

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291054

研究課題名(和文) PCP因子による卵管上皮における多階層をつなぐ極性形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms controlling the multilevel polarity formation in the mouse oviduct

研究代表者

藤森 俊彦 (FUJIMORI, Toshihiko)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類の卵管上皮細胞においては、一方向へ運動する多繊毛を有し、上皮細胞は卵管の長軸に平行に伸長しており、一層の上皮シートが卵管長軸に平行にひだを形成している。これらの現象は、上皮細胞が平面内細胞極性(PCP)を有していることを示唆しており、細胞内の極性から組織の形態までを制御している可能性が考えられた。本研究課題においては、細胞内の極性から、細胞の形態、組織の形態という階層をつなぐ極性を制御する機構の解明をPCP因子の機能解析を中心に進めた。

研究成果の概要(英文)：Ovulated oocytes are transported in oviducts by unidirectional motility of multi-cilia and the resultant secretory fluid flow from ovary to uterus. The mammalian oviduct is highly polarized, where the epithelium forms longitudinal folds along the ovary-uterus axis, epithelial cells are elongated along the axis, and the epithelial multicilia beat towards the uterus to transport the ovulated ova. These cellular orientations in the oviduct are reflecting planar cell polarity (PCP). We studied mechanisms of the multilevel polarity formation process in the mouse oviduct by focusing on the function of PCP factors.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：マウス 卵管 細胞極性

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の卵管は、卵巣から排卵された卵を子宮へと送るだけでなく、その中で受精も行われ生殖・発生に必須の器官である。申請者らはマウス卵管に関して基礎的な観察から開始し、卵管上皮細胞の細胞極性に着目して研究を進めてきた。注目している卵管採付近の卵管上皮では、成体において繊毛細胞が約75%を占め、残りの多くは分泌細胞であった。繊毛細胞のアピカル面は多くの繊毛に覆われており、繊毛は卵管の長軸(卵管-子宮軸)に平行に数ヘルツの往復運動を行っていた。繊毛の基底部の basal foot が卵管の長軸に平行な向きに細胞内で揃っていることが電子顕微鏡観察によって観察された。上皮細胞のアピカル面の形態を観察すると、上皮細胞は卵管の長軸に平行に伸長していた。更に、卵管内腔では、一層の上皮シートが卵管長軸に平行にひだを形成している。これらの現象は、上皮細胞が平面内細胞極性(PCP)を有していることを示唆しており、細胞内の極性から組織の形態までを制御している可能性が考えられた。そこで、PCP 因子として知られているタンパク質の局在を調べた結果、Celsr1(7回膜貫通型カドヘリン)、Vangl2(4回膜貫通型タンパク質)が上皮細胞の短辺側(卵管の長軸に垂直な辺)に局在していることが明らかになった。Celsr1に焦点を絞り機能解析を進めた。生後2日目にはCelsr1タンパク質が細胞膜に局在していたが、極性を有した局在は成体に向けて増強された。Celsr1を欠失するマウスの卵管においては、細胞形態の伸長が抑制されており、細胞の伸長方向とひだの向きが一致しなくなった。更に興味深いことに、卵管内腔のひだが卵管の長軸に平行に形成されておらず、異常な分岐もみられた。繊毛細胞の数と細胞あたりの繊毛数には変化は見られなかったが、繊毛の向きが個々の細胞の中で揃っておらず、隣接する細胞間においても一致しなかった。他のPCP因子Vangl2の局在も乱れていた。これらのことから、卵管の機能発揮の為に卵管上皮細胞の極性形成および卵管の形態形成にPCP因子が重要であることが考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題においては、細胞内の極性から、細胞の形態、組織の形態という階

層をつなぐ極性を制御する機構が存在していると考えられ、この機構の実体を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

卵管上皮において、個々の細胞がどう極性を形成し、細胞群が集団として極性を協調し、形態形成を実現するか解明するために、以下の5つの項目について研究を進めた。

(1)Celsr1欠失変異体における多階層表現型をつなぐ機構の解析、(2)細胞極性と組織形態をつなぐ基盤機構の解明 (3)モザイク解析による細胞間での極性協調メカニズムの解明 (4)極性タンパク質の可視化による極性維持機構の解明 (5)Vangl1及びVangl2の欠失変異体における卵管形成異常の解析 具体的な方法については、次項目の研究成果と共に記載する。

4. 研究成果

(1)Celsr1欠失変異体における多階層表現型をつなぐ機構の解析

細胞内から組織形成までの階層をつなぐ機構としての力学的連結、異方性が関与する仮説を実験的に検証した。直接上皮細胞シートの張力を測定することは難しい為、レーザーによって細胞辺を変性し切断した際に見られる周辺領域の移動を計測し、そこから力の推定を行った。細胞形態を可視化するために、アクチン骨格系を蛍光タンパク質で標識したマウス(Venus-Moesinマウス)を用いた。野生型成体において卵管の長軸、短軸方向でそれぞれ細胞辺の切断を行い、周辺細胞の辺、交叉点などのランドマークの移動を比較した所、各細胞においては長軸、短軸によらずほぼ同様に細胞境界面に張力がかかっていることが明らかになった。更にCelsr1変異体において同様な解析を行い野生型と比較した所、野生型とほぼ同様であった。一方で、多細胞に渡る張力を測定すると、野生型では長軸方向に強い張力がかかっていることが明らかになった。

