

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K08462

研究課題名(和文) 上皮細胞間ジャンクションの再編成におけるDLG1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis for DLG1 during the remodeling of epithelial cell-cell junctions.

研究代表者

向後 晶子 (Iizuka-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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：個体発生の過程では、細胞分裂、細胞分化に加え、多数の細胞が場所に応じて適切に配置され正しい組織構造が構築される必要がある。聴覚上皮では、発生初期の未分化で均質な組織が、細胞の分化と再配置を経て、数種類の細胞が規則的なモザイク模様をなす細長い帯状の組織へと変化する。本研究ではこの過程での細胞分化、細胞動態、細胞内での機能蛋白質の局在変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察し、これまで知られていなかった細胞と蛋白質の動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の有毛細胞は再生できないので、正常な聴力を獲得、維持するためには機能的な有毛細胞が正常に発生、維持される必要がある。また哺乳類組織の収縮伸長のメカニズムは、無脊椎モデル動物と比較しても理解が不十分な点が多く残されている。本研究で明らかにした聴覚上皮初期発生の形態学的知見は、発生生物学および将来の臨床応用の両面において基盤的な知識として役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：During the developmental processes, cell proliferation, differentiation, and distribution are required for the formation of the tissue structure. Auditory epithelium is originally an immature homogeneous tissue and differentiates into a narrow and elongated tissue with a checkerboard-like mosaic pattern of several cell types. We analyzed the detail of the process of cell differentiation, cell dynamics, and localization of functional proteins during the tissue formation and found their novel dynamic behaviors.

研究分野：発生生物学、解剖学、組織学

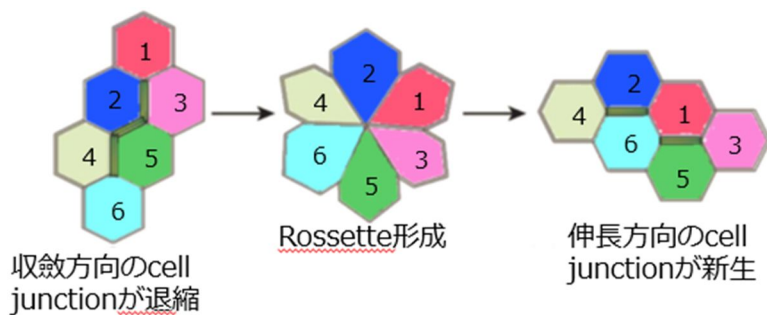
キーワード：コルチ器 聴覚上皮 収縮伸長 発生 細胞極性 平面内極性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マウス発生における DLG1 の機能 : DLG1 は、PDZ ドメインをもつ膜結合型グアニル酸キナーゼ (MAGUK) スーパーファミリーの細胞質性のタンパク質で、哺乳類では PSD95 などとともに DLG ファミリーを形成している。主に神経組織で発現する PSD95 などと違い、DLG1 は上皮細胞にも分布し、頂底極性に関わる蛋白質複合体の足場となっている。2005 年以降、Dlg1 遺伝子 改変マウスの解析を行った私達を含め複数のグループにより、DLG1 が泌尿生殖器の発生に関わり、出生後の生存に不可欠であることが報告された。(Naim et al. Kid. Int., 2005; Mahoney et al., PNAS, 2006; Iizuka-Kogo et al., Development, 2007)

(2) DLG1 と PCP シグナルの関連性 : 発生期の多くの器官発生においては、組織内に頂底極性と平面内極性という直交する 2 つの極性が形成される。平面内極性の形成に関わるシグナルは PCP シグナルと呼ばれ、平面内極性のほか、収斂伸長を司る。収斂伸長とは、組織の辺縁部の細胞が中央部の細胞の間に嵌入することによって、組織の横幅が狭まり縦に伸長する現象である。PCP シグナル因子欠損マウスでは、心臓、内耳、腸管などに特徴的な器官形成異常が見られる(Simons & Mlodzik, 2008)。私達は Dlg1 遺伝子破壊(KO)マウスで、腎泌尿器の低形成以外にも心臓大血管接続異常、心室中隔欠損、腸管の伸長不全があることを発見し、これらが PCP 因子欠損マウスの表現型と酷似していることから、DLG1 と PCP シグナル経路との関連を疑った。コルチ器は、収斂伸長によって伸長し、有毛細胞不動毛の向きは平面内極性を反映することから、哺乳類において PCP シグナル機能をはかる指標とされる。そこで Dlg1 KO マウス胎仔のコルチ器を観察したところ、不動毛の向きは正常だが、組織長が正常マウスよりも有意に短く、有毛細胞列が部分的に増えていた。このことから、平面内極性は正常に形成されるが、組織の収斂伸長が阻害されていることが示された。

