

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460240

研究課題名(和文) 器官形成時の組織の伸長と癒合を制御するDlg1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Dlg1 in the extension and fusion of developing tissues.

研究代表者

向後 晶子 (Kogo, Akiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20340242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DLG1は、細胞内で各種蛋白質を細胞膜近傍に係留する足場として働く足場蛋白質である。Dlg1遺伝子欠損マウスは、様々な器官に発生異常をきたす。そこで、発生途上の器官におけるDLG1の機能を明らかにするため、心臓流出路と内耳コルチ器の発生過程を検証した。その結果、DLG1欠損マウスの心臓では、将来の肺動脈・大動脈となる総動脈幹の伸長が不十分であり、二次心臓領域と呼ばれる心臓外領域の細胞移動能の異常が示唆された。またコルチ器では、組織の伸長に伴う細胞間接着面の再編成とそれに伴う細胞の並び替えの異常が見られた。以上の結果から、DLG1は、組織の伸長に必要な細胞運動を制御することが判明した。

研究成果の概要(英文)：DLG1 is a scaffolding protein that anchors various proteins near the plasma membrane. Null mutant mice for Dlg1 gene exhibits congenital defects in many organs. To clarify the function of DLG1 protein, developmental process was examined in the outflow tract of the heart and the organ of Corti in the inner ear, whose developments are impaired in the mutant. In the development of outflow tract, lengthening of the truncus arteriosus was not enough in the mutant. This result implicates defects in the cell migration process from the second heart field to the nascent outflow tract region. In the organ of Corti, loss of function of the DLG1 protein caused abnormal patterns in cell-cell junction remodeling and rearrangement of epithelial cells during the tissue elongation. These results showed that DLG1 regulates cell motility which is necessary for the tissue extension.

研究分野：発生学

キーワード：心臓 コルチ器 収斂伸長 細胞運動 DLG1 細胞間ジャンクション 発生

1. 研究開始当初の背景

DLG1 は、蛋白質間の相互作用を担う PDZ ドメインをもち、細胞内で各種蛋白質を細胞膜近傍に係留する足場として働く「足場蛋白質」である。DLG1 は、神経細胞シナプスでの膜受容体の局在、上皮細胞の極性形成や細胞間接着などに関わることが報告されている。私はこれまでに、Dlg1 遺伝子欠損(KO)マウスでは、多くの器官形成に異常がみられ、その多くは組織の伸長と組織間の癒合現象の異常に起因していることを報告してきたが、これらの発生過程における Dlg1 の作用機序は不明であった[1]。一方で、研究開始までの時期に、Dlg1 遺伝子欠損マウスにみられる複数の器官形態異常が、平面内極性(PCP)シグナル因子の欠損マウスで生じるという報告が見られるようになった。例えば、Dlg1 遺伝子欠損マウスの約 70~90%の個体で生じる心室中隔欠損と心臓流出路異常は、PCP シグナル因子の欠損によっても生じ、これは二次心臓領域と呼ばれる心臓外領域の細胞が流出路部分に移動してくる過程が阻害され、発生期の心臓流出路が十分な長さをもたないことによって引き起こされると報告された[2]。また、Dlg1 遺伝子欠損マウスの内耳では、コルチ器(聴覚上皮)が十分に伸長せず、本来 4 列幅で並ぶはずの有毛細胞が所々で 5 列以上の幅になるという異常を呈する。この異常についても、PCP シグナル因子欠損マウスで発症することから、この表現型は PCP シグナルが制御する収斂伸長現象の異常であると認識されるようになった[3]。以上の知見から、器官形成における DLG1 の機能が、PCP シグナル系と機能的に関連しているのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

器官形成における DLG1 の機能を、PCP シグナル系との関係に着目して解析するために本研究を実施した。本研究では、心臓流出路と内耳コルチ器を解析対象とした。心臓流出路については、DLG1 欠損による異常がどのようなメカニズムで生じるのか、すなわち、PCP 因子欠損マウスと同様に、二次心臓領域の異常によるのかどうかを検証することを目的とした。また、Dlg1 遺伝子欠損マウスのコルチ器の異常については、収斂伸長異常によると云えるのか、また DLG1 が本来、コルチ器の収斂伸長でどのような機能を果たしているのか、そしてそれが PCP シグナル系の機能とどのように関連しているのかを明らかにすることを目的とした。さらに、コルチ器の収斂伸長における DLG1 の機能を検証するためには、正常な収斂伸長過程がどのように進行するかという情報が不可欠であるが、これについてはいまだに不明な点が多いことから、正常マウスコルチ器の収斂伸長過程、および同時期に起こる発生現象についての基礎的なデータを収集することも本研究の目的の一つとした。

