

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16153

研究課題名(和文) 平面内細胞極性の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms underlying the maintenance of planar cell polarity

研究代表者

新田 昌輝 (Arata, Masaki)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・特任助教

研究者番号：50829900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵管上皮組織の多繊毛細胞は、卵巣-子宮方向に繊毛を動かし卵を子宮へ輸送する。このような器官の軸に沿って発達する上皮細胞の極性(平面内細胞極性)は器官の機能に必須であるが、絶えず細胞の入れ替わりが起こる上皮組織で平面内細胞極性が維持される仕組みは不明である。本研究ではマウス卵管上皮組織を題材とし、組織に新たに供給された細胞(新生細胞)が多繊毛細胞への分化過程で平面内細胞極性を獲得することを明らかにした。さらに、新生細胞が隣接細胞の向きを読み取ることで自らの向きと器官の向きとを一致させる仮説を検証するとともに、一細胞遺伝子発現解析から、新生細胞が平面内細胞極性を獲得する分子機構の解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生過程における平面内細胞極性の形成機構はショウジョウバエ翅をモデル系として研究が進んできた。しかし、ショウジョウバエ翅の上皮細胞は羽化直後に死滅するため平面内細胞極性の維持機構の研究には適していない。新たに生まれた細胞がいかんして自らの向きと大きく成長した器官の向きとをすり合わせ、器官全体で細胞の向きが揃った状態が維持されるのか、その機構は未解明のままである。本研究では平面内細胞極性が成体でも維持されるマウスの卵管上皮組織に着目することで、この問題を解決する基盤となる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Planar cell polarity (PCP) is the coordinated alignment of cellular polarity in the plane of epithelial tissues, which is exemplified by unidirectional ciliary movements of multiciliated cells (MCCs) in the oviduct. Although PCP is essential for functions of organs, mechanisms of how PCP is maintained in matured organs are still unclear.

In the mouse oviduct epithelium, cellular turnover occurs throughout life. We found that proliferated oviduct epithelial cells acquired PCP as they differentiated to MCCs. We hypothesized that differentiating cells establish PCP by reading orientations of adjacent cells, and verified this hypothesis. Furthermore, to identify genes that regulate the acquisition of PCP during MCC differentiation, gene expressions were analyzed by single cell RNA-sequencing. We focused on genes whose expression levels changed during MCC differentiation, and prepared to investigate roles of those genes in the maintenance of PCP.

研究分野：発生生物学

キーワード：平面内細胞極性 マウス 卵管 恒常性維持

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵管の上皮組織を構成する多繊毛細胞は、卵巣-子宮方向に繊毛を動かし卵を子宮へと輸送する(図1)。このような器官の軸に沿って上皮細胞が発達させる平面内細胞極性(planar cell polarity; PCP)は、気管や脳室など様々な器官の機能を支えている。上皮組織は外界からの様々な刺激にさらされており、ダメージを受けた上皮細胞は組織から排除され、幹細胞から新たに細胞が供給されることにより、上皮組織の恒常性が維持される(Messier and Leblond, Am J Anat., 1960)。このような細胞の入れ替わりは発生期に確立されたPCPの攪乱を招く可能性があるが、正常な上皮組織ではそのような問題は生じない。上皮組織に新たに供給された未分化な細胞(新生細胞)がどのようにして、器官の軸に沿った極性を発達させ、上皮組織のPCPが維持されるか、その機構は明らかにされていない(図1)。

発生過程においてPCPは、core PCPタンパク質群が細胞境界上で一方向的に偏って局在することにより形成される。Core PCPタンパク質群は7回膜貫通型カドヘリン分子Celsr1や4回膜貫通型タンパク質Vangl2を含む進化的に保存された分子群である。これらcore PCPタンパク質の機能が損なわれると、例えばマウスの卵管では繊毛運動の方向が卵巣-子宮軸に沿わなくなり、卵の輸送といった器官の機能が阻害される(Shi et al., Development, 2014)。

