

UC Irvine

UC Irvine Previously Published Works

Title

Genetic interactions of cell intrinsic factors and secreted signals regulate neurogenesis in olfactory epithelium / 細胞固有因子と分泌シグナルが嗅上皮での神経発生を調節する遺伝的相互作用

Permalink

<https://escholarship.org/uc/item/6891p5gj>

Journal

Nihon Aji to Nioi Gakkai.: Journal for the Japanese Association for Study of Taste and Smell, 19(1)

ISSN

1340-4806

Authors

Muto, A
Shimako, K
Santos, R
[et al.](#)

Publication Date

2012

Copyright Information

This work is made available under the terms of a Creative Commons Attribution License, available at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Peer reviewed

総説特集Ⅱ：嗅覚系の発生・再生・加齢－4

細胞内因子と分泌シグナル因子の反作用による
嗅覚上皮神経発生の制御川内 紫真子¹⁾*・Rosaysela Santos¹⁾・Joon Kim²⁾・Kimberly Gokoffski¹⁾・
Hsiao-Huei Wu³⁾・Arthur D Lander^{4,5)}・Anne L Calof^{1,5)}¹⁾カリフォルニア大アーバイン校・医、²⁾KAIST・医科学、³⁾南カリフォルニア大・医、⁴⁾カリフォルニア大アーバイン校・理、⁵⁾カリフォルニア大アーバイン校・CCBS)

我々はこれまでに、TGF- β ファミリーの分泌因子である Gdf11 や Activin β B が嗅覚上皮の発生を負に制御することを見出した。さらに、転写因子 Foxg1 が TGF- β ファミリーの分泌因子 Gdf11 の活性制御を通じて嗅覚上皮の発生に関与することを、マウスの遺伝学的手法を用いて発見した。これらの結果は、Foxg1 とフォリスタチン (Fst) を介した、Gdf11 の「負のフィードバック機構」の適切な制御が、嗅覚上皮の層構造形成 (histogenesis) および鼻甲介形成 (morphogenesis) の両方に重要であるが、その制御機構には差異があることを示している。

キーワード：Gdf11、嗅覚上皮発生、Foxg1、フォリスタチン、負のフィードバック機構

はじめに

神経上皮における総細胞数の制御やパターンの決定は、神経発生の過程において最も興味深い現象の一つである。特に神経、脳ではそのサイズと形態が高次機能に反映することは明らかである。我々の研究室では、神経上皮の発生機構を理解するため、マウス (*mus musculus*) の嗅覚上皮をモデルシステムとして用いている。嗅覚上皮神経細胞は単純な細胞系譜を持ち、Sox2 を発現する幹細胞から、Neurogenin1 (Neurog1) を発現する神経前駆細胞 (Immediate Neuronal Precursor: INP) を経て、Ncam (Ncam1) を発現する神経細胞 (Olfactory Receptor Neuron: ORN) に最終分化する (図 1)。また、上皮の層状構造における細胞の位置により、大まかに細胞系譜を把握することができる¹⁾。近年になって、嗅覚上皮幹細胞は Sox2 発現と Mash1 (Ascl1) 発現との間を揺らいでいる状態にあるということも示されてきた²⁾。

我々はこれまでに嗅覚神経細胞の発生には TGF- β ファミリーの分泌因子が嗅覚上皮の発生を負に制御することを明らかにしてきた。さらに、Growth Differentiation Factor 11 (Gdf11) は INP の細胞分裂を阻害することで、また Activin β B は幹細胞の増殖を妨げることで、ORN の系譜発生をコントロールすることをノックアウトマウスや嗅覚神経上皮のプライマリーカルチャーの系を用いて示してきた^{2,3)}。

嗅覚神経上皮は、個体の一生を通して再生する稀な神経組織として知られている。ORN に代表されるマルチステージ (幹細胞 - 前駆細胞 - 分化細胞) から構成される細胞系譜に Gdf11 や Activin β B に代表される「負の制御因子 (Chalone: ケイロン)」が作用すると、再生の際にどのような効果が見られるかを数学的にシミュレーションする試みも行った⁴⁾。その結果、TA 細胞 (Transit Amplifying cell) に相当する INP の自己複製の確率を「負に制御」する因子 Gdf11 が存在すると、INP の増殖が爆発的に促進

Received March 16, 2012; Accepted April 9, 2012

Opposing actions of cell intrinsic factors and secreted signals regulate neurogenesis in olfactory epithelium.

