

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18780

研究課題名（和文）ICK繊毛キナーゼが内耳有毛細胞の平面内細胞極性を制御するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism underlying planar cell polarity regulation in inner ear hair cells by ICK ciliary kinase

研究代表者

岡本 志央 (Okamoto, Shio)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：10838139

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）：聴覚を司る蝸牛の螺旋構造は、様々な周波数の音を受容する上で重要であるが、これは収斂伸長(CE)と呼ばれる細胞運動により形成される。また蝸牛有毛細胞表面上の平面内細胞極性(PCP)と呼ばれるアクチン突起の非対称性構造により精緻な音の聴取が可能となる。蝸牛において、CEや有毛細胞のPCPは、繊毛により制御されることが知られているが、両者に共通する制御機構については未解明である。本研究では、基質-細胞間に存在する接着斑の構成要素に着目し、その制御機構を解明することを試みた。予想とは異なり、興味深いことに、接着斑構成要素はCEや有毛細胞のPCPではなく、有毛細胞の運命決定に影響することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞外からの機械的刺激が細胞の増殖、分化、移動などを制御することが知られているが、蝸牛の発生における機械的刺激の役割については、その多くが未解明である。本研究は、細胞-基質間に存在する接着斑を介した機械的刺激が、聴覚受容に必須である有毛細胞の運命決定に重要な役割を果たす可能性を明らかにした点で学術的意義がある。また今後、機械的刺激が有毛細胞の運命決定を制御するメカニズムについて明らかにすることにより、現時点では未解明である、有毛細胞障害により一旦失われた聴覚を、意思疎通が可能となるレベルに回復させる手法の解明に大きく貢献できる可能性を秘めており、社会学的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The cochlea, a hearing organ, has a unique spiral structure which makes it possible for us to hear various sound frequency. This structure is formed by convergent extension (CE) that is dynamic cell arrangement. Another structure important for elaborate hearing is planar cell polarity (PCP) which is the U- or V-shaped staircase structure formed by actin protrusion called stereocilia on the apical surface of hair cells. CE and PCP formation in hair cells are regulated by cilia on the apical surface of hair cells in cochlear development, whereas the mechanism these two have in common remains to be explored. To elucidate this mechanism, we focused on the component of focal adhesion between cells and substrates because one of the focal adhesion components were expressed in both apical and basal membranes of progenitor cells. Unexpectedly one of the focal adhesion components we focused on affected cell fate specification, while they affected neither CE nor PCP in hair cells.

研究分野：蝸牛有毛細胞発生

キーワード：蝸牛有毛細胞 運命決定 接着斑

1. 研究開始当初の背景

繊毛は脊椎動物のほぼすべての細胞に存在しており、器官の発生や恒常性維持において重要な役割を果たしている。繊毛の形成不全や機能障害は繊毛病と呼ばれる多彩な症状をきたす症候群を引き起こす。聴覚を司る蝸牛においても繊毛が重要な機能を持つことは、聴覚受容に必須である有毛細胞の繊毛機能不全が、繊毛病の一つであり、難聴をきたす Alström 症候群を引き起こすという研究結果から示唆される(Jagger et al., Human Molecular Genetics, 2011.)。

蝸牛において、音による振動の情報を、脳へ伝えるための電気信号へと変換する場合は、感覚上皮と呼ばれる。感覚上皮は有毛細胞と支持細胞により構成され、両者は共通の前駆細胞より分化する。蝸牛感覚上皮の発生においては、細胞分化、上皮の収斂伸長、有毛細胞の平面内細胞極性(Planar Cell Polarity: PCP)が、同時に、あるいはやや時期をずらしながら進行する。マウスの蝸牛感覚上皮では、前駆細胞は胎生 12.5 日から 13.5 日頃にかけて細胞周期を離脱し、その後有毛細胞および支持細胞への分化へと進む。一方、胎生 14 日から生後 0 日目頃に、感覚上皮は、勾玉状の太く短い構造から、収斂伸長と呼ばれるダイナミックな細胞の配列変化により、その幅を収束させると同時に、前後方向へ伸長し、最終的に螺旋構造となる(図 1)。さらに、有毛細胞への分化が進むと、胎生 15.5 日頃より有毛細胞頂側面に 1 本の繊毛と多数のアクチン突起が出現し、これらは有毛細胞頂側面上を移動し、生後 0 日頃には PCP と呼ばれる非対称性を形成する(図 2)。

私たちは、繊毛タンパク質である Intestinal Cell Kinase(ICK)が、蝸牛感覚上皮の収斂伸長と有毛細胞の PCP の両者を制御することを明らかにした(Okamoto S, et al. J. Neurosci., 2017)。ICK を欠失させた ICK ノックアウト(KO)マウスの蝸牛では、収斂伸長が障害されると同時に、有毛細胞の PCP も障害され、頂側面より突出する 1 本の繊毛と多数のアクチン突起の配列関係が乱れていた。これらの結果から、蝸牛感覚上皮における収斂伸長と有毛細胞の PCP 形成の間には、共通の分子制御機構が存在する可能性が示唆された。

図 1. 蝸牛感覚上皮における収斂伸長の模式図

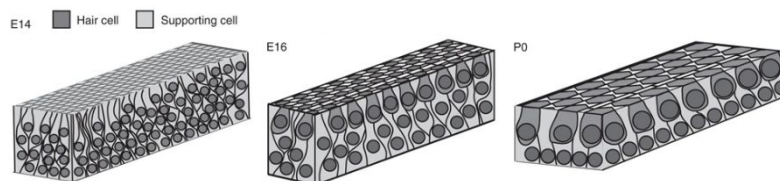
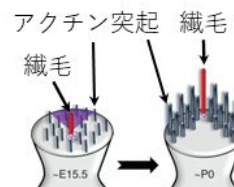