(3) 収斂伸長における PCP シグナル系の役割 : 以上の結果は、発生期コルチ器の収斂伸長の過程で DLG1 が機能することを示している。近年、上皮組織の収斂伸長では、細胞間接着面の作り直し、すなわち細胞間ジャンクションの再編成が重要な原動力であると考えられている。収斂伸長では、まず横方向の細胞間接着面(ジャンクション)が収縮して周囲の細胞がロゼット状に並び、次に縦方向のジャンクションが伸長してロゼットが解消され、結果的に細胞の隣接関係が変わり組織が伸長する(図)。



収斂伸長では、まず横方向の細胞間接着面(ジャンクション)が収縮して周囲の細胞がロゼット状に並び、次に縦方向のジャンクションが伸長してロゼットが解消され、結果的に細胞の隣接関係が変わり組織が伸長する(図)。

この過程には PCP シグナルが必要である。

(4) コルチ器発生における DLG1 の機能解析の現状 : マウスコルチ器では、ジャンクション収斂を担う非筋型ミオシン II 分布の方向性が他の典型的な収斂伸長組織と異なるとされており、細胞間ジャンクション再編成について不明な点が多い。私は平成 27 年度までに、正常マウスおよび Dlg1 KO マウスのコルチ器発生過程で、有毛細胞の配列と細胞間ジャンクション再編成の進行の相関関係を調べ、有毛細胞の多列化に細胞間ジャンクション再編成のパターン異常が併発していることを見出したが、DLG1 欠損を再編成異常へと導くメカニズムを始め、聴覚上皮における細胞間ジャンクション再編成進行の分子基盤については未解明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究課題は下記を目的として開始した。

(1) 細胞間ジャンクション再編成における DLG1 機能の解明 :

コルチ器聴覚上皮における DLG1 の動態と、再編成進行との関係を明らかにする。DLG1 欠損と

ジャンクション再編成異常をリンクさせる DLG1 相関因子を同定し、組織内の動態と DLG1 との相互作用の有無を検証する。また DLG1 機能はリン酸化の影響を受けるとされているので、DLG1 リン酸化状態も検証することを計画した。

(2) コルチ器の収斂伸長機構の解明：

マウスコルチ器では収斂伸長に関わる非筋型ミオシン分子の分布が他の系と異なることから、収斂伸長メカニズムが非典型的であるとされているが、その詳細は検討されていない。そこで、コルチ器の収斂伸長メカニズムの、他の典型的な組織の収斂伸長との共通点、相違点を明らかにする。

(3) 各種器官の発生異常機構の解明

DLG1 によって仲介される細胞間ジャンクションの再編成メカニズムが、Dlg1 KO マウスの他の器官における発生異常に関与しているかどうかを検証する。

### 3. 研究の方法

聴覚上皮細胞が最終分裂を終えたマウス胎仔聴覚上皮を採取し、各種固定液により固定したのち、凍結切片あるいは聴覚上皮部分の表面サンプル(蝸牛管の天井部分を開放し底面の聴覚上皮を全載標本として使用)を作成し、核染色試薬、蛍光標識ファロイジン、各種蛋白質に対する抗体で多重蛍光染色を行った。染色標本は共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。表面サンプルについては、聴覚上皮の全長にわたる蛍光像と、特定の部位においては全深にわたる光学的切片を取得し、組織の全体像を観察した。

### 4. 研究成果

本研究は当初、ライブイメージング手法を用いて聴覚上皮細胞間ジャンクション再編成過程を詳細に観察することを中心に計画したものであった。しかし本手法の準備が順調に進まず停滞していた時期に、海外研究グループから、聴覚上皮発生過程のライブイメージングを成功させ、その細胞動態を詳細に解析した報告が発表された。同様の実験系を期間内に立ち上げるためには予算、研究体制ともに脆弱であり、達成の見込みは低いと思われたため、期間の途中から、急速ライブイメージングではなく、固定標本を用いた解析を中心とする方針に改めて研究を行った。これにより、下記の研究成果を得た。

