ばして、脊髄神経管の外縁と内腔に接触していることが示された(図 9I)。 このことから、roof plate 領域は、それぞれの roof plate 細胞が正中線上に整列するとともに、細胞自身も形態変化を起すことにより、背腹軸に沿って伸長することが示唆された。また、これらの結果と *Wnt3a* タンパク質の空間分布の解析から、発生後期の伸長した roof plate 細胞においても *Wnt* が発現し続けていることが示唆された。

伸長した roof plate 細胞の特徴

ここまでの結果から、roof plate 細胞は背腹軸に沿って細胞突起を伸ばす細胞であることが新たに見出された。また、1 つの細胞が背側と腹側へ 2 本の細胞突起を伸ばしていることから、伸長した roof plate 細胞は apical 方向と basal 方向に細胞突起を伸ばした bipolar な細胞であるといえる。脊髄神経管において roof plate 細胞と同様に apical 方向と basal 方向に突起を伸ばす bipolar な細胞としては、ラジアルグリア細胞が知られている。ラジアルグリア細胞は内腔の周りに存在し、増殖して非対称分裂により新生ニューロンを産生する神経前駆細胞であると考えられている。Roof plate 細胞もラジアルグリア細胞の一種と考えられるのだろうか？ラジアルグリア細胞を特徴づける性質としてエレベーター運動があげられる。エレベーター運動はラジアルグリアなどの神経上皮細胞が細胞周期にともなって起こす核移動である。細胞周期の G2 期に細胞核が apical 側へと移動し、M 期には apical 面で分裂したのち、G1 期になると basal 側へと移動する。このような、エレベーター運動を roof plate 細胞も行っているか明らかにするため、M 期特異的にシグナルが検出される phospho Histone H3 (pHH3) の抗体染色を行い、M 期の細胞のうち apical 側に存在する細

胞の割合を脊髄神経管の roof plate 領域とそれ以外の神経上皮細胞の領域で比較した。E12.5 日胚では、roof plate 以外の神経上皮細胞のうち pHH3 陽性の M 期の細胞のほとんどは内腔の周りの apical 面に存在していたことから、神経前駆細胞はエレベーター運動を行っていると考えられた(図 10A, C)。一方で、roof plate 領域では全体で pHH3 陽性の M 期の細胞が検出され、内腔の周りの apical 面での特異的な細胞分裂は見られなかった(図 10A, C)。さらに E13.5 日になると、roof plate 以外の神経上皮細胞では引き続き内腔の周りの apical 面で細胞分裂が検出されるのに対して、roof plate 領域では細胞分裂自体がほとんど起こらず、apical 面での細胞分裂は検出されなかった(図 10B, C)。このように、roof plate 細胞はエレベーター運動を行っておらず、さらに伸長後には分裂しなくなることから、ラジアルグリア細胞とは異なった性質を持った細胞であることが示された。

細胞突起の性質は細胞骨格系により特徴づけられる。例えば、cytoneme はアクチン依存的な細胞突起である。(Kornberg and Roy, 2014; Ramírez-Weber and Kornberg, 1999)。また、MT-nanotube やラジアルグリアの細胞突起は微小管依存的な構造である(Inaba et al., 2015)。伸長した roof plate 細胞の細胞突起がどういった細胞骨格系で構成されているか明らかにするため、抗体染色による解析を行った。E18.5 日胚で、伸長した roof plate 細胞では中間径フィラメントの構成因子である Nestin のシグナルが背腹軸方向に軟膜から内腔まで連続して繊維状に観察された(図 11A)。一方で、安定な微小管構造に見られる acetylated tubulin の伸長した roof plate での集積は観察されなかった(図 11C)。さらに、伸長した roof plate 細胞の内部構造をより詳細に解析するため、透過電子顕微鏡による観察を行った。まず、伸長した roof plate の腹側の細胞突起の先端と、退縮した内腔の背側領域に注目すると、伸長した roof plate 細胞の細胞突起の先端は一点に集まるようにして東になって、内腔の周りの細胞の間に入り込み、内腔表面の背側領域まで到達していた(図 12A, C)。また、これらの伸長した roof plate の先端では多くの小胞が観察された(図 9H; 黄矢印)。このことから、roof plate の先端から内腔へ向けて、分泌タンパク質が小胞を介して分泌されている可能性が示唆された。次に、伸長した roof plate 細胞の細胞骨格に注目すると、Nestin の抗体染色の結果と同様に背腹軸にそって中間径フィラメントが配向していることが明らかになった(図 12E, G; 黄矢印)。また、微小管が背腹軸方向に配向している像も観察された(図 12E, G; 赤矢印)。これらの結果から、伸長した roof plate 細胞の細胞突起は中間径フィラメントに富んだ構造であることが示された。

Wls cKO(Wnt1-Cre)マウスによる roof plate からの Wnt タンパク質の分泌阻害

ここまでの結果から、Wnt 産生細胞である roof plate は発生過程において細胞形態を変化させ伸長すること、さらにこのとき後期の脊髄神経管においても Wnt の発現を維持していることが明らかになった。そこで、発生後期の脊髄神経管における Wnt の機能を明らかにするため、Wnt/ β -catenin シグナルを欠損させたマウスの解析を試みた。Roof plate で特異的に発現する *Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体は E12.5 日までに致死となってしまうので、

これまで、発生後期の脊髄神経管での *Wnt1*、*Wnt3a* の機能解析は行われてこなかった。そこで、本研究では Wnt タンパク質の分泌に必須な因子である *Wls* を roof plate 特異的に欠失させることで、roof plate からの Wnt タンパク質の分泌を抑制し、roof plate の Wnt の機能阻害を行った。Wnt タンパク質は産生細胞内で *Wls* との結合依存的に細胞外へと分泌される (Goodman et al., 2006, Bartscherer et al., 2006, Bänziger et al., 2006)。Roof plate 特異的に *Wls* を欠損させるため、roof plate 特異的に発現する *Wnt1-Cre* マウスを用いた。*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)マウスは *Wnt1-Cre; Wls*^{+/-}マウスと *Wls flox/flox* マウスを組み合わせることで得た (Carpenter et al., 2010, Danielian et al., 1998)。まず、*Wls* および *Wnt1*、*Wnt3a* の抗体染色を行い、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)マウスで実際に *Wls* の発現が欠失し roof plate からの Wnt の分泌が阻害されているかの確認を行った。E13.5 日では、正常胚において *Wls* のシグナルは背側正中の roof plate 領域で見られるのに対し、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)胚では *Wls* のシグナルが失われた (図 13A, B)。正常胚において *Wnt1*、*Wnt3a* タンパク質のシグナルも roof plate 領域で検出されるが、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)胚ではより強いシグナルが観察された (図 13C-F)。これは、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)胚では Wnt タンパク質が分泌されずに roof plate 内に蓄積しているためだと考えられる。これらの結果から、この *Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)マウスでは roof plate 特異的に *Wls* の発現が抑えられ、roof plate からの *Wnt1* および *Wnt3a* タンパク質の分泌が阻害されていることが示唆された。

次に、この *Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)マウスが *Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体と同様の表現型を示すかどうかの確認を行った。まず、E13.5 日胚での形態的な解析から、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)変異体においても *Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体と類似した頭部の形態異常が観察された (図 14A-E; Ikeya et al., 1997)。次に、E10.5 日胚を用いて、*in situ* hybridization と抗体染色により脊髄神経管の神経前駆細胞の分子マーカー解析を行った。*Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体では、正常胚と比較して roof plate のマーカーである *Gdf7* の発現は変化しないのに対して、D1 介在神経前駆細胞のマーカーである *Math1* と D2 介在神経前駆細胞のマーカーである *Ngn1* の発現細胞が減少し、発現領域も背側へとシフトする。また、D3、D4、D5 介在神経前駆細胞のマーカーである *Mash1* は発現領域を背側に拡大させることが報告されている (Muroyama et al., 2002)。*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)胚でも *Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体と同様に *Gdf7* の発現は変化しないのに対して、*Math1*、*Ngn1* の発現細胞の減少と発現領域の背側へのシフト、*Mash1* 発現領域の背側への拡大が観察された (図 14F-M)。*Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体に比べて *Ngn1* の発現細胞の減少がやや少なかったことから、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)胚の表現型の方が弱いことが示唆される。さらに、E18.5 日の *Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)胚では正常胚に比べて、背側脊髄神経管の背腹軸方向の長さが有意に減少した (図 14N-P)。これは発生初期の roof plate での Wnt シグナルの欠損により細胞増殖が減少したことが原因であると考えられ、*Wnt1*、*Wnt3a* の機能と一致する。これらの結果から、*Wls* cKO(*Wnt1-Cre*)マウスは roof plate における Wnt の機能を欠損し、脊髄神経管において *Wnt1* と *Wnt3a* の二重変異体とほぼ同様の表現型を示すと考えられる。

Roof plate から分泌された Wnt は roof plate の正常な伸長に必要である

これらの *Wls* cKO(Wnt1-Cre)マウスを用いて、背側脊髄神経管の神経前駆細胞の領域形成が完了した後の、発生後期における roof plate から分泌された Wnt の機能の解析を行った。*Axin2* の *in situ* hybridization の結果から E13.5 日以降の伸長を開始した roof plate で Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が見られたことから、roof plate から分泌された Wnt は roof plate 自身に作用し、オートクラインに作用している可能性が示唆された。そこで、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚で伸長した roof plate に異常が見られるかどうかを検証するため、細胞骨格系のマーカーの抗体染色を行った。E18.5 日胚において、安定化した微小管のマーカーである acetylated tubulin のシグナルは正常胚と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚で差が見られなかった(図 11C, D)。一方で、伸長した roof plate に豊富にみられる中間径フィラメントの一種である Nestin のシグナルには差が見られた(図 11A, B)。正常胚では Nestin のシグナルは背側脊髄神経管の正中線上で外縁領域から退縮した内腔の背側にかけて連続して観察される。これと比較して、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では背側脊髄神経管の背側半分にあたる白質領域では連続した Nestin のシグナルが観察されるのに対し(図 11A, B; 白波括弧)、腹側半分にあたる灰白質の領域では Nestin のシグナルが途切れながら存在していた(図 11A, B; 白角括弧)。このことから、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では roof plate 細胞が曲がって伸長していることが示唆された。また、透過電子顕微鏡の観察から *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では正常胚に比べて、正中領域における伸長した roof plate 細胞の束が細くなっていることを見出した(図 12E, F)。しかし、細胞内における中間径フィラメントおよび微小管の構造については変化が見られなかった(図 12G, H)。また、伸長した roof plate 細胞の腹側の細胞突起の先端と退縮した内腔の背側領域との接続部分の構造についても、正常胚では伸長した roof plate 細胞が細く集まって内腔に達している構造が観察されるのに対して、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では細長い細胞の束は観察されなかった(図 12A-F)。これらの結果から、roof plate から分泌された Wnt は、roof plate の正常な伸長に必要であることが示唆された。

次に、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚における roof plate の伸長の異常が、いつ、どのように起こるのかを明らかにするため、より早い時期での解析を行った。Roof plate の形態変化は細胞の並び替えと細胞突起の伸長が組み合わさって起こっている。まず、E10.5 日胚では roof plate の細胞はくさび形の形態をとっており、左右軸方向に整列している(図 15A, D, G)。つづいて、roof plate の伸長が観察される E13.5 日になると Ezrin 陽性の roof plate 細胞は rearrangement を起こして背腹軸方向に一行に整列するようになる(図 15B, E, H)。これに対して、E13.5 日の *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では、Ezrin 陽性の roof plate 領域は腹側へと伸長しているにも関わらず、roof plate の細胞は背腹軸方向に一行に整列していなかった(図 15C, F, I)。このように、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では roof plate 細胞の正常な整列が乱されていた(図 15J)。このことから、roof plate の伸長が開始される時期における適切な rearrangement が起こらなかったことにより、roof plate の正常な伸長が阻害されたことが

示唆される。したがって、伸長を開始する時期の roof plate の Wnt は roof plate 自身に作用し、オートクラインに機能していることが示唆された。一方で、E13.5 日における Ezrin 陽性の roof plate 細胞の数を定量すると、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚でわずかに細胞数が増加していた(図 15K)。このことから、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚で観察される rearrangement の異常は roof plate の細胞数が増加し、細胞が混み合ったことにより二次的に引き起こされた可能性も考えられる。

Roof plate から分泌された Wnt は内腔の周りの細胞での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化と細胞増殖に必要である

発生後期の脊髄神経管においては、内腔の周りの細胞で特に強い Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が見られることが、Wnt レポーターマウスの解析から明らかになった(図 7G, H)。また、透過電子顕微鏡による観察から伸長した roof plate 細胞の腹側の細胞突起の先端は退縮した内腔表面まで到達していることも明らかにした(図 12A, C)。さらに、*egfp-Wnt3a* ノックインマウスの解析から、伸長した roof plate 細胞においても Wnt は発現しており、EGFP-Wnt3a タンパク質が細胞突起の腹側先端まで輸送されていることを見出した(図 6C', D')。これらの結果から、伸長した roof plate 細胞の腹側の細胞突起の先端から退縮した内腔へ Wnt タンパク質が分泌され、内腔の周りの細胞にパラクラインに作用している可能性が示唆された。この可能性を検証するため、E15.5 日胚および、E18.5 日胚で退縮した内腔の周りの細胞における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化を *ins-TOPGAL* レポーターマウスを用いて、 β -gal の抗体染色により可視化し、正常胚と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚で比較した。E15.5 日の正常胚の脊髄神経管では TOPGAL のシグナルが内腔の周りの細胞で検出された(図 16A, C)。一方で、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では内腔の周りの細胞のうち、TOPGAL 陽性の細胞の割合が有意に減少した(図 16B, C)。同様に、E18.5 日の正常胚の脊髄神経管においても TOPGAL のシグナルが内腔の周りの細胞で検出された(図 16D, F)。一方で、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚では内腔の周りの細胞のうち、TOPGAL 陽性の細胞の割合が有意に減少した(図 16E, F)。伸長した roof plate 細胞は内腔の背側領域に接触していることから、内腔の周りの細胞のうち特に背側の細胞での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化に寄与していることが予測された。そこで、内腔の周りの細胞のうち背側、腹側、それぞれの TOPGAL 陽性の細胞の割合を正常胚と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚で比較すると、背側半分に位置する細胞での TOPGAL シグナルの減少がより大きくなっていた(図 16F)。これらの結果から、roof plate から分泌された Wnt タンパク質は内腔の周りの細胞に作用し Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させることが示された。

Roof plate から分泌された Wnt 依存的に活性化される内腔の周りの細胞での Wnt/ β -catenin シグナルはどのような機能を果たしているのだろうか。この問題を解決するため、内腔の周りの細胞の細胞増殖に注目した。E18.5 日胚を用いて、抗体染色により内腔の周りの細胞における、Ki67 陽性の増殖している細胞の割合を解析した(図 17)。正常胚で

は、内腔の周りの細胞のうち 21.3%の細胞が増殖していたのに対して、*Wls*cKO(*Wnt1-Cre*)胚では 11.8%と有意に減少した(図 17)。特に内腔の細胞のうち背側半分に位置する細胞での細胞増殖している細胞の割合が大きく減少した(図 17)。これらの結果から、roof plate から分泌された Wnt は内腔の周りの細胞増殖を促進することが示された。したがって、伸長した roof plate から分泌された Wnt は内腔の周りの細胞に作用し、パラクラインに機能している可能性が示唆された。

