

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592491

研究課題名(和文) 発生期内耳有毛細胞の形態形成に関する研究

研究課題名(英文) Morphological regulation of the developmental inner ear hair cells by non-muscle myosin II

研究代表者

坂口 博史 (Sakaguchi, Hirofumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00515223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：非筋II型ミオシン(NMII)は、細胞の骨格を形作るアクチンと呼ばれる線維状の構造を収縮して細胞の形を制御する分子である。NMIIは筋細胞では複合体を形成し、アクチンと交互に配列してサルコメアと呼ばれる構造を形成し収縮力を発揮することが知られているが、上皮細胞において収縮力を発揮する仕組みは不明であった。本研究において、聴覚を受容する内耳の上皮組織では、NMIIは細胞頂側に存在する細胞間結合に沿って分布し、同部において筋細胞におけるサルコメア構造と類似した構造を形成し、収縮力を発揮することが示された。

研究成果の概要(英文)：Non-muscle myosin II (NMII) is known to regulate cell shapes through the contraction of actin filaments, major components of the cytoskeleton. In muscle cells, NMII is known to form a complex which aligned alternately with actin filaments and to provide force by contracting this "sarcomere" structure. On the other hand, the mechanism for providing NMII-based contraction force in the epithelial cells is still unclear. In this research, we demonstrated that NMII localized to the apical cell junction in the inner ear sensory epithelia, forming sarcomeric structures with the apical actin ring to provide string-like contraction force to the apical surface of the cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 ミオシン 上皮細胞 有毛細胞 蝸牛 聴覚 サルコメア 頂側結合

## 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は人口比5%にも達する頻度の高い疾患でありながら、有効な治療はごく限られており、根本的な治療は皆無である。感音難聴の治療に新たなブレークスルーを得るためには、聴覚受容器の構造と機能に関する本質的な理解が必要不可欠である。本研究は、聴覚の成立に必須である有毛細胞の特異な細胞形態を制御するメカニズムに着目し、その分子機構に関する基盤を与えることを目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 発生期有毛細胞の形態変化

発生期の有毛細胞形態の経時的変化を観察し、形態の定量化を行う。収集したデータの解析から形態変化を定量化し、後に行う機能実験の評価基準を確立する。

### (2) 形態変化に伴う分子局在の変化

細胞形態変化に関与する因子を組織学的に検討する。我々はとりわけ細胞間相互作用に注目した。相互作用の主体は頂側の細胞間結合部位で生じることになる。同部で力学的影響を与える分子として、ミオシン分子とアクチン分子が考えられる。これらの分子がどのような機序で細胞形態を制御するか解析する。

### (3) 分子の機能阻害による形態変化

非筋II型ミオシンは細胞骨格を構成するアクチン線維に介在して収縮力を与え、細胞形態の変化を引き起こすことが知られている。非筋II型ミオシンの収縮力が有毛細胞-支持細胞間の相互作用の駆動力となり、特徴的な細胞形態の維持にかかわると考えて非筋II型ミオシン活性を特異的に阻害、もしくは阻害後に再度活性を回復させて細胞形態維持に与える影響を調べる。

(4) アクトミオシン複合体の分子組成非筋II型ミオシンと複合体を形成する分子としてアクチン、アクチニンが知られており、これらの分子がどのような構造を形成して収縮力を発揮するのか、生理的条件下ならびに非

筋II型ミオシン阻害下における分子局在を調べることで検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 発生期有毛細胞の形態変化

発生期(胎生後期から生後早期)のマウス蝸牛組織を用いて、有毛細胞の頂側面の輪郭が一般的な上皮細胞と同様の多角形から円形へと変化する過程を解析した。

方法として、蝸牛から感覚上皮を摘出、抗ZO-1抗体で染色して細胞の輪郭を描出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて水平断面を観察した。

### (2) 形態変化に関わる分子の局在解析

細胞間相互作用に関与すると予想される非筋II型ミオシンの3種類のアイソフォームについて免疫組織化学を行い、発生期における細胞内局在を観察した。さらに、非筋II型ミオシンと複合体を形成する可能性があるアクチン、アクチニンについても蛍光標識で局在を確認した。また、非筋II型ミオシンが細胞の最頂側からどの程度の深度まで分布するかについても調べた。

### (3) 非筋II型ミオシンの阻害実験

マウス蝸牛感覚上皮の器官培養系を用いてミオシンの機能阻害を行い、細胞頂側面の形態に与える影響を調べた。すなわち、生後早期の蝸牛感覚上皮を摘出して培養し、ミオシンの阻害剤であるプレビスタチン、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤であるML-7、ROCK阻害剤のY27632等を培養液中に添加して一定時間培養した後に固定、形態変化を定量的に解析した。