(1) 聴覚上皮発生早期の有毛細胞観察手法の開発と聴覚上皮発生動態の解明

DLG1 欠損マウスではコルチ器(聴覚上皮)の伸長不全が認められる。マウスコルチ器聴覚上皮の組織伸長における DLG1 の作用機序を解明することである。

渦巻き型の蝸牛管の全長にわたって、聴覚上皮はその底面の一部として帯状をなしており、渦巻きの下端から先端に向かって分化が進行するため、未分化な前感覚上皮は偽重層上皮をなすのに対し、成熟したコルチ器は二層の重層上皮をなす。またコルチ器の伸長過程は、収斂伸長と呼ばれる組織変形による。収斂伸長におけるジャンクション再編成や DLG1 の機能を検証する為には、コルチ器の収斂伸長を含めた組織構築過程を理解する必要がある。これまで、有毛細胞はマーカー分子であるミオシン 6 の発現によって同定されてきたため、より未分化な「有毛細胞前駆細胞」と呼ぶべき細胞がどのような挙動を経て有毛細胞へと分化するのかが明らかになっていなかった。我々は、聴覚上皮では場所により異なる分化状態を観察することが可能であることを生かして、偽重層上皮をなす未分化状態の聴覚上皮から、上層の有毛細胞、下層の支持細胞の二層構造をなす分化状態の聴覚上皮に至る発生過程を詳細に解析し、下記を発見した。

未分化な聴覚偽重層上皮では、細胞核は組織下層に集積しており全ての細胞がミオシン 6 陰性(検出限界以下、以下同様)である(図 1)。この時期上皮

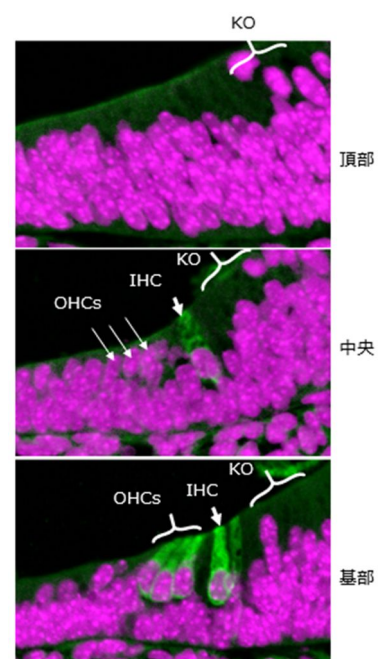


図1 ● Myo6, ● 核 KO: Kollikers Organ

細胞頂部面の細胞形状は一様で、細胞種による差は認められない(図2)。その後一部の細胞核が組織上層へと移行し、徐々に上皮組織において上下二層の重層構造が完成する。このとき上層に移行した細胞は、その後ミオシン6陽性となり、外有毛細胞へと分化する。内有毛細胞については核の上層への移動は不明瞭だったが、核が1列に整列することから形態的に特定することが可能だった。

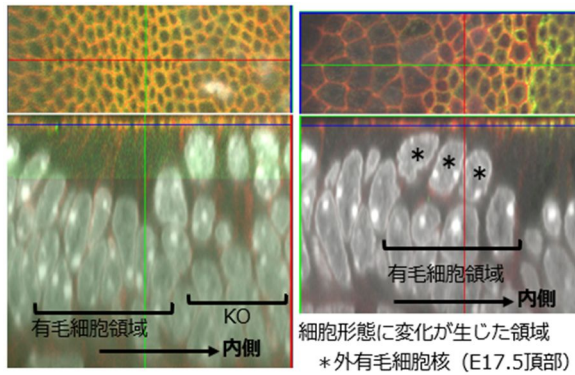


図2 未分化な領域

有毛細胞は、ミオシン6陽性となるよりも早い、聴覚上皮組織の重層構造が完成する前の段階で、Non Muscle Myosin IIC (以降 NMII C) 弱陽性(支持細胞より発現が弱い)、phalloidin 強陽性(支持細胞より発現が強い)の細胞として周囲の支持細胞から区別できることを見出した(図3)。「外有毛前駆細胞」において、この染色性は細胞核が上皮組織の底層部を離れ上層へと移行するのとはほぼ同時に獲得された。このような外有毛細胞は、はじめ聴覚上皮の外側(内有毛細胞から遠い領域)に出現し、次第に内有毛細胞に近い領域にも現れる。それに伴い聴覚上皮の幅が狭まった。この染色性は組織の分化過程を通じて内外有毛細胞の特定に非常に適していた。ミオシン6の発現は、内有毛細胞については聴覚上皮が二層構造になった直後に陽性となったが、外有毛細胞についてはさらに後期に至るまで陰性であった。

