

平成 30 年 9 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10782

研究課題名(和文) 嗅上皮形態形成の機構解明並びに嗅覚機能との結びつき

研究課題名(英文) Role of cellular arrangement in the olfactory epithelium

研究代表者

勝沼 紗矢香 (Katsunuma, Sayaka)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80457043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、嗅上皮における嗅細胞と支持細胞の配列形成機序を接着分子の観点から明らかにした。嗅細胞は支持細胞に囲まれて互いに接することなく配列しているが、その配列機序は不明であった。申請者は、嗅細胞と支持細胞が自ら再配列運動して規則的な細胞配列を形成する過程を観察し、両細胞が異なるサブタイプの接着分子ネクチンとカドヘリンを特徴的な組み合わせで発現していることを示した。さらに、マウスを用いた組織学的実験と、数理モデルおよび培養細胞実験での検証を組み合わせ、これら接着分子が、嗅細胞と支持細胞間に見える3種類の細胞境界の接着力を調整することで、嗅上皮の特徴的な細胞配列が完成することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the olfactory epithelium, olfactory cells (OCs) and supporting cells (SCs) are arranged in a characteristic mosaic pattern, where OCs are separated each other and surrounded by SCs. The cellular pattern is established by cellular rearrangement during development. However, the mechanisms underlying this cellular rearrangement was unclear. In the olfactory epithelium, OCs express nectin-2 and N-cadherin, and SCs express nectin-3 and E-cadherin. Heterophilic trans-interaction between nectin-2 on OCs and nectin-3 on SCs recruits N-cadherin via alpha-catenin to the heterotypic junctions, and differential distribution of cadherins between junctions promote cellular intercalations, resulting in the formation of the mosaic pattern. These results suggest the possibility that synergistic action of nectins and cadherins contributes to various complex cellular patterning, which cannot be achieved by a single mechanism.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅上皮 接着分子

1. 研究開始当初の背景

感覚上皮は、機能の異なる感覚細胞と支持細胞の2種類の細胞から構成され、感覚細胞は支持細胞に囲まれて互いに接することなく並んでいる。しかし、感覚上皮において機能の異なる細胞が規則正しく配列することの機能的な意義のみならず、細胞が規則正しく並ぶためのメカニズムすらほとんど明らかにされていない。本研究の連携研究者は、マウス内耳の聴覚上皮の細胞配列には接着分子ネクチンの働きが必須であることを明らかにしていた (Togashi, et al. 2011)。そこで申請者は、嗅上皮においても内耳と同様のメカニズムが働いていると想定して研究をすすめたところ、マウス嗅上皮において嗅細胞 (感覚細胞) と支持細胞が異なるサブタイプの接着分子ネクチンとカドヘリンを特徴的なパターンで発現することがわかった。また、嗅細胞と支持細胞が発生過程において自ら再配列運動することで規則的な細胞パターンを形成すること、さらに接着分子ネクチンをロックアウト (KO) したマウスや、カドヘリンの細胞内領域に結合する分子である N-カテニンを KO したマウスの嗅上皮では、本来接することのない嗅細胞が接したままで分離できないという細胞パターンの異常が観察された。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究から、マウス嗅上皮の嗅細胞と支持細胞は異なる接着分子を特徴的なパターンで発現していること、嗅細胞と支持細胞は再配列運動によって細胞パターンを形成しており、その再配列運動に接着分子が関与していることを明らかにしてきた。しかし、嗅上皮の特徴的な細胞パターンが形成される分子機構は明らかでない。本研究では、嗅上皮で発現している接着分子の働きに着目し、特徴的な細胞パターンが形成される分子機構を解明することを目的とした。また、感覚上皮において機能の異なる細胞が規則正しく配列することの機能的な意義は分かっていない。そこで、感覚上皮の細胞配列に異常をきたしているネクチン KO マウスの感覚機能を測定し、感覚上皮の細胞配列が感覚受容を担うメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 嗅上皮形態形成における接着分子の働きを明らかにする目的で、接着分子ネクチンとカドヘリンによる嗅上皮の細胞パターン形成機構に着目し研究をすすめる。これまでの申請者による研究結果から、ネクチンとカドヘリンによる選択的な細胞間接着が嗅上皮の細胞配列を制御している可能性を想定し、マウス嗅上皮組織培養を用いた細胞パターン変化の観察、KO マウスを用いた組織レベルの実験と、得られた実験結果をもとにした数理モデルによる検討、および培養

