

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月18日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790193

研究課題名（和文） 心臓神経堤細胞の発生におけるDlg1の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of Dlg1 function in the development of the cardiac neural crest cells.

研究代表者

向後 晶子 (KOGO AKIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20340242

研究成果の概要（和文）：Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスは、心臓流出路の分離不全や心室中隔欠損を呈する。そこでDlg1 KO マウスで心臓神経堤細胞の分布を観察したが、顕著な異常は認められなかった。一方、Dlg1 KO マウスでは、コルチ器、腸管、尿管、胸骨などで組織の伸長が不十分であった。これらの組織伸長や、心臓流出路の発生には、収斂的伸長機構が必要であることが最近報告されたことから、Dlg1 は収斂的伸長の制御を通じて器官形成に関与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dlg1 gene targeted mice exhibit congenital heart defects including outflow tract separation defect and ventricular septal defect. Distribution of cardiac neural crest cells did not exhibit retarded migration. On the other hand, elongation of organ of Corti, intestine, ureter and sternum was insufficient in these mice. As the convergent extension process was recently reported to be needed in the elongation of these tissues and in the outflow tract development, Dlg1 may be involved in the organogenesis through its role in the convergent extension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：器官形成、Dlg1、心臓、神経堤細胞、コルチ器、細胞極性、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) Dlg1とは

DLGは、ショウジョウバエの上皮細胞における癌抑制因子として同定された、膜関連型グアニル酸キナーゼ蛋白質(MAGUK)の一員である。DLGは上皮組織における頂底極性の形成に

必要な足場タンパク質として働くほか、神経細胞のシナプスで足場蛋白質として働き、神経伝達物質受容体の膜局在に関わる。哺乳類には4種ホモログ分子、Dlg1、PSD-93、PSD-95、NE-Dlgがあり、これらはSAPファミリーを構成している。これらはいずれも神経細

胞に多く発現している。またD1g1は、神経細胞だけでなく上皮細胞にも広く存在している。

(2) 上皮性器官の発生におけるD1g1の機能

哺乳類の発生におけるD1g1の機能に興味をもち、D1g1遺伝子ノックアウト (D1g1 KO) マウスの解析を行ったところ、D1g1 KOマウスでは口蓋裂がみられるほか、腎臓、尿管を始めとする泌尿生殖器の発生異常が生じていた (Development, 2007)。また、腸管の伸長が有意に抑制されていることから、D1g1が体内の様々な上皮組織の形態形成に関与することが示された。しかし一方で、D1g1 KOマウスの腎、尿管の上皮細胞において、ZO-1, E-cadherin といった細胞間接着分子が正常な細胞内分布を示していたことから、マウスではD1g1が欠損していても細胞の頂底極性は少なくともある程度正常に形成されると考えられた。

(3) D1g1 KOマウスにおける心臓奇形

D1g1 KOマウスは、チアノーゼと呼吸困難を呈して出生当日に死亡するが、そのメカニズムは不明であった。上記研究と並行して行ったD1g1 KOマウスの解析過程で、本マウスでは、心室中隔欠損、心臓流出路 (肺動脈、大動脈) の分離不全などが見られることを見出した。総動脈幹の分離と心臓流出路の形成を担う動脈幹隆起の形成には心臓神経堤細胞が必須 (Kirby et al. Science. 1983) であるため、心臓神経堤細胞の発生が何らかの理由で障害されるとD1g1 KOマウス表現型と同様の心大血管奇形が生じる。このことから、D1g1が神経堤細胞の発生に寄与しているのではないかと考えた。そこで平成19-21年度の若手研究 (B) ではこれについての解析を行い、D1g1 KOマウスでは胎生期に動脈幹隆起の形成不全が見られることを明らかにした。さらに、神経堤由来細胞がGFPで標識されるP0-Cre/CAG-GFPトランスジェニックマウスにおいて、遊走時およびその直後の心臓神経堤細胞とその周囲の細胞にD1g1の発現が認められることを確認した。