マウスの卵管上皮組織では生後2日目の段階でcore PCPタンパク質が卵巣-子宮軸に垂直な細胞境界に偏って局在し、その後成体でも維持される(Shi et al., Development, 2014)。卵管の上皮組織には幹細胞が存在し(Ghosh et al., Development, 2017)細胞の入れ替わりが生じることが示されている(Roberson et al., Dev Dyn., 2020)。このことから、PCPが確立した組織に供給された細胞がcore PCPタンパク質の卵巣-子宮軸に沿った偏りを獲得することによりPCPが維持されると考えられるが、新生細胞がPCPを獲得する過程でのcore PCPタンパク質の量や局在の変化やその制御機構は明らかにされていない。

Core PCPタンパク質の偏りの方向と器官の軸との一致には、分泌性因子の濃度勾配、液流や外力といった器官の軸の情報をコードするグローバル因子が寄与することが報告されている。グローバル因子の多くはまだ器官が小さい発生過程で一過的に機能し、その後core PCPタンパク質の偏った局在が組織の成長過程でも維持されることにより、組織全体で細胞の向きが揃った状態が確立される。しかし、成体の卵管では新生細胞が極性を獲得する際に、液流、力や非古典的Wnt分子の濃度勾配といったグローバル因子が機能する可能性は低い。ウズラの卵管の一部を切除し卵巣-子宮の向きを逆転させて縫合しても、上皮細胞の極性が再配向しないことが報告されており、また、成長した器官では器官全体に及ぶWnt分子の濃度勾配を形成・維持することは難しいと推測されるためである。別の可能性としては、新生細胞がPCPを確立した隣接細胞の向きを読み取ることが考えられるが、検証されていない。

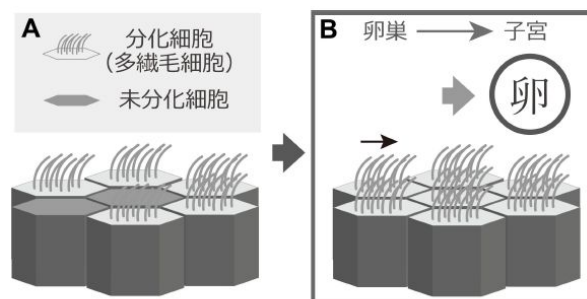


図1. 卵管上皮組織の平面内細胞極性の恒常性
繊毛は卵巣-子宮方向に動き(→)、卵を輸送する。平面内細胞極性が確立した卵管に供給された未分化な細胞(A)は、どのようにして器官の軸に沿った平面内細胞極性を獲得するのか(B)?

2. 研究の目的

本研究ではPCPが維持されるメカニズムを理解するため、新生細胞が器官の軸に沿った極性を獲得する分子機構の解明を目指す。具体的には、新生細胞がPCPを獲得する過程でのcore PCPタンパク質の量や局在の変化を明らかにし、その制御を担う分子の同定を目指す。さらに、新生細胞がPCPを確立した隣接細胞の向きを読み取り、器官の向きと自らの向きとを一致させる仮説を検証する。

3. 研究の方法

本研究では個体の一生を通じて細胞が入れ替わるマウスの卵管上皮組織を題材として、PCP維持機構を解析した。マウス卵管の上皮組織は主に分泌細胞と多繊毛細胞から構成され、分泌細胞が分裂し多繊毛細胞に分化する。Core PCPタンパク質の細胞境界上の量は分泌細胞では少ないのに対し、多繊毛細胞では量が多く偏りも顕著である。そこでまず、多繊毛細胞への分化過程でのcore PCPタンパク質の量や局在の変化を免疫染色により解析した。さらに、損傷させた卵管においてcore PCPタンパク質の偏った局在がどこからどのように再生するか解析することで、前述の仮説の検証を進めた。

新生細胞が多繊毛細胞へ分化する過程でcore PCPタンパク質の量や局在の変化を制御する分子を同定するため、多繊毛細胞の分化過程における遺伝子発現プロファイルの変化をsingle cell RNA-sequencing (scRNAseq)により1細胞レベルで解析した。このデータを用いて、多繊毛細胞が分化する際にcore PCPタンパク質の量や局在の変化と相関して発現量が変化する遺