Wnt/ β -catenin シグナルの活性化領域は発生の進行にしたがって変化する

Wls cKO(*Wnt1-Cre*)胚の解析から roof plate から分泌された Wnt は発生後期において、roof plate の伸長と内腔の周りの細胞の増殖を制御することが明らかになった。しかし、*Wnt1-Cre*を用いた *Wls* の欠損実験では発生段階の早い時期から roof plate の Wnt の分泌を阻害してしまうため、roof plate が伸長する前の発生初期の段階に roof plate の Wnt が欠損した結果により、発生後期の脊髄神経管での表現型が現れている可能性が考えられる。そこで、伸長を開始した後の roof plate からの Wnt シグナルの機能を解析するため *Wnt1-CreERT*を用いて時期特異的な *Wls* の欠損を試みた。*Wnt1-CreERT* マウスは、タモキシフェンを投与することで時期特異的に roof plate での発現を誘導することができる。初期の roof plate からは、神経細胞と神経堤細胞が産生され、過去に *Wnt1*を発現した子孫細胞は背側脊髄神経管全体に広がっている。伸長した roof plate からの Wnt の機能を正しく評価するためには、*Wnt1-CreERT*の子孫細胞がどこに分布しているかを把握する必要がある。そこで、roof plate が伸長を開始した E13.5 日における *Wnt1-CreERT*発現細胞が roof plate 細胞にのみ寄与しているかどうかを確認するため系譜解析を行った。*Wnt1-CreERT*と *R26R-tdTomato* レポーターマウスをかけ合わせ、妊娠マウスに対して妊娠 13.5 日にタモキシフェンを腹腔内投与し、roof plate 細胞を標識し、E18.5 日胚で観察を行った(図 18A)。すると、Tomato のほとんどすべてのシグナルが背側正中領域で検出された(図 18B, C)。この結果から E13.5 日以降の *Wnt1-CreERT*陽性の roof plate 細胞は背側正中の伸長した roof plate にのみ寄与していることが示唆された。

E13.5 日以降に *Wnt1-CreERT*を用いることで伸長した roof plate のみの影響を解析できることが確認できたので、*Wnt1-CreERT*; *Wls*+/+マウスと *Wls* flox/flox マウスをかけ合わせ、妊娠マウスに対して E13.5、E15.5、E17.5 日にタモキシフェンを腹腔内投与することで伸長を開始した後の roof plate で特異的に *Wls* を欠失させる実験を行った(図 19A)。*Wnt1-Cre*を用いた *Wls* の欠損マウスと区別するため、*Wnt1-CreERT*を用いて時期特異的に *Wls* を欠損したマウスは *Wls* cKO(*Wnt1-CreERT*)と表記する。まず、*Wls* の欠損が roof plate で起きているかどうかを *Wls* の抗体染色により確認した。E18.5 日胚において正常胚で見られる脊髄神経管の背側正中領域の *Wls* のシグナルは、E13.5 日以降の *Wls* cKO(*Wnt1-CreERT*)胚ではほとんど失われた(図 19B, C)。次に、roof plate の形態を観察するため、Nestin による抗体染色を行った。E18.5 日胚で *Wls* cKO(*Wnt1-CreERT*)胚におい

でも正常胚と同様に脊髄神経管外縁から内腔までの連続した Nestin のシグナルが観察された(図 19D, E)。さらに、透過電子顕微鏡による観察からも、伸長した roof plate の腹側の細胞突起の先端と内腔との接触部分の構造に異常は見られなかった(図 19F, G)。加えて、脊髄神経管の背腹軸方向の長さも有意な差は見られなかった(図 19H-J)。これらの結果から E13.5 日以降の伸長した roof plate における *Wls* の欠損は roof plate の伸長に影響を与えないことが示唆された。

続いて、E13.5 日以降に roof plate からの Wnt の分泌阻害による、内腔の周りの細胞への影響を解析した。*ins-TOPGAL* レポーターをもつ *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)マウスを用いて、内腔の周りの細胞のうち TOPGAL 陽性の Wnt/ β -catenin シグナルが活性化されている細胞の割合を解析した(図 20A)。E18.5 日胚において、TOPGAL のシグナルは脊髄神経管の内腔の周りの細胞だけではなく、外縁部や全体でまばらに観察される(図 7H, 図 20C)。そこで、roof plate からの Wnt の分泌阻害による影響の特異性を明らかにするため、脊髄神経管を「外縁部」、「内腔の周り」、および「それ以外の領域」に分け、TOPGAL 陽性細胞の数を解析した(図 20B-E)。*Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚において「外縁部」および「それ以外の領域」での TOPGAL 陽性細胞の数は正常胚と比較して有意な差がなかった(図 20E)。一方で、脊髄神経管の内腔の周りの細胞における、TOPGAL 陽性細胞の数および割合は、正常胚と比較して *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚では有意に減少した(図 20E, H-J)。特に内腔の細胞のうち背側半分に位置する細胞での Wnt/ β -catenin シグナルが有意に減少した(図 19J)。このことから、*Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚では脊髄神経管の内腔の背側の細胞特異的に Wnt/ β -catenin シグナルが減少していることが示された。さらに、内腔の周りの細胞のうち Ki67 陽性の増殖している細胞の割合も正常胚に比べて *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚では有意に減少し、特に内腔の細胞のうち背側半分に位置する細胞での細胞増殖が有意に減少した(図 19K-M)。これらの結果から、E13.5 日以降の伸長した roof plate 細胞から分泌された Wnt は内腔の周りの背側の細胞に作用し Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させ、細胞増殖を促進することが示唆された。したがって、発生後期における、脊髄神経管の内腔の周りの細胞における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は伸長した roof plate から分泌された Wnt の影響によるものであると考えられる。一方で、roof plate の伸長に関しては E13.5 日以前の早い時期での roof plate からの Wnt シグナルが影響していることが考えられるが、伸長後の roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルが影響するかどうかは評価できていない。

これまでの研究から、内腔が退縮して最終的に形成される中心管の周りの細胞は、発生初期の脊髄神経管の腹側領域の細胞に由来することが知られている(Yu et al., 2013)。発生初期の脊髄神経管の腹側領域では Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が見られないことから、これらの細胞はもともと Wnt/ β -catenin シグナルを受容していなかった細胞である。さらに、本研究では、roof plate 由来の細胞が脊髄神経管の内腔の周りの細胞に寄与していないかを、*Wnt1-Cre* マウスと *R26R-tdTomato* マウスを用いて roof plate 細胞の lineage trace

を行うことで検証した(図 21A)。E18.5 日胚で Tomato 陽性細胞は背側正中と背側神経管で検出されたものの、内腔の周りの細胞ではほとんど検出されなかった。(図 21B, B', C)。多くの切片では内腔の周りの細胞では Tomato 陽性細胞は検出されなかったが、いくつかの切片では内腔の周りの細胞のうち最も背側に位置する細胞で、切片あたり 1 個あるいは 2 個検出された(図 21C)。この結果から、roof plate 由来の細胞は内腔の周りの細胞に最も背側の細胞を除いて寄与していないことが示された。また、この Tomato 陽性の内腔の周りの細胞の数は、伸長した roof plate からの Wnt 依存的に内腔の周りで活性化する Wnt/ β -catenin シグナル陽性細胞の数に比べて十分に少ない(図 20E, 図 21C)。したがって、発生後期で Wnt/ β -catenin シグナルが活性化されている内腔の周りの細胞は、発生初期では Wnt/ β -catenin シグナルが活性化していなかった脊髄神経管の腹側の細胞に由来することが示された。このことから、発生の進行にしたがって、Wnt の産生細胞である roof plate が形態を大きく変化させることにより、Wnt/ β -catenin シグナルの活性化領域が背側神経管から内腔の周りの細胞へとシフトしたことが示唆される(図 22)。

Roof plate 細胞の伸長は脊髄損傷後の神経前駆細胞の増殖を制御する

伸長した roof plate 細胞が内腔の周りの細胞に作用することが明らかになった。それでは、roof plate が伸長し、内腔の周りの細胞に作用することはどのような生物学的意義を持つのだろうか？これまでの研究から脊髄神経管の内腔の周りの細胞を構成する上衣細胞は成体マウスの神経幹細胞としての特徴を持つと考えられている。成体マウスの脊髄においては、神経新生はほとんど行われていない(Shechter et al., 2007; Habib et al., 2016)。しかし、脊髄損傷に反応して内腔の周りの上衣細胞がオリゴデンドロサイトやアストロサイトを産生することが知られている。また、*in vitro* の実験からも、脊髄神経管の上衣細胞は効率的に neurosphere を形成し、神経、オリゴデンドロサイト、アストロサイトといった多様な細胞へと分化しうることを示されている(Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008)。このように脊髄神経管の上衣細胞は成体の神経幹細胞を含んでいると考えられている。したがって、伸長した roof plate が内腔の周りの細胞に作用することで、神経幹細胞の挙動を制御している可能性が考えられる。そこで、伸長した roof plate から分泌された Wnt が成体の神経幹細胞に与える影響の解析を行った。成体マウスの脊髄神経管では内腔の周りの上衣細胞はほとんど増殖していない。しかし、これらの上衣細胞は脊髄損傷に反応して細胞増殖を行う(Johansson et al., 1999; Martens et al., 2002; Weiss et al., 1996)。そこで、roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルによる成体の神経幹細胞の挙動への影響を評価するため、脊髄損傷後の上衣細胞の細胞増殖を解析した。まず、脊髄損傷に反応した内腔の周りの細胞増殖の時間的変化を確認した。Ki67 の抗体染色により内腔の周りの増殖している細胞を観察すると、損傷前の神経管ではほとんど増殖をしていなかった(図 23A)。損傷後 1 日では細胞増殖が開始され、損傷後 2 日には内腔の周りの細胞の多くが増殖していた。さらに、損傷後 6 日になると神経管全体での細胞増殖は観察されるものの内腔の周りの細胞で

の増殖は減少していた(図 23B-D)。これらの結果から、内腔の周りの細胞は損傷後 2 日で激しく増殖し、その後増殖が抑えられることが明らかになった。そこで、脊髄損傷後の内腔の周りの細胞の応答を解析するため、損傷後 2 日で観察を行うことにした。

Wnt1-CreERT; Wls^{+/-} と *Wls flox/flox* マウスをかけ合わせ、妊娠マウスに対して E12.5、E14.5、E16.5 日にタモキシフェンを腹腔内投与し、発生後期の roof plate において Wnt の分泌を阻害した。このマウスを 8 週齢まで飼育したのち、脊髄の半球にメスを用いて外科的に傷をつけ、損傷後の内腔の周りの細胞応答を解析した(図 24A)。8 週齢の成体マウスの脊髄においては、内腔の周りの細胞はほとんど増殖を行っていない。一方で、脊髄損傷に反応して Ki67 陽性の増殖している細胞が増加した。それに対し、*Wls cKO(Wnt1-CreERT)* マウスでは脊髄損傷に反応した増殖している内腔の周りの細胞の割合が有意に減少した(図 24B-D)。特に内腔の周りの細胞のうち背側半分に位置する細胞での細胞増殖が有意に減少していた。これらの結果から、伸長した roof plate からの Wnt の分泌は、脊髄損傷に反応した上衣細胞の適切な増殖に必要であることが示唆された。

脊髄損傷後の細胞応答に roof plate の伸長がどのように作用したかについて 2 つの可能性が考えられる。一つは胚発生期に内腔の周りの細胞が roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルを受け、神経幹細胞に作用した可能性。もう一つは、損傷後の roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルが内腔の周りの神経幹細胞に作用した可能性である。これらの可能性を検証するため、成体マウスにおける Wnt と Wls の発現を抗体染色により解析した。8 週齢の成体マウスの脊髄では Wnt1 および Wnt3a の発現は見られなかった(図 25A, C)。また、Wls に関しても背側正中での発現は検出されなかった(図 25E)。一方で、脊髄損傷に反応して、Wnt1 の発現が損傷側の脊髄と正中領域で観察された(図 25B)。しかし、Wnt3a の発現は見られなかった(図 25D)。また、Wls の発現は脊髄の背側正中領域で観察された(図 25F)。これらの結果から、脊髄損傷に反応して脊髄において Wnt1 が再び発現するようになることが示された。そこで、脊髄損傷に反応した Wnt1 の発現上昇が、伸長した roof plate からの Wnt の分泌依存的な現象であるかどうかを検証するため、脊髄損傷に反応した Wnt1 の発現を正常マウスと *Wls cKO(Wnt1-CreERT)* マウスで比較を行った(図 25G-K)。損傷側の脊髄での Wnt1 の発現は、正常マウス、*Wls cKO(Wnt1-CreERT)* マウスともに活性化され、Wnt1 発現細胞数にはほとんど差が見られなかった(図 25G-K)。一方で背側正中領域での Wnt1 発現細胞数は正常マウスと比較して *Wls cKO(Wnt1-CreERT)* マウスにおいて有意に減少した(図 25G-K)。このように、成体の脊髄で Wnt は発現していないが、脊髄損傷に反応して損傷部位と背側正中領域で Wnt1 が発現を開始することが明らかになった。さらに、胚発生期に roof plate からの Wnt の分泌を阻害すると脊髄損傷後の Wnt1 の発現のうち背側正中領域での発現が特異的に抑制された。このことから、損傷後に成体の脊髄背側正中領域において再び発現する Wnt1 が、脊髄損傷後の上衣細胞での細胞増殖の促進に関与している可能性が示唆される。

考察

本研究から、脊髄神経管の roof plate が発生過程をおって大きく形態を変化させ細胞突起を伸長させることが見出された。さらに、伸長した roof plate 細胞では *Wnt* の発現が維持されており、roof plate の形態変化にともなって *Wnt/β-catenin* シグナルの標的細胞がシフトすることが明らかになった。Roof plate が伸長する前の脊髄神経管では *Wnt1*、*Wnt3a* は背側脊髄神経管に作用して、細胞増殖と介在神経の神経前駆細胞の細胞分化と領域化に機能している (Lee et al., 2000; Muroyama et al., 2002)。一方で、発生が進行し roof plate の形態が変化して細胞突起を伸長させると、*Wnt/β-catenin* シグナルの標的細胞は、伸長した roof plate 細胞の細胞突起の先端に位置する退縮した内腔の周りの細胞へと変化し、roof plate からの *Wnt* タンパク質の分泌依存的に細胞増殖が促進されていた。興味深いことに、伸長過程において roof plate からの *Wnt/β-catenin* シグナルは roof plate 自身にも作用し、roof plate の伸長を制御していた。このように、roof plate からの分泌される *Wnt* の標的と機能は、roof plate の伸長とともに変化した。したがって、発生過程において分泌性シグナルタンパク質の産生細胞の細胞形態が変化することにより、シグナルの作用範囲が制御され新しい機能を獲得しうることが示された。

本研究では roof plate で発現する *Wnt* の機能を解析するため、2種類の *Cre* マウスを使って roof plate における *Wls* の欠損実験を行った。1つは、*Wnt1-Cre* を用いた *Wls* の欠損であり、発生初期の段階から roof plate の *Wnt* の分泌阻害を行った。もう1つは *Wnt1-CreERT* を用いた *Wls* の欠損であり、E13.5 日胚以降の伸長した roof plate で時期特異的に *Wls* の欠損を行った。これら2つのマウスの系統を比較することで、roof plate における *Wnt* の時期特異的な機能の解析が可能となった。*Wnt1-Cre* での *Wls* の欠損では、roof plate の伸長が阻害され、内腔の周りの細胞での *Wnt* シグナルと細胞増殖が減少した。一方で、*Wnt1-CreERT* を用いて E13.5 日以降の伸長を開始した roof plate 細胞での *Wls* を欠損させると、roof plate は正常に伸長したが、内腔の周りの細胞での *Wnt* シグナルと細胞増殖は減少した。すなわち、脊髄神経管の内腔の周りの細胞での *Wnt* シグナルと細胞増殖の活性化は、発生後期の伸長した roof plate から分泌された *Wnt* によって直接的に引き起こされると考えられる。このことから、E13.5 日以前の roof plate の *Wnt* は roof plate 自身にオートクラインに作用して roof plate の伸長を制御することが示唆された。一方で、E13.5 日以降の伸長した roof plate の *Wnt* は伸長した細胞突起の先端から分泌され、隣接する内腔の周りの細胞にパラクラインに作用し、細胞増殖を制御している可能性が示唆された。このように、発生期の脊髄神経管 roof plate における *Wnt* の新たな2つの機能が見出された。

本研究では、細胞間シグナルに関わる新しいタイプの細胞突起を見出した。伸長した roof plate 細胞の細胞突起は中間径フィラメントに富み、*Wnt/β-catenin* シグナルを長い距離伝達するという点で特徴的である。これまでの研究から、cytoneme や MT-nanotube といった細胞突起が細胞間シグナルを伝達することが知られている。Cytoneme は仮足状の細胞突