細胞を用いた細胞選別実験による検討、を組み合わせて、嗅上皮の形態形成機構を統合的に解明した。

(2) 感覚上皮の細胞パターンが感覚受容を担うメカニズムを明らかにする目的で、感覚上皮の細胞パターンに異常をきたしているネクチン KO マウスの聴覚を、聴性脳幹反応及び耳音響反射で測定した。

4. 研究成果

(1) マウス嗅上皮組織培養を用いた細胞パターン変化の観察
 嗅上皮の細胞配列形成過程を、胎生マウス嗅上皮を用いてライブイメージングを行い観察した。細胞境界にあまねく発現している接着分子 ZO-1 を蛍光識別した遺伝子改変マウスを用いた。同マウス嗅上皮を摘出して培養環境におき、72 時間タイムラプス動画を撮影した。その結果、はじめ接着していた嗅細胞の間に隣接する支持細胞が割り込み、それにより嗅細胞が離れ、割り込んだ支持細胞が新たな接着を形成する様子が観察された (図 1)。この結果は、細胞再配列運動が嗅上皮の細胞配列形成に必要であることを直接示している。またここから、接着した嗅細胞が離れる過程では、嗅細胞と嗅細胞間の境界 (O-O) が短くなり、それに伴って嗅細胞と隣接する支持細胞間の境界 (O-S) が延長し、最終的に新たな支持細胞境界 (S-S) が形成されて、嗅細胞が離れることがわかった。

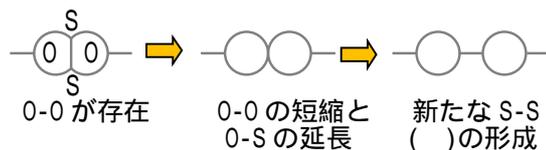


図 1. マウス嗅上皮発生過程における嗅細胞 (O) と支持細胞 (S) の配列変化 (模式図)。

KO マウスを用いた組織レベルの実験
 これまでの申請者の研究で、嗅上皮の嗅細胞にはネクチン-2 と N-カドヘリンが、支持細胞にはネクチン-2、-3 と E-カドヘリンが発現しており、ネクチン-2 または-3 遺伝子を KO したマウスの嗅上皮では、本来接することのない嗅細胞が接したままであるという細胞パターンの異常が観察されていた。しかし異常な嗅細胞の頻度は嗅細胞全体の 3 割以下であった。ネクチンはカドヘリンと協調して細胞間接着の形成に働く。また、これら分子が協調するためにはカドヘリンの細胞内領域に結合する分子 カテニンが重要である。そこで、嗅上皮の細胞配列形成にもネクチンとカドヘリンが協調して働くことを想定し、カテニンのサブタイプの一つである N-カテニン KO マウスの嗅上皮を観察したところ、ネクチン KO マウスと同様の配列異常 (接着したままの嗅細胞がみられる) がより高い