2. 研究の目的

平成21年度までの研究で、D1g1が心臓神経堤細胞に由来する器官の発生に必須であることが示されたが、これによりさらに新たな疑問が多く生じた。そこで、本研究ではあ、D1g1遺伝子欠損が心臓領域の発生異常を引き起こすメカニズムを解明することを目的として、以下の研究を実施した。

(1) D1g1 KOマウスにおける心臓神経堤細胞の発生異常の解析

D1g1 KOマウスでは、心臓流出路の分離不全や心室中隔欠損の発症が見られる。これらの先天異常は心臓神経堤細胞の遊走異常 (遊走の遅延、遊走細胞数の低下) によって生じることが報告されている。D1g1 KOマウスの心臓、心臓流出路に先天異常が生じる原因が、心臓神経堤細胞にあるならば、D1g1 KOマウスでは心臓神経堤細胞の遅延や遊走量低下が認められる可能性があるため、それを検証する。

(2) D1g1の分子機能の解明

D1g1は足場蛋白質としての性質をもつため、その機能は、他蛋白質との相互作用において発揮されると考えられる。そこで心臓発生におけるD1g1分子の機能を解明するため、D1g1の細胞内機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) 神経堤標識D1g1 KOマウスの確立とD1g1 KOマウスにおける神経堤細胞の遊走の解析
P0-Cre Tgマウス、CAG-GFP Tgマウス、D1g1 KOマウスの交配により、3種の外来遺伝子配列 (P0-Cre Tg, CAG-EGFP Tg, D1g1変異アリル) をもつマウスを得た。このマウスを交配し、妊娠マウスから、心臓流出路の形成が盛んに行われる胎生11.5日を中心として胎仔心臓領域をサンプリングした。この中から、PCRによるジェノタイプングでP0-Cre TgとCAG-EGFP Tgの両方を持つマウス (すなわち神経堤由来細胞が蛍光標識されるマウス) を選び、さらにD1g1遺伝子の有無を確認し、実態顕微鏡下および凍結切片上での間でEGFP標識された神経堤由来細胞の分布を比較した。

(2) D1g1 KOマウスにおける平面内極性の解析

① コルチ器表面サンプルの観察

胎生18.5日のマウス胎仔を子宮から摘出し、側頭骨を正中割断して4%パラホルムアルデヒドにて一晩固定した。側頭骨から蝸牛管を取り出し、蝸牛軸、ラセン靱帯を除き、前庭膜を切開してコルチ器を露出させ「コルチ器表面サンプル」を作製した。Alexa標識ローダミンでコルチ器表面サンプルを染色し、通常の蛍光顕微鏡若しくは共焦点レーザー顕微鏡にて有毛細胞の形態を観察した。

② コルチ器有毛細胞の増殖解析

有毛細胞増殖パターンの異常の有無を調べるため、胎生14.5日から16.5日まで母マウスにBrdUを腹腔投与してS期の細胞を標識し、胎生18.5日にコルチ器を採取した。

③ コルチ器有毛細胞の免疫組織化学

胎生18.5日のコルチ器表面サンプルを作成し、抗Dlg1抗体、抗Fzd3抗体Alexa標識2次抗体を用いてホールマウント免疫組織化学染色を行い、細胞内局在様式を観察した。またp27kip1、ミオシン6、BrdUの検出においては、コルチ器の凍結切片を作成し、通常の方法で抗p27kip1抗体、抗BrdU抗体、抗ミオシン6抗体とAlexa標識2次抗体を用いて免疫組織化学法を行った。BrdU検出時には、105°Cで15分間、クエン酸による抗原賦活化処理を行った。

4. 研究成果

(1) 心臓神経堤細胞の遊走

流出路や心室の中隔形成不全の原因のひとつに、心臓神経堤細胞の遊走障害があることが知られていることから、胎生11.5日～18.5日のP0-Cre, CAG-EGFPマウス胎仔を得て心臓流出路部分の神経堤細胞を観察した。その結果、Dlg1遺伝子ノックアウトマウスにおいて、神経堤細胞遊走の時期および量に明らかな異常は認められなかった。一部のDlg1 KOマウスでは、心臓領域で神経堤細胞の顕著な減少が認められたが、Dlg1遺伝子ノックアウトマウス全体の約70%の個体で心室中隔欠損が、また約45%で心臓流出路の分離不全が見られることから、観察された神経堤細胞の減少がこれらの心奇形の直接の原因になっているとは考えにくい。一方、Dlg1遺伝子ノックアウトマウス発生初期の心臓流出路における神経堤細胞の分布は、野生型マウスと比較してやや乱れているという傾向が見られた。

