

# 研究報告書

## 「機械刺激受容体と神経軸索組織の構築基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 和田 浩則

### 1. 研究のねらい

哺乳類の成体では、神経系の再生能力が乏しいため、外傷や老化にともなって様々な疾患が生じる。ところが、魚類では、一生にわたって成長を続けるため、成体においても新たな神経回路が形成し、かつ高い再生能力を維持している。本研究のねらいは、このような顕著な特徴をもつ魚類神経系をモデルに、「繰り返し構築される神経回路」と「再生能力」の仕組みを、細胞・分子レベルで解明し、「組織がいかにして構築され、決まった形態や大きさを獲得するのか」という生物学の基本的な問題に挑戦する。得られた知見を踏まえ、将来的に、再生医療への応用を目指す。

動物の体は、様々な器官から構成される。それぞれの器官は、決まった大きさを持っており、体全体が協調的に働くために重要である。とりわけ、感覚器官は、外界の情報を的確に受容し、中枢に伝える役目を担っており、体の特定の場所に、正しい大きさと数の器官が形成される。しかし、これらの形質がどのような発生メカニズムで生じるのか分かっていない。本研究では、魚類の側線神経の感覚器官(感丘)をモデルに、器官サイズ決定の仕組みの解明に取り組む。

魚類の側線神経系は、機械刺激受容体(側線感覚器・感丘)とそれを支配する神経軸索からなる。魚の成長に伴って、感覚器官は一定の大きさを保ちながら数を増し、それに応じて神経軸索も再構築される。これまで、私は、感覚器の増加が、一部の細胞の遊走と増殖によって起きることを明らかにした。さらに、側線感覚器は、著しい再生能力を持ち、感覚細胞(有毛細胞)は一定の頻度で死に、周囲の支持細胞の分裂によって再生されることから、感覚器の大きさを、発生・再生過程で常に一定に保つためのシステムがあると考えられた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

感覚器官を正しいサイズに保つことは、体全体が協調的に働くために重要である。魚類の側線神経系は、機械刺激受容体(側線感覚器)とそれを支配する神経軸索からなる。側線感覚器は一生にわたり、同じサイズを維持する。本研究において、私は、Wnt シグナルが感覚器の細胞増殖を促進すること、一方、分化した感覚細胞が Wnt 阻害因子 Dkk を分泌して細胞増殖を抑制し、その結果、器官サイズを一定に保つことを示した。また、細胞増殖には、感覚器への軸索投射が必要であることを示した。さらに、器官の形態を維持するためには、Wnt シグナルを抑制する必要があることを示した。本研究により、感覚器の形と大きさを維持するための新しい調節機構が明らかになった。

(2) 詳細

(1) Wnt/Dkk の負のフィードバック・ループが器官サイズを制御する

魚類の側線神経感覚器(感丘, neuromast)は、感覚細胞(有毛細胞)とそれを取り囲む支持細胞からなる(図1A)。感丘細胞を GFP で標識するゼブラフィッシュ・トランスジェニックシステムを用い、感丘が「出芽」し新たな感丘を形成する過程を調べ、「出芽」には細胞移動と細胞増殖が伴うことを見出した(文献1)。次に、感丘で特異的に発現する遺伝子を検索した結果、*dkk2* 遺伝子が分化した有毛細胞で強く発現することが分かった(図1D-F)。*Dkk* 遺伝子は、Wnt シグナルの阻害因子であることが知られている(図1B)。レポーターシステムを用い、Wnt シグナル活性を調べたところ、増殖している出芽細胞でシグナル活性が高いことを見出した(図1C)。この結果は、Wnt シグナルが細胞増殖を促進し、逆に *Dkk2* がその活性を抑えることによって、増殖を止めていることを示唆している。

そこで、(1) *dkk2* とその受容体 *krm*(図1B)の機能阻

害(2) 特定組織での *dkk2* の過剰発現(3) Wnt パスウェイを活性化する恒常的活性型  $\square$ catenin の過剰発現、(4) Wnt パスウェイの恒常活性型変異体 *apc* の解析、(5) Wnt パスウェイの下流因子 *lef1* の機能阻害、(6) aphidicolin 薬剤処理による細胞分裂阻害、による検証実験を行った。その結果、Wnt シグナル活性を亢進させた場合は、分裂細胞が増え、感丘が大きくなり、有毛細胞の数も増えた(図1G,H)。逆に、Wnt シグナル活性を阻害した場合は、分裂細胞が減少し、感丘は小さくなり、有毛細胞の数も減少した(図1I)。有毛細胞の増減に伴って、*dkk2* 遺伝子の発現も増減した。つまり、Wnt シグナルは感丘の細胞増殖を促進し、一方、分化した感覚細胞は、Wnt 阻害因子 *Dkk2* を分泌して、周囲の細胞増殖を抑制している。Wnt/Dkk からなる「負のフィードバック」によって、器官サイズを一定に調節していることが示された。

