

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06664

研究課題名(和文) 骨格形成の基盤となる新たな細胞極性形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating the involvement of Microtubule-Wnt/PCP network in cartilage development

研究代表者

菊池 浩二 (Kikuchi, Koji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：70457290

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)：私共が発見した細胞極性形成を制御する新たな分子メカニズム：微小管-Wnt/PCPネットワーク(EMBO Rep., 2018.)に関して、哺乳類動物の組織形成時における機能を明らかにすべく、マウスを用いた解析を実施した。私共は、制御分子のひとつであるMap7D1が軟骨細胞の細胞極性形成に関与し、さらに、細胞極性の異常により生じる軟骨細胞の分化の乱れが骨形成に必要な細胞間相互作用に影響する可能性を見出した。特に、分化状態に応じてMap7D1の発現や局在パターンが変化したことから、Map7D1の分子ダイナミクス変化によって軟骨細胞の細胞極性形成が制御される可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内軟骨性骨化では、分化系譜に沿って配列した軟骨細胞と血管/破骨細胞/骨芽細胞などの細胞間相互作用によって、軟骨組織が骨組織へと置換されていく。この時に、分化系譜に沿った軟骨細胞の配列：カラム形成には、細胞極性：紡錘体軸/細胞挿入/繊毛形成/配列保持が必須である。しかし、軟骨細胞の細胞極性形成メカニズムは依然として未解明な点が多く残されている。私共は、その鍵となりうる分子としてMap7D1を見出した。本研究がさらに進展する事で、骨格形成の仕組みを理解するという学術的重要性のみならず、内軟骨性骨化の異常により生じる骨軟骨異形成症の発症原理の理解につながる。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the function of a molecular mechanism we discovered that regulates cell polarity formation: the microtubule-Wnt/PCP network (EMBO Rep., 2018.) during tissue formation in mice. We found that Map7D1, one of the regulatory molecules, is involved in the formation of chondrocyte cell polarity, and furthermore, the disruption of chondrocyte differentiation caused by abnormal cell polarity may affect cell-cell interactions required for bone formation. In particular, the expression and localization patterns of Map7D1 were changed depending on the differentiation state, suggesting that the cell polarity formation of chondrocytes may be regulated by changes in the molecular dynamics of Map7D1.

研究分野：細胞生物学、発生生物学、分子生物学、生化学

キーワード：軟骨細胞 細胞極性 Map7D1 分化 内軟骨性骨化

1. 研究開始当初の背景

希少難治性疾患群のひとつである骨軟骨異形成症は、結合組織や骨・軟骨の成長・発達異常に伴う骨格の異形成により運動器機能不全を引き起こす。骨軟骨異形成症の発症素因のひとつとして、骨組織の大半を作り出す内軟骨性骨化の異常が挙げられる。内軟骨性骨化では、分化系譜に沿って配列した軟骨細胞と血管/破骨細胞/骨芽細胞などの細胞間相互作用によって、軟骨組織が骨組織へと置換されていく。この時に、分化系譜に沿った軟骨細胞の配列：カラム形成には、細胞極性：紡錘体軸/細胞挿入/繊毛形成/配列保持が必須である。細胞極性の異常により生じる軟骨細胞の分化の乱れが骨形成に必要な細胞間相互作用に影響すると想定されるが、その詳細は未解明である。

私共はショウジョウバエや培養細胞を用いた研究から、細胞極性形成を制御する新たな分子メカニズム：微小管-Wnt/PCP ネットワークを発見し、その制御分子として微小管結合タンパク質：Map7 とそのパラログである Map7D1 を同定した (*EMBO Rep.*, 2018.)。私共は、本ネットワークが生物/細胞種を超えて保存される可能性を見出していたことから、Map7、及び、Map7D1 についてマウスを用いた解析を開始し、Map7D1 が軟骨細胞の細胞極性形成に関与する可能性を見出した。そこで、本研究では、「軟骨細胞の細胞極性が微小管-Wnt/PCP ネットワークにより制御されるのか？」という問いに、制御分子：Map7D1 の機能から明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の開始までに得られた知見に基づき、本研究の目的は、Map7D1 の機能解析から、「微小管-Wnt/PCP ネットワークがどのようにして軟骨細胞の細胞極性を制御するのか？」という点を明らかにする事である。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下の研究方法に従って研究を推進した。本研究の表現型解析では、Map7D1 の C 末端側を欠失した変異マウス (*Map7d1^{ΔC/ΔC}* マウス) を用いた。