(2)細胞極性と組織形態をつなぐ基盤機構の解明

細胞が卵管の長軸に沿って伸長しており、卵管内腔面上皮は長軸に沿ったヒダ構造を形成している。この細胞極性と組織形態を

つなぐ機構について前述の力学測定に基づく推定、コンピュータシミュレーションによって考察をおこなった。その結果、各細胞辺にかかる張力が一定である場合でも、細胞が伸長しその向きが揃っていることによって、組織の長軸に沿った張力が高くなることが予想され、これは実測でも示唆された。シミュレーションによって、上皮シートの長軸方向に強い張力が加わった状態で上皮シートの面積を増やした際には、長軸方向に沿ってヒダ構造が形成されること、張力の向きがランダムになると変異体でみられたようなヒダの分岐が起きることが明らかになった。これらによって、細胞が長軸方向に平行に伸長することによって、長軸方向のヒダの形成へと繋がることを示唆された。

(3)モザイク解析による細胞間での極性協調メカニズムの解明

卵管上皮細胞シート全体でなくモザイク状に PCP 関連因子を欠失した状態を作り影響を検討した。核で EGFP を発現するマウスと掛け合わせた *Celsr1* 欠失マウスから ES 細胞を樹立した。この ES 細胞を野生型胚盤胞へと移植し、*Celsr1* を欠失した細胞をモザイク状に持つ卵管を得た。野生型卵管の中の *Celsr1* 欠失細胞が少ない場合には、長軸に平行して走るヒダの中でも、欠失細胞では細胞伸長が見られず、方向性もランダムであった。更に、欠失細胞と隣接する野生型細胞においても細胞伸長が抑制されていた。欠失細胞の数が多き場合には、変異型の卵管と同様にヒダの分岐がみられた。これらの結果から、細胞形態、伸長の向きは細胞自律的に *Celsr1* によって制御されており、隣接する細胞間の伸長、伸長方向の同調にも *Celsr1* が機能していることが示唆された。

(4)極性タンパク質の可視化による極性維持機構の解明

Vangl2 の全長に蛍光タンパク質 EGFP を融合した Vangl2-EGFP を全身で発現するトランスジェニックマウスを準備した。このマウスでは、卵管上皮だけでなく、気管や内耳といった既に PCP タンパク質が局在することが知られている組織においても EGFP のシグナルも内在性のタンパク質と同様に細胞内で局在しており、PCP を可視化することが可能である。このマウスを用いて、成体卵管上皮において PCP タンパク質がどのようにして極性

を有した状態を維持するかを検討した。FRAP によって、Vangl2-EGFP の挙動を検討した。一辺の細胞境界においては Vangl2-EGFP は比較的自由に移動するが、トリセルラージャクションを越えて移動することは希であることが明らかになった。また、微小管の重合阻害を行った場合にも、Vangl2-EGFP の局在は維持されており、PCP タンパク質の局在の維持は微小管に依存しないことが示唆された。

(5)Vangl1 及び Vangl2 の欠失変異体における卵管形成異常の解析

Celsr1 以外の PCP 因子の中で、Vangl2 タンパク質も卵管上皮において極性を持った局在がみられた。そこで、Vangl1、Vangl2 のノックアウトマウスを用いた解析を行った。Vangl1 ノックアウトマウスは、少数の胚が致死となるが、生後のホモ接合体では外見上の異常は見られず、妊娠も可能である。一方で、Vangl2 ノックアウトマウス胚は、胚性致死であり本研究の目的である卵管の解析には利用できないため、卵管で Vangl2 を不活性化するために Wnt7a-Cre で誘導した Vangl2 コンディショナルノックアウトマウスを用いた。Vangl1 変異体においては、細胞伸長が阻害され、ヒダに異常な分岐がみられたが、繊毛形成や方向性は正常であった。Vangl2 変異体においては、異常な卵管閉鎖はみられたが、細胞伸長、ヒダ構造、繊毛の方向性などは正常であった。これらのことから、PCP 因子によって、関与する極性が異なることが示唆された。

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 6 件)

Suzuki, M., Sato, M., Koyama, H., Hara, Y., Hayashi, K., Yasue, N., Imamura, H., Fujimori, T., Nagai, T., Campbell, R.E., and Ueno, N., Distinct intracellular Ca²⁺ dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure. *Development*, 2017, 144:1307-1316, 査読有

doi: 10.1242/dev.141952

Minegishi, K., Hashimoto, M., Ajima, R., Takaoka, K., Shinohara, K., Ikawa, Y., Nishimura, H., McMahon, AP., Willert, K., Okada, Y., Sasaki, H., Shi, D., Fujimori,