(2) Wnt/Dkk のフィードバックは、器官サイズの恒常的維持に働く

感丘は高い再生能力を持つ。有毛細胞は、除去後 24 時間以内に、分裂を再開した支持細胞によって再生され、除去前と同じ数に戻る(図2A-C)。Wnt/Dkk フィードバック機構が、有毛細胞数(=器官サイズ)の一定性の制御に働くかどうかを調べるために、*dkk2* 遺伝子を過剰発現した胚において、再生過程を調べた。過剰な *Dkk2* の存在下では、細胞分裂が抑制され、有毛細胞は再生しなかった(図2D-F)。この結果

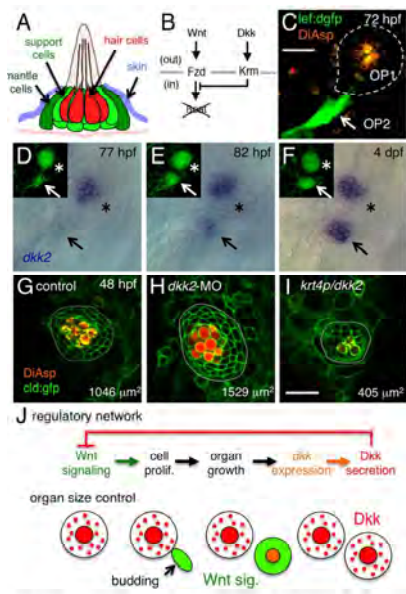


図1. Wnt/Dkkフィードバックが器官サイズを制御する (A) 感丘の模式図 (B) Wntパスウェイ模式図。 (C) 出芽細胞におけるWntリポーター活性 (*lef1:dgfp*)。 (D-E) 感丘の成熟に伴い有毛細胞で*dkk2*が発現する。 (G-I) *Dkk*は、細胞増殖を抑え器官サイズを調節する。 (J) 負のフィードバックによる器官サイズ調節機構。

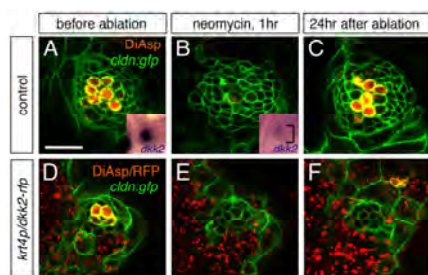


図2. フィードバックにより器官が一定サイズを維持する仕組み (A-B) 感丘の再生過程。有毛細胞の除去により*dkk2*の発現が落ち、周囲の細胞のWntシグナルが上昇し増殖を引き起こす。 (D-F) *Dkk*の過剰発現は有毛細胞の再生を阻害する。 (G) 負のフィードバックが器官サイズを一定に保つ仕組み。

は、有毛細胞除去に伴い、*dkk2* 遺伝子の発現レベルが落ちることによって、周囲の支持細胞の分裂が再開し、再生した有毛細胞が一定数に達すると、再び発現した Dkk2 が支持細胞の分裂を阻害して、器官の成長を止めるというモデルを支持する(図2G)。すなわち、Wnt/Dkk による負のフィードバック機構は、器官サイズの家オスタティックな維持に働いている。