① マイクロ CT による全身骨格の撮影

Map7d1^{ΔC/+} 雌雄マウスの掛け合わせにより得られた 18.5 日胚を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定後に重量を計測し、リガク社・マイクロ CT : R_mCT2 により非破壊的に全身骨格像を撮影した。取得した画像ファイルはソフトウェア : OsiriX を用いて 3次元画像化し、解析した。また、性差を確認するために、各胎仔の性別を *Sry* 遺伝子に対する PCR により確認した。

② 組織切片を用いた脛骨長の測定

固定した 18.5 日胚を用いてパラフィンブロック・組織切片を作製し、トルイジンブルー染色により軟骨組織を染色した。脛骨に着目し、染色された成長板軟骨組織間の骨組織部分の長さを脛骨長として測定した。

③ 定量的逆転写 PCR (RT-qPCR)

Map7D1 は MAP7 ファミリーに属し、他に 4つのパラログが存在する。軟骨組織におけるそれぞれの遺伝子発現を確認するために、新生仔マウスより採取した成長板軟骨組織から RNA 抽出液を作製し、RT-qPCR を実施した。

④ Map7d1-egfp ノックインマウスを用いた Map7D1 の発現パターン解析

Map7d1-egfp ノックイン (*Map7d1-egfp^{KI}*) 新生仔マウスより採取した後肢を 4%パラホルムアル

ルデヒドで固定して、凍結切片を作製した。抗 GFP 抗体、及び、抗 Col2a1 抗体（軟骨細胞マーカー）を用いた免疫二重染色により成長板軟骨組織における Map7D1 の発現パターンを解析した。また、細胞標識として DAPI 染色を行った。

4. 研究成果

本研究で用いた *Map7d1^{AC/AC}* マウスは周産期致死であり、また、*Map7d1^{AC/AC}* マウス胎仔の重量を測定したところ、野生型、及び、*Map7d1^{AC/+}* マウス胎仔と比較して、若干低体重になる傾向が認められた。*Map7d1^{AC/AC}* マウス胎仔の姿勢に変化が見られたため、マイクロ CT によって非破壊的に全身骨格を撮影し、骨格形成への影響を解析した。*Map7d1^{AC/AC}* マウス胎仔は脊椎後弯を呈し、脛骨長が短くなる事を見出した。また、上記の表現型に性差は認められなかった。さらに、マイクロ CT による解析と並行して、トルイジンブルー染色を行った組織切片を用いて脛骨長を測定し、同様に *Map7d1^{AC/AC}* マウス胎仔の脛骨長が短くなる事が確認できた。トルイジンブルー染色を行った組織切片を用いて、軟骨組織と接する骨組織の領域を観察したところ、野生型と *Map7d1^{AC/AC}* マウス胎仔では構造や細胞の集積が異なる可能性を見出した。

Map7D1 は MAP7 ファミリーに属し、他に 4 つのパラログが存在する。私共は HeLa 細胞を用いた解析により Map7D1 と Map7 が機能重複する事を報告しており (*EMBO Rep.*, 2018.)、軟骨組織においても機能重複する可能性を考え、軟骨組織における MAP7 ファミリー遺伝子の発現量を RT-qPCR により解析した。軟骨組織では *Map7d1* の発現量が最も多く、Map7 の発現量はかなり低い事がわかった。従って、以降の解析は Map7D1 のみに着目して解析を行う事にした。

RT-qPCR の結果を踏まえ、組織切片を用いた免疫染色によって、軟骨細胞の分化状態に応じた Map7D1 の発現パターンを解析した。*Map7d1-egfp^{KI}* 新生仔マウスより採取した後肢・軟骨組織を抗 GFP 抗体、及び、抗 Col2a1 抗体（軟骨細胞マーカー）を用いた免疫二重染色により観察した結果、Map7D1 の発現が前肥大軟骨細胞層で上昇する事を見出した。また、野生型新生仔マウスより採取した後肢・軟骨組織を抗 Map7D1 抗体で染色した場合にも同様の結果が得られた。さらに、ホールマウント免疫染色により軟骨細胞内における Map7D1 の局在パターンを解析したところ、休止/増殖軟骨細胞層の軟骨細胞において Map7D1 は中心体に局在し、前肥大軟骨細胞層の軟骨細胞では中心体の局在化が減弱し、細胞質や微小管上に局在化するようになり、分化状態によって局在化パターンが変化する事を見出した。