起でアクチン依存的に形成される。Cytoneme の細胞突起は $0.1\ \mu\text{m}\sim 0.4\ \mu\text{m}$ の直径をもち、 $1\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ の長さに達し、リガンドおよび受容体を隣接細胞から比較的離れた細胞に輸送し、細胞間シグナル伝達に関与している(Kornberg and Roy, 2014; Ramírez-Weber and Kornberg, 1999)。また、MT-nanotube は微小管依存的に形成される。MT-nanotube の細胞突起は $0.4\ \mu\text{m}$ の直径をもち、 $3\ \mu\text{m}$ 程度の長さで、受容細胞から伸長した突起をもちいて、隣接細胞間シグナル伝達に関与している(Inaba et al., 2015)。一方で、本研究で見出された伸長した roof plate の細胞突起は cytoneme や MT-nanotube に比べて長く、脊髄神経管の背腹方向の半分程度 ($\sim 500\ \mu\text{m}$) まで達し、Wnt/ β -catenin シグナルを内腔の周りの細胞まで伝達していた。また、伸長した roof plate の細胞は apical 方向と basal 方向に細胞突起を伸ばした bipolar な細胞で、その細胞突起は中間径フィラメントに富んだ構造であった。脊髄神経管において、伸長した roof plate 細胞と似たような構造をもつ細胞にラジアルグリア細胞があげられる。ラジアルグリア細胞は apico-basal に細胞突起を伸ばす bipolar な細胞で、エレベーター運動を行い細胞分裂し、新たな細胞を産生する神経幹細胞として働くとともに、細胞移動をガイドする機能を担っている。一方で、伸長した roof plate 細胞は細胞分裂を行っておらず、Wnt/ β -catenin シグナル伝達に機能するという点でラジアルグリア細胞とは異なる性質を持っている。このように、脊髄神経管では伸長した roof plate という cytoneme や MT-nanotube とは異なるタイプの細胞突起が長距離のシグナル分子の輸送に関わっていることが示唆された。

これまでの研究から、細胞間シグナル伝達に関わる細胞突起では、その形成と維持にシグナル分子自身に関わることを示されてきた。ショウジョウバエの翅原基では Dpp シグナルが cytoneme の形成を制御することが知られている(Hsiung et al., 2005; Roy et al., 2014)。同様に、MT-nanotube の形成、維持にも Dpp と Tkv 受容体の相互作用が必要であることが示されている(Inaba et al., 2015)。一方で、本研究では roof plate の伸長に roof plate からの Wnt の分泌が必要であることを見出した。したがって、細胞間シグナル輸送を行う細胞突起の維持にそのシグナル自身に関与し、細胞の形態変化を制御することは、普遍的な現象であると考えられる。本研究では、roof plate からの Wnt タンパク質の分泌を阻害すると roof plate の rearrangement が乱され、正常な伸長が起こらないことを見出した。しかし、これらの Wnt による細胞伸長の制御が Wnt/ β -catenin シグナル依存的なものであるか、また、どのように rearrangement が制御されているかという問題が残されている。

細胞間シグナル伝達は胚発生期および成体の両方で神経前駆細胞および神経幹細胞を制御すると考えられている。たとえば、Wnt/ β -catenin シグナルは成体の哺乳類の脳の SVZ と海馬の SGZ において神経前駆細胞および神経幹細胞を制御することが知られている(Adachi et al., 2007; Bowman et al., 2013; Lie et al., 2005, Maretto et al., 2003,)。さらに、脳の損傷実験では SVZ において Wnt/ β -catenin シグナルが活性化することが示されている(Piccin and Morshead, 2011)。このように、神経前駆細胞および神経幹細胞の制御に細胞

間シグナル伝達が重要な機能を果たすのにも関わらず、これらのシグナル分子がどの細胞から供給されるのかに関してはいまだに解明されていない。脊髄では神経前駆細胞および神経幹細胞は中心管の周りの上衣細胞に存在していると考えられている(Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008; Weiss et al., 1996)。本研究では発生後期の脊髄神経管の解析から、神経幹細胞を含む内腔の周りの細胞もまた細胞間シグナル伝達により制御されることを示した。内腔の周りの神経前駆細胞での Wnt/ β -catenin シグナルは roof plate 細胞の伸長によって活性化され、細胞増殖を促進していた。このことから、脊髄神経管においては、伸長した roof plate 細胞から分泌された Wnt が内腔の周りの神経前駆細胞および神経幹細胞を制御していることが示唆された。脳においても大脳の SVZ と海馬の SGZ は中心管から連なる脳室の周りに存在し、Wnt/ β -catenin シグナルによる神経前駆細胞および神経幹細胞の制御を受けている。したがって、脳においても脊髄神経管と同様に細胞突起を介したシグナル伝達による神経前駆細胞および神経幹細胞の制御が存在するかどうかは興味深い問題である。

成体の脊髄においては内腔の周りの上衣細胞が神経前駆細胞および神経幹細胞として機能していると考えられているが、成体脊髄では神経新生はほとんど行われず上衣細胞もほとんど増殖をしていない(Johansson et al., 1999; Shechter et al., 2007; Habib et al., 2016)。一方で、これらの細胞は脊髄損傷に反応して増殖し、オリゴデンドロサイトやアストロサイトを産生する(Hamilton et al., 2009; Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008)。本研究では胚発生期に、伸長した roof plate において Wnt タンパク質の分泌に必須な因子である *Wls* を欠損させると、成体脊髄での脊髄損傷に反応した中心管の周りの細胞増殖が抑制されることを見出した。このことから、roof plate からの Wnt タンパク質の分泌が、脊髄損傷後の上衣細胞の反応を制御していることが示唆される。また、成体脊髄では背側正中領域における Wnt の発現は見られないが、脊髄損傷後には Wnt1 の発現が再び活性化されることが見出された。これらの結果から、損傷後に再び発現する Wnt1 が、脊髄損傷後の上衣細胞での細胞増殖を制御している可能性が考えられる。しかし、胚発生期での roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルの欠損により、内腔のまわりの神経前駆細胞および神経幹細胞の数あるいは性質が変化しており、その結果として脊髄損傷後の増殖が減少していた可能性は排除できない。そこで、胚発生期における roof plate からの Wnt/ β -catenin シグナルが内腔の周りの神経前駆細胞および神経幹細胞の数や分化能に影響を与えるかどうかを検証するため、これらの細胞による neurosphere の形成実験を計画している。これにより、成体における脊髄損傷後の細胞反応に Wnt シグナルがどのように関与するのかが明らかになれば、roof plate 細胞が伸長することの意義がより明確になることが期待される。

本研究では細胞間シグナル伝達の制御機構を理解するために、分泌性シグナルタンパク質 Wnt の可視化を試み、*egfp-Wnt3a* ノックインマウスの作製を行った。このマウスでは内在の Wnt3a タンパク質と同様の GFP シグナルが観察され、ホモ変異体でも発生に十分な活性を持っていた。したがって、内在の Wnt3a の挙動を解析するのに有用な *egfp-Wnt3a*

ノックインマウスの作製に成功したと考えられる。*egfp-Wnt3a* ノックインマウスを用いた解析から、E10.5 日胚ではこれまで考えられてきたような、濃度勾配を形成して分布する様式だけでなく、新たに roof plate 内での apical 側への集積や、脊髄神経管の周りの軟膜への局在が見出された。これらの集積した Wnt タンパク質がどのように作用し、どのような機能を担っているのかということは、細胞間シグナル伝達の制御機構を理解するうえで重要な問題である。また、*egfp-Wnt3a* ノックインマウスを用いたライブイメージングによる、分泌性シグナルタンパク質の時間をおった挙動の解析も今後取り組むべき課題である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂きました高田慎治博士に感謝いたします。また、議論を通じて示唆を頂きました吉田松生博士、米村重信博士、藤森俊彦博士、木下典行博士、豊岡やよい博士、中山啓博士に深く感謝いたします。また、Wnt3a 抗体の提供、研究を進めるにあたり高田律子博士に丁寧な指導を賜りました。*Egfp-Wnt3a* ノックインマウスの作製には清成寛博士、阿部高也博士にご指導を賜りました。脊髄損傷実験は門松健博士、両角正義博士にご指導を賜りました。池中一裕博士、石野雄吾博士、橋本弘和博士、北舘祐博士、美崎佳寿代博士、高橋佳子博士には実験技術の指導を頂きました。ここに感謝の意を表します。また、日頃からさまざまな議論を行い、支えてくださった高田研究室のみなさまに感謝いたします。最後に、いつも私を支えてくれている娘の沙玖と妻の裕子に心から感謝します。

参考文献

Adachi, K., Mirzadeh, Z., Sakaguchi, M., Yamashita, T., Nikolcheva, T., Gotoh, Y., Peltz, G., Gong, L., Kawase, T., Alvarez-Buylla, A., Okano, H. and Sawamoto, K. (2007). Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25, 2827-2836.

Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G. and Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509-522.

Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D. and Boutros, M. (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523-533.

Böhme, G. (1989). Formation of the central canal and dorsal glial septum in the spinal cord of the domestic cat. *J. Anat.* 159, 37-47.

Bowman, A.N., van Amerongen, R., Palmer, T. D. and Nusse, R. (2013). Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/ β -catenin-responsive neural stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 110, 7324-7329.

Carpenter, A. C., Rao, S., Wells, J. M., Campbell, K. and Lang, R. A. (2010). Generation of mice with a conditional null allele for Wntless. *Genesis* 48, 554-558.

Chenn, A. and Walsh, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-369.

Chizhikov, V. V. and Millen, K. J. (2004) Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 5,808-812.

Chizhikov, V. V. and Millen, K. J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev. Biol.* 277, 287-295.

Clevers, H. and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 149, 1192-1205.

Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K. and McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.* 8, 1323-1326.

Eom, D. S., Bain, E. J., Patterson, L. B., Grout, M. E. and Parichy, D. M. (2015) Long-distance communication by specialized cellular projections during pigment pattern development and evolution. *eLife* 4, e12401.

Fairchild, C. L. and Barna, M. (2014). Specialized filopodia: at the 'tip' of morphogen transport and vertebrate tissue patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 27, 67-73.

Goodman, R. M., Thombre, S., Firtina, Z., Gray, D., Betts, D., Roebuck, J., Spana, E. P. and Selva, E. M. (2006). Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development* 133, 4901-4911.

Habib, N., Li, Y., Heidenreich, M., Swiech, L., Avraham-Davidi, I., Trombetta, J. J., Hession, C., Zhang, F. and Regev, A. (2016). Div-Seq: single-nucleus RNA-Seq reveals

dynamics of rare adult newborn neurons. *Science* 353, 925-928.

Hamilton, L. K., Truong, M. K., Bednarczyk, M. R., Aumont, A. and Fernandes, K. J. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 164, 1044-56.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131, 2791-2801.

Hsiung, F., Ramirez-Weber, F. A., Iwaki, D. D. and Kornberg, T. B. (2005). Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437, 560-563.

Ikeya, M., Lee, S. M., Johnson, J. E., McMahon, A.P. and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389, 966-970.

Inaba, M., Buszczak, M. and Yamashita, Y. M. (2015). Nanotubes mediate niche-stem-cell signalling in the *Drosophila* testis. *Nature* 523, 329-332.

Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N. and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1172-1183.

Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U. and Frisén, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.

Kondrychyn, I., Teh, C., Sin, M. and Korzh, V. (2013). Stretching morphogenesis of the roof plate and formation of the central canal. *PLoS One* 8, e56219.

Kornberg, T. B. and Roy, S. (2014). Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development* 141, 729-736.

Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M. and Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of

- NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 12, 1097-1105.
- Lakso, M., Pichel, J. G., Gorman, J. R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F. W. and Westphal, H. (1996). Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 93, 5860-5865.
- Lee, K. J., Dietrich, P. and Jessell, T. M. (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403, 734-740.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 261-294.
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R. and Gage, F. H. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437, 1370-1375.
- Lois, C. and Alvarez-buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 90, 2074-2077.
- Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L. and Krauss, S. (2007). A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev. Biol.* 311, 223-237.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S. and Zeng, H. (2009). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133-140.
- Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A. B., Volpin, D., Bressan, G. M. and Piccolo, S. (2003). Mapping Wnt β -catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100, 3299-3304.
- Martens, D. J., Seaberg, R. M. and van der Kooy, D. (2002). In vivo infusions of

exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1045-1057.

McKinney, M. C., Stark, D. A., Teddy, J. and Kulesa, P. M. (2011). Neural crest cell communication involves an exchange of cytoplasmic material through cellular bridges revealed by photoconversion of KikGR. *Dev. Dyn.* 240, 1391-1401.

McMahon, A. P. and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085.

Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O. and Frisén, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 6, e182.

Moriyama, A., Kii, I., Sunabori, T., Kurihara, S., Takayama, I., Shimazaki, M., Tanabe, H., Oginuma, M., Fukayama, M., Matsuzaki, Y., Saga, Y. and Kudo, A. (2007). GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. *Genesis* 45, 90-100.

Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., McBurney, M. W., Staines, W. A., Morassutti, D., Weiss, S. and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071-1082.

Munji, R. N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J. A. and Pleasure, S. J. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J. Neurosci.* 31, 1676-1687.

Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* 16, 548-553.

Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G. and McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119, 247-261.

Piccin, D. and Morshead, C. M. (2011). Wnt signaling regulates symmetry of division of neural stem cells in the adult brain and in response to injury. *Stem Cells* 29, 528-538.

Ramírez-Weber, F. A. and Kornberg, T. B. (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607.

Roelink, H. and Nusse, R. (1991). Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes. Dev.* 5, 381-388.

Roy, S., Huang, H., Liu, S. and Kornberg, T. B. (2014). Cytoneme-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* decapentaplegic signaling protein. *Science* 343, 1244624.

Saotome, I., Curto, M. and McClatchey, A. I. (2004). Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev. Cell* 6, 855-864.

Shechter, R., Ziv, Y. and Schwartz, M. (2007). New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem Cells* 25, 2277-2282.

Shimizu, T., Kagawa, T., Wada, T., Muroyama, Y., Takada, S. and Ikenaka, K. (2005). Wnt signaling controls the timing of oligodendrocyte development in the spinal cord. *Dev. Biol.* 282, 397-410.

Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., van Rheenen, J., Simons, B. D. and Clevers, H. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing *Lgr5* stem cells. *Cell* 143, 134-144.

Stenman, J. M., Rajagopal, J., Carroll, T. J., Ishibashi, M., McMahon, J. and McMahon, A. P. (2008). Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* 322, 1247-1250.

Tabata, T. and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation.

Development. 131, 703-12.

Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T. and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791-801.

Takada, S., Fujimori, S., Shinozuka, T., Takada, R. and Mii, Y. (2017). Differences in the secretion and transport of Wnt proteins. *J. Biochem.* 2017 161, 1-7.

Takada, S., Stark, K. L., Shea, M. J., Vassileva, G., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1994). Wnt-3a regulates somites and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8, 174-189.

Toledo, E. M., Colombres, M. and Inestrosa, N. C. (2008). Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog. Neurobiol.* 86, 281-296.

Varela-Nallar, L. and Inestrosa, N. C. (2013). Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci.* 7, 100.

Weiss, S., Reynolds, B. A., Vescovi, A. L., Morshead, C., Craig, C. G. and van der Kooy, D. (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci.* 19, 387-393.

Wrobel, C.N., Mutch, C. A., Swaminathan, S., Taketo, M. M. and Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev. Biol.* 309, 285-297.

Yan, D. and Lin, X. (2009). Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002493.

Yu, K., McGlynn, S. and Matise, M. P. (2013). Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development* 140, 1594-1604.

Zervas, M., Millet, S., Ahn, S. and Joyner, A. L. (2004). Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 43, 345-357.