*Shimako Kawauchi: Department of Anatomy and Neurobiology, University of California, Irvine School of Medicine, USA; skawauch@uci.edu; Fax: +1-949-824-1104

川内 紫真子・Rosaysela Santos・Joon Kim・Kimberly Gokoffski・Hsiao-Huei Wu・Arthur D Lander・Anne L Calof

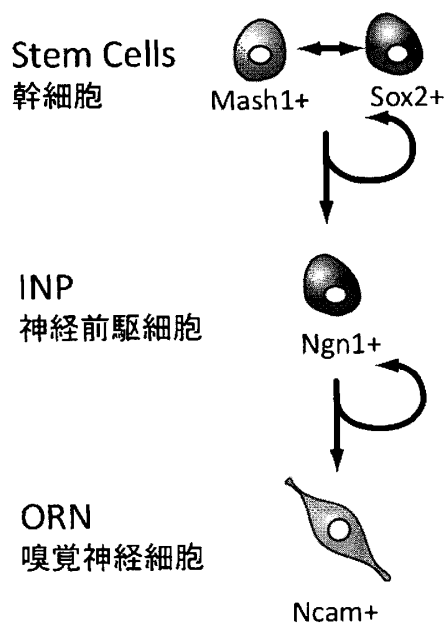


図1 嗅覚神経細胞の細胞系譜

幹細胞 (Stem Cell: Sox2/Mash1 を発現) から、神経前駆細胞 (INP: Ngn1 を発現) を経て、神経細胞 (ORN: Ncam を発現) に最終分化する。

され、ORN の総細胞数が一定値に達するまでの時間が短縮されること、そしてその後一定値が安定化することを見出した。この上に幹細胞を負に制御する別の制御因子 (Activin β B) が追加されると、システムはさらに安定化することも示唆された。

しかし、Gdf11, Activin β B をはじめとする TGF- β シグナリングの制御機構に関しては未解明の点が多い。TGF- β は細胞表面に存在する TGF- β レセプターに結合し、細胞内シグナリング分子 Smad2/3 をリン酸化することによってそのシグナル伝達を開始する。リン酸化された Smad2/3 は、Smad4 との複合体を形成し核へ移行する。この活性化 Smad 複合体は、他の転写因子とパートナーを組むことで様々な生物学的効果を制御し、細胞の状態に特異的な転写調節を行うと考えられている。近年、Fox ファミリーの一員である転写因子 Foxg1 は Smad3 に直接結合して、標的遺伝子のうちの一つである p21Cip1 の発現を抑制し、細胞周期の進行を阻害することが示された⁵⁾。これまでに、Foxg1 は前脳をはじめとする頭部感覚組織発生において重要な役割を果たすことが示されており⁶⁾、この発見により Foxg1 が嗅覚上皮を含む頭部神経組織特異的な TGF- β シグナ

リング制御の一旦を担っている可能性が考えられた。本稿では、これらの知見に基づいて、Foxg1 が嗅覚上皮において Gdf11 の活性を制御すると仮説を立て、マウス遺伝学を用いたアプローチを用い検証を行った研究について紹介する。

研究方法

1. マウスの作出

Gdf11^{tm2/+} マウスは C57/B6J マウス (Jackson labs, ME USA) と交配し維持した³⁾。*Foxg1^{Cre/+}* ノックインマウスは Swiss Webster マウス (Harlan, IN, USA) と交配し維持した⁶⁾。簡略化の為、以降それぞれを *Gdf11^{+/-}*、*Foxg1^{+/-}* と表記する。コンパウンド変異マウスを得る為、*Foxg1^{+/-};Gdf11^{+/-}* マウスを交配した。すべての動物実験はカリフォルニア大アーバイン校の動物実験委員会で審査、承認された方法を用いて行った。

2. in situ hybridization 実験

マウス胚の凍結切片を作成し、in situ hybridization を従来のプロトコールに従って行なった。cRNA プローブは 2.0 kb のマウス全長 *Fst* cDNA、391 bp のマウス *Ncam* cDNA、676bp のマウス *P21Cip1* cDNA のシーケンスを用いて合成した。実験方法の詳細については以前の報告⁸⁾ を参照していただきたい。