軟骨組織のカラム形成には、軟骨細胞の細胞極性：紡錘体軸/細胞挿入/繊毛形成/配列保持が必須である。細胞分裂とカップルした紡錘体軸の制御、及び、分裂後の姉妹細胞間で行われる細胞挿入は増殖軟骨細胞層で観察される。一方で、軟骨細胞の繊毛は増殖軟骨細胞層以降で発達し、方向性が決定・維持され、前肥大軟骨細胞層で発現する Indian Hedgehog (Ihh) などの外因性のシグナルを感受して肥大軟骨細胞へと分化していくと考えられている。また、細胞挿入後に配列した軟骨細胞は増殖軟骨細胞層以降も配列が保持されて分化していく。骨形成に関する表現型解析の結果に加え、Map7D1 の発現上昇が前肥大軟骨細胞層で認められ、また、繊毛の基底部として機能する中心体に局在した事から、Map7D1 が繊毛の発達や方向性の決定/維持、及び、配列保持に関与する可能性を考えている。さらに、*Map7d1^{AC/AC}* マウス胎仔において、軟骨組織と接する骨組織の構造や細胞の集積が異なる可能性を見出している事から、*Map7d1* の欠損により生じる軟骨細胞の分化の乱れが骨形成に必要な細胞間相互作用に影響すると考えられる。私共は、Map7D1 の機能をより正確に理解するために、タモキシフェン投与により軟骨細胞特異

的に *Map7d1* 遺伝子を欠損できる Cre-LoxP コンディショナルノックアウト (cKO) マウス : *Col11a2-CreERT2; Map7d1^{flax/flax}* を樹立しており、解析を進めている。

<引用文献>

- ① Kikuchi, K.^{*}, Nakamura, A., Arata, M., Shi, D., Nakagawa, M., Tanaka, T., Uemura, T., Fujimori, T., Kikuchi, A., Uezu, A., Sakamoto, Y., and Nakanishi, H.[†] Map7/D1 and Dvl form a feedback loop that facilitates microtubule remodeling and Wnt5a signaling. *EMBO Rep.* 19: e45471, 2018. (*, 筆頭責任著者 ; †, 第二責任著者)