3. 研究の方法

(1) 心臓流出路発生異常の解析

P0-Cre/EGFP トランスジェニックマウスと Dlg1 遺伝子欠損マウス(ヘテロ接合体)の交配を繰り返して、Dlg1 遺伝子を欠損し、かつ神経堤由来細胞が EGFP 標識されるマウスを作出して、E9.5 から E18.5 にかけての心臓流出路の形成過程と心臓神経堤細胞の分布を正常マウスと比較した。

(2) 内耳コルチ器発生異常の解析

収斂伸長異常であることの検証: マウス胎仔を BrdU でパルスラベルし、Dlg1 遺伝子欠損マウス内耳の聴覚上皮細胞増殖の亢進の有無を検証した。E18.5 胎仔内耳コルチ器を phalloidin で染色して有毛細胞を可視化し、有毛細胞の総数を正常マウスと Dlg1 遺伝子欠損マウスで比較した。

正常マウス聴覚上皮発生初期の有毛細胞同定法の確立: DLG1 の機能を評価するためには、正常発生での組織構築過程を基準とする必要がある。しかし、聴覚上皮の収斂伸長と、細胞の分化過程とが、どのように同時進行するか、特に各細胞が組織内でどのような挙動を示すのか、詳細は不明であった。そこで、発生初期、分化直後の支持細胞と有毛細胞を識別するため、聴覚上皮細胞の非筋肉型ミオシン II(NMII)C の発現様式に着目し、E16.5 および E17.5 のコルチ器で NMII C 蛍光抗体染色を行って、とくにコルチ器頂部付近の未成熟な感覚上皮における発現パターンを詳細に検証した。

Dlg1 遺伝子欠損マウス聴覚上皮の発生における細胞間ジャンクション再編成の解析: 有毛細胞と支持細胞の配置は発生途上で動的に変化し、最終的には非常に整ったモザイクパターンを形成する。Dlg1 遺伝子欠損マウスで、有毛細胞の過剰列が出現している場所では、このパターンが乱れている。この乱れを定量的に検証するため、正常マウスおよび Dlg1 遺伝子欠損マウスの聴覚上皮を NMII C 抗体および phalloidin を用いて蛍光染色し、発生時の支持細胞間のジャンクションの形状変化を解析した。

正常マウス聴覚上皮発生初期の有毛細胞の動態解析: 聴覚上皮の収斂伸長運動パターンが、有毛細胞、支持細胞の分化、出現とどのように相関しているのかを検証するため、発生ごく初期の有毛細胞の挙動を解析した。

4. 研究成果

(1) Dlg1 遺伝子欠損マウスにおける心臓流出路形成不全

Dlg1 遺伝子欠損マウス E9.5 の心臓流出路は、野生型マウスよりも短かった。蛍光標識神経堤細胞を実体顕微鏡で観察した限りでは、心臓流出路の中隔を形成する心臓神経堤細胞

の侵入時期と流出路内のおおまかな分布に異常は見られなかったが、組織切片を観察したところ、Dlgl1 遺伝子欠損マウスでは流出路における神経堤由来細胞の分布が正常マウスに比べて疎である傾向が見られた。一方、DLG1 抗体による染色の結果、DLG1 標識は心臓流出路を形成する細胞で広く検出されたが、神経堤細胞よりも周囲の二次心臓領域由来の細胞でより強いシグナルが認められた。これらの結果より、心臓流出路形成においては、DLG1 は心臓流出路を形成する二次心臓領域細胞の流出路領域への移動に関与することが示唆された。

(2) Dlgl1 遺伝子欠損マウスにおけるコルチ器収斂伸長異常

Dlgl1 遺伝子欠損マウスにおける有毛細胞過剰列の出現が、細胞分裂の亢進によるものかどうかを検証するために BrdU 取り込み実験を行ったが、Dlgl1 遺伝子欠損マウスで細胞増殖の亢進は認められず、また有毛細胞総数も増加せず、むしろ有意に減少していた。このことから、有毛細胞過剰列の出現は、有毛細胞の増加によるものではなく、細胞配置の異常、すなわち収斂伸長現象に異常によるものであると判明した。

また、有毛細胞同定のために、聴覚上皮細胞における NMII 蛋白質の発現パターンを詳しく調べた。NMII は、聴覚上皮細胞の辺縁部の、細胞膜から少し離れたところで点線状に分布しており、この染色は、有毛細胞ではその発生段階とともに減弱していくことが示された。有毛細胞では phalloidin の染色が周囲の支持細胞に比べて増強していることが知られており、phalloidin と NMII C の二重線画をすることで、より早期の有毛細胞を同定することが可能になった。この方法を用いて、コルチ器発生期の支持細胞間のジャンクションの形状変化を解析した。その結果、E17.5 の野生型マウスコルチ器の支持細胞間のジャンクションの長さや角度は、コルチ器頂部ではばらつきが大きい、中央よりやや基底部寄りの領域では、完成したモザイクパターンに合致して角度・長さともに顕著に収斂していた。これに対し、Dlgl1 遺伝子欠損マウスではコルチ器全長にわたってこのような収斂が見られず、支持細胞間ジャンクションの長さ、角度はばらつきが大きいままであり、細胞間接着面の退縮や伸長によるリモデリングの調節に異常が生じていることが判明した。このことは、DLG1 が、細胞間ジャンクションの再編成に関わってコルチ器の組織構築に寄与することを示しているが、そのメカニズムの解明にはまだ至っていない。