### (3) 感覚器に投射する神経軸索が、感覚器の細胞増殖に必要である

以上の研究から、Dkk2 は、細胞増殖過程において、Wnt シグナルの inhibitor として働くことが示された。次に、何が、Wnt シグナルの activator として働いているかを調べた。*Wnt* 遺伝子は感丘もしくはその周辺組織に特異的に発現しておらず、また *wnt3a* 遺伝子の過剰発現は、感丘の増殖に影響しないことから、Wnt リガンド自身は、activator ではない可能性が示唆された。感丘の出芽細胞(=増殖細胞)には、母感丘から分岐した神経軸索末端が分布している(図3A,B)。神経細胞(側線神経節感覚神経細胞)をレーザー照射により除去すると、感丘は出芽の際と同様に伸長するが、出芽細胞は増殖しないことがわかった(図3C,D)。つまり、神経軸索は、感丘の細胞増殖に必要である。次に、決まった出芽パターンを示す尾鰭の感丘(*ter2*,図3E)について調べたところ、出芽細胞(*ter2'*)では Wnt シグナルの活性が高かった(図3F)。また、*hsp:dkk1* 系統を用いて、一過的に Dkk を過剰発現させ Wnt シグナルを阻害すると、神経軸索を除去した時と同様に、出芽細胞の増殖が抑えられた(図3G,H)。つまり、神経軸索は Wnt シグナルを亢進して、細胞増殖を制御していることが示唆された。神経細胞には Wnt 活性化因子である *rspo2* 遺伝子が発現しており(図3J,K)逆に、感丘細胞では、その受容体 *lgr6* 遺伝子が発現している(図3I)。神経軸索が分泌する Wnt 活性化因子が、細胞増殖の activator として働く可能性が考えられた(Montpellier 大学・Alain Ghysen 博士との共同研究)。

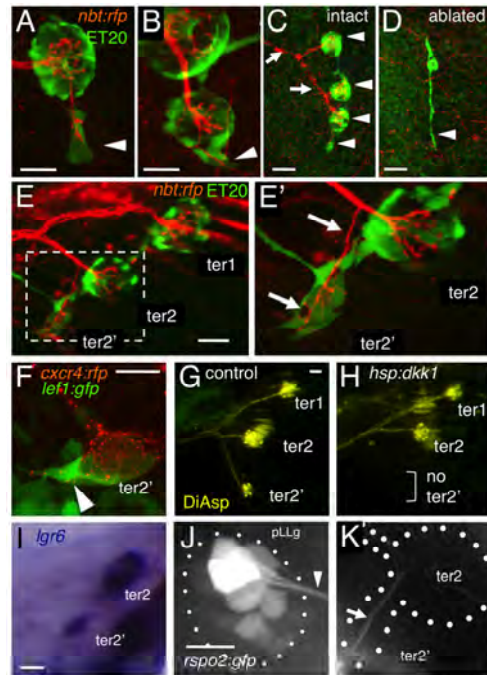


図3. 神経軸索投射が細胞増殖を促進する (A,B) 出芽細胞に軸索が投射する。(C,D) 軸索を除くと、出芽細胞の増殖が阻害され、娘感丘が形成されない。(E,F) 出芽細胞におけるWntリポーター活性。(G,H) Wntパスウェイの阻害は、細胞増殖を抑制する。(I-K)神経細胞では、Wnt活性化因子*rspo2*が発現し、逆に、感丘では受容体*lgr6*が発現する。

#### (4) 感丘外縁を取り囲むマンテル細胞が、器官の形態維持に必要である

器官サイズを調節するためには、器官の形態を正常に保つことが必要である。感丘は、上皮極性をもった細胞が同じ向き並んでおり、中央に感覚細胞が位置することにより、Wnt/Dkk のフィードバックが有効に働いていると考えられる(図4 A,B,E)。Wnt パスウェイが恒常的に活性化される *apc* 変異体では、細胞増殖が促進する以外に、器官が皮膚の外に出ず、vesicle 状の異常形態を示した(図4C-E)。有毛細胞は正常に分化するが、感覚毛を異所的に生じた内腔に伸ばした(図4D, inset)。さらに、*apc* 変異体では、感丘の最外層を一行に取り囲む支持細胞(マンテル細胞)が欠損していることが分かった(図4D)。マンテル細胞は、器官の最外縁を取り囲むことによって、器官形態を維持し、感覚毛を皮膚の外に伸ばす役割があると考えられた。感丘の形成過程において、Wnt シグナルの抑制は、細胞増殖を抑制するだけでなく、マンテル細胞の分化を促進し、器官の形態を正常に保つ働きがある。

