

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16887

研究課題名(和文)内耳発生におけるWntシグナル、微小管制御蛋白質Dapleの機能の解明

研究課題名(英文)Role of Daple in the inner ear morphogenesis

研究代表者

大園 芳之(Ozono, Yoshiyuki)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10724768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：聴覚に重要な蝸牛有毛細胞上の聴毛がV字型配列になるメカニズムは完全には分かっていない。本研究では、Daple(Ccdc88c)を欠損したマウスが、広い周波数範囲で聴覚障害を示すことを発見した。聴毛の歪んだ配列が蝸牛のすべての領域で検出され、特に基底領域で検出され、また有毛細胞のアピカル微小管が不規則に凝集し、細胞膜に付着する微小管の数が減少したことも示した。また野生型胎児マウス蝸牛器官培養で、微小管重合阻害薬処理で同様の歪んだパターンを示した。これらの結果は、頂端微小管分布を介した聴毛の配置、およびそれによる聴覚でのDapleの重要な役割を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚の発生、器官形成、生体恒常性維持には、細胞内、細胞間の極性を正しく決めるメカニズムが重要である(平面細胞極性planar cell polarity:PCP)。本研究は蝸牛のPCPにおけるDaple(Ccdc88c)の役割を明らかにし、蝸牛PCP異常下での聴覚障害や、生体におけるPCP調整のメカニズムを解明する一助になる成果を報告した。

研究成果の概要(英文)：The V-shaped arrangement of hair bundles on cochlear hair cells is critical for auditory sensing. However, regulation of hair bundle arrangements has not been fully understood.

In the present study, we found that Daple(Ccdc88c) -/- mice exhibited hearing disturbances over a broad frequency range through auditory brainstem response testing. Consistently, distorted patterns of hair bundles were detected in almost all regions, more typically in the basal region of the cochlear duct. In Daple -/- mice, apical microtubules were irregularly aggregated, and the number of microtubules attached to plasma membranes was decreased. Similar phenotypes were manifested upon nocodazole treatment in a wild type cochlea culture without affecting the microtubule structure of the kinocilium. These results indicate critical role of Daple in hair bundle arrangement through the orchestration of apical microtubule distribution, and thereby in hearing.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内耳 平面細胞極性 細胞骨格 難聴

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胚の発生、臓器の形成には、種々の細胞が決まった極性に合わせて変化し、共同して必要な機能を発現しなければならないため、細胞内、細胞間の極性を正しく決めるメカニズムが重要である(平面細胞極性: planar cell polarity (PCP))。

蝸牛においても、有毛細胞が外有毛細胞3列、内有毛細胞1列に揃い、各々の有毛細胞に生える聴毛(stereocilia)のV字型配列が同じ向きに揃うために重要な役割をPCPが担っていると考えられるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

Daple(Ccdc88c)はWntシグナル系を伝達する中心蛋白質の一つであるDishevelledに結合する蛋白質として同定され、その変異により脳脊髄液の還流異常からなる水頭症の発症の他、細胞移動、癌浸潤のメカニズムといった生命の根幹にかかわる機能を制御する蛋白質として報告されている。本研究は、水頭症のモデルマウスとして報告されたDapleノックアウトマウスに着目し、内耳有毛細胞の異常を検証し、内耳有毛細胞PCPにおいて、Dapleの重要な役割について解明を試みた。

### 3. 研究の方法

Dapleノックアウトマウスを購入し、まず機能検査として、聴性脳幹反応(auditory brainstem response(ABR))を測定した。また、蝸牛コルチ器を免疫蛍光染色、走査電子顕微鏡で観察し、構造異常がないかどうかを観察した。幼年、胎児マウスに対しても同様に蝸牛コルチ器の観察を行った。認められた異常が、細胞骨格微小管の異常に起因すると推定されたため、野生型胎児マウス蝸牛器官培養を、微小管重合阻害薬である、nocodazole添加下に培養し、影響を免疫蛍光染色、走査電子顕微鏡にて観察を行った。

### 4. 研究成果

Dapleノックアウトマウス(Daple<sup>-/-</sup>)のABRを用いた聴力検査を施行したところ、成体マウスにおいてDapleワイルドタイプマウス(Daple<sup>+/+</sup>)に比し、難聴が示された。(図1)

また、内耳の形態、蝸牛有毛細胞について観察を行ったところ、内耳形態としては大きな異常を認めず、通常通り2回転半の蝸牛が観察されたが、蝸牛外有毛細胞にあるstereociliaのV字型配列が乱れ、その乱れ様も一定ではなく、もともとのV字型配列を維持している細胞もある一方、様々な乱れた配列が観察されることが示された。(図2)この配列の乱れは特に蝸牛管の基底回転側に強く認められた。また、Daple<sup>-/-</sup>の新生仔マウスにおいてstereociliaの整列に寄与すると考えられている、一次繊毛であるkinociliaの位置にも異常が認められることがわかった。kinociliaの局在が異常になるとstereociliaの配列の乱れが強い傾向にあり、kinociliaがstereociliaの配列異常に関与を推定される一方、kinociliaとstereociliaが時に離れる様も観察された。(図3)