図表

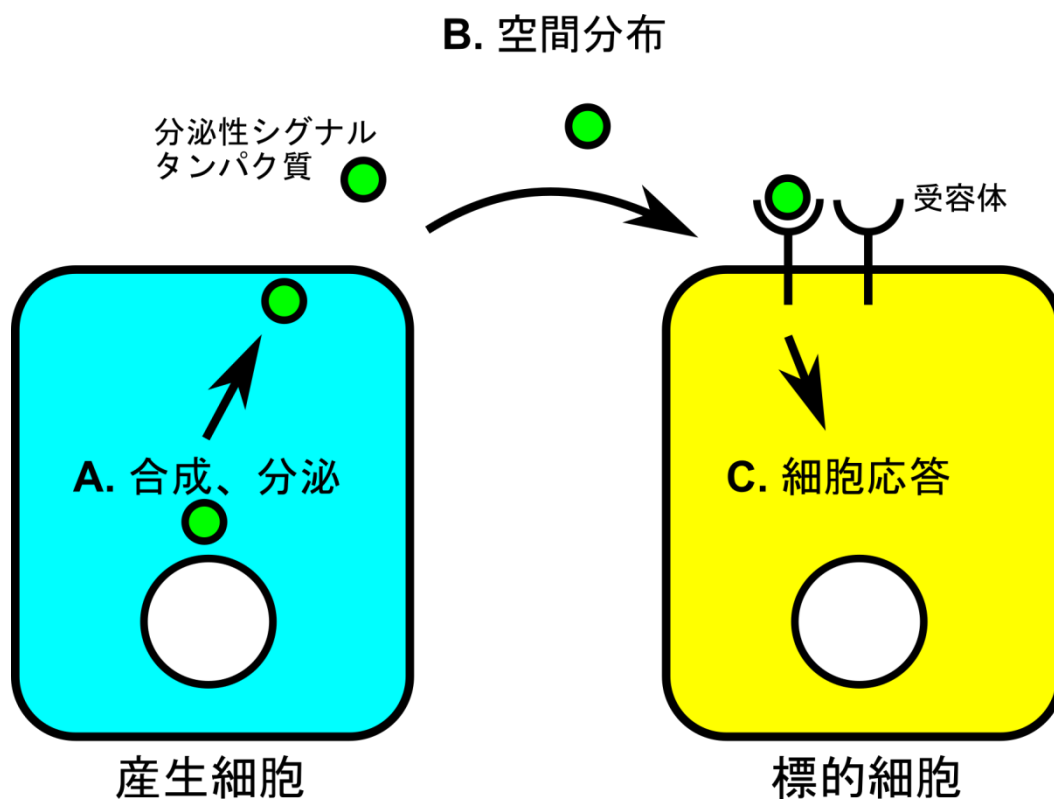


図1 細胞間シグナル伝達

細胞間シグナル伝達を担う分泌性シグナルタンパク質は、産生細胞で分泌され、標的細胞に作用する。産生細胞内での分泌性シグナルタンパク質の分泌経路(A)、および標的細胞内での細胞応答(C)に関しては多くの知見が蓄積してきている。一方で分泌性シグナルタンパク質の空間分布(B)に関してはあまり研究が進んでいない。

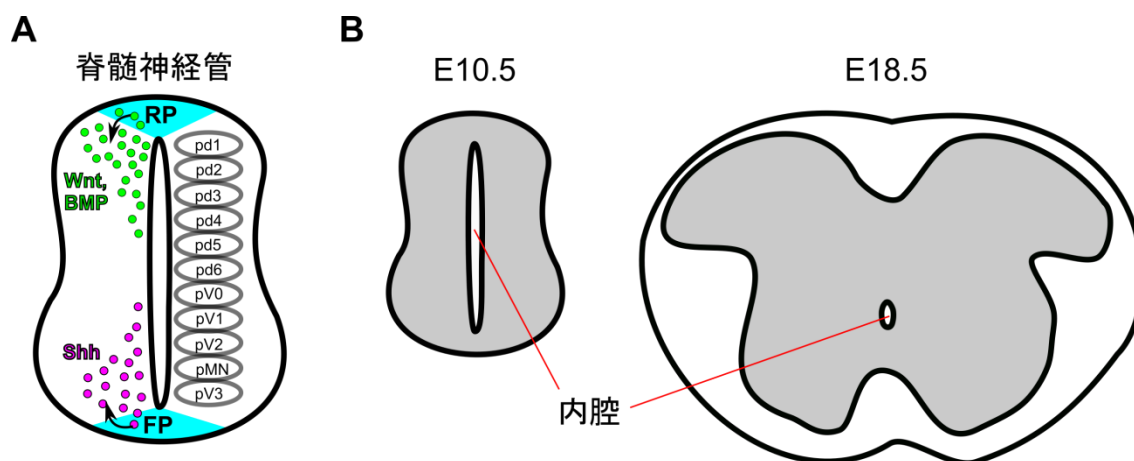


図2 脊髄神経管の発生

脊髄神経管の最も背側の領域である roof plate(RP)からは Wnt や BMP、最も腹側の領域である floor plate(FP)からは Shh といった分泌性シグナルタンパク質が分泌され、脊髄神経管の背腹軸に沿った神経前駆細胞の領域形成(pd1-pV3)を制御している(A)。神経前駆細胞の領域形成完了後、発生の進行にしたがって脊髄神経管は大きく形態を変化させる。このとき脊髄神経管の内腔が背腹軸方向に徐々に退縮していき、中心管を形成する(B)。

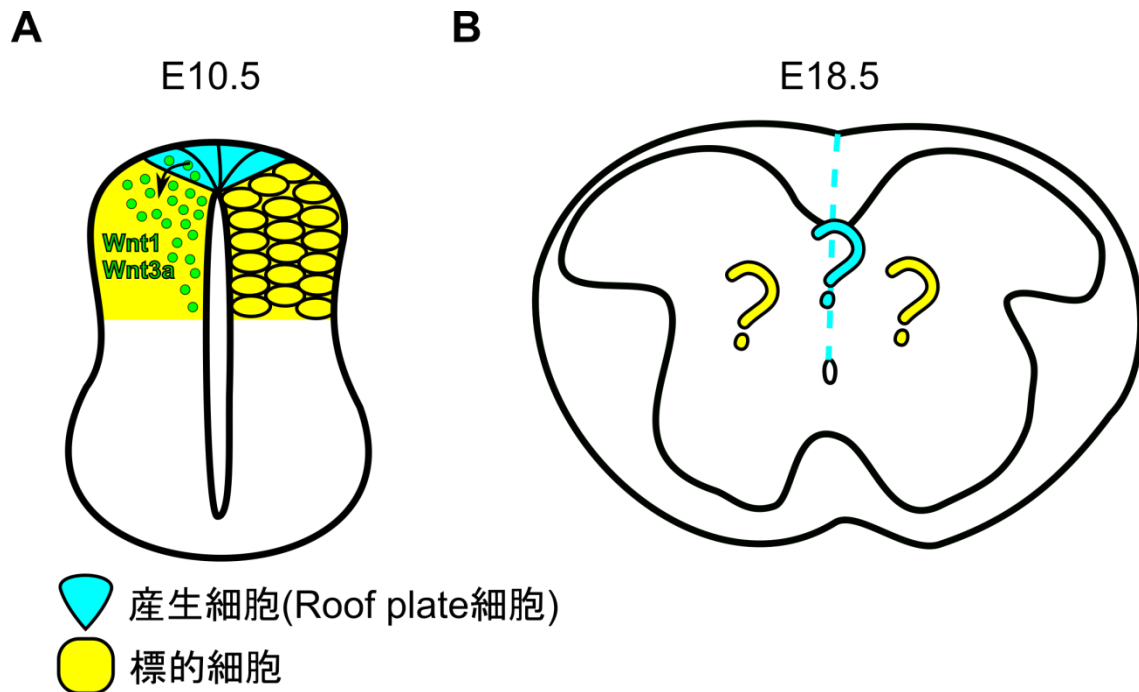


図3 発生過程の脊髄神経管における *Wnt* の産生細胞と *Wnt* シグナルの標的細胞
 発生初期の脊髄神経管の roof plate は、*Wnt1* と *Wnt3a* を特異的に産生している。これらの *Wnt* は背側脊髄神経管をシグナルの標的として、細胞増殖と細胞分化を制御している(A)。発生後期の脊髄神経管の roof plate は背腹軸にそって伸長していることが示唆される。しかし、roof plate において *Wnt* の産生が維持されているか、また、roof plate からの *Wnt* シグナルの標的や機能については明らかになっていない(B)。

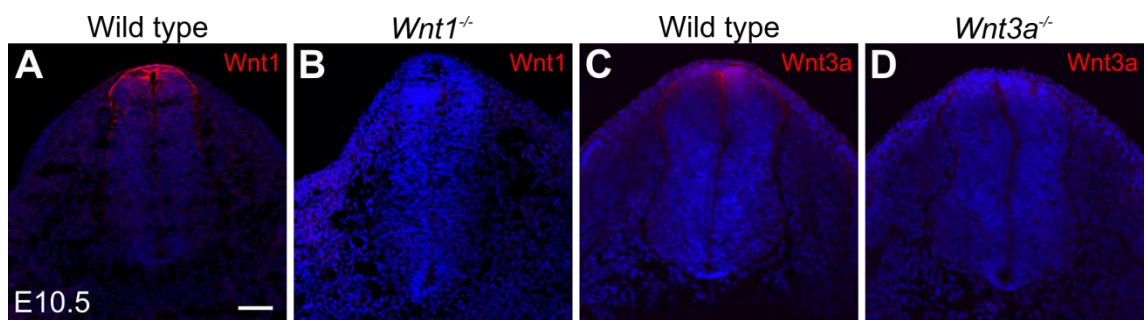


図4 脊髄神経管における内在の *Wnt1*、*Wnt3a* タンパク質の局在

*Wnt1*の抗体染色（赤）、DAPIによる核染色（青）をE10.5日の野生型胚(A)、*Wnt1*ホモ欠損変異胚(B)で行った。*Wnt3a*の抗体染色（赤）、DAPIによる核染色（青）をE10.5日の野生型胚(C)、*Wnt3a*ホモ欠損変異胚(D)で行った。前肢レベルでの横断面切片。n = 3。スケールバー: 100 μ m。

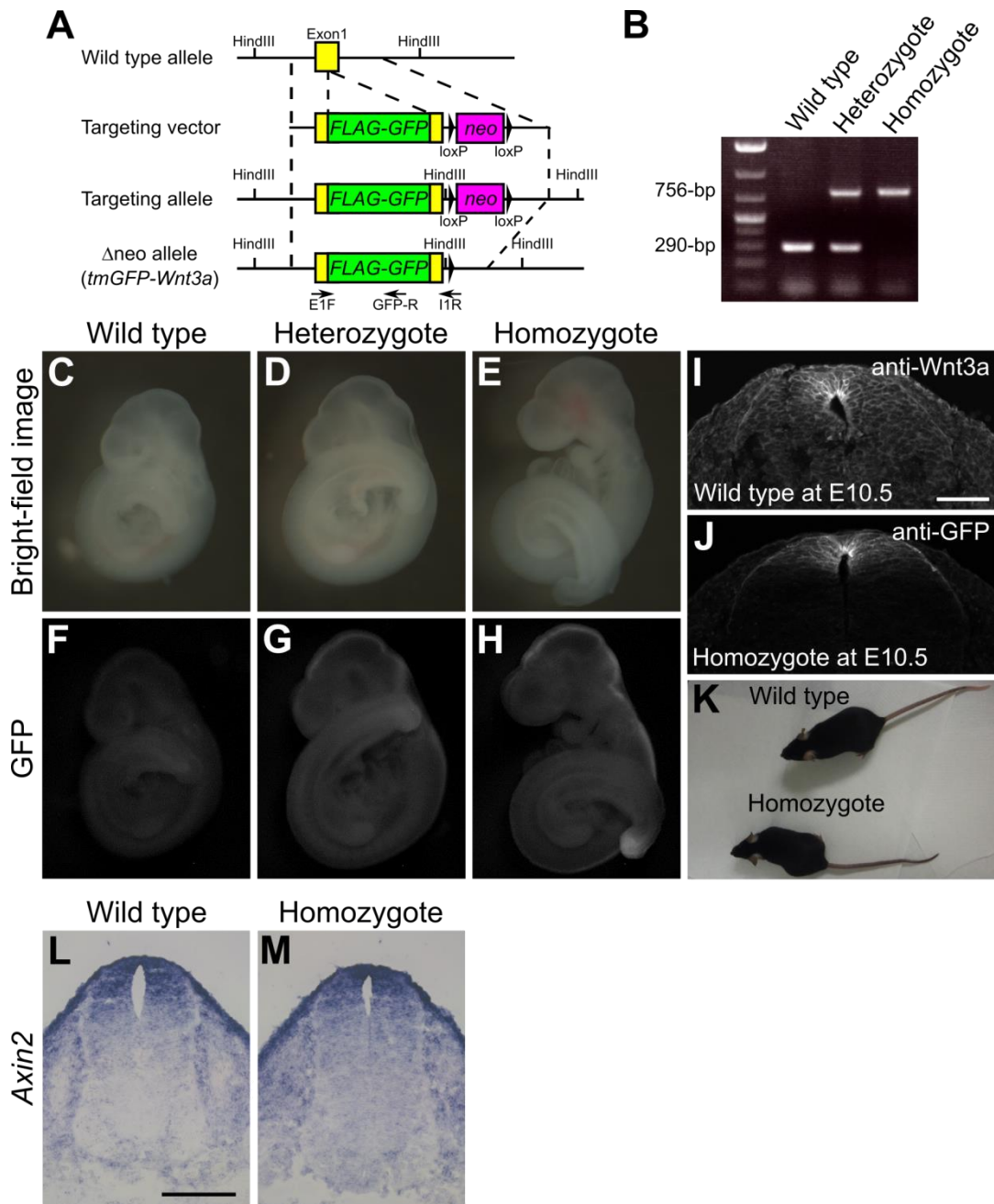


図5 *EGFP-Wnt3a* ノックインマウスの作製

egfp-Wnt3a ノックインマウス作製の模式図(A)。Wnt3a のエキソン 1 のシグナルペプチドのすぐ後ろに FLAG-EGFP を挿入した。ジェノタイプリングは PCR で行い、野生型は 290-bp、変異体は 756-bp のバンドにより検出される (B)。E9.5 日胚の野生型 (C)、*Wnt3a^{tm(GFP-Wnt3a)}+* (D)、*Wnt3a^{tm(GFPWnt3a)/tm(GFP-Wnt3a)}* (E) で形態的な差異は見られなかった。E9.5 日胚における EGFP シグナル野生型 (F)、*Wnt3a^{tm(GFP-Wnt3a)}+* (G)、*Wnt3a^{tm(GFPWnt3a)/tm(GFP-Wnt3a)}* (H)。G と H において EGFP のシグナルは内在の *Wnt3a* の

発現パターンと同様に背側正中と *tailbud* で検出された。(I, J)E10.5 日胚背側脊髄神経管における GFP-Wnt3a と内在の Wnt3a の空間分布の比較。野生型における Wnt3a の抗体染色(I)。 *Wnt3a^{tm(GFPWnt3a)/tm(GFP-Wnt3a)}*における GFP の抗体染色(J)。 GFP-Wnt3a は内在の Wnt3a と同様の空間分布を示した。 *Wnt3a^{tm(GFPWnt3a)/tm(GFP-Wnt3a)}*マウスは成体まで成長し繁殖可能である(K)。 E10.5 日の正常胚(L)と *Wnt3a^{tm(GFPWnt3a)/tm(GFP-Wnt3a)}*(M)における *Axin2* の *in situ* hybridization。スケールバー: 50 μ m (I)、100 μ m (L)。