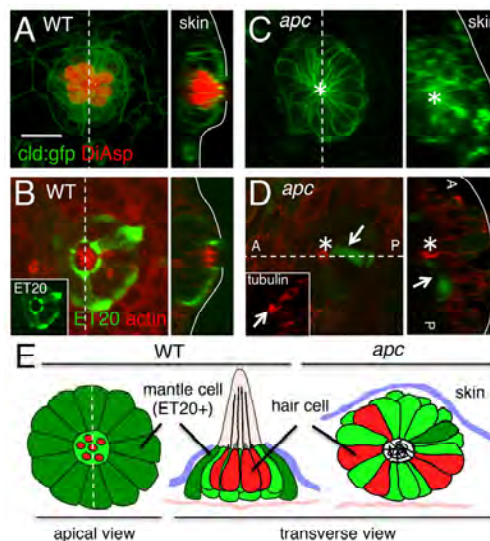


図4. マンテル細胞が、感丘の形態を制御する (A,B) 正常個体ではマンテル細胞(ET20+)が感丘の周囲を取り囲み、有毛細胞は皮膚の外に感覚毛を伸ばす。(C,D) *apc*変異体は、マンテル細胞を欠失し、vesicle 状の形態を示す。有毛細胞は正常に分化するが(D, inset)、感覚毛は異所的に生じた内腔(\*)に伸びる。(E) 模式図。

#### (5) まとめ: 器官の形態とサイズの制御における Wnt シグナルの役割

これまで、本研究で明らかになった、感覚器形成メカニズムの模式図を図5に示す。

1: Wnt シグナルは細胞増殖を促進させる。一方、感覚細胞の形成には関与せず、一定頻度で分化した感覚細胞が Dkk2 を分泌し、周囲の細胞増殖を抑制する。Wnt/Dkk からなる「負のフィードバック」によって、発生過程・再生過程における感覚器サイズを一定に保っている(図5A)。

2: 神経軸索が Wnt シグナルの亢進を介して細胞増殖を制御している。したがって、神経細胞で Wnt 活性化因子が発現している可能性がある。その候補として、Rspo/Lgr シグナルが考えられる(図5A)。

3: Wnt シグナルは、マンテル細胞の分化を抑制する(図5A)。マンテル細胞は、感丘の最外層を取り囲み、すべての感丘細胞を

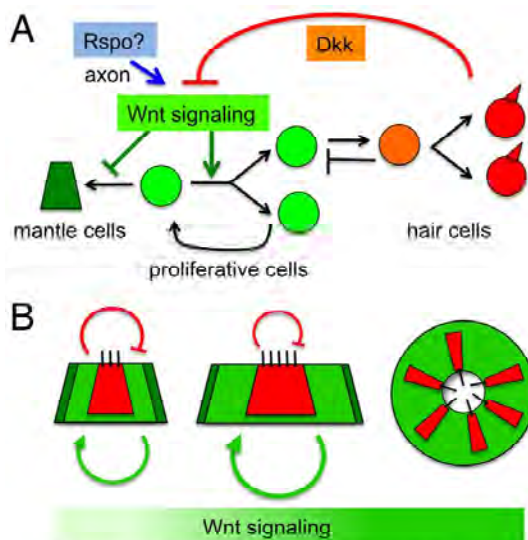


図5. 感覚器のサイズと形態を制御するメカニズム (A) 感丘形成における細胞間制御ネットワーク。(B) Wnt/Dkkのバランスが感覚器サイズを制御する。Wnt signalingがさらに過剰になると、マンテル細胞(濃緑)が欠失し、vesicle 状の形態をとる。

apico-basal 方向に並べる働きがある。マントル細胞が欠失すると、感丘は正常の形態を保てず、vesicle 状の構造を取り、その結果、感覚毛を表皮の外に伸ばすことができなくなる(図 5B)。つまり、マントル細胞は、物理的な力で器官形態を支える「ブック・エンド」として働いていると考えられる。

### 3. 今後の展開

#### (1) 器官サイズの調節メカニズム

器官を正しいサイズに保つことは、体全体を協調的に動かすために重要である。本研究では、感丘が負のフィードバック機構により、一定の大きさを保つことを見出した。さらに、神経軸索が、細胞増殖を制御していることを示した。今後、activator 分子とその作用機序を明らかにし、器官サイズ決定システムの全体像を解明したい。