3. 嗅覚上皮プライマリーカルチャーと免疫染色

CD-1 マウス (Charles River, MA USA) を交配して得られた胚齢 14 日～15 日 (E14.5-15.5) の嗅覚上皮に Gdf11 を投与し、14 時間培養した²⁾。培養後、組織片を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定し、抗 P21Cip1 抗体 (Clone AB-6 [HJ-21]、Neomarker, CA, USA) を用いて免疫染色を行った⁸⁾。

Foxg1^{-/-} における嗅覚上皮発生異常

マウスの嗅覚上皮の発生は、E9.0 頃に特異化する嗅プラコードと呼ばれる神経上皮形成により開始する。E10.0 頃までには *Foxg1^{-/-}* (シングルノックアウト) マウスでは、この嗅プラコードの形成は認められるが、その後の嗅覚上皮の発生が著しく阻害されることがわかった。E11.5 までには細胞数の減少や細胞系譜マーカーの発現阻害が観察され、E13.5 までには、鼻甲介形成の完全な消失が観察された⁸⁾。

細胞内因子と分泌シグナル因子の反作用による嗅覚上皮神経発生の制御

Foxg1 と Gdf11 による P21Cip1 の発現制御

前脳神経細胞培養の系においては、TGF- β シグナルによって誘導されたサイクリン依存性キナーゼインヒビターである P21Cip1 の発現を、Foxg1 が阻害することが示されている⁵⁾。Gdf11 は TGF β レセプターを介してシグナルが伝達されるため、我々は Gdf11 が P21Cip1 の発現にどのように影響するかを調べる実験を行った。E13.5 の Gdf11^{-/-} の嗅覚上皮では、P21Cip1 の発現が、野生型に比べ顕著に阻害されることがわかった (図 2A)。逆に、嗅覚上皮の培養系に Gdf11 を導入すると、抗 P21Cip1 抗体によって検出されるシグナルがコントロールに比べて約 5 倍上昇した (図 2B)。このことから、P21Cip1 の発現は Gdf11 によるシグナリングに応答することが示された。また、E10.5 野生型では、P21Cip1 の発現は嗅プラコードの縁のみに認められるが、Foxg1^{-/-} ノックアウトマウスではその発現部位がプラコード全体に広がっていることが確認された (図 2C)。これらの実験より、Gdf11 と Foxg1 は互いに相反する方向への P21Cip1 の制御に関与していることが強く示唆された。

Foxg1^{-/-};Gdf11^{-/-} (ダブルノックアウト) マウスにおける嗅覚上皮発生の顕著な回復

嗅覚組織の発生ステージを追った Foxg1 と Gdf11 の詳細な発現解析を行った結果、両遺伝子は発生初期から嗅覚上皮で共に発現していることが解った⁷⁾。さらに、Foxg1 と Gdf11 の相互関係を遺伝学的に解析する為に、Foxg1^{-/-};Gdf11^{-/-} (ダブルノックアウト) マウスにおいて、その表現型を解析した。ダブルノックアウトマウスでは、Foxg1^{-/-} シングルノックアウトマウスで観察された表現型に比べ、顕著な回復が認められた (図 3)。興味深いことに、このマウスでは、上皮層構造形成 (histogenesis) はほぼ野生型レベルまで回復しているにも関わらず、鼻甲介形成 (morphogenesis) の回復は完全ではなかった。さらに、Foxg1^{-/-};Gdf11^{+/-} マウスではダブルノックアウトマウスに比べ、鼻甲介形成の回復が低レベルであったことから、Foxg1^{-/-} の Gdf11 ミューテーションによる表現型の回復は、Gdf11 の発現量依存적であることが示唆された。