頻度で観察された。これらの結果は、ネクチンとカドヘリンが協調的に嗅上皮の細胞パターン形成に働いていることを示唆していた。そこで、 β -カテニンを以て観察された、3種類の細胞境界(0-0、0-S、S-S)の変化を踏まえて、各細胞境界における接着分子の集積、および、接着力の変化を観察した。発生過程におけるマウス嗅上皮をネクチン-2、ネクチン-3、N-カドヘリン、E-カドヘリン、 β -カテニン、E-カテニン、 γ -カテニンに対する抗体で蛍光免疫染色し、0-0、0-S、S-Sにおける輝度を測定し、得られた輝度値を経時的に比較した。ある細胞境界における β -カテニンの濃縮の程度は、その細胞境界における、接着分子による接着力の総和を示すと考えられる。嗅細胞が接している胎生初期の段階では、 β -カテニンはS-Sにのみ強く集積していたが、発生がすすむにつれて、0-SにもS-Sと同程度に強く集積するようになり、嗅細胞が離れたあとでは0-Sにおける β -カテニンの集積は低下していた。発生過程を通して β -カテニンは常にS-Sに強く濃縮していた(図2)。以上の結果から、0-Sの接着力がS-Sのそれと同等まで上昇することが、0-0の離れる過程において重要であると仮定できる。また、0-Sにおける β -カテニンの濃縮が上昇する時期に合致して、ネクチン-2、ネクチン-3、とN-カドヘリンの0-Sでの濃縮が上昇していた。ネクチンははじめ細胞間で結合した後、同部位にカドヘリン-カテニン複合体をリクルートすることで細胞間接着を完成させることが知られている。このことから、0-Sにおいて嗅細胞のネクチン-2と支持細胞のネクチン-3が相互作用し、同部位にN-カドヘリンを集積することで0-Sの接着力が上昇し、その結果嗅細胞が分離すると考えられた。この仮定を検証するため、 β -カテニン KO マウス嗅上皮の発生過程で、細胞境界における β -カテニンの濃縮程度を観察した。同マウスの0-Sにおける β -カテニンの濃縮は発生過程を通じて常に低いままであり(図2)、0-Sにおける接着力の上昇が嗅細胞の分離に必要であると考えられた。

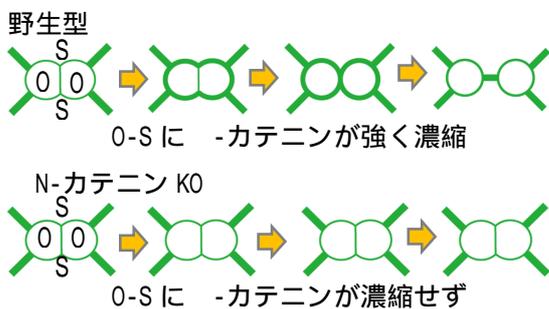


図2. マウス嗅上皮発生過程での、細胞境界における β -カテニンの濃縮の変化。S, 支持細胞; O, 嗅細胞。太い・細い緑のライン, β -カテニンの強い・弱い濃縮。

数理モデルを用いた細胞配列形成機構の

検討。

の結果は、2種類の細胞でつくられる上皮では、これら細胞でできる3種類の細胞境界の接着力が変化することで、細胞配列形成運動が生じることを示している。そこで、パテックスモデルを用いた力学シミュレーションを行い、これを検証した。二次元平面に、嗅細胞(O)または支持細胞(S)とみだた2種類の多角形を敷き詰めた。この2種類の多角形でできる3種類の細胞境界に、 β -カテニンの濃縮を以て得られたマウス嗅上皮細胞境界における接着力の比と同等の接着力を各々インプットして、細胞配列に変化が生じるか検討した。野生型を以てはめたシミュレーションでは、はじめ隣接していた多角形Oは分離し、分離したOの間に多角形S同士の新たな境界面があらわれた。一方で、 β -カテニン KO マウスを以てはめたシミュレーションでは、隣接する多角形Oは分離しなかった。このように、今回の力学シミュレーションで得られた結果は、 β -カテニンを以て得られたマウス嗅上皮の観察と同等の結果といえた。以上より、接着した嗅細胞が離れる過程において、0-Sにおける接着力の上昇が重要であることが明らかとなった。