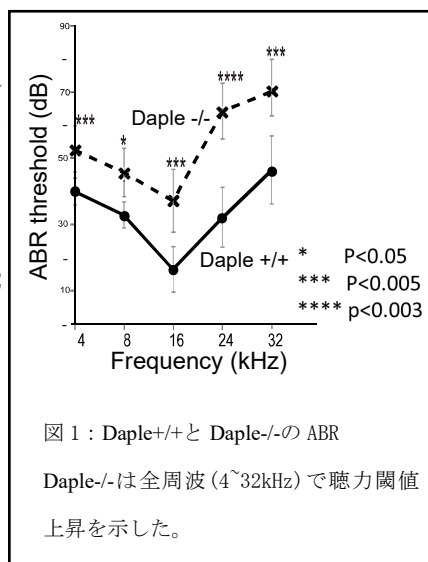


図1: Daple<sup>+/+</sup>とDaple<sup>-/-</sup>のABR  
Daple<sup>-/-</sup>は全周波(4~32kHz)で聴力閾値上昇を示した。

先行する脳室上皮細胞の PCP 異常の報告で、Daple と微小管動態制御の関係が示されており [1]、kinocilia の細胞アピカル面移動にはアピカル微小管の構築が重要になることが知られているため、アピカル面の微小管を確認したところ、構築に大きな異常が示された。

(図 4) Daple<sup>+/+</sup>では通常 kinocilia の根部を中心に放射状に広がる微小管が観察されるが、Daple<sup>-/-</sup>では根部に凝集している。このことから、微小管構築の異常が、kinocilia、stereocilia の位置、配列の異常に関与していると考えられた。

この考えを補強するために、微小管の構築に異常をもたらすと、kinocilia の位置の異常、stereocilia の配列の異常に問題を生じうるのかを検証した。微小管重合阻害薬である、nocodazole を添加しながら正常マウス胎児の胎児蝸牛器官培養を行い、発生過程で微小管重合阻害される環境下での蝸牛有毛細胞の stereocilia 配列に異常が認められるか観察した。2 日間培養し、コルチ器を観察すると、Daple ノックアウトマウスで観察される kinocilia、stereocilia の異常に近い異常が見られることが示された。(図 5)

本研究では、成体 Daple ノックアウトマウスの聴覚を測定し、難聴を認めること、また有毛細胞感覚突起である stereocilia の配列に著しい乱れを確認した。更に、この stereocilia の配列形成に重要な一次繊毛、kinocilia の位置にも異常があることを示した。原因として、Daple ノックアウトマウスの蝸牛有毛細胞において、アピカル細胞骨格の 1 種である微小管の動態制御に異常があることを示した。

また微小管重合阻害下での胎児蝸牛器官培養を行い stereocilia、kinocilia に Daple ノックアウト

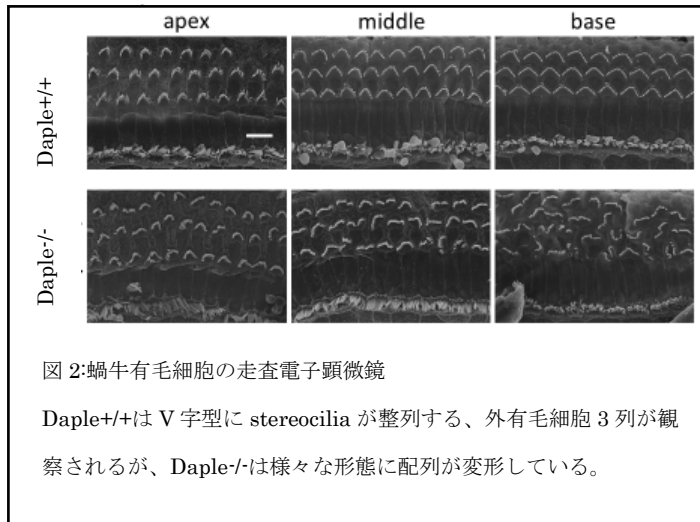


図 2:蝸牛有毛細胞の走査電子顕微鏡

Daple<sup>+/+</sup>は V 字型に stereocilia が整列する、外有毛細胞 3 列が観察されるが、Daple<sup>-/-</sup>は様々な形態に配列が変形している。

