

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06847

研究課題名(和文) Vangl2によるNカドヘリンの制御機構に関する遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of Vangl2 regulation of N-cadherin

研究代表者

岸 将史 (Kishi, Masashi)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・部長

研究者番号：60573938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：平面内細胞極性の制御因子群は、神経管の閉鎖や内耳有毛細胞上皮の配向性を司り、その遺伝子異常の多くは先天的な二分脊椎や難聴を引き起こします。私は神経シナプスの形成機構を調べる過程で、平面内細胞極性の一つVangl2がシナプス間細胞接着因子Nカドヘリンを直接的に制御するという機能を見出しました。本研究では、Vangl2の遺伝子変異マウスとNカドヘリンの遺伝子欠損マウスとを交配し、両遺伝子二重ヘテロ接合体の遺伝子型を有する個体が、90%前後の浸透度で神経管の閉鎖不全を来しヒト脊髄髄膜瘤と類似の二分脊椎を呈すること、そして、内耳有毛上皮細胞の方向性に軽度の不整を伴うことを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Vangl2によるNカドヘリンの直接的制御という機能がシナプス形成だけでなく、平面内細胞極性依存性の形態形成の典型例である神経管の閉鎖や内耳有毛細胞の配向性制御にも重要であることが明らかとなりました。従って医学的には、今後、二分脊椎や難聴の患者様に、Vangl2だけではなくNカドヘリンの遺伝子異常を有する方が見つかるという可能性が考えられ、本研究の成果は、将来的には新たな出生前診断法や遺伝子治療法の開発につながって来るものであります。

研究成果の概要(英文)：The regulators of planar cell polarity (PCP) are known to control closure of the developing neural tube and orientation of the cochlear hair cell epithelia. Studying molecular mechanisms of synaptogenesis, my research group has found that one of the PCP protein Vangl2 interacts N-cadherin to control synaptic cell-cell adhesion. To address if this molecular mechanism is generally adopted in the PCP development, we bred the mutant mice of the two genes and found that the digenic heterozygotes were with spina bifida and abnormal orientation of cochlear epithelia.

研究分野：神経生物学 発生生物学 細胞生物学

キーワード：二分脊椎 脊髄髄膜瘤 神経管閉鎖不全 収斂伸長運動 難聴 有毛細胞上皮

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) は、上皮組織平面内での細胞群の方向性を一定に定める役割を担っており、その中心的制御因子としては大きく分類して6種類の分子 (Van Gogh, Prickle, Dishevelled, Frizzled, Flamingo, Diego) が知られております。それら平面内細胞極性の制御因子群は細胞接着部位において複合体を形成することによって機能しておりますが、私の研究グループは、それらが神経シナプスの接着部位にも存在しシナプスの形成に不可欠な役割を果たしていることを見出しました (Nagaoka et al., Cell Reports, 2014)。また、その分子メカニズムについては、PCP 因子の一つである Vangl2 という4回膜貫通分子が代表的なシナプス間細胞接着分子の一つである N カドヘリンに結合しその動態を制御することによって、シナプス形成を司っているということが明らかとなりました。

2. 研究の目的

同様の制御機構は、上皮細胞の形態形成における E カドヘリンの制御にも関わっていますが (Nagaoka et al., Scientific Reports, 2014) Vangl2 による古典的カドヘリンの直接的制御、という分子機構がシナプスや上皮形態形成に特異性の高い分子機能であるのか、それとも PCP シグナル依存性の形態形成一般に広く用いられているものなのか、という問題には答えられていませんでした。それを明らかにするためマウスを用いた遺伝学的な解析を基に、神経管の閉鎖と内耳有毛細胞上皮の配向性を調べました。

3. 研究の方法

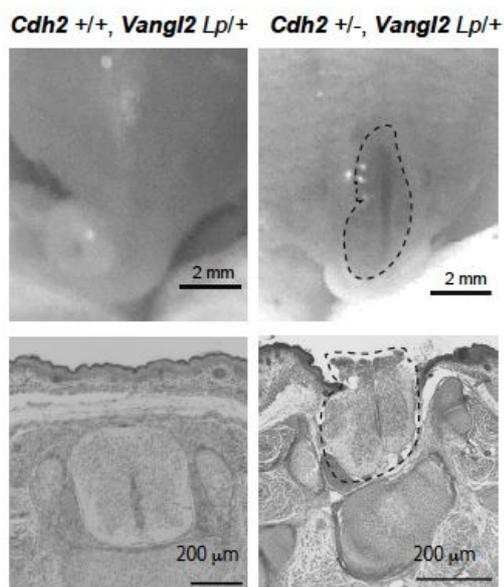
具体的には、Vangl2 の自然発生変異体である Lpt ミュータントのヘテロ接合体と N カドヘリンノックアウトマウスのヘテロ接合体を交配し、digenic なヘテロ接合体の神経管と内耳有毛細胞上皮を調べることで両者の間に遺伝学的相互作用があるかどうかを調べました。