培養細胞による細胞選別実験を用いた細胞配列形成機構の検討。

前述のように、0-Sにおいて嗅細胞のネクチン-2と支持細胞のネクチン-3が相互作用し、同部位にN-カドヘリンを集積することで0-Sの接着力が上昇し、その結果嗅細胞が分離すると考えられた。そこで、ネクチンとカドヘリンの組み合わせの相互作用によって細胞境界の接着力が変化するのか、またそれにより細胞配列が形成するのかわ、培養細胞を用いた実験で検証した。まず、ネクチンとカドヘリンの相互作用を検討した。ネクチン-2及びネクチン-3は、同じサブタイプ同士、つまりネクチン-2同士、またはネクチン-3同士の間に弱い同種親和性結合能を持つが、異なるサブタイプ同士、すなわちネクチン-2と-3の異種親和性結合能のほうが同種のそれよるはるかに強い。HEK293細胞に、ネクチン-2または-3をそれぞれ強制発現させた細胞を作成し混合培養すると、両細胞境界には β -カテニンが強く集積し、両細胞は互い違いになる配列を形成した。また、細胞内の蛋白結合領域を欠損させたネクチン-2または-3をそれぞれ強制発現させて混合培養したところ、両細胞境界に β -カテニンは集積せず、細胞の配列形成もみられなかった。さらに、カドヘリン欠損株である neuro-2a に、ネクチンを強制発現させても細胞配列形成は生じなかった。以上より、細胞境界におけるネクチンの親和性結合が同境界にカドヘリン・カテニン複合体をリクルートすることで細胞境界の接着力をうみだして、細胞配列を形成することがわかった。続いて、ネクチンとカドヘリンの特徴的な組み合わせの発現が嗅上皮の配列を形成するのか、HEK293細胞を用

いて検証した。嗅細胞のモデルとして、ネクチン-2とN-カドヘリンを発現させた細胞を、支持細胞のモデルとしてネクチン-3とE-カドヘリンを発現させた細胞を作成した。両者を混合培養したところ、嗅細胞モデルは単離し、一方支持細胞モデルは嗅細胞モデルを囲むとともに、支持細胞モデル同士は隣接するといった細胞配列を形成した。この配列は嗅上皮の細胞配列パターンと同等といえる。また、嗅細胞モデルと支持細胞モデルの境界および支持細胞モデル同士の境界では、カテニンが強く同程度に濃縮し、これも野生型のマウス嗅上皮の配列形成過程と同等といえた。

以上より、嗅細胞と支持細胞は異なるサブタイプのネクチンとカドヘリンを特徴的な組合せで発現しており、嗅細胞に発現するネクチン-2と支持細胞に発現するネクチン-3が両細胞境界で異種親和性に強く結合し、同境界にN-カドヘリンを多くリクルートすることで、同境界の接着力が上昇し、その結果接着した嗅細胞間への支持細胞の割りこみが生じて特徴的な細胞配列が形成されることを明らかにした (Katsunuma, et al. 2016)。

得られた成果の位置づけと今後の展望
本研究では、嗅上皮における嗅細胞と支持細胞の配列形成メカニズムを接着分子の観点から明らかにした。これまで個々の細胞を結びつける細胞間の接着メカニズムについては詳細が明らかにされてきたが、細胞同士が組織内で相互に認識してパターンを作り出す過程はほとんど不明であった。また、*in vitro* でみられる細胞選別現象を個体レベルで検証した例はほとんどない。本研究では、嗅上皮と同様の接着分子の発現環境を *in vitro* でモデル化して再現し、細胞の振る舞いを観察することで、組織における細胞パターンと接着分子の働きを細胞レベルで検証できた。その結果、異なる種類の接着分子ネクチンとカドヘリンが協調することが明らかになった。両者は協調して、2種類の細胞でできる3種類の細胞間境界の接着力を繊細かつ厳密に調整することで特徴的な細胞配列を完成させていた。今回、異なる種類の接着分子の協調を明らかにしたことにより、形態形成では数多く存在する接着分子の様々な組み合わせで、細胞間接着力をコントロールして複雑な細胞配列が形成される可能性を示せたといえる。形態形成を理解する上で普遍性が高くかつ新しい機序を提唱できたと考える。今回は、上皮頂端面側という二次元といえる部位での細胞配列形成機序を示したが、今後三次元の細胞配列形成機序に拡張することで、試験管内での組織再生に必要な条件を提示し再生医療に貢献したい。また本研究では、細胞境界の接着力の変化が細胞配列に結びつくことを明らかにしたが、接着分子による細胞間接着力がどのように細胞骨格を変化