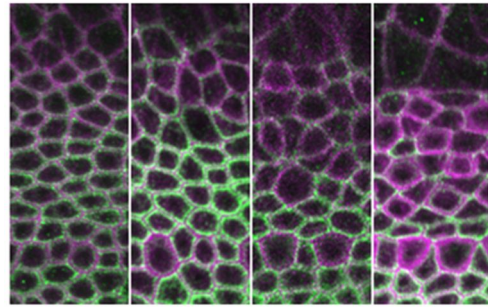


図3 E16.5コルチ器 (phalloidin, NMII C)

聴覚上皮の幅が十分に狭くなり細胞数が成熟コルチ器と同等になった時点でも、成熟コルチ器に見られる規則的なモザイク模様は全く完成しておらず、各所に多数のロゼット構造が形成されていた(図4左)。ロゼット構造はE16.5からE17.5にかけて聴覚上皮前長にわたって分布するが、その後基部から解消されていき、最終的に、1列の内有毛細胞、3列の外有毛細胞の間に支持細胞が規則正しく配置されたモザイク模様が完成する(図4右)。

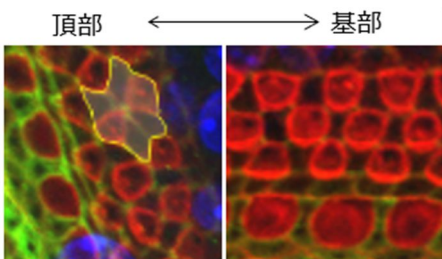


図4 収斂伸長途上に見られるrosette構造(左)とモザイク模様の完成(右)

DLG1 欠損マウスではロゼットの形成そのものは阻害されないが、その後ロゼットが正常に減少しないことが判明した。このことから、DLG1はロゼットの解消、あるいはロゼット尾形成過程の終了に関与することが示唆された。

DLG1 欠損マウスではロゼットの形成そのものは阻害されないが、その後ロゼットが正常に減少しないことが判明した。このことから、DLG1はロゼットの解消、あるいはロゼット尾形成過程の終了に関与することが示唆された。

## (2) 細胞間ジャンクション再編成関連因子の動態解析

聴覚上皮のジャンクション再編成への寄与が報告されている分子として Baz/PAR3, NECTIN3, E-cadherin、また DLG1 分子との相互作用が知られている Pins/LGN の、有毛細胞頂部膜付近における発現、局在のパターンを、正常マウスおよび DLG1 KO マウスで検証、比較した。これまで、PAR3 は発生途上のやや分化段階の進んだ有毛細胞で、内有毛細胞より遠位側のジャンクションに集積していることが知られてきたが、本研究ではより早期の有毛(前駆)細胞で PAR3 と NECTIN3 が有毛細胞の近位側(内有毛細胞寄り)のジャンクションに集積していることを新たに見出した。このような極性局在は E-cadherin ではほとんど見られなかった。有毛細胞の分化に伴い PAR3 は急激にその近位側局在を失い逆に遠位側に局在するようになるのに対し、NECTIN3 は同時期に近位側局在を失い、細胞の全周に一樣に分布するようになった。E-cadherin は発生段階を通じて顕著な極性局在を示さなかった(図5)。

外有毛細胞の LGN は、PAR3 が外有毛細胞の遠位側に局在するようになるのと概ね同じタイミングで頂部面に検出されるようになった。発現開始時の局在は遠位側に弱い局在を示す程度だが、モザイク模様が完成する段階では完全に遠位側のみに集積するようになった。ジャンクション再編成における DLG1 の動きを考察する上で、PTEN と DLG1 の関係性を検討したいと考えていたが、コルチ器において PTEN の発現を検出する手法は期間中に確立できなかった。

Dlg1 KO マウスでも、外有毛前駆細胞での PAR3 と NECTIN3 の一過的な近位側への局在が観察されたが、近位側の局在も、その後の局在変化も、正常マウスほど顕著ではなかった(図5)。これらの分子が内側に局在する時期は、聴覚上皮の外有毛細胞領域で盛んに収斂伸長運動がおこって組織幅が狭小化する時期と一致していたことから、これらの局在の違いが DLG1 KO マウスにおける rosette 解消の一因となっていることが示唆された。