T., Ohtsuka, T., Igarashi, Y., Yamaguchi, TP., Shimono, A., Shiratori, H., and Hamada, H., A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking. *Dev Cell*, 2017, 40:439-452, 査読有

doi:10.1016/j.devcel.2017.02.010

Shi, D., Usami, F., Komatsu, K., Oka, S., Abe, T., Uemura, T., and Fujimori, T., Dynamics of planar cell polarity protein Vangl2 in the mouse oviduct epithelium. *Mech Dev*, 2016, 141:78-89, 査読有

doi: 10.1016/j.mod.2016.05.002

石東博、小松紘司、藤森俊彦、卵の取り込みと受精卵の輸送、*臨床婦人科産科*、70、No.9、810-816、2016、査読無
<http://medicalfinder.jp/doi/10.11477/mf.1409208853>

Shi, D., Komatsu, K., Hirao, M., Toyooka, Y., Koyama, H., Tissir, F., Goffinet, A.M., Uemura, T., and Fujimori, T., *Celsr1* is required for the generation of polarity at multiple levels of the mouse oviduct. *Development*, 2014, 141:4558-4568, 査読有

doi: 10.1242/dev.115659

Imuta, Y., Koyama, H., Shi, D., Eiraku, M., Fujimori, T., and Sasaki, H., Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos. *Mech Dev*, 2014, 132:44-58, 査読有

doi: 10.1016/j.mod.2014.01.004

[学会発表](計 6 件)

Toshihiko Fujimori, Cell polarity formation during the mouse oviduct development. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, 2017 年 3 月 15 日-18 日, Kiel(Germany)

Toshihiko Fujimori, Mouse oviduct multicilia formation regulated by PCP factors. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Toshihiko Fujimori, PCP in the mouse oviduct. Finnish-Japanese joint symposium on Morphogenesis and Signaling, 2015 年 3 月 3 日-4 日, Helsinki(Finland)

Toshihiko Fujimori, PCP Pathway and Cellular Geometric Pattern in Oviduct Morphogenesis. The 62nd NIBB Conference FORCE IN DEVELOPMENT, 2014 年 11 月 17-19 日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

Toshihiko Fujimori, Behaviors of cells and gene expression in early mouse development. Academia Sinica Lecture, 2013 年 12 月 9 日, Taipei (Taiwan)

Toshihiko Fujimori, Behaviors of Cells and Gene Expression in Early Mouse Development. The 61st NIBB Conference Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, 2013 年 7 月 10 日~12 日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

[図書](計 1 件)

Shi, D., Arata, M., Usui, T., Fujimori T., and Uemura, T., Springer, The Cadherin Superfamily, 2016, 428(251-275)

[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]

プレスリリース

動物の管腔器官のヒダの形成における物理的な力の役割、2016 年 8 月 10 日、小山宏史、石東博、藤森俊彦、鈴木誠、上野直人、上村匡、*Biophysical Journal*

卵管が卵を一方向に運ぶようになる仕組みを発見、2014 年 11 月 18 日、石東博、藤森俊彦、*Development*

アウトリーチ活動

藤森俊彦、愛知県立岡崎高等学校平成 28 年度スーパーサイエンスハイスクール進路オリエンテーションにて講演、2017 年 2 月 6 日、(愛知県・岡崎市)

藤森俊彦、基礎生物学研究所一般公開 2016 「生き物の不思議」にて「ほ乳類の初期発生」と題し研究室公開および研究紹介展示。2016 年 10 月 8 日、基礎生物学研究所、(愛知県・岡崎市)

藤森俊彦、第 1 回長野県高等学校科学協会総会・科学教育研究大会」にて講演、「ほ乳類発生における新しい研究アプローチ～物理学と生物学の交流～」、2016 年 8 月 20 日、松本市教育文化センター、(長野県・松本市)

藤森俊彦、あいち科学技術教育推進協議会平成 27 年度発表会「科学三昧 in あいち 2015」にて英語によるポスター発表指導、2015 年

12月25日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県・岡崎市）

藤森俊彦 大学共同利用機関シンポジウム 2014「研究者博覧会」トークセッション「動物のからだの形作りを探る」 2014年11月22日、東京国際フォーラム（東京都）

藤森俊彦、長野県松本深志高校で特別講義、2014年11月8日、（長野県・松本市）

藤森俊彦、あいち科学技術教育推進協議会平成25年度発表会「科学三昧 in あいち 2013」にて英語によるポスター発表指導、2013年12月26日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県・岡崎市）

藤森俊彦、JT生命誌研究館20周年記念シンポジウム「かたちまつり 3～脊椎動物の原腸形成運動は似ているのか？」にて講演、2013年10月12日、JT生命誌研究館、（大阪府・高槻市）

藤森俊彦、基礎生物学研究所一般公開2013「体感！最先端の体の世界」にて「ほ乳類の初期発生」と題し研究室公開および研究紹介展示。2013年10月5日、基礎生物学研究所、（愛知県・岡崎市）

ホームページ等

基礎生物学研究所・初期発生研究部門

<http://www.nibb.ac.jp/embryo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤森 俊彦 (FUJIMORI, Toshihiko)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274

(2) 研究分担者

小林 徹也 (KOBAYASHI, Tetsuya)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：90513359