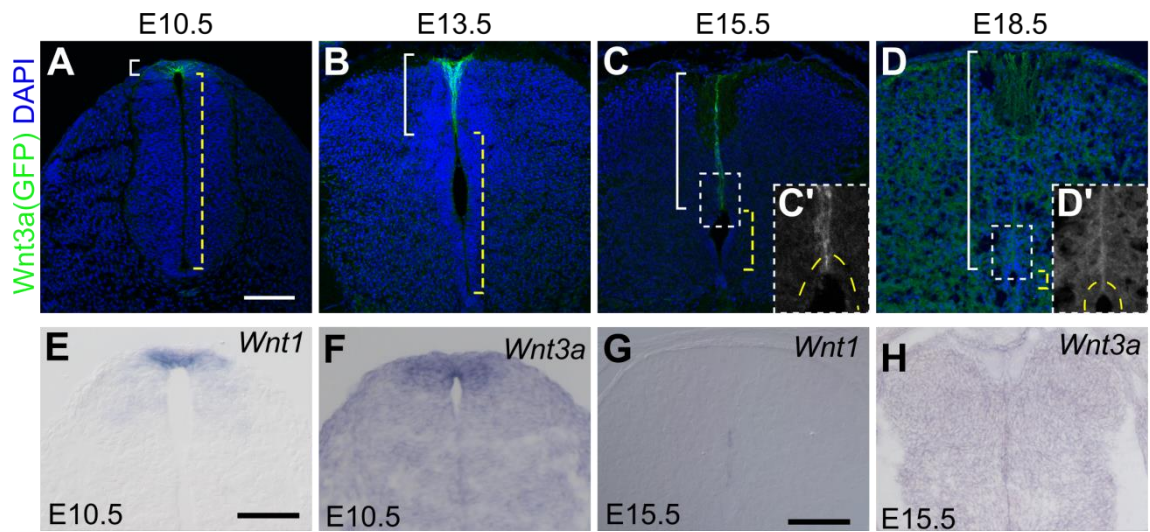


図6 発生過程のマウス脊髄神経管における Wnt タンパク質の空間分布の変化

(A-D) GFP 抗体による Wnt3a の空間分布の変化の解析。E10.5 (A), E13.5 (B), E15.5 (C), E18.5 (D) の脊髄神経管の前肢レベルでの横断面を示す。DAPI による核染色を行った (青)。白角括弧は roof plate 領域を示す。脊髄神経管の内腔は黄破線角括弧で示す。C、D の白破線で囲んだ内腔の周りの領域の拡大図(C', D')。内腔の周りの細胞を黄破線で囲んだ。(E-H) 脊髄神経管における Wnt の *in situ* hybridization。E10.5 (E, F) および E15.5 (G, H) 日胚における Wnt1 (E, G) と Wnt3a (F, H)。スケールバー: 50 μ m (E), 100 μ m (A, G)。

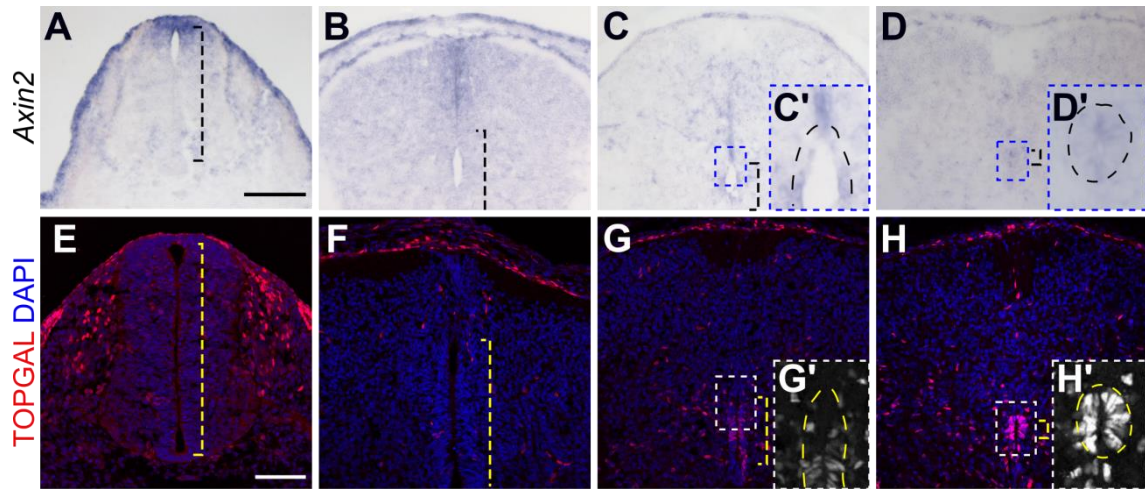


図7 発生過程のマウス脊髄神経管における *Wnt/β-catenin* シグナルの活性化領域の変化 (A-D) *Axin2* の *in situ* hybridization により *Wnt/β-catenin* シグナルを可視化した。E10.5 (A), E13.5 (B), E15.5 (C), E18.5 (D)。脊髄神経管の内腔は黒破線角括弧で示した。C、D の青破線で囲んだ内腔の周りの領域の拡大図(C', D')。内腔の周りの細胞を黒破線で囲んだ。n = 3。 (E-H) *ins*-TOPGAL レポーターマウスを用いた β-gal の抗体染色により *Wnt/β-catenin* シグナルを可視化した。E10.5 (E), E13.5 (F), E15.5 (G), E18.5 (H)。脊髄神経管の内腔は黄破線角括弧で示した。G、H の白破線で囲んだ内腔の周りの領域の拡大図(G', H')。内腔の周りの細胞を黄破線で囲んだ。n = 3。前肢レベルでの横断面切片。スケールバー: 100 μm。

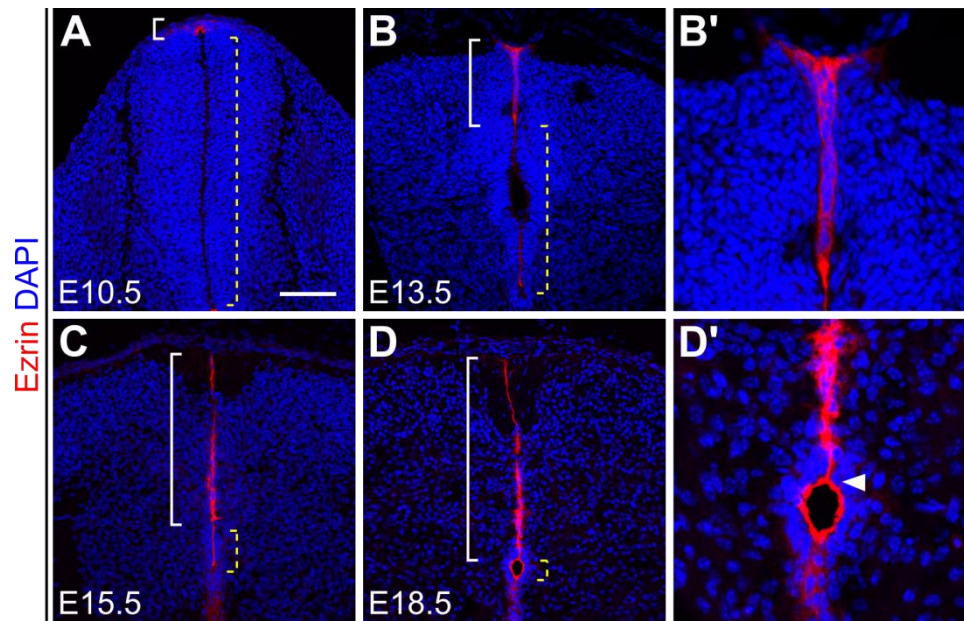


図8 マウス脊髄神経管における roof plate の伸長

Ezrin の抗体染色による roof plate の形態変化の解析。E10.5 (A), E13.5 (B), E15.5 (C), E18.5 (D) の脊髄神経管の前肢レベルでの横断面を示す。B、D の拡大図を示す(B', D')。DAPI による核染色を行った (青)。白角括弧は roof plate を示す。黄破線角括弧は脊髄神経管の内腔を示す。白矢尻は伸長した roof plate の腹側先端を示す。n = 3。スケールバー: 100 μ m。

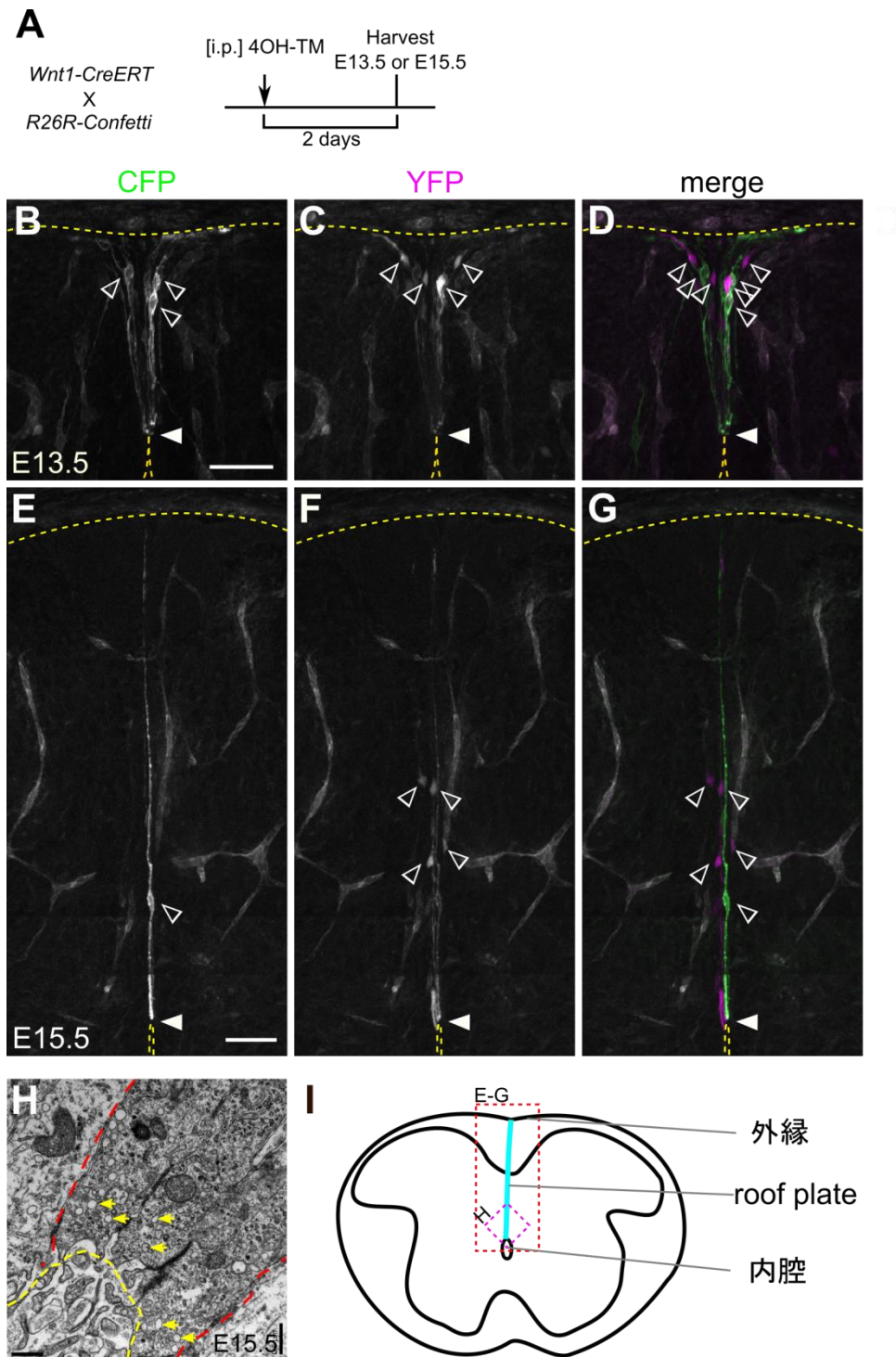


図9 Roof plate 細胞は背腹軸に沿って細胞突起を伸長させる

(A-G) Roof plate の細胞を低頻度に標識した。*Wnt1-CreERT*マウスと *R26R-Confetti*マウスのかけ合わせの模式図(A)。低頻度に標識した roof plate 細胞を E13.5 日胚 (B-D)および E15.5 日胚 (E-G)で観察した。細胞膜における CFP 陽性細胞(B, E)、細胞質における YFP

陽性細胞(C, F)、マージ画像(D, G)をそれぞれ示している。矢尻は細胞突起の先端を、open 矢尻は細胞体の位置を指している。黄破線は内腔と神経管の外縁を示している。(H) Roof plate 細胞の透過電子顕微鏡像。E15.5 日胚における roof plate の細胞突起の先端と脊髄神経管内腔との接触領域。Roof plate 細胞は赤破線で示した。脊髄神経管の内腔は黄破線で示した。伸長した roof plate の細胞突起の先端では多くの小胞(黄矢尻)が観察された。(I) 発生後期における脊髄神経管と roof plate(水色)の模式図。伸長した roof plate の細胞突起は脊髄神経管の外縁と内腔にそれぞれ接触している。E-G で観察した領域を赤破線、H で観察した領域をマゼンタ破線で示す。スケールバー: 50 μm (A, D), 0.5 μm (H)。

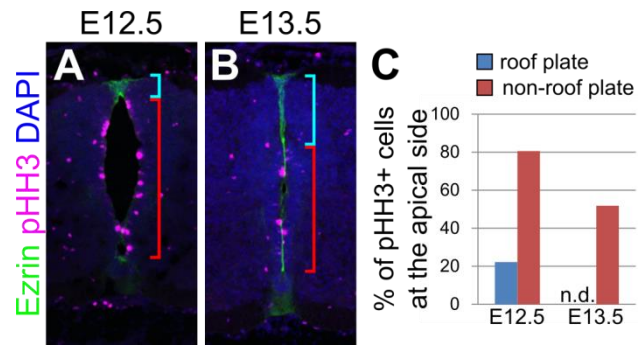


図 10 Roof plate 細胞における細胞増殖

E12.5 (A), E13.5 (B)日胚における Ezrin の抗体染色(緑)、pHH3 の抗体染色(マゼンタ)、DAPI による核染色(青)。pHH3 陽性の M 期の細胞のうち、核が apical 面に存在するものの割合を roof plate 領域(青角括弧)とそれ以外の神経上皮細胞領域(赤角括弧)で比較した(C)。前肢レベルでの横断面切片。n = 12 切片(3 個体)。

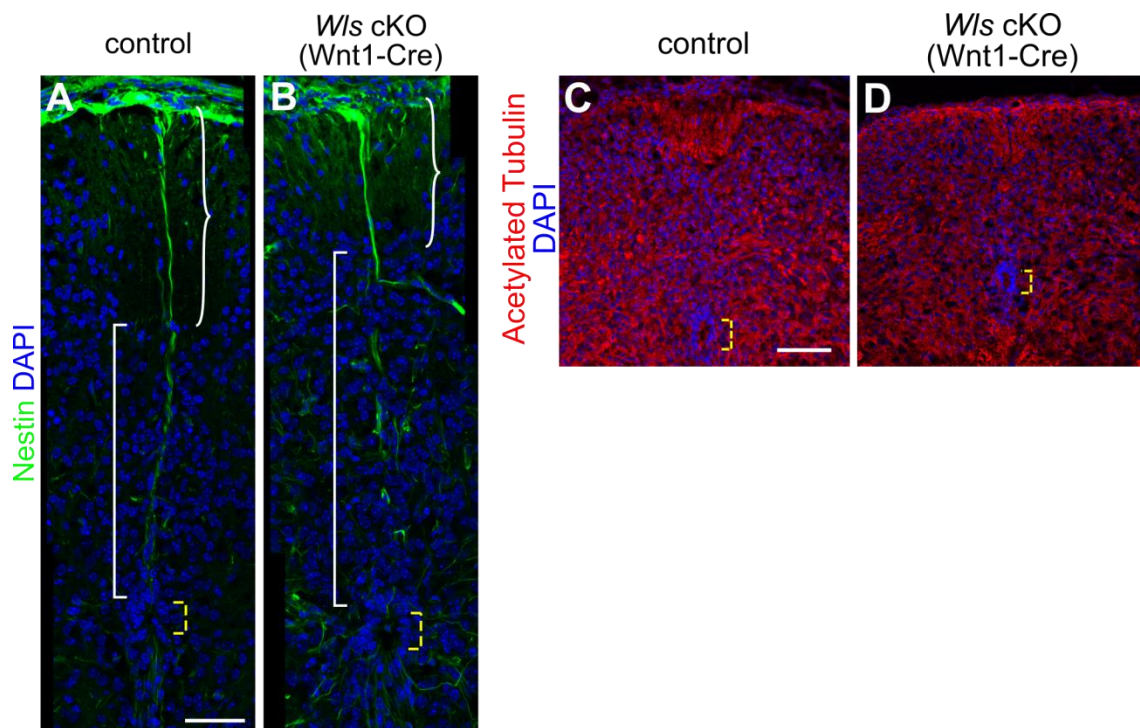


図 11 伸長した roof plate 細胞は Nestin に富んだ構造である

(A, B) E18.5 日の正常胚(A)と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(B)における Nestin の抗体染色(緑)と DAPI による核染色(青)。Nestin のシグナルは白質の領域では差が見られなかったが(白波括弧)、灰白質の領域で異常が見られた(白角括弧)。(C, D) E18.5 日の正常胚(C)、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(D)における acetylated tubulin の抗体染色(赤)、DAPI による核染色(青)。黄破線角括弧は脊髓神経管の内腔を示す。n = 3。スケールバー: 100 μ m (A), 50 μ m (C)。