### (4) アクトミオシン複合体の分子構造

上述の非筋II型ミオシン、アクチン、アクチニンについて、それぞれの配置から細胞の収縮力を発揮するための複合体構造の全容について解析した。さらに、非筋II型ミオシンが、筋細胞に見られるサルコメア構造と同様に双極性フィラメントを形成している可能性

について、分子の二重標識を行なって検証した。

(5) 非筋II型ミオシンアイソフォーム間相互の機能的代償

非筋II型ミオシンの特定のアイソフォームを欠失したモデルマウスを用いて、聴覚に対する影響を調べた。さらにモデルマウスにおいて他のアイソフォームの発現がどのように変化するかを検証した。

(6) 消化管上皮細胞との比較

内耳以外に消化管上皮細胞を用いて非筋II型ミオシンの細胞内局在を確認し、内耳上皮細胞との違いについて検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 胎生後期から生後内耳有毛細胞の形態

胎生 16 日から生後 8 日までの各発達段階における有毛細胞の経時的形態変化を観察した。胎生期には多くの有毛細胞において頂側面が上皮細胞に普遍的な多角形を呈していたが、生後 2 日では外有毛細胞のほとんどが特有の円形に変化していた。次に生後 4 日目から蝸牛軸方向で陥凹したハート型に変化する細胞が認められるようになった。このような形態変化は蝸牛の基底回転で早期に始まり、蝸牛頂に近いほど遅く現れることが判明した。丸型からハート型への変化を定量的に算出したところ、基底回転では生後 4 日目、頂回転では生後 6 日目から顕著になることが判明した。以上より、基底回転から頂回転での各部位での細胞形態変化の違いが明らかになり、また生後 2 日目に円形へと変化することが有毛細胞の特徴的な形態形成のきっかけとなる重要な変化であることが示唆された。

(2) 免疫染色により非筋 II 型ミオシンの 3 種のサブタイプ (IIA, IIB, IIC) のうち、IIA はほとんど発現が認められず、逆に IIB と IIC は内耳感覚上皮に高発現することが分かった。これらの非筋 II 型ミオシンは頂側

結合に沿う周期的な点として分布し、この非筋 II 型ミオシンの点状局在はアクチンや  $\alpha$ -アクチニンと交互に配置することが分かった。このことから、非筋 II 型ミオシンは上皮細胞の頂側結合においても重合体を形成し、細胞頂側に存在するアクチン環と結合して筋細胞におけるサルコメアに類似した構造 (上皮系サルコメア) をとることが示唆された。また、細胞の頂側から基底側までの各断面における局在を観察すると、非筋 II 型ミオシンはタイト結合周囲から接着帯に至る深度まで存在することが分かった。

(3) 生後 2 日目の内耳コルチ器を組織培養し、プレビスタチンによって非筋 II 型ミオシン活性を 1 時間阻害すると、有毛細胞、支持細胞の頂側面輪郭の周囲長と面積が増大し、また有毛細胞の輪郭に見られる特徴的な円形性が損なわれることが判明した。さらに、非筋 II 型ミオシン阻害により形態が変化したコルチ器を、再び阻害剤を除いた培養液中で 2 時間培養すると、正常な形態に回復することが確認された。このことから、非筋 II 型ミオシンは蝸牛有毛細胞ならびに支持細胞の形態およびサイズを動的に制御していることが判明した。さらに、ROCK 阻害剤である Y27632 を用いると、プレビスタチンに比べて軽度ながら同様の効果が得られるが、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤である ML-7 では異なる細胞形態変化が見られたことから、有毛細胞における非筋 II 型ミオシンの活性は ROCK を介した経路で主に制御されている可能性が示唆された。

(4) 頂側結合に沿って点状に分布する非筋 II 型ミオシンとアクチン、 $\alpha$ -アクチニンの二重染色の画像解析から、それぞれの局在を定量化したところ、非筋 II 型ミオシンはアクチン、 $\alpha$ -アクチニンのいずれとも交互に配列していることが確認された。また、個々の非筋 II 型ミオシンの点状集積部位において、ミオシン重鎖の C 末端と N 末端を別の蛍光で

標識したところ、個々の点はC末端を中央に、N末端を中央に配置していることが判明した。すなわち、筋細胞サルコメアと同様にII型ミオシンは頭部を両端に持ち、尾部を中心に配置した双極性フィラメントを形成していることが判明し、上皮系サルコメア構造の存在が裏付けられた。さらに、プレビスタチンにより非筋II型ミオシン活性を阻害すると、互いに隣接する非筋II型ミオシン集積部の間隔が延長し、その程度は細胞周囲長の増大の程度に一致していた。このことから、上皮系サルコメアは筋細胞のサルコメアと同様の機構で頂側アクチン環を収縮しうることが推測された。