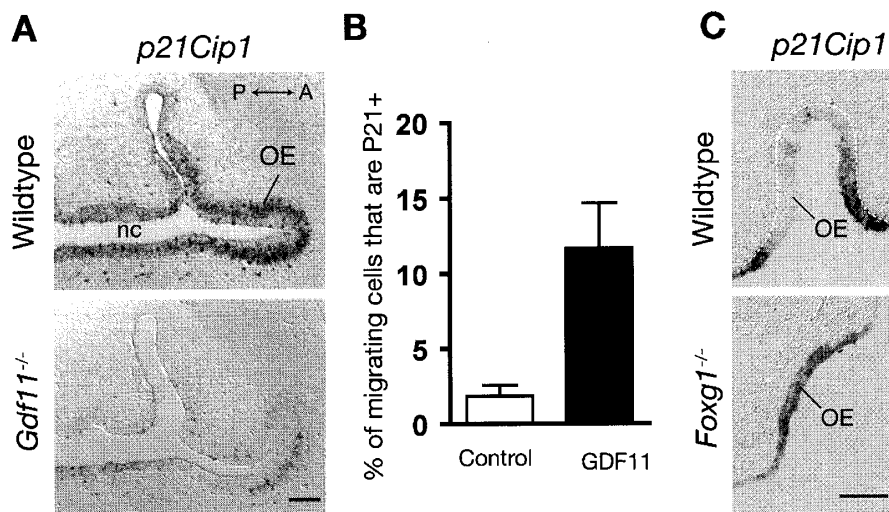


図 2 Foxg1 と Gdf11 による P21Cip1 の発現の制御

A: 野生型 (E13.5) では P21Cip1 の in situ hybridization シグナルは嗅覚神経細胞に認められるが、Gdf11^{-/-} では著しく阻害されていた。

B: 嗅覚上皮プライマリーカルチャーに Gdf11 を導入すると、P21Cip1 の発現が促進された。

C: 野生型 (E10.5) では P21Cip1 のシグナルは、嗅プラコードの縁に認められるが、Foxg1^{-/-} ではその発現部位がプラコード全体に拡大していた。nc: 鼻腔、OE: 嗅覚神経上皮、A-P: 前後軸、スケール: 100 μ m。(文献 8 より改変)

川内 紫真子・Rosaysela Santos・Joon Kim・Kimberly Gokoffski・Hsiao-Huei Wu・Arthur D Lander・Anne L Calof

Foxg1^{-/-}におけるフォリスタチンの発現減少

Gdf11のアンタゴニストであるフォリスタチン(Fst)は、Gdf11が嗅覚上皮で発現を開始するのと時期(E10.5以降)を同じくして上皮に近接する間充織に発現する。興味深いことに、Foxg1^{-/-}マウスではこのFstの発現がほぼ完全に消失していた(図4A)。またFoxg1^{-/-};Gdf11^{-/-}、Foxg1^{-/-};Gdf11^{+/-}両コンパウンドマウスにおいては、表現型の回復に伴い

Fstの発現も回復していた(図4B)。

まとめ

これらの実験により、Foxg1はGdf11のシグナル活性を抑制することによって、嗅覚上皮の発生を促進すると考えられた。そのメカニズムとしては、おそらくTGF-βのシグナリング分子Smadに依存したターゲット遺伝子転写抑制がその一旦を担っていると考えられる。実際、Gdf11^{-/-}では、TGF-βの代

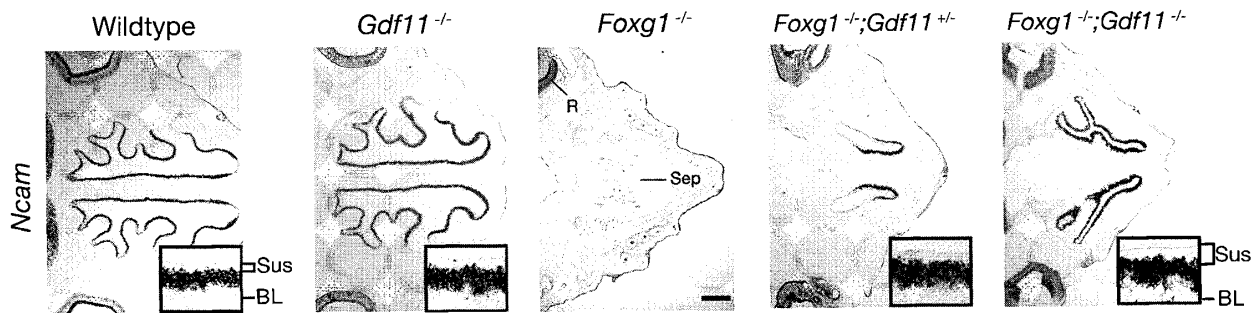


図3 Foxg1^{-/-} 嗅覚上皮表現型の Gdf11 変異導入による回復 (E16.5)

Ncamのin situ hybridizationシグナルは、嗅覚神経細胞に認められた。E16.5までにFoxg1^{-/-}の嗅覚上皮および鼻腔は完全に消失するが、Gdf11変異導入により、上皮層状構造はほぼ回復した。鼻甲介の回復はGdf11遺伝子量に依存していた。Sus: 支持細胞、BL: 基底ラミナ、スケール: 400 μm。(文献8より改変)