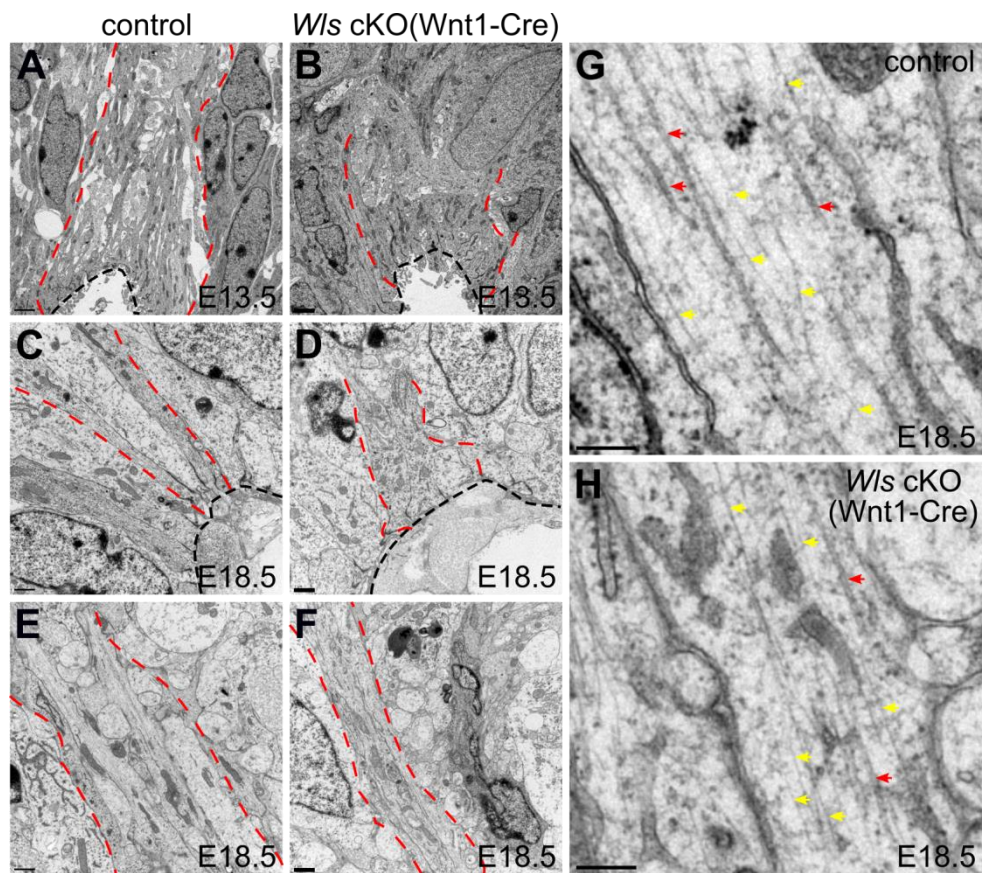


図 12 透過電子顕微鏡による roof plate 細胞の観察

Wts cKO(Wnt1-Cre)胚(B, D, F, H)、同腹の正常胚(A, C, E, G)のE13.5(A, B)およびE18.5(C-H)における透過電子顕微鏡像。伸長した roof plate 細胞は赤破線で示した。脊髄神経管の内腔は破線で示した。G, Hで中間径フィラメントは黄矢印、微小管は赤矢印でそれぞれ示した。n = 2。スケールバー: 2 μ m (A, B), 1 μ m (C-F), 0.2 μ m (G, H)。

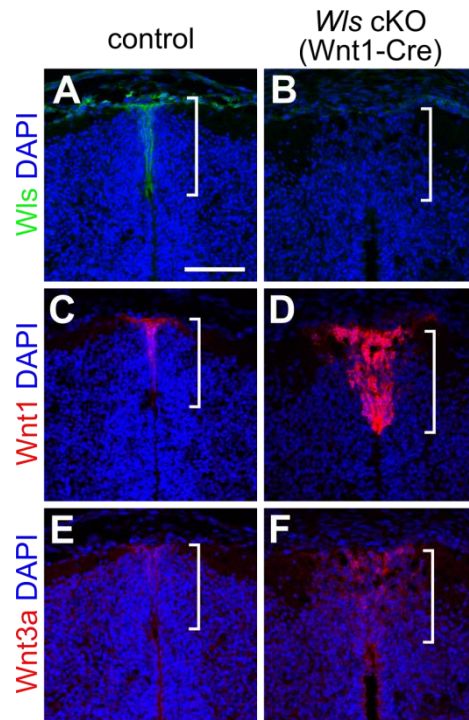


図 13 *Wls* の欠損による roof plate からの Wnt タンパク質の分泌阻害

E13.5 日の正常胚(A, C, E)と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(B, D, F)における *Wls*(A, B:緑)、*Wnt1*(C, D:赤)、*Wnt3a*(E, F:赤)、の抗体染色。DAPI による核染色を行った (青)。白角括弧は roof plate 領域を示す。前肢レベルでの横断面切片。 n = 3。スケールバー: 100 μ m。

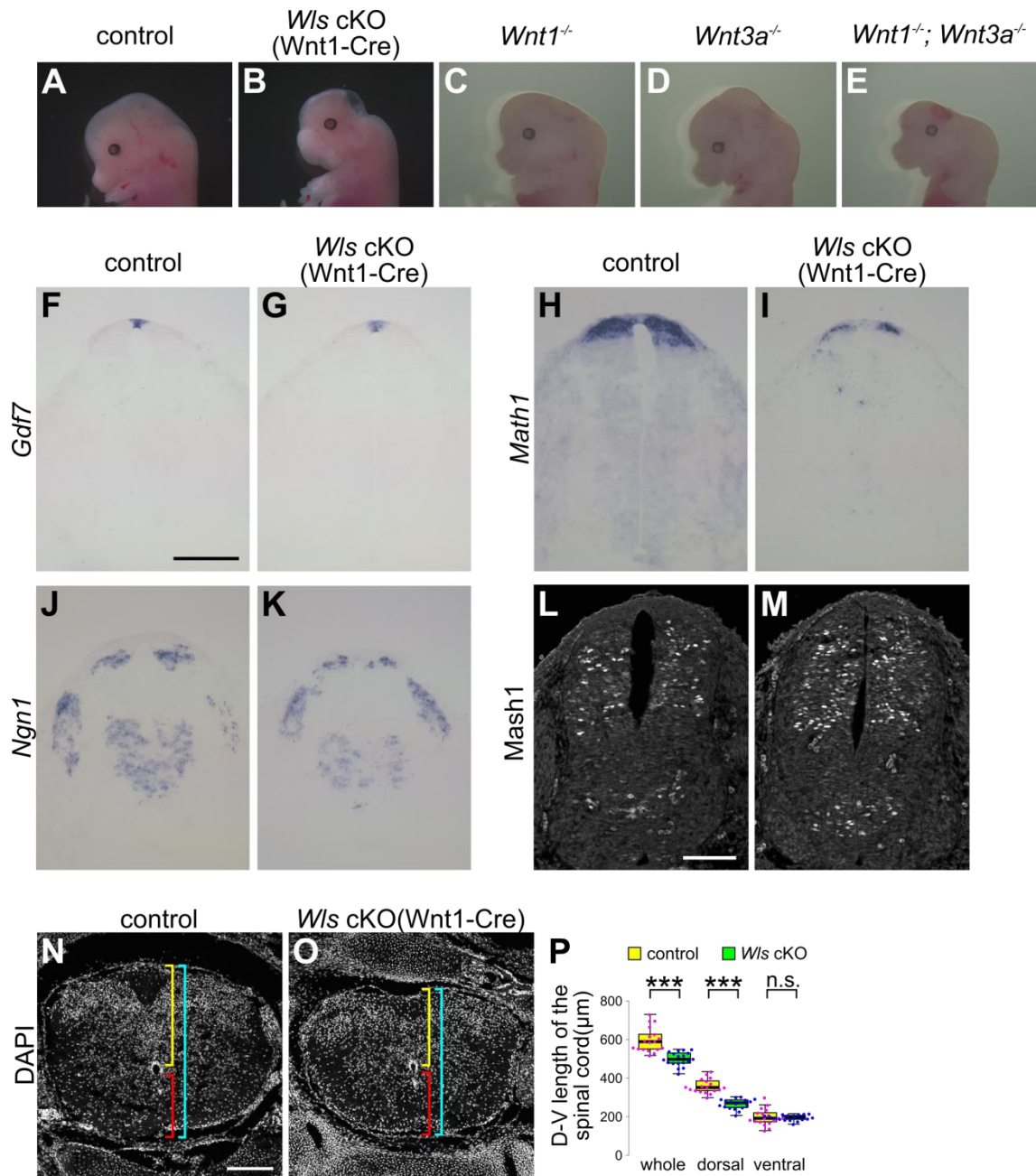


図 14 Roof plate での *Wls* の欠損は、脊髄神経管における *Wnt1*, *Wnt3a* 二重ホモ変異胚と類似した表現型を示す

(A-E) E13.5 日胚の頭部の形態。正常胚(A)、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(B)、*Wnt1* ホモ変異胚(C)、*Wnt3a* ホモ変異胚(D)、*Wnt1*, *Wnt3a* 二重ホモ変異胚(E)。*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚は *Wnt1*, *Wnt3a* 二重ホモ変異胚と同様の頭部の形態異常を示した。(F-M) E10.5 日胚の神経前駆細胞のマーカ解析。正常胚(F, H, J, L)、*Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(G, I, K, M)における、roof plate マーカー *Gdf7*(F, G)、D1 神経前駆細胞マーカー *Math1*(H, I)、D2 神経細胞前駆細胞マーカー *Ngn1*(J, K)の *in situ* hybridization および D3-5 神経前駆細胞マーカー *Mash1*

の抗体染色(L, M)。n = 3。(N-P) E18.5 日における正常胚(N)と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(O)の脊髄神経管の背腹軸方向の長さの比較。統計解析は P に示した。*** $P < 0.001$; Student's *t*-test。n = 18 切片(3 個体)。スケールバー: 100 μm (F, L), 200 μm (N)。

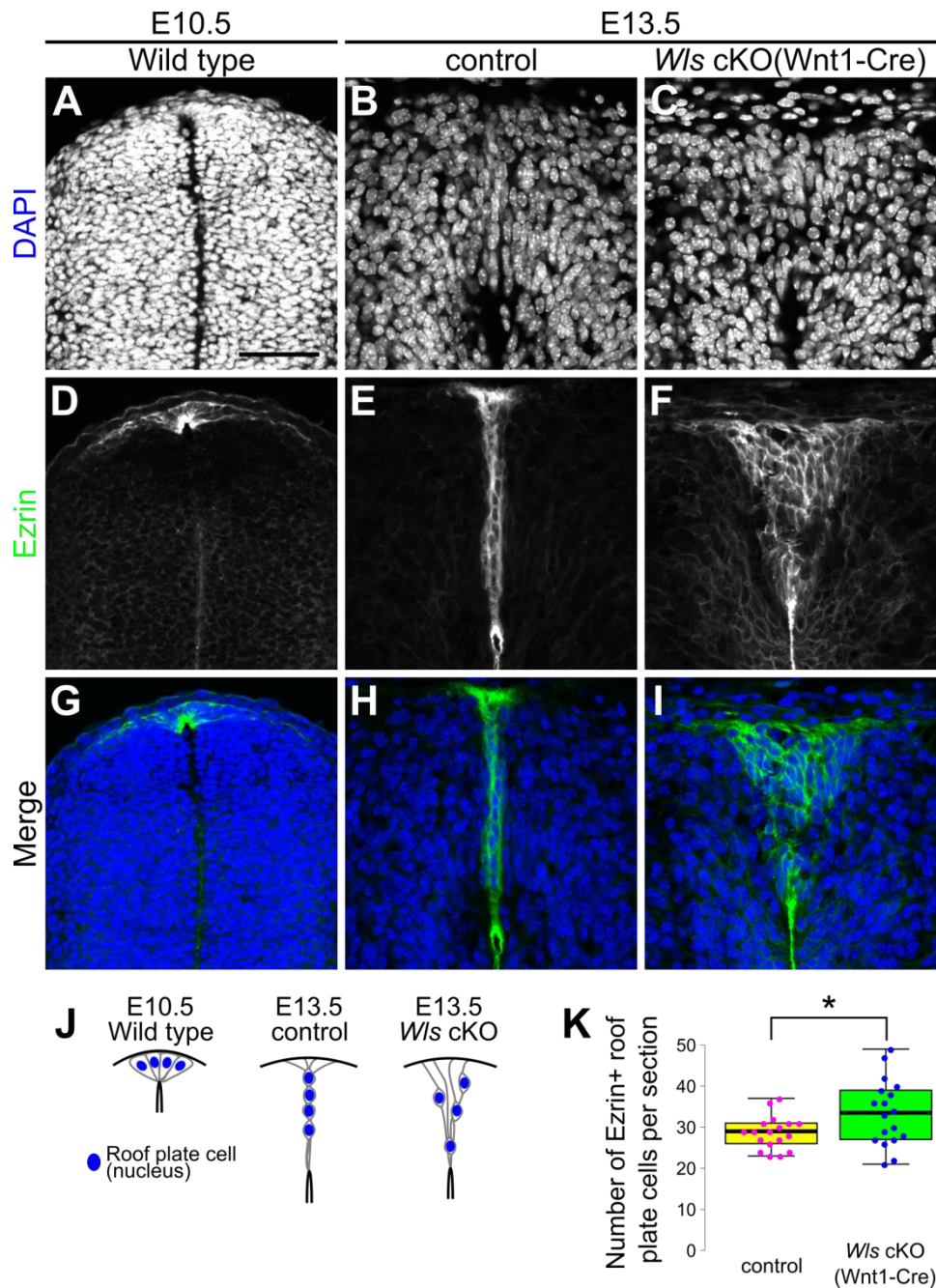


図 15 Roof plate 細胞からの Wnt の分泌は、roof plate 細胞の正常な rearrangement に必要である

Roof plate 細胞の rearrangement を *W/s cKO(Wnt1-Cre)* 胚 (C, F, D) と正常胚(A, B, D, E, G, H) で E10.5 (A, D G) および E13.5 (B, C, E, F, H, I) 日において比較した。DAPI による核染色(A-C)、Ezrin (D-F)の抗体染色、マージ画像(G-I)。Roof plate 細胞の rearrangement の模式図(J)。E13.5 日胚における Ezrin 陽性の roof plate 細胞の数の統計解析(K)。* $P < 0.05$; Student's *t*-test. $n = 18$ 切片(3 個体)。スケールバー: 50 μm 。