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 1件）

1. 著者名 Kikuchi Koji, Sakamoto Yasuhisa, Uezu Akiyoshi, Yamamoto Hideyuki, Ishiguro Kei-ichiro, Shimamura Kenji, Saito Taro, Hisanaga Shin-ichi, Nakanishi Hiroyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Map7D2 and Map7D1 facilitate microtubule stabilization through distinct mechanisms in neuronal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202201390	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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kikuchi Koji, Nakagawa Mami, Fujimori Toshihiko, Shimada Ryuki, Fujimura Sayoko, Usuki Shingo, Yasunaga Kei-ichiro, Araki Kimi, Ishiguro Kei-ichiro
2. 発表標題 Map7 regulates Sertoli cell polarity to support the differentiation of male germ cell lineages.
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会「生殖の多様性」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kikuchi Koji, Nakagawa Mami, Fujimori Toshihiko, Araki Kimi, Shimamura Kenji, Ohta Kunimasa, Nakamura Akira, Suzuki Makoto, Ishiguro Kei-ichiro
2. 発表標題 Conserved Map7/7D1/Ens proteins coordinate microtubule remodeling and Wnt/PCP signaling for cell polarity formation.
3. 学会等名 EMBO Workshop Wnt2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuchi Koji, Nakagawa Mami, Fujimori Toshihiko, Fujimura Sayoko, Araki Kimi, Ishiguro Kei-ichiro
2. 発表標題 Map7 Regulates Sertoli Cell Polarity to Support the Differentiation of Germ Cell Lineages.
3. 学会等名 The 68th NIBB Conference "Principles of Cell Communication in the Tissue"（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuchi Koji , Nakagawa Mami , Fujimori Toshihiko , Araki Kimi , Ishiguro Kei-ichiro
2. 発表標題 Map7 regulates Sertoli cell polarity through microtubule-Wnt/PCP network to support the differentiation of sperm lineage cells.
3. 学会等名 第55回日本発生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuchi Koji , Sakamoto Yasuhisa , Uezu Akiyoshi , Yamamoto Hideyuki , Ishiguro Kei-ichiro , Shimamura Kenji , Saito Taro , Hisanaga Shin-ichi , Nakanishi Hiroyuki
2. 発表標題 細胞運動や神経突起伸長における微小管ダイナミクスの新規制御機構
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuchi Koji , Sakamoto Yasuhisa , Uezu Akiyoshi , Yamamoto Hideyuki , Ishiguro Kei-ichiro , Shimamura Kenji , Saito Taro , Hisanaga Shin-ichi , Nakanishi Hiroyuki
2. 発表標題 Map7D2 and Map7D1 facilitate microtubule stabilization through distinct mechanisms in neuronal cells.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、荒木 喜美、石黒 啓一郎
2. 発表標題 哺乳類動物の組織形成における新たな細胞極性形成メカニズムの機能解明
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池 浩二, 坂本 泰久, 上江洲 章吉, 嶋村 健児, 石黒 啓一郎、中西 宏之
2. 発表標題 Map7D2 and Map7D1 facilitate microtubule stabilization through distinct mechanisms to control cell motility and neurite outgrowth.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、石黒 啓一郎、荒木 喜美、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 Microtubule-Wnt/PCP network is evolutionarily conserved for cell polarity regulation during tissue formation.
3. 学会等名 第94回日本生化学大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、石黒 啓一郎、荒木 喜美、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 Microtubule-Wnt/PCP network is evolutionarily conserved for cell polarity regulation during tissue formation.
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、石黒 啓一郎、荒木 喜美、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 Microtubule-Wnt/PCP network is evolutionarily conserved for cell polarity regulation during tissue formation.
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、畠山 淳、佐藤 晴香、嶋村 健児、太田 訓正、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 組織形成における微小管結合タンパク質：Map7D1の時空間的な制御による細胞極性の調節メカニズム
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、畠山 淳、佐藤 晴香、嶋村 健児、太田 訓正、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 組織形成における微小管結合タンパク質：Map7D1の時空間的な制御による細胞極性の調節メカニズム
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、石黒 啓一郎、中村 輝、荒木 喜美、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 Map7D1の時空間的な制御による細胞極性形成メカニズムとその異常による組織形成の破綻
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、畠山 淳、佐藤 晴香、嶋村 健児、太田 訓正、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 細胞極性の新たな分子メカニズム：微小管 - Wnt/PCP ネットワークの組織形成への関与
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会・第19回日本蛋白質科学会年会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 浩二
2. 発表標題 細胞極性形成における微小管とWnt/PCPシグナルをつなぐ新たな分子メカニズム
3. 学会等名 植物細胞骨格研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、畠山 淳、佐藤 晴香、嶋村 健児、太田 訓正、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 細胞極性形成における微小管とWnt/PCPシグナルをつなぐ新たな分子メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 浩二、中川 真美、藤森 俊彦、畠山 淳、佐藤 晴香、嶋村 健児、太田 訓正、中村 輝、鈴木 誠、中西 宏之
2. 発表標題 Map7D1, a Regulator of Microtubule-Wnt/PCP Network, Is Involved in Mammalian Tissue Morphogenesis.
3. 学会等名 ABiS Symposium "Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging" (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Science Japan https://sj.jst.go.jp/news/202206/n0622-02k.html 神経細胞の「かたち」や「うごき」を調節する新たな仕組みの解明 https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20220425 神経細胞の「かたち」や「うごき」を調節する新たな仕組みの解明 https://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np134/ Researchmap: http://researchmap.jp/read0147459/ ORCID: http://orcid.org/0000-0002-7616-8200 Web of Science: https://www.webofscience.com/wos/author/record/W-1048-2017 Researchgate: https://www.researchgate.net/profile/Koji_Kikuchi/
--

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