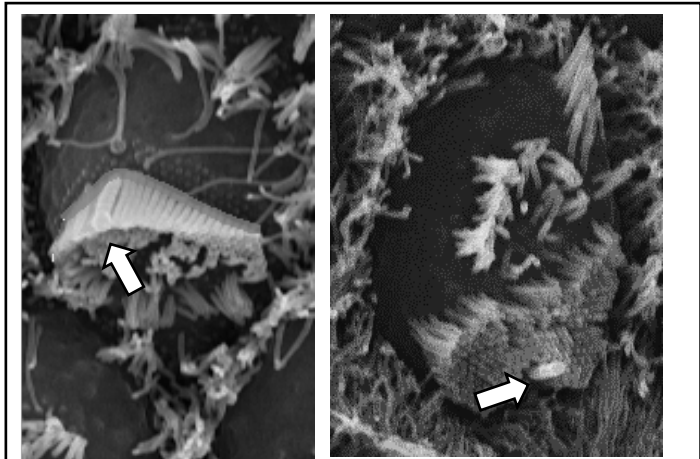


図 3:生後 3 日のマウスの外有毛細胞

Daple<sup>-/-</sup>では様々な kinocilia、stereocilia の形態をとる。通常(左図)では、stereocilia は V 字型に生え、その頂点部分に kinocilium が生えている。(左矢印)

右図では kinocilium の位置が様々な位置に存在し(右矢印)、stereocilia 配列とも離れて存在する。

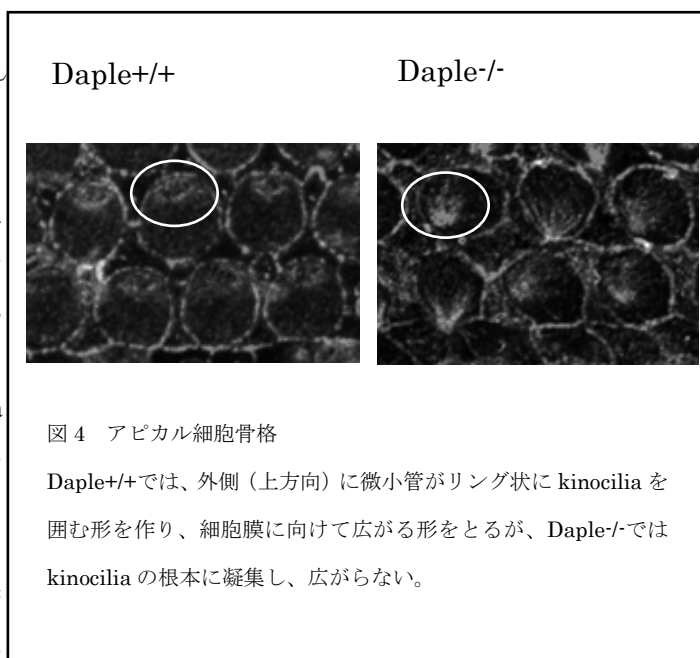


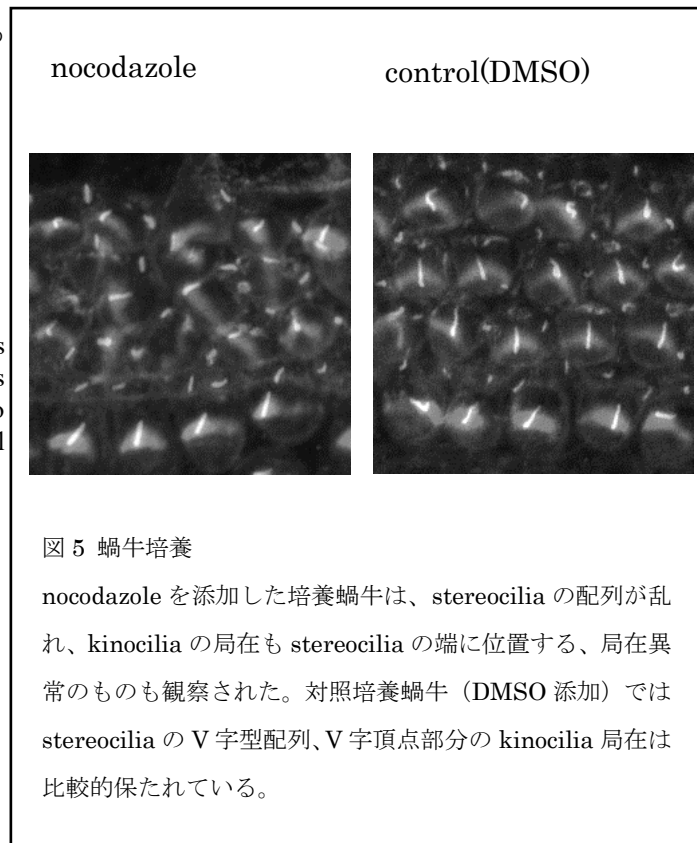
図 4 アピカル細胞骨格

Daple<sup>+/+</sup>では、外側(上方向)に微小管がリング状に kinocilia を囲む形を作り、細胞膜に向けて広がる形をとるが、Daple<sup>-/-</sup>では kinocilia の根本に凝集し、広がらない。

トマウスと同様な異常が観察されることを示した。

参考文献

[1] Takagishi et al, Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus; Cell Rep. 2017 Jul 25;20(4):960-972.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大園 芳之、森鼻 哲生、猪原 秀典
2. 発表標題 Dapleの欠損は平面細胞極性と上皮面細胞骨格の構築に異常を示し、難聴をもたらす
3. 学会等名 第29回日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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