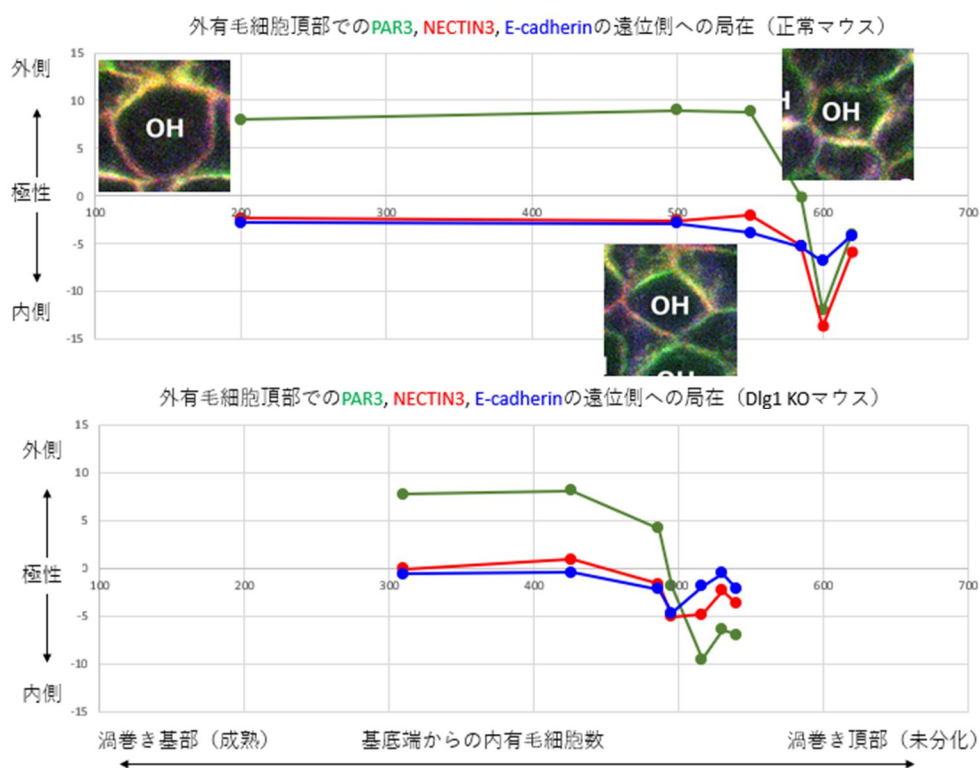


図5 外有毛細胞におけるジャンクション蛋白質の平面極性局在

(3) 研究成果のまとめ 本研究課題において発生初期の未成熟な有毛細胞の同定方法を確立したことにより、聴覚上皮発生初期における有毛細胞の詳細な動態について多くの新たな知見が得られた。特に有毛細胞ジャンクションの PAR3 については、これまで聴覚上皮外側方向への極性局在を示すことのみが知られていたが、初期の有毛細胞では NECTIN3 と共にそれとは全く逆の極性局在を示すことが初めて示された。また NECTIN3 のこの一過的な極性局在は、Dlg1 遺伝子欠損の影響を受けることも明らかになった。これらの蛋白質動態、細胞の平面内極性獲得の意義について、今後更なる検証が必要であると考える。

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iizuka-Kogo, A.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Spatiotemporal coordination of cellular differentiation and tissue morphogenesis in organ of Corti development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0185-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向後 晶子、計良 佳彦、佐藤 聖、浜田 真理子、向後 寛、松崎 利行
2. 発表標題 マウスコルチ器発生過程有毛細胞におけるPar3、LGN/Pins、F-actinの極性分布
3. 学会等名 第125回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向後晶子、中塩 莞人、前田 皓、向後 寛、松崎 利行
2. 発表標題 マウス内耳コルチ器の収斂伸長過程でPAR3は伸長ジャンクションに局在する
3. 学会等名 第124回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向後晶子・長野史弥・松浦勉・向後寛・松崎利行
2. 発表標題 コルチ器の組織構築過程とDLG1の機能解析
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 向後 晶子、今井 愛理、根本 奏子、向後 寛、松崎 利行
2. 発表標題 DLG1はコルチ器の収斂伸長における新たな細胞間ジャンクションの形成に關与する
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国學術集會
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向後 晶子
2. 発表標題 Role of MAGUK polarity protein DLG1 in the cardiac neural crest and the second heart field (SHF) development.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国學術集會/第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	向後 寛  (Kogo Hiroshi)  (20282387)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師    (12301)	
研究分担者	野村 隆士  (Nomura Ryuji)  (20325161)	藤田医科大学・医学部・講師    (33916)	
研究分担者	松崎 利行  (Matsuzaki Toshiyuki)  (30334113)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授    (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	下村 敦司  (Shimomura Atsushi)  (50340237)	北海道医療大学・リハビリテーション科学部・教授    (30110)	
研究分担者	松浦 勉  (Matsuura Tsutomu)  (80181692)	群馬大学・大学院理工学府・准教授    (12301)	

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