図 2. 有毛細胞の PCP



(Montcouquiol and Kelley, Cold Spring Harb Perspect Med. 2020 より一部改変)

2. 研究の目的

脊椎動物の形態形成過程において、細胞が最終的な配置取りを行う上で、細胞極性の形成や収斂伸長は欠かせない行程である。細胞極性や収斂伸長の研究モデルとして使用されることの多い、原腸陥入期の胚では、細胞極性が、収斂伸長を引き起こす細胞移動の原動力となる。一方、蝸牛感覚上皮では、収斂伸長が細胞移動であるのに対し、有毛細胞の PCP は、細胞頂側面上の繊毛やアクチン突起の移動により形成される。PCP 経路関連タンパク質であるコア PCP タンパク質や、Ift88 などの繊毛タンパク質を欠損させたマウスの蝸牛感覚上皮では、ICK KO マウスの蝸牛感覚上皮と同様に、上皮の収斂伸長と有毛細胞の PCP の両者が障害されるが(Montcouquiol et al., Nature, 2003, Jones et al., Nat Genetics, 2008)、一方で、P120-catenin を欠失させたマウスでは、蝸牛感覚上皮の収斂伸長のみが障害され、有毛細胞の PCP は正常に形成される。さらに Pcdh15 は有毛細胞の PCP 形成を制御するが、収斂伸長には関連しない(Chacon-Heszele et al., Development, 2012)。このため、蝸牛感覚上皮の発生における収斂伸長と有毛細胞の PCP には共通の制御機構が存在するのか、あるいは、各々に対し、別の制御機構が存在するのかについては、一定の結論には至っていない。本研究では、両者に共通の制御機構が存在すると仮定し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

蝸牛感覚上皮の発生段階において、上皮の収斂伸長が、細胞の基質に沿った移動であるのに対し、有毛細胞の PCP 形成は、細胞頂側面に沿った繊毛やアクチン突起の移動であることから、本研究ではまず、前駆細胞の基底面と頂側面の両者に発現する遺伝子に着目することにした。近

年、細胞外からの機械的刺激が細胞の分化、増殖、移動などを制御することが知られている。中でも細胞-基質間に存在する接着斑を介した細胞外シグナルは、細胞内のアクチンフィラメントの挙動を変化させ、それに続く、核膜やクロマチンの構造変化が、遺伝子発現を制御することが報告されている。

そこで、蝸牛感覚上皮の収斂伸長と有毛細胞の PCP の両者を制御する遺伝子の候補として、接着斑の構成要素に着目した。まず蝸牛感覚上皮の発生段階における接着斑構成要素の発現パターンの解析を行い、前駆細胞の基底面と頂側面の両方に発現する構成要素を同定した。続いて、CAGGCre-ERTM マウスを用いて、同定した構成要素の遺伝子を、発生段階の複数の時点において、時期特異的に欠失させ、表現型を観察した。

4. 研究成果

まず初めに、蝸牛感覚上皮の発生段階における、接着斑構成要素の発現パターンを *in situ* hybridization により解析したところ、構成要素の一つである遺伝子 A は、胎生 11.5 日目と 13.5 日目の前駆細胞において、基底面および頂側面の両方に発現していた。そこで、遺伝子 A の蝸牛感覚上皮発生段階における機能について解析するため、CAGGCre-ERTM マウスを用いて、遺伝子 A の flox マウスと交配させることにより、遺伝子 A のコンディショナルノックアウト(cKO) マウスを作製した。タモキシフェン(TAM)を胎生 12.5 日目、13.5 日目、14.5 日目、15.5 日目に投与し、時期特異的に遺伝子 A を欠失させたところ、胎生 14.5 日目、15.5 日目に TAM を投与した cKO マウスでは、コントロールマウスと比較し、細胞の分化や上皮の収斂伸長、有毛細胞の PCP に明らかな差異は見られなかった。しかし、胎生 12.5 日目と 13.5 日目に TAM を投与した cKO マウスの蝸牛は、螺旋状構造を呈してはいたものの、有毛細胞と支持細胞はほとんど見られず、ごく少数存在する有毛細胞と支持細胞は、コントロールマウスの有毛細胞や支持細胞に比べて、免疫染色における特異的マーカーの蛍光強度が低く、極めて未熟な状態であると考えられた。

これらの結果より、遺伝子 A は、蝸牛感覚上皮の収斂伸長や有毛細胞の PCP の制御に関与するという当初の仮説とは異なっていたものの、有毛細胞や支持細胞の運命決定に関与する可能性が示唆された。有毛細胞や支持細胞の運命決定に関しては、これまで Wnt シグナルや Notch シグナル、Fgf シグナルが重要であることは知られているが、細胞外からの機械的シグナルの関与や、機械的シグナルと既知のシグナルとの関連性については、多くが未解明である。さらに、聴覚の再生分野において、これまでの研究では、発生段階において有毛細胞の運命決定に関与する、転写因子を中心とした遺伝子の強制発現が広く行われてきたが、一旦失われた聴覚を、意思疎通が可能なレベルにまで回復させる手法は未解明である。従って、細胞外からの機械的シグナルが有毛細胞の運命決定を制御するメカニズムを解明できれば、今後の聴覚再生研究に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------