伝子を絞り込んだ。さらに卵管由来の培養細胞株で、core PCP タンパク質の量や局在に影響を与える分子をスクリーニングする実験系の準備を進めた。

4. 研究成果

(1) 多繊毛細胞の分化過程は、繊毛の基部構造である基底小体の細胞内分布から type - の5つのステージに分類される。卵管上皮組織の免疫染色から、core PCP タンパク質 Celsr1 の細胞境界上の量は、基底小体がアピカル面へと移行する type 以降のステージから増加することを見出した。このことは未分化な細胞はもともと PCP を持たず、多繊毛細胞へ分化する過程で PCP が確立されることを示している。さらに、分泌細胞と多繊毛細胞の境界部で、Celsr1 の細胞境界上での量が多い傾向が見いだされたことから、多繊毛細胞が周囲の細胞に向きの情報を伝達している可能性が考えられた。

この可能性を検証するために卵管に損傷を与えて、core PCP タンパク質の偏った局在がどこからどのように再生するかを調べることにした。もし、新生細胞が隣接細胞の極性を読み取るのであれば、傷の縁から中央にむかって core PCP タンパク質の偏った局在が漸次的に再生することが期待された。卵管を逆作用ピンセットでつまんで損傷を与えると、損傷部位で細胞増殖が亢進し、その後、多繊毛細胞と分泌細胞からなる上皮組織が再構築された。損傷部位はマウスに持続的に EdU を投与することで可視化した。EdU はチミジンアナログであり細胞分裂で新たに組織に供給された細胞の DNA 中に取り込まれる。この実験系で core PCP タンパク質 Vangl2 の細胞境界上の局在の変化を免疫染色により経時的に解析した。損傷後 4 日目では損傷部位で Vangl2 の細胞境界上の局在に顕著な偏りは検出されなかったが、損傷後 7 日目以降、卵巣-子宮軸に沿って偏った Vangl2 の局在が徐々に回復することを見出した。これらのデータは損傷部位に対する各細胞の位置と各細胞における Vangl2 の局在とを関連付けて、定量的に評価する手法を開発することで得られたものである。次に損傷部位を卵巣子宮軸に沿って 8 つの領域に区分し、損傷後の各ステージ間で領域ごとの Vangl2 の偏りの強さを比較した。しかし、町域ごとに Vangl2 の偏りの強さのばらつきが大きく、Vangl2 の偏った局在が損傷部位の端から再生するか否かは明確に結論が出せなかった。この解析では損傷修復の進行の個体差がデータのばらつきを生む要因であると推測された。そこで、ライブイメージングにより一細胞の損傷修復過程を経時的に観察することで、新生細胞が隣接細胞の極性を読み取る仮説の検証を進めることにした。

先行研究では腹側部に imaging window を設置したマウスで雌性生殖器の生体内イメージングが行われており、卵巣表層の同一視野を数日間にわたり撮影できること、そしてがん細胞の移動を数分間隔の時間分解能で観察できることが報告されていた (Bochner et al., Sci Rep., 2015)。この先行研究を参考にして、マウスの卵管上皮組織を生体内観察する実験系(以下卵管 IVM; intravital microscopy)を構築した。卵管 IVM ではマウスを長期間に麻酔下に置き、外科的に体外へ露出させた卵管を 3D プリンターで成型したイメージングウィンドウ内に入れて観察する。マウスは自作の保定装置に置き、麻酔をかけた状態で正立型の共焦点顕微鏡 (CSU-X1+ORCA-Fusion) によりイメージングを行う。卵管の上皮組織の大部分は卵管の内腔面に存在するが、卵管の卵巣側の末端部では上皮組織が露出しており、上皮組織の撮像が可能である。EGFP を付加した Vangl2 (Vangl2:EGFP) を発現するマウスの卵管上皮組織を卵管 IVM で観察したところ、細胞境界上で偏った局在をしていると推測される Vangl2:EGFP のシグナルや細胞内部の小胞状のシグナルが撮像された。さらに、脂溶性の蛍光色素である DiD を先端に付着させた逆作用ピンセットで卵管をつまむことにより、損傷部位を可視化した状態で Vangl2:EGFP のシグナルを観察できた。これまでに 12 時間程度の経時観察に成功しており、イメージングによる卵管上皮組織へのダメージも検出されていない。現在細胞境界を可視化できるマウスを導入しており、今後卵管 IVM で Vangl2:EGFP の細胞境界上偏った局在が損傷部位のどこからどのように回復するか解析を進める予定である。また、ライブイメージングと並行して、遺伝学的な手法を用いた解析を進めている。具体的には *Celsr1^{fllox/fllox}* マウスの卵管に Cre を導入し、*Celsr1* を欠損する変異細胞集団を卵管上皮組織で作成することを予定している。変異細胞集団の周囲の新生細胞で core PCP タンパク質の局在が異常になれば、隣接細胞の極性の読みとりが PCP の維持に必要であると解釈できる。