頭部にある特殊な感丘(管器感丘 canal organ)は、魚の成長と共に大きくなる。管器感丘は、体表の感丘とは異なり、皮膚下に存在し、硬骨に取り囲まれており、環境の水に接していない。したがって、管器感丘は、水の流れではなく、加速度や餌の振動を感知すると考えられている。つまり、感丘は感覚機能に応じて、「一定サイズを保つ」戦略と、「プロポーションに成長する」戦略を使い分けている。また、感丘形態は魚種によって多様であることから、activator, inhibitor の他に、regulator が存在すると考えられる。今後、感覚器のサイズや形を制御する仕組みを調べることによって、生物が様々なプロポーションや形態を生み出す普遍的なメカニズムを明らかにしたい。

#### (2) 聴覚器官の再生医療への応用

哺乳類の聴覚器官(蝸牛管)は、魚類の感丘と同じく、有毛細胞とそれを取り囲む支持細胞からなる。我々の聴覚器の有毛細胞が外傷や老化に伴って失われ、二度と再生しないのに対し、感丘は、著しい再生能力を持っている。本研究で明らかにした細胞増殖制御メカニズムは、感丘をすみやかに再生し、恒常的に維持するためのシステムである。今後、感丘細胞における Wnt シグナルの役割を調べることによって、聴覚器の治療や再生医療に結びつくと考えられる。

### 4. 自己評価

当初の研究のねらいでは、「側線組織がいかにして構築され、決まった形態を獲得するのか」という漠然とした全体像を思い描いていた。研究を開始した時点で、分子については何も分かっていない状況であった。本研究によって、分子レベルで解明したことは、「感覚器の大きさを制御する仕組み」という限られた部分であるが、器官サイズ制御における負のフィードバック機構という新しいメカニズムを提唱できたと考えている。

つぎに、「器官構築における神経軸索の役割」として、細胞増殖に神経軸索が必要であることを明らかにした。実際に働いている分子はまだ分かっていないが、候補となる分子を同定しており、近い将来、実験的に検証できると考えている。さらに、「感覚器の形態を維持する仕組み」として、マントル細胞の役割を提唱した。その細胞・分子レベルでの役割は全く未知のものであり、今後の研究課題としたい。

もう一つ、当初の予定では、「多様性を生み出す仕組み」を考えていた。具体的には、「今後

の展開」で述べた、魚の成長と共に大きくなる特殊な感丘の発生機構を解析である。予備実験の結果、この感丘は、発生が非常に遅く、孵化後1ヶ月かかること、頭骨や皮骨に深くもぐり込み、遺伝子解析が容易でないこともあり、記載のみにとどまった。この感丘の発生には、骨形成(骨芽細胞と破骨細胞)が密接に関与していることが分ってきたので、今後の研究課題としたい。

## 5. 研究総括の見解

一生成長が持続する魚類では神経回路の構築が繰り返されるため再生能力の仕組みの解析に適していることに着目し、遺伝子の機能操作実験にも適したゼブラフィッシュを用いて側線神経感覚器官(感丘)の増加と器官サイズ決定の仕組みを解析した。感丘の増加は細胞の移動と増殖によること、これに Wnt シグナルが関わっており、分化した感覚細胞が Wnt 阻害因子 *dkk2* を分泌して周囲の細胞増殖を抑制する負のフィードバックにより、器官サイズが調節されまた支持細胞を介して器官の形態が正常に保たれることを見出した。さらに神経軸索が Wnt シグナルを介して感丘の細胞増殖を制御することを示した。これらの成果は感覚器のサイズの決定という形態形成における基本的な課題の理解に大きな前進をもたらし、国際的な総説も著わした。本研究では、魚類の感丘をモデルシステムとしてサイズ決定という形態制御に関わる細胞・分子機構の解明を行ったが、ここで明らかになった機構は脳のサイズの決定などにも当てはまる可能性があり、今後その普遍性が明らかになることが期待される。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. **Wada H**, Dambly-Chaudiere C, Kawakami K, Ghysen A. Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult fish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2013), in press.

2. **Wada H**, Ghysen A, Satou C, Higashijima S, Kawakami K, Hamaguchi A, Sakaizumi M. Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish. Dev. Biol.(2010),349, 583-594.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

総説(本)

Ghysen A, **Wada H**, Dambly-Chaudiere C. Patterning the Lateral Line in Teleosts: Evolution of Development. in "Flow Sensing in Air and Water - Behavioural, Neural and Engineering Principles of Operation." ed. by Bleckmann H, Mogdans J, Coombs S, Springer-Verlag. in press.