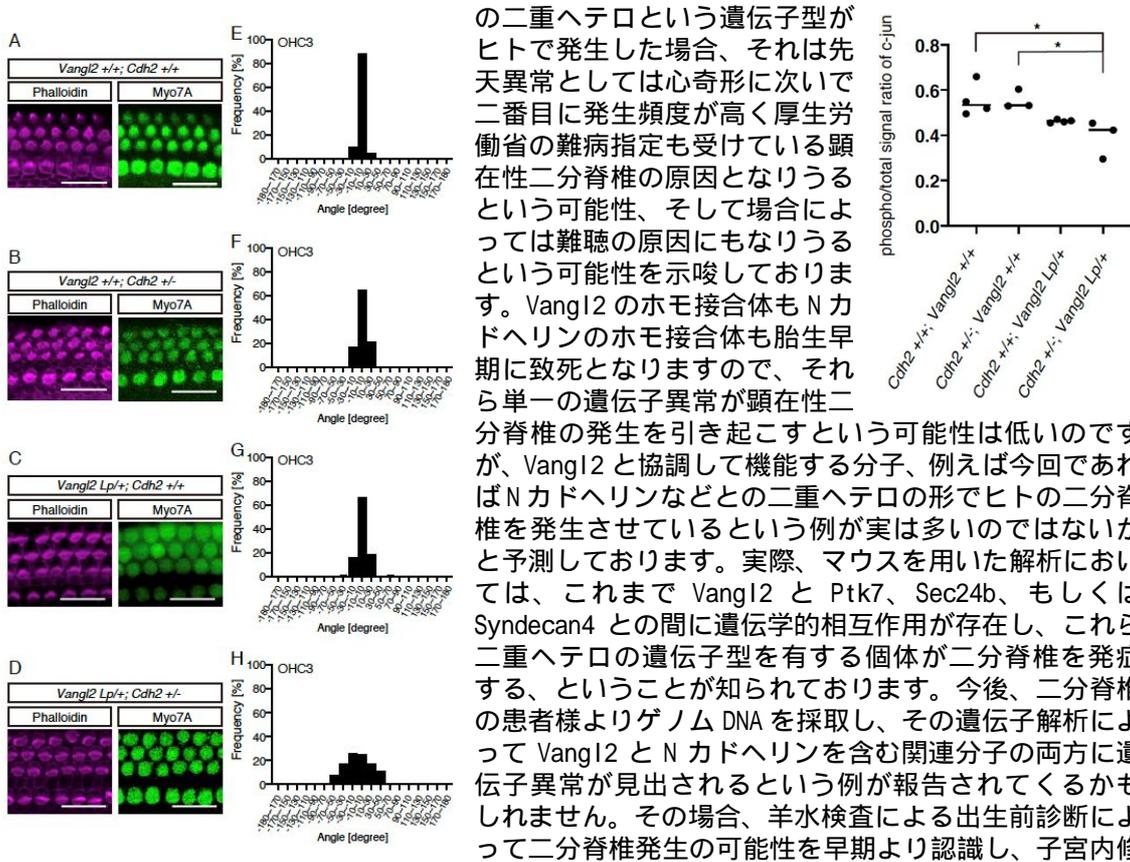
4. 研究成果

PCPシグナルが果たすことで知られる代表的な発生生物学的役割としては、神経管の閉鎖が挙げられます。神経管の閉鎖は、神経板を構成する神経細胞群がお互いに内外側方向に滑り込み運動を起こすことによって、組織全体の幅を収縮させると同時に前後方向に伸長させる、いわゆる収縮伸長運動によって起こりますが、この滑り込み運動は神経板平面内の神経細胞の極性化と移動によって引き起こされ、その過程には PCP の制御因子が中心的な役割を担っております。この過程に異常が生じると神経管閉鎖不全、すなわち二分脊椎や無脳症といった先天異常が生じることが知られています。

もう一つ、脊椎動物において典型的な平面内細胞極性を示す組織としては内耳の感覚神経上皮が挙げられますが、組織平面内の有毛細胞群が一定の方向を向いて整列するためには、やはり PCP の制御因子群が不可欠です。例えば、Vangl2 遺伝子を欠損したマウスでは、有毛細胞がバラバラの方向を向き、難聴となることが知られています。