(5) 非筋II型ミオシンのうちIIC型のアイソフォームを欠失したマウスでは、有毛細胞の形態に変化は見られず、聴力も正常であった。他のアイソフォームによる代償の可能性が考えられたため、免疫組織化学により確認したところ、正常マウスにおいて発現がほとんど見られなかったIIAのアイソフォームが、IICアイソフォームを欠失したマウスの蝸牛では高発現しており、またNMII Bの発現も増加していた。すなわち、非筋II型ミオシンの各アイソフォームは一定の機能的代償を担う可能性が示唆された。また、コルチ器の中で有毛細胞と支持細胞がモザイク状に混在する部分においては、有毛細胞でIIBが優位に、ダイテルス細胞(支持細胞)ではIICが優位に発現していることが判明した。一方で、均一な細胞(内溝細胞)で構成される部位では、各細胞にIIBとIICのアイソフォームが同程度に発現していた。このことから、各アイソフォーム発現の細胞特異性が、異なる細胞形態の形成に寄与している可能性が示唆された。

(6) 上述のような頂側結合における上皮系サルコメア構造は、胃、小腸、大腸の上皮細胞でも認められた。このことから、上皮系サルコメア構造は上皮細胞に普遍的な構造で

あることが示唆された。さらに興味深いことに、隣接する細胞間では、それぞれの上皮系サルコメアの各ユニットは多くの場合、頂側結合を挟んで対称的に分布していた。このことから、上皮系サルコメアは隣接する細胞同士で細胞間接着分子等を介してリンクしており、組織構築の改変において隣接する細胞が協調して変化することを可能にしていると考えられた。

以上の成果は複数の国内、国外の学会で報告され、また英文誌に論文として掲載された。上皮系サルコメア構造の存在と機能が明らかになったことで、内耳有毛細胞の形態形成に関わる新たな分子機構の一端が解明された。また、非筋II型ミオシンによる細胞形態制御が可塑的であることが示されたことは、非筋II型ミオシンが内耳障害における細胞形態と機能の自律的回復に関わる可能性を示唆しており、今後の内耳障害に対する新たなアプローチの1つとして注目されると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1) Ebrahim S, Fujita T, Millis BA, Kozin E, Ma X, Kawamoto S, Baird MA, Davidson M, Yonemura S, Hisa Y, Conti MA, Adelstein RS, Sakaguchi H, Kachar B. NMII forms a contractile transcellular sarcomeric network to regulate apical cell junctions and tissue geometry. *Curr Biol*. 23 731-6, 2013 (corresponding author) (査読あり)

2) 藤田 朋己, 坂口 博史, 米村 重信, 久育男. 発生期蝸牛有毛細胞の形態変化とmyosin IIの関与. *耳鼻咽喉科ニューロサイエンス*27: 19-21. 2013 (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 坂口博史, 藤田朋己, 足立直子, 神谷透, 中村高志, 瀧正勝, 兵庫美砂子, 鈴木敏弘, 米村重信, 久育男. II 型ミオシンによる有毛細胞形態の制御機構. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会 2012, 新潟

2) Sakaguchi H. From Bench to Clinic: Next Generation in Otology. Dynamic Regulation of the Apical Hair Cell Structures. The 14th Japan-Korea Joint Meeting of ORL-HS. 2012 年, 京都 (シンポジウム)

3) 坂口博史. 内耳発生・再生に関する基礎研究. 内耳感覚上皮細胞の形態形成-ミオシンによる動的制御に関して-. 第 22 回日本耳科学会. 2012 年, 名古屋 (シンポジウム)

4) Sakaguchi H. Molecular Mechanism of the Dynamic Morphological Regulation in Hair Cells. The 20th IFOS Congress. 2013 年, ソウル (シンポジウム)

5) Fujita T, Sakaguchi H, Yonemura Y, Hisa Y. The morphological change of Reticular Lamina by ROCK inhibitor ”、36th Association for Research in Otolaryngology (ARO) Midwinter Meeting、2013 年, ボルチモア

6) Fujita T, Sakaguchi H, Yonemura S, Hisa Y. “ The morphological change of Reticular Lamina by three myosin II inhibitors.” 36th Association for Research in Otolaryngology (ARO) Midwinter Meeting、2014 年, サンディエゴ

〔その他〕

ホームページ

京都府立医科大学耳鼻咽喉科/研究/内耳研究グループ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/ent/research.html>

6 . 研究組織

研究代表者

坂口 博史 (SAKAGUCHI, Hirofumi)

京都府立医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室 准教授

研究者番号 : 00515223