(2) (1) の結果から多繊毛細胞の分化過程で core PCP タンパク質の量や局在が変化することが明らかになった。さらに、EGFP を付加した core PCP タンパク質 Vangl2 を分泌細胞で強制発現しても細胞境界上に分布しないことから、多繊毛細胞への分化過程で core PCP タンパク質の細胞境界上の量や局在を制御する機構が変化すると推測された。そこで、多繊毛細胞への分化過程で core PCP タンパク質の量や局在の変化を制御する分子を同定するために、多繊毛細胞の分化過程における遺伝子発現プロファイルの変化を single cell RNA-seq (scRNAseq) により 1 細胞レベルで解析した。その結果、分泌細胞と、分化過程の多繊毛細胞、そして、成熟した多繊毛細胞に相当する細胞が検出され、多繊毛細胞の分化過程で発現量が変動する遺伝子を同定することができた。しかし、検出された 1 細胞当たりの遺伝子の総数が少なく、その後のスクリーニングには不十分だと考えた。そこでより多くの遺伝子を検出するために、分化過程の細胞を集めて、あるいは分化過程の細胞が多い組織で RNA-sequencing を行うことを着想した。分化過程

の細胞を集めることは技術的な問題から断念し、(1)で記したように、卵管を損傷させ人為的に新生細胞を増やした条件で今後の解析を進めることとした。また、Celsr1にEGFPを付加したCelsr1:EGFPを恒常的に発現する培養細胞株で、外来遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンし、Celsr1:EGFPの細胞境界上の量や局在を定量的に評価する実験系を準備した。この実験系を用いることで、新生細胞がPCPを獲得する過程で発現量が変動する遺伝子の中からcore PCPタンパク質の細胞境界上の量や局在を制御する遺伝子を同定できると期待される。最終的には同定した遺伝子の機能を生体内でも解析する予定である。

さらにscRNAseqの解析では分泌細胞が遺伝子発現の異なる複数の群に分類できることを見出した。分泌細胞は卵管上皮組織の幹細胞であることが示唆されているが、幹細胞としてふるまうのが分泌細胞全体か、あるいは一部かは明らかにされていない。近年の研究から分泌細胞に発がん性変異を導入すると、増殖が亢進する場合と、亢進しない場合があると報告されており、分泌細胞は性質の異なる複数の細胞種から構成されると議論されている(Zeng et al., bioRxiv, 2022)。しかし、それぞれの細胞種を区別できるマーカーは同定されておらず、卵管上皮組織の幹細胞は同定されていない状況にある。そこで、本研究で見出した分泌細胞の各分類群で特異的に発現する遺伝子を利用し、体細胞組み換えによる細胞系譜の解析から幹細胞の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Usami Fumiko Matsukawa, Arata Masaki, Shi Dongbo, Oka Sanae, Higuchi Yoko, Tissir Fadel, Takeichi Masatoshi, Fujimori Toshihiko	4. 巻 134
2. 論文標題 Intercellular and intracellular cilia orientation is coordinated by CELSR1 and CAMSAP3 in oviduct multi-ciliated cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.257006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masaki Arata, Fumiko Matsukawa Usami, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Single-cell profiling of mouse oviduct epithelial cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Arata, Fumiko Usami, Toshihiko Fujimori
2. 発表標題 Mechanisms Underlying the Maintenance of Planar Cell Polarity
3. 学会等名 The 66th NIBB Conference / ABiS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Arata, Kaoru Sugimura, Tadashi Uemura
2. 発表標題 Difference in Dachsous Levels between Migrating Cells Coordinates the Direction of Collective Cell Migration
3. 学会等名 The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 新田昌輝、藤森俊彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 8
3. 書名 実践 卵管学、1章、Celsr1による卵管機能の制御	

1. 著者名 宇佐美文子、新田昌輝、藤森俊彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 10
3. 書名 生殖生理 5章 受精卵の移送と卵管内環境	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------