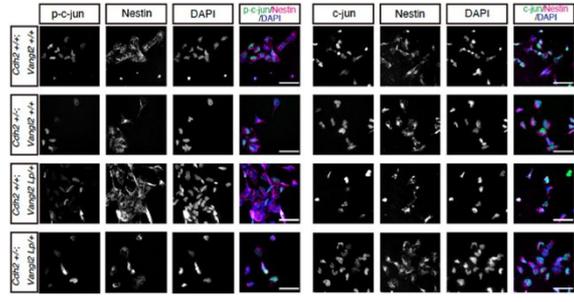
我々はシナプスにおいて Vangl2 による N カドヘリンの直接的制御、という分子機構を見出しましたが、それがシナプスに特異的な分子機能であるのか、それとも PCP シグナル依存性の形態形成一般に広く用いられているものなのか、という問題には答えられていませんでした。そこで我々は、Vangl2 の遺伝子変異マウスと N カドヘリンの遺伝子欠損マウスを交配し、両分子が神経管の閉鎖という発生過程において機能的に相互作用していることを見出しました。すなわち、Vangl2 のヘテロ接合体も N カドヘリンのヘテロ接合体も神経管の閉鎖不全を呈することはほぼないのですが、二重ヘテロ接合体が生まれた場合には8~9割の割合で顕在性の二分脊椎を呈するということが明らかとなったのです (右上)。更に我々は、両分子の相互作用が神経管の閉鎖だけではなく、他の PCP 依存性の形態形成にも不可欠であるかどうかを調べ、より一般性の高い内容を有する研究にしようとして試みました。具体的には上に記載致しました内耳有毛細胞の配向性に関する解析を加えることにした訳ですが、我々が期待した通り、二重ヘテロ接合体の有毛細胞は一定方向を向かずその不動毛をバラバラの向きに伸ばす傾向が強いということが分かりました (次頁左上)。まだ聴力検査は行っておりませんが、可能性としては当個体は難聴になっている可能性が考えられます。これまでの結果を総合して考えますと、Vangl2 と N カドヘリン





の二重ヘテロという遺伝子型がヒトで発生した場合、それは先天異常としては心奇形に次いで二番目に発生頻度が高く厚生労働省の難病指定も受けている顕在性二分脊椎の原因となりうるという可能性、そして場合によっては難聴の原因にもなりうるという可能性を示唆しております。Vangl2 のホモ接合体も N カドヘリンのホモ接合体も胎生早期に致死となりますので、それら単一の遺伝子異常が顕在性二分脊椎の発生を引き起こすという可能性は低いのですが、Vangl2 と協調して機能する分子、例えば今回であれば N カドヘリンなどの二重ヘテロの形でヒトの二分脊椎を発生させているという例が実は多いのではないかと予測しております。実際、マウスを用いた解析においては、これまで Vangl2 と Ptk7、Sec24b、もしくは Syndecan4 との間に遺伝学的相互作用が存在し、これら二重ヘテロの遺伝子型を有する個体が二分脊椎を発症する、ということが知られております。今後、二分脊椎の患者様よりゲノム DNA を採取し、その遺伝子解析によって Vangl2 と N カドヘリンを含む関連分子の両方に遺伝子異常が見出されるという例が報告されてくるかもしれません。その場合、羊水検査による出生前診断によって二分脊椎発生の可能性を早期より認識し、子宮内修

復術によって予後を大幅に改善させるといった医療も通常に行われるようになると考えられます。最後に細かな事となりますが、分子レベルでは N カドヘリンと Vangl2 の結合は恐らくその局所でのみ働き、PCP シグナルの核における到達点である c-Jun のリン酸化などにはほとんど影響を及ぼさないことが分かっております(右上・右図)。また予防面では、この二分脊椎の発生が葉酸の投与によって抑制されるという可能性を示すデータは今のところ得られておりません。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagaoka Tadahiro, Furuse Mikio, Ohtsuka Toshihisa, Tsuchida Kunihiro, Kishi Masashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Vangl2 interaction plays a role in the proteasomal degradation of Prickle2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39642-z	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 -

1. 著者名 Nakanishi Keiko, Niida Hiroyuki, Tabata Hidenori, Ito Tsuyoshi, Hori Yuki, Hattori Madoka, Johmura Yoshikazu, Yamada Chisato, Ueda Takashi, Takeuchi Kosei, Yamada Kenichiro, Nagata Koh-ichi, Wakamatsu Nobuaki, Kishi Masashi, Pan Y Albert, Ugawa Shinya, Shimada Shoichi, Sanes Joshua R, Higashi Yujiro, Nakanishi Makoto	4. 巻 29(9)
2. 論文標題 Isozyme-Specific Role of SAD-A in Neuronal Migration During Development of Cerebral Cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 3738 - 3751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhy253	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

1. 著者名 Riuko Ohashi et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Frequent Germline and Somatic Single Nucleotide Variants in the Promoter Region of the Ribosomal RNA Gene in Japanese Lung Adenocarcinoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9112409	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 岸将史 永岡唯宏 土田邦博
2. 発表標題 Vangl2との結合はPrickle2のコピキチン化とプロテアソーム依存性の分解を引き起こす。
3. 学会等名 日本神経科学学会2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Kishi
2. 発表標題 Scrap & Build of Mammalian Synapses by the Planar Cell Polarity Proteins
3. 学会等名 MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovation Area, 3rd Scrap & Build Meeting Osaka 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Kishi, Tadahiro Nagaoka, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 Vangl2 interaction enhances ubiquitination and proteasomal degradation of Prickle2 in a Cullin-1-dependent manner.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Meeting on Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits, AWAJI, JAPAN (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://nozaki.tokushukai.or.jp/rint/?PHPSESSID=11dt89ivpg32vi5unn9oi3v1u4

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
---------	---------