最後に、正常マウスにおける聴覚上皮収斂伸長過程の細胞動態を知るため、発生期の有毛細胞の分布パターンを調べたところ、未分化な感覚上皮では、はじめ細胞核は基底部周辺に集まっているが、内有毛細胞が分化して同定されるようになった後、外有毛細胞領

域の辺縁部に近いごく一部の細胞の核が上層に移動しはじめ、これらが外有毛細胞として同定されるようになるため、外有毛細胞は主に聴覚上皮の辺縁部に近い領域から出現してくることが判明した。これまで、有毛細胞マーカーである MyosinVI の発現は、外有毛細胞の内側列の細胞から出現するというデータが示されていたものの、聴覚上皮細胞の運命決定と細胞分化が、いつ、どこで起こるのか、詳細な解析結果は得られていなかった。今回、NMII C 発現及び細胞核の位置から同定された有毛細胞が辺縁部で検出された時期は MyosinVI 陽性となるより早い段階であった。外有毛細胞の細胞核の上層への移動と、その後の MyosinVI 発現が、聴覚上皮の別の場所で開始することの意義は不明だが、発生初期の聴覚上皮細胞の運命決定と組織構築の関係を知らうえで大変興味深い。

上記一連の実験結果は、DLG1 が、心臓流出路およびコルチ器の器官形成期の細胞運動に関与していることが示されたため、この結果は国内学会および原著論文として発表した [4]。しかし、正常マウスのコルチ器の組織構築過程についてもいまだに詳細な発生メカニズムが解明されていない状況のため、DLG1 の機能の正確な評価には至っていない。今後のさらなる検証が必要である。

<引用文献>

- Iizuka-Kogo, A., et al., Abnormal development of urogenital organs in Dlgl1-deficient mice. Development, 2007. 134(9): p. 1799-807.
Sinha, T., et al., Disheveled mediated planar cell polarity signaling is required in the second heart field lineage for outflow tract morphogenesis. Dev Biol, 2012. 370(1): p. 135-44.
Fritsch, B., et al., Dissecting the molecular basis of organ of Corti development: Where are we now? Hear Res, 2011. 276(1-2): p. 16-26.
Iizuka-Kogo, A., et al., Requirement of DLG1 for cardiovascular development and tissue elongation during cochlear, enteric, and skeletal development: possible role in convergent extension. PLoS One, 2015. 10(4): p. e0123965.

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)

[雑誌論文](計 1 件)

- Iizuka-Kogo A, Senda T, Akiyama T, Shimomura A, Nomura R, Hasegawa Y, Yamamura K, Kogo H, Sawai N, Matsuzaki T. Requirement of DLG1 for cardiovascular development and tissue

elongation during cochlear, enteric, and skeletal development: possible role in convergent extension. *PLoS One*. (査読有) 2015 Apr 10;10(4):e0123965. doi: 10.1371/journal.pone.0123965. PMID: 25860837; PMCID: PMC4393223.

〔学会発表〕(計 5 件)

2016.3.29 向後晶子:第 121 回日本解剖学会全国学術集会(福島県・福島市)マウスコルチ器の組織形成における細胞間ジャンクションの再編成
2015.12.3 向後晶子:第 38 回分子生物学会年会(兵庫県・神戸市)Dlg1 遺伝子 KO マウス発生過程における内耳聴覚上皮の cell junction remodeling 異常
2015.3.22 向後晶子:第 120 回日本解剖学会全国学術集会(兵庫県・神戸市)コルチ器の伸長における予定感覚上皮の形態学的解析
2014.11.27 向後晶子:第 37 回分子生物学会年会(神奈川県・横浜市)Convergent extension によるコルチ器の伸長と Dlg1 の機能
2014.3.28 向後晶子:日本解剖学会(栃木県・下野市)Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスにおける心臓奇形の発症機構

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

向後 晶子(KOGO, Akiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号:20340242

(2)研究分担者

向後 寛(KOGO, Hiroshi)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号:20282387

松崎 利行(MATSUZAKI, Toshiyuki)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号:30334113

野村 隆士(NOMURA, Ryuji)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号:20325161

下村 敦司(SHIMOMURA, Atsushi)
北海道医療大学・リハビリテーション科学部・教授
研究者番号:50340237

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

根本 奏子(NEMOTO, Kanako)
今井 愛理(IMAI, Airi)