させて配列を完成させるのかは分かっていない。今後、接着分子と細胞骨格の相互作用とその制御機構を明らかにすることが課題である。

(2)ネクチン-3K0 マウス聴覚上皮では、有毛細胞(感覚細胞)同士が接するという細胞配列異常がみられる(Togashi, et al. 2011)。このK0マウスの聴力を聴性脳幹反応及び耳音響反射で測定したところ、中等度の難聴であった(未発表)。同K0マウス生後の聴覚上皮を観察したところ、成長とともに接したままの有毛細胞が脱落していることがわかった(未発表)。

得られた成果の位置づけと今後の展望
感覚上皮の細胞配列規則性は、進化上、下等な生物から保存されており、感覚機能に必須と考えられるが、感覚上皮の細胞配列と機能に着目した研究はほとんどみられない。ネクチンK0マウス聴覚上皮において、異常に接した有毛細胞が脱落し、機能が損失する原因は、有毛細胞の異常な配列にあると考えられる。一般に、有毛細胞は傷害を受けやすく様々な原因で失われる一方、支持細胞の多くは傷害を受けずに残るがその理由は明らかでない。これらのことから、申請者は、支持細胞が有毛細胞を取り囲む特徴的な細胞配列が、有毛細胞の維持と機能に關与しているという着想を得た。今後、聴覚上皮の特徴的な細胞配列が、支持細胞の働きを通してどのように有毛細胞の維持及びきこえに結びついているかを明らかにし、聴覚受容機構を新たな視点から解明するとともに、有毛細胞保護の新戦略を提供したい。

引用文献

Togashi H, et al. Nectins establish a checkerboard-like cellular pattern in the auditory epithelium. *Science*. 333(6046):1144-7, 2011. DOI: 10.1126/science.1208467.

Katsunuma S, et al. Synergistic action of nectins and cadherins generates the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. *J. Cell Biol.* 212(5):561-75, 2016. DOI: 10.1083/jcb.201509020.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

て〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Togashi H, and Katsunuma S. Cellular recognition and patterning in sensory systems. *Exp Cell Res*. 査読有. Vol. 358, Issue 1, 2017, Page 52-57. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.04.005.

2. Katsunuma S, Honda H, Shinoda T,

Ishimoto Y, Miyata T, Kiyonari H, Abe T, Nibu K, Takai Y, Togashi H. Synergistic action of nectins and cadherins generates the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. J. Cell Biol. 査読有. Vol. 212, Issue 5, 2016, Page 561-75. DOI: 10.1083/jcb.201509020

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 勝沼紗矢香. 嗅上皮の細胞の並び方を形成するネクチンとカドヘリンの協調的な働き. 第16回日本再生医療学会 シンポジウム15「気道の再生医療」, 2017.3.8, 仙台国際センター(宮城県).招待講演.
2. 勝沼紗矢香, 丹生健一. 嗅上皮の細胞の並び方を形成するネクチンとカドヘリンの協調的な働き.第55回日本鼻科学会総会・学術講演会, 2016.10.14, 栃木県総合文化センター(栃木県).
3. Katsunuma S, Honda H, Nibu K, and Togashi H. Synergistic action of nectins and cadherins establish the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), 2016.06.06, パシフィコ横浜(東京都).
4. Katsunuma S, Togashi H, and Nibu K. Synergistic action of nectins and cadherins establishes the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2015.12.03, 一橋大学一橋講堂(東京都).
5. Katsunuma S, Honda H, and Togashi H. Synergistic action of nectins and cadherins establish the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. The 26th CDB Meeting, 2015.09.08, 理研CDB(兵庫県).
6. 勝沼紗矢香, 富樫英, 丹生健一. 嗅上皮の細胞の並び方を形成するネクチンとカドヘリンの協調的な働き. 第33回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会, 2015.08.29, グランヴィア大阪(大阪府).

〔その他〕

受賞歴

Katsunuma S, Honda H, Nibu K, and Togashi H. Synergistic action of nectins and cadherins establish the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. The

17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), 2016. Young Investigator Award 受賞.

ホームページ

神戸大学研究ニュース 2016年2月29日

http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_02_29_01.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝沼 紗矢香 (KATSUNUMA, Sayaka)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号: 80457043

(3)連携研究者

富樫 英 (TOGASHI, Hideru)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90415240