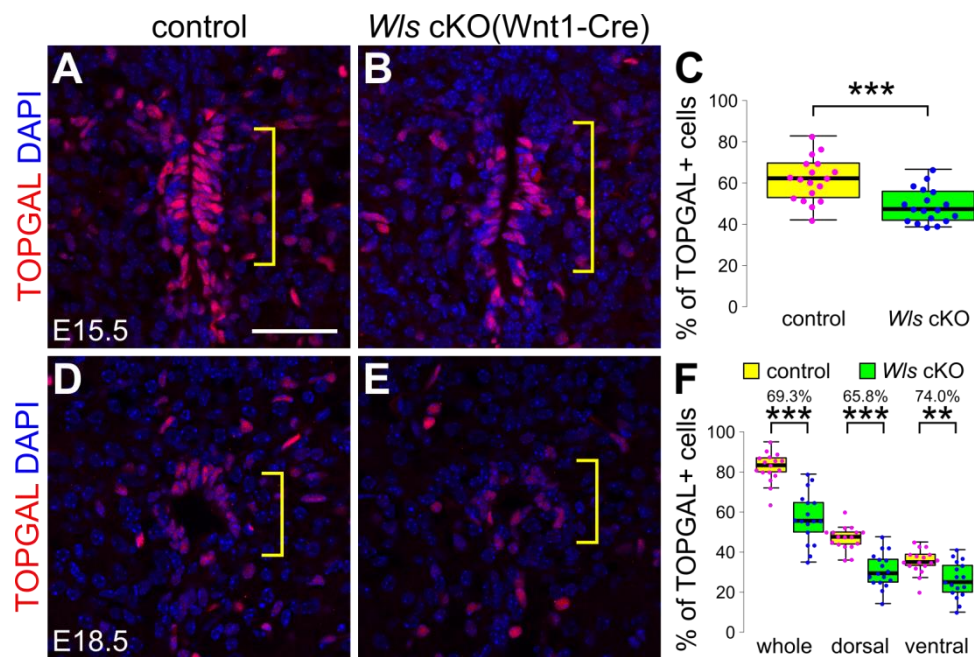


図 16 Roof plate 細胞からの Wnt の分泌は、内腔の周りの細胞での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化に必要である

E15.5 日(A-C)、E18.5 日(D-F)の正常胚(A, D)と *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚(B, E)の脊髄神経管の内腔の周りの細胞において、Wnt/ β -catenin シグナルを *ins-TOPGAL* レポーターマウスの β -gal の抗体染色(赤)、核を DAPI による染色(青)により比較した。内腔の周りの細胞を黄角括弧で示す。内腔の周りの細胞のうち TOPGAL 陽性細胞の割合の統計解析(C, F)。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Student's *t*-test。 *Wls* cKO(Wnt1-Cre)胚における β -gal 陽性細胞の正常胚に対する減少率をグラフ上部に示した(F)。n= 18 切片(3 個体; C)。n= 17 切片(3 個体; F)。スケールバー: 50 μ m。

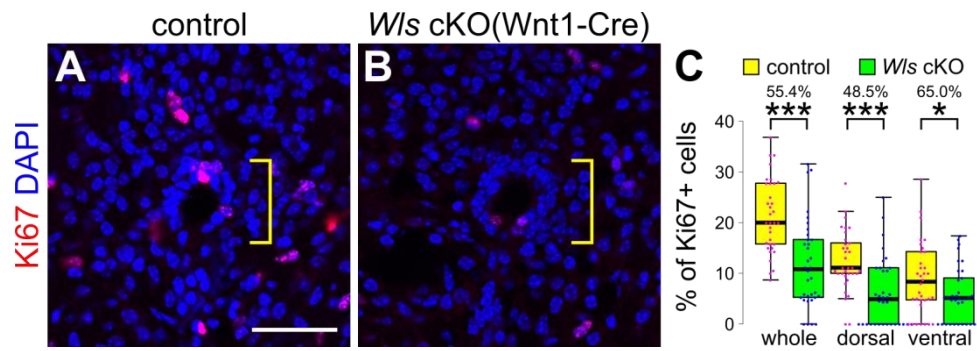


図 17 Roof plate 細胞からの Wnt の分泌は、内腔の周りの細胞の増殖を促進する

E18.5 日の脊髄神経管の正常胚(A)、と *W/s cKO(Wnt1-Cre)*胚(B)において、細胞増殖を Ki67 の抗体染色 (赤)、核を DAPI による染色 (青) により比較した。内腔の周りの細胞を黄角括弧で示す。内腔の周りの細胞のうち Ki67 陽性細胞の割合の統計解析(C)。 $*P < 0.05$, $***P < 0.001$; Student's *t*-test。 *W/s cKO(Wnt1-Cre)*胚における Ki67 陽性細胞の正常胚に対する減少率をグラフ上部に示した。n= 34 切片(6 個体)。スケールバー: 50 μ m。

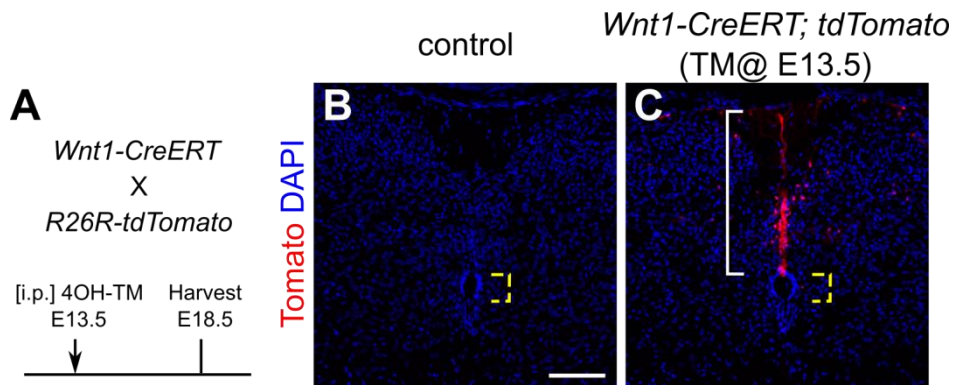


図 18 E13.5 日以降の伸長した Roof plate 細胞の系譜解析。

Wnt1-CreERT マウスと *R26R-tdTomato* マウスを交配し、妊娠 13.5 日の母親マウスにタモキシフェンを腹腔内注射し roof plate 細胞を標識し、E18.5 日胚で観察した(A)。コントロール胚(B)と roof plate 細胞の標識胚(C)。Tomato の抗体染色において、ほとんどの Tomato 陽性細胞(赤)は背側背側正中領域で検出された。DAPI による核染色を行った (青)。白角括弧は roof plate を示す。黄破線角括弧は脊髄神経管の内腔を示す。n = 3。スケールバー: 100 μ m。

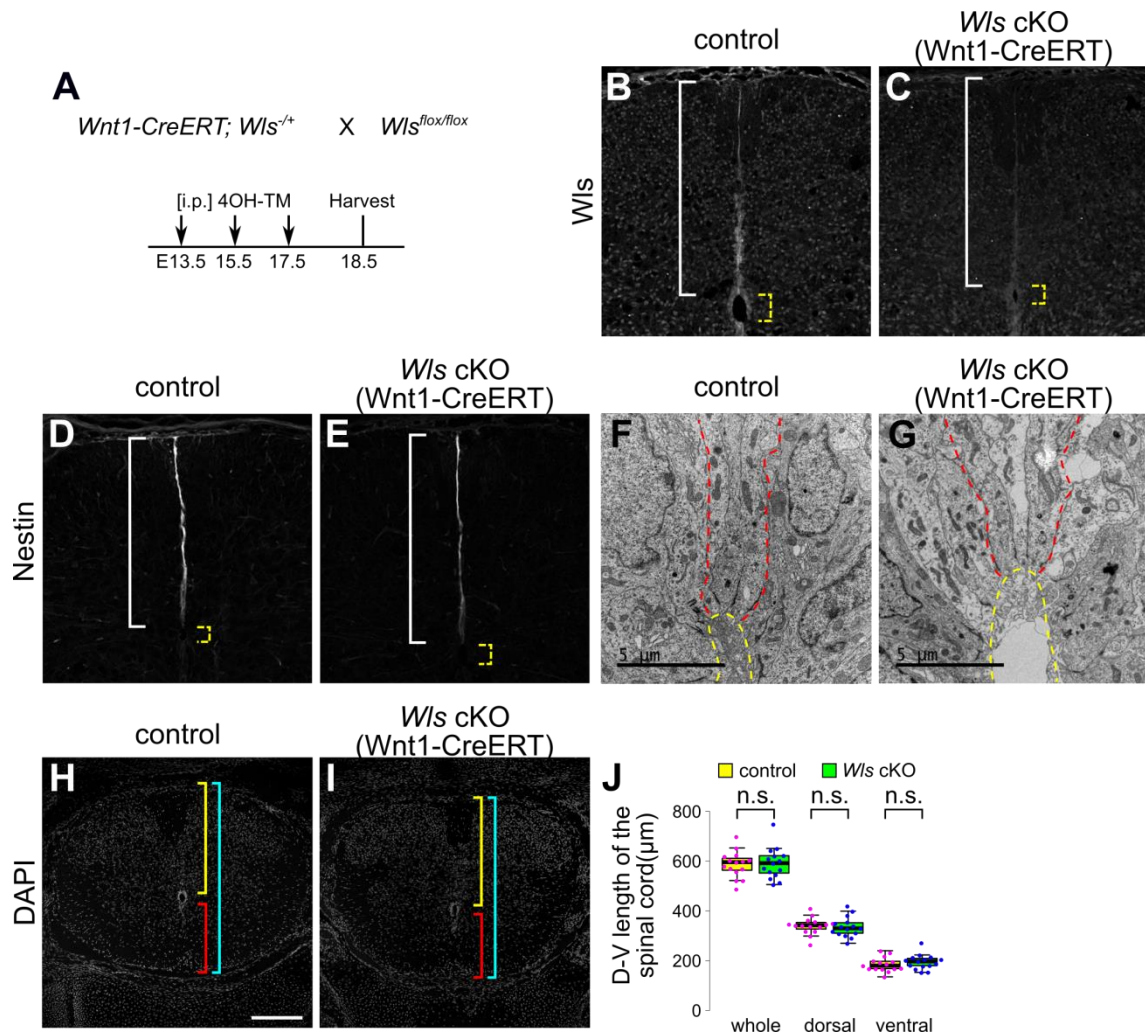


図 19 E13.5 日以降の伸長した roof plate からの Wnt の分泌阻害

(A) Roof plate からの Wnt 分泌阻害の模式図。 *Wnt1-CreERT; Wls^{+/-}* マウスと *Wls flox/flox* マウスを交配し、妊娠 13.5, 15.5, 17.5 日に母親マウスへのタモキシフェンの腹腔内注射を行い E13.5 日以降の roof plate での *Wls* の欠損により Wnt の分泌を阻害した。(B-E) E18.5 日の正常胚(B, D)と *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚(C, E)での *Wls* の抗体染色(B, C)、Nestin の抗体染色(D, E)。白角括弧は roof plate を示す。黄破線角括弧は脊髓神経管の内腔を示す。n = 3。(F, G) E18.5 日の正常胚(F)と *Wls* cKO 胚(G)での、伸長した roof plate の細胞突起の先端と脊髓神経管の内腔との接続領域の透過電子顕微鏡像。伸長した roof plate 細胞は赤破線で示す。脊髓神経管の内腔は黄破線で示す。n = 2。(H-J) E18.5 日における正常胚(H)と *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚(I)の脊髓神経管の背腹軸方向の長さの比較。統計解析は J に示した。Student's *t*-test. n = 15 切片(3 個体)。スケールバー: 100 μ m (B), 5 μ m (F), 200 μ m (H)。

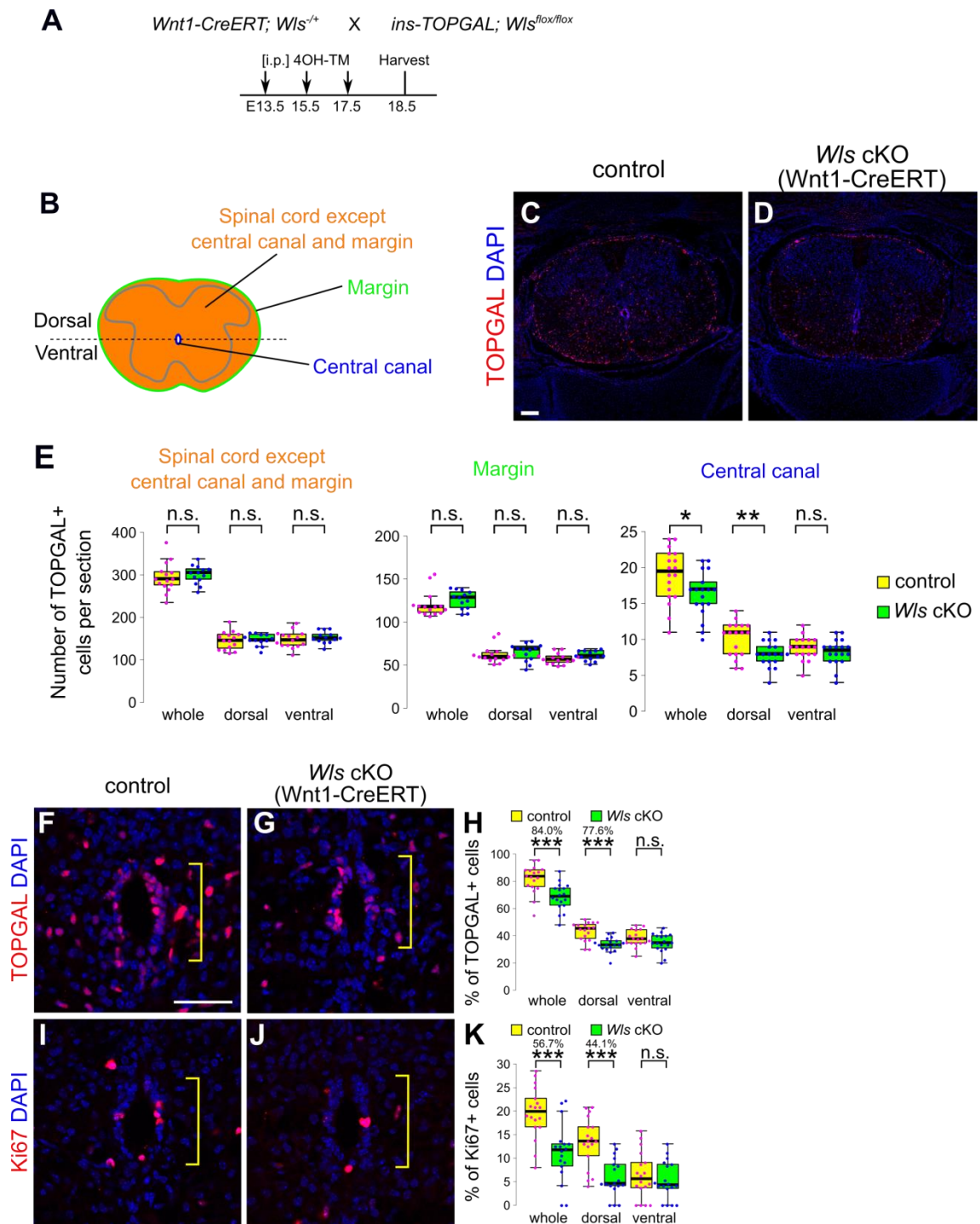


図 20 伸長した roof plate 細胞からの Wnt の分泌は、内腔の周りの細胞での Wnt/ β -catenin シグナルの活性化と細胞増殖に必要である

(A) Roof plate からの Wnt 分泌阻害の模式図。(B-E) E18.5 日の脊髄神経管における TOPGAL シグナル陽性細胞の数の解析。脊髄神経管の模式図(B)。脊髄神経管全体での正常胚(C)と Wls cKO($Wnt1\text{-CreERT}$)胚(D)における Wnt/ β -catenin シグナルを $ins\text{-TOPGAL}$

マウスの β -gal の抗体染色 (赤)、核を DAPI による染色 (青) により比較した。TOPGAL 陽性細胞の数の統計解析(E)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Student's t -test。n= 18 切片(3 個体)。(F-K) E18.5 日の脊髄神経管の内腔の周りの細胞において、正常胚(F)と *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚(G)での Wnt/ β -catenin シグナルを *ins-TOPGAL* マウスの β -gal の抗体染色 (赤)、核を DAPI による染色 (青) により比較した。内腔の周りの細胞を黄角括弧で示す。内腔の周りの細胞のうち TOPGAL 陽性細胞の割合の統計解析(H)。 *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚における TOPGAL 陽性細胞の正常胚に対する減少率をグラフ上部に示した。*** $P < 0.001$; Student's t -test。n= 18 切片(3 個体)。(I-K)E18.5 日の脊髄神経管の内腔の周りの細胞において、正常胚(I)、と *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚(J)において、細胞増殖を Ki67 の抗体染色 (赤)、核を DAPI による染色 (青) により比較した。内腔の周りの細胞を黄角括弧で示す。内腔の周りの細胞のうち Ki67 陽性細胞の割合の統計解析 (K) 。 *Wls* cKO(Wnt1-CreERT)胚における Ki67 陽性細胞の正常胚に対する減少率をグラフ上部に示した。*** $P < 0.001$; Student's t -test。n= 18 切片(3 個体)。スケールバー: 100 μ m(C), 50 μ m(H)。