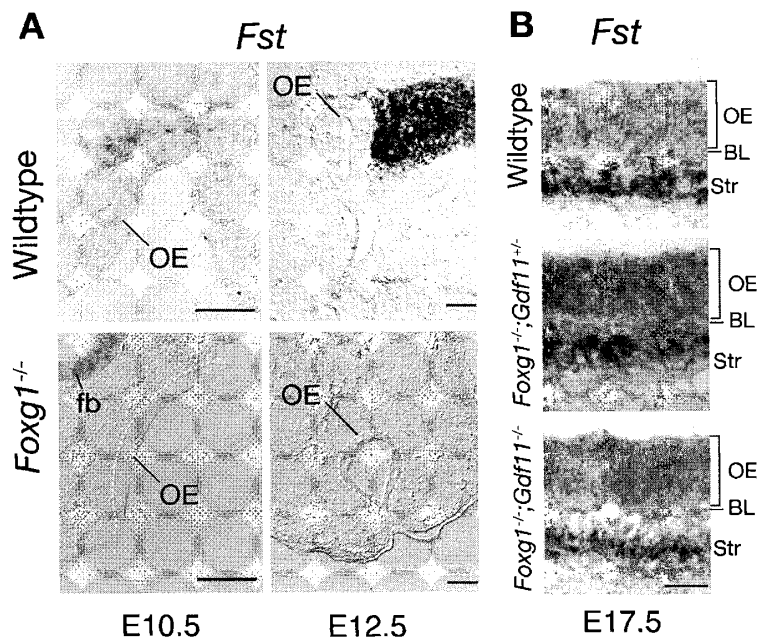


図4 Foxg1^{-/-}におけるFstの発現消失とGdf11変異導入による発現回復

Fstのin situ hybridizationは各遺伝型のマウス胚の凍結切片を用いて行った。A: Fstの発現は野生型の嗅覚上皮では隣接する間充織に認められるが、Foxg1^{-/-}胚では全く認められなかった。B: Fstの発現はGdf11変異導入による嗅覚上皮回復に伴い、間充織に認められた。OE: 嗅覚上皮、fb: 前脳。(文献8より改変)

細胞内因子と分泌シグナル因子の反作用による嗅覚上皮神経発生の制御

表的なターゲットである P21Cip1 の発現が失われることがわかった (図 2A)。さらに、Foxg1 は Gdf11 のアンタゴニストである Fst の発現を間接的に制御していることが示唆された (図 4A)。Foxg1^{-/-} の嗅覚上皮では、細胞内因子 (Smad) および細胞外因子 (Fst) を介した Gdf11 への抑制制御が両方とも消失してしまうため、Gdf11 の“負の制御機構”が増強され、結果的に上皮喪失という強い表現型を導くと考えられる (図 5)。

興味深いことに、Foxg1^{-/-} の表現型とは異なり、Fst^{-/-} マウスは嗅覚上皮の層構造形成のみに異常を示す⁸⁾。Foxg1;Gdf11 コンパウンド変異マウスでは、嗅覚上皮の層構造形成 (histogenesis) の回復が Fst の発現回復を伴って起こることから、Foxg1、Fst に

よる Gdf11 制御機構には差異があることが示唆された。ほ乳類は他の類と比べて比較的大きな鼻甲介を形成する。基本的な嗅覚上皮の層状構造はほぼ同一であるが、マウスをはじめとするげっ歯類、イヌ、クマなどの動物の鼻甲介は高度に入り組んだ構造をしており⁹⁾、進化の過程で、嗅覚の感度を増す為に嗅覚上皮の表面積を広げて対応してきたものと考えられる。Foxg1、Fst による Gdf11 制御の差異は組織形成の目的の違いと捉えることができる。つまり、嗅覚神経上皮の「morphogenesis」はより柔軟に環境への適応を行うために、「histogenesis」はより安定した嗅覚神経細胞数の確保 (ホメオスタシス) のために緻密に制御されていると考えることができる。