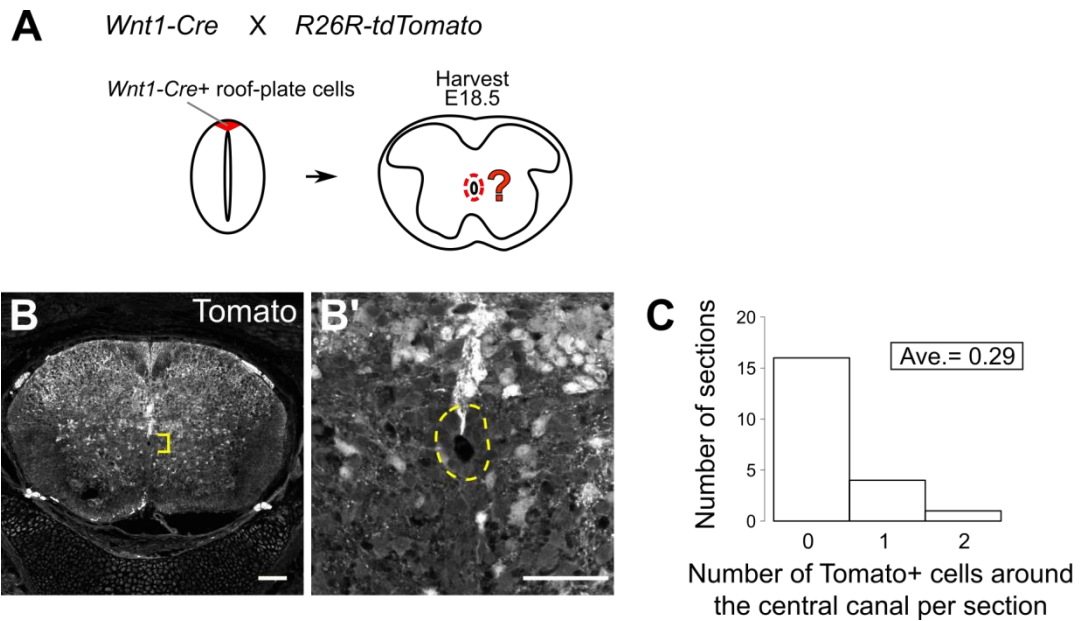


図 21 Roof plate に由来する細胞は内腔の周りの細胞に寄与しない

Wnt1-Cre マウスと *R26R-tdTomato* マウスを用いた、E18.5 日胚における roof plate 細胞の系譜解析の模式図(A)。Tomato の抗体染色において Tomato 陽性細胞は背側脊髄神経管で検出されたが、内腔の周りの細胞ではほとんど検出されなかった(B)。拡大像(B')。黄角括弧と黄破線は内腔の周りの細胞を示す。切片あたりの Tomato 陽性な内腔の周りの細胞の数の定量(C)。切片あたり平均 0.29 個の Tomato 陽性細胞が内腔の周りで検出された。n = 21 切片(4 個体)。スケールバー: 100 μ m (B), 50 μ m (B')。

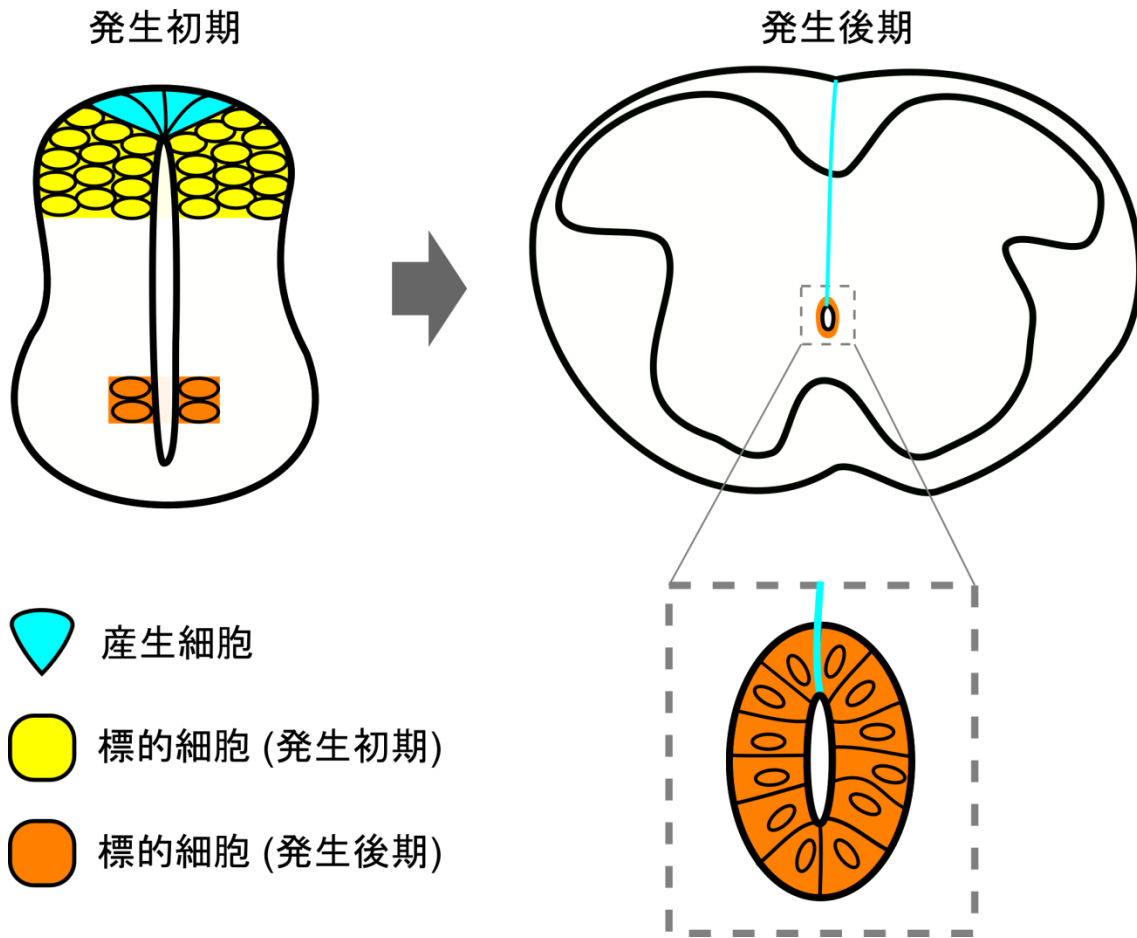


図 22 Wnt の産生細胞の形態変化は Wnt/ β -catenin シグナルの活性化領域をシフトさせる
 脊髄神経管の Wnt の産生細胞である roof plate(水色)は、脊髄神経管の内腔の退縮にともな
 って、形態を変化させ細胞突起を伸長させる。発生初期では背側神経管で Wnt/ β -catenin
 シグナルが活性化されている(黄色)。一方で、発生後期になると腹側の脊髄神経管に由来す
 る退縮した内腔の周りの細胞で Wnt/ β -catenin シグナルが活性化される(オレンジ色)。発生
 過程における Wnt の産生細胞の形態変化によって、Wnt/ β -catenin シグナルの活性化領域
 の変化が引き起こされたことが示唆される。

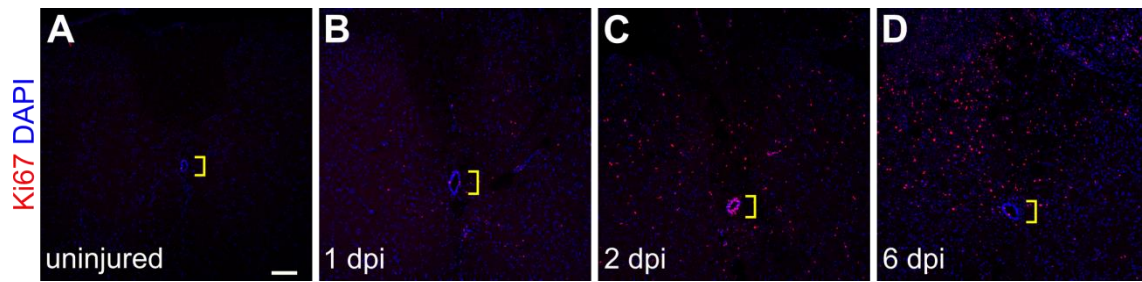


図 23 脊髄損傷に応答した細胞増殖の時間的変化

8 週齢マウスにおける Ki67 陽性増殖細胞の抗体染色。損傷前(A)、損傷後 1 (B)、2 (C)、6 日(D)。中心管の周りの上皮細胞のほとんどは損傷後 2 日目に増殖が活性化していた。黄角括弧は脊髄の中心管を示す。n = 2。スケールバー: 100 μm 。

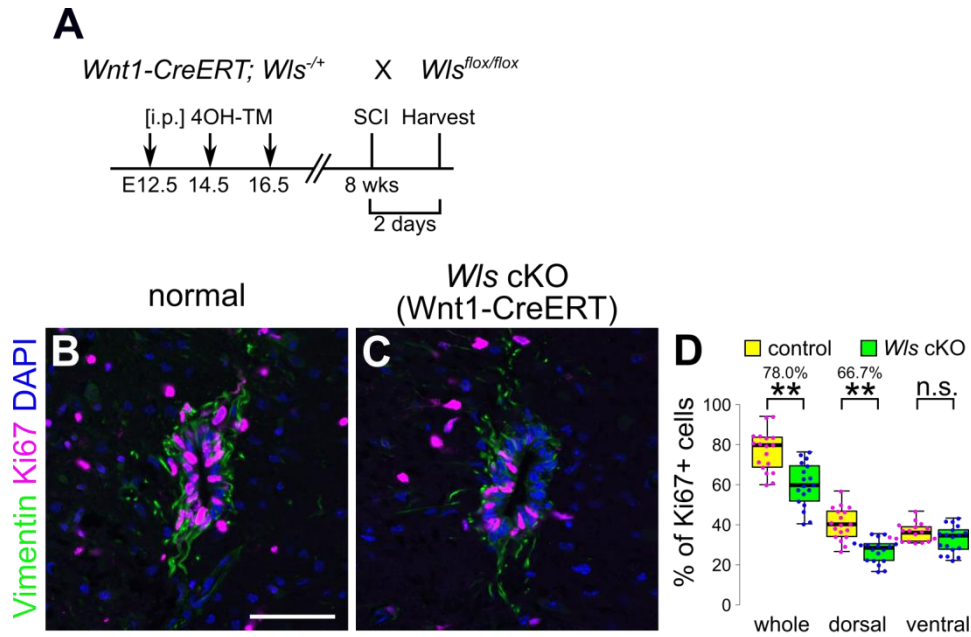
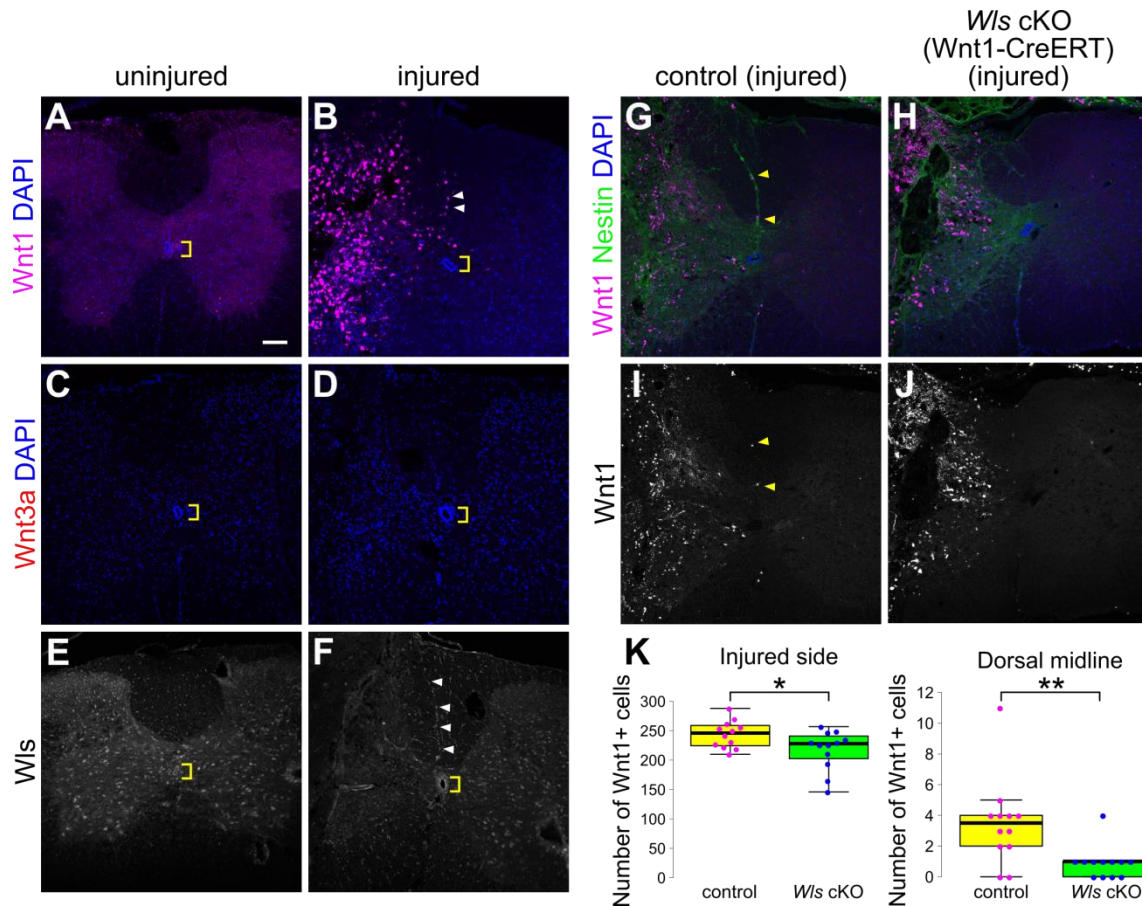


図 24 成体 Wls cKO(Wnt1-CreERT)マウスにおける脊髄損傷に応答した中心管の周りの細胞の細胞増殖

実験操作の模式図(A)。8週齢、脊髄損傷後2日の正常マウス(B)、と Wls cKO(Wnt1-CreERT)マウス(C)において、細胞増殖を Ki67 の抗体染色 (マゼンタ)、中心管の周りの細胞を Vimentin の抗体染色 (緑)、核を DAPI による染色 (青) により比較した。中心管の周りの細胞のうち Ki67 陽性細胞の割合の統計解析(D)。 Wls cKO(Wnt1-CreERT)マウスにおける TOPGAL 陽性細胞の正常マウスに対する減少率をグラフ上部に示した。 ** $P < 0.01$; Student's t -test. $n = 18$ 切片(6 個体)。スケールバー: 50 μm 。



(A-F) 8 週齢マウスでの損傷前(A, C, E)、損傷後(B, D, F)、における Wnt1 による抗体染色 (A, B; マゼンタ)、Wnt3a の抗体染色 (C, D; 赤)、Wls(E, F)の抗体染色。損傷後、背側正中領域で Wnt1、Wls の発現が見られたが(白矢尻)、Wnt3a の発現は見られなかった。黄角括弧は脊髄の中心管を示す。(G-K)8 週齢マウスの脊髄損傷に応答した Wnt1 の発現の正常マウス (G, I)と *Wls*cKO(Wnt1-CreERT)マウス(H,J)の比較。Wnt1 による抗体染色 (マゼンタ)、Nestin による抗体染色 (緑)、DAPI による核染色 (青)を行った。背側正中領域における Nestin と Wnt1 の二重陽性細胞を黄矢尻で示す。損傷領域と背側正中領域における Wnt1 の発現の統計解析(K)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Student's *t*-test. $n = 12$ 切片(3 個体)。スケールバー: 100 μm 。