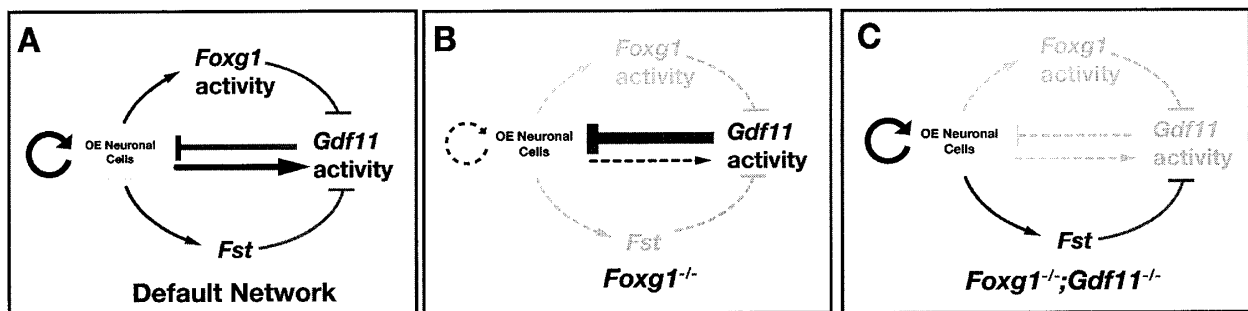


図5 Foxg1 と Gdf11 相互作用のモデル

A: 野生型の嗅覚上皮では、Foxg1、Gdf11 共に嗅覚上皮に発現する。Foxg1 は Gdf11 の活性を阻害する。また、Fst も発現し、Gdf11 のレセプターへの結合を阻害する。Gdf11 の負のフィードバック作用は二重に制御され、適切なバランスを保つと考えられる。

B: Foxg1^{-/-} マウスでは、Foxg1 が存在せず、また Fst の発現も阻害されるため、Gdf11 の活性が異常に上昇すると考えられる。

C: Foxg1;Gdf11 ダブルノックアウトマウスにおいては、Fst の発現が回復し、少なくとも組織層構造形成はほぼ完全にレスキューされる。

謝 辞

東北大学医学研究科の守田匡伸博士、UCI Dept of Dev.& Cell の武藤彰彦博士には的確なコメントをいただきましたことに感謝致します。本研究は、NIH グラント DC03583 [A.L.Calof]、GM076516 [A.D. Lander] による助成を受けた。

文 献

- 1) Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE and Calof AL: Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* 306, 309-316 (2005)
- 2) Gokoffski KK, Wu HH, Beites CL, Kim J, Kim EJ, Matzuk MM, Johnson JE, Lander AD and Calof AL: Activin and GDF11 collaborate in feedback control of neuroepithelial stem cell proliferation and fate. *Development*.138(19), 4131-4142 (2011)
- 3) Wu HH, Ivkovic S, Murray RC, Jaramillo S, Lyons KM, Johnson JE and Calof AL: Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron* 37, 197-207 (2003)
- 4) Lander AD, Gokoffski KK, Wan FY M, Nie Q and

川内 紫真子・Rosaysela Santos・Joon Kim・Kimberly Gokoffski・Hsiao-Huei Wu・Arthur D Lander・Anne L Calof

- Calof AL: Cell lineages and the logic of proliferative control. *PLoS Biol.* 7 (1): e1000015 (2009)
- 5) Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA and Massague J: Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211-223 (2004)
- 6) Xuan S, Baptista CA, Balas G, Tao W, Soares VC and Lai E: Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14, 1141-1152 (1995)
- 7) Hebert JM and McConnell SK: Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* 222, 296-306 (2000)
- 8) Kawauchi S, Kim J, Santos R, Wu HH, Lander AD and Calof AL: Foxg1 promotes olfactory neurogenesis by antagonizing Gdf11. *Development* 136 (9), 1453-1464 (2009)
- 9) Farbman AI: *In Cell Biology of Olfaction.* (Barlow PW, Bray D, Green PB and Alack JMW eds) Cambridge University Press, New York, pp.1-23 (1992)

<著者紹介>

川内 紫真子 (かわうち しまこ) 氏略歴

- 1994年 東北大学 農学部 農芸化学科 卒業
1996年 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス科修士 終了
2000年 筑波大学 医学部 基礎医学 博士 終了
2000年 ヒューマンフロンティア・サイエンスプログラム ポストドクトラルフェロー University of California, Irvine (UCI) , USA
2004年 NIH-UCI ガン研究ポストドクトラルフェロー , UCI, USA
2005年 Assistant Project Scientist, Dept. of Anatomy & Neurobiology, UCI, USA
2011年 Associate Project Scientist, Dept. of Anatomy & Neurobiology, UCI, USA