(2) Dlg1 KOマウスにおける平面内極性

2010年に、平面内細胞極性形成に異常があるマウスでは、心臓流出路や心室中隔の癒合不全といった、主に身体の正中部での組織癒合に異常が見られることが報告された。正中部での組織の癒合異常は、Dlg1 KOマウスで見られる表現型の多くに共通している。そこで、Dlg1 KOマウスにおいても、平面内極性に異常が生じ、これが発生異常を引き起こしているのではないかと考えた。哺乳類では、コルチ器有毛細胞の不動毛の向きが、平面内極性を反映することが知られている。すなわち、平面内極性形成に異常のある動物では、本来揃うはずの不動毛の向きがランダムになる。また、有毛細胞内のVangl2, Fzd3などの極性因子の分布パターンも、平面内極性を反映している。そこで本研究では、Dlg1遺伝子の欠損が平面内極性に影響を及ぼす可能性を検証するためコルチ器を観察した。しかし、不動毛の配向、fzd3の細胞内局在とともに異常は見ら

れなかった。

一方、コルチ器観察の過程で、Dlg1 KOマウスでは外有毛細胞および内有毛細胞の過剰列(外有毛細胞:3列→4列、内有毛細胞:1列→2列)が散見された。これらの場所では、支持細胞(Deiter's細胞)も有毛細胞数と対応して増加していた。コルチ器の有毛細胞、支持細胞は、通常、胎生14日までに最終分裂を終えることが知られている。そこで有毛細胞の増殖パターンの異常の有無を調べるため、胎生14.5～16.5日にBrdUを投与して増殖細胞を可視化したところ、Dlg1 KOマウスではBrdU陽性のHensen細胞が増加していたが、BrdU陽性の有毛細胞はほとんど検出されなかった。

(3) Dlg1 KOマウスにおける組織伸長

コルチ器で有毛細胞の過剰列は、Notchシグナル異常によって有毛細胞、支持細胞の運命決定に異常が生じた場合や、組織の収斂的伸長(Convergent extension; CE)過程の異常によってコルチ器および蝸牛管の伸長が阻害された場合などに出現することが報告されている。そこでDlg1 KOマウスのコルチ器を観察したところ、有毛細胞の過剰列の出現は支持細胞の脱落を伴っておらず、また蝸牛管全体の長さが正常マウスに比べ約1割短かった。さらに、コルチ器頂部端では有毛細胞の過剰な多列化が観察された。これらの観察結果から、Dlg1 KOマウスコルチ器では収斂的伸長の過程に何らかの異常が生じ、これにより有毛細胞の配列が乱れたものと考えられた。

そこで次に、Dlg1 KOマウスにおける組織の伸長過程を検討した。その結果、Dlg1 KOマウスでは、腸管、尿管、胸骨長において有意な短縮が認められ、また上肢、下肢の長管骨についても全般的に拡張・短縮の傾向が見られた。

腸管、尿管の伸長には、非古典的Wntシグナル経路が必要であると報告されており、腸管伸長の過程では上皮細胞が収斂的伸長運動を示す。また、心臓流出路の発生においても、組織の収斂的伸長が関与すると報告されている。以上の知見から、Dlg1 KOマウスにおける心臓発生異常は、組織の伸長不全に起因する可能性があると考えられる。

(4) 平面内極性形成シグナルと組織伸長

平面内極性は、PCP経路と呼ばれるシグナル伝達経路によって形成される。PCP経路においては、Fzdによって細胞内に伝えられたWntシグナルによって、RhoファミリーG蛋白質の活性化を通じ最終的には細胞骨格の再編成がおこると考えられている。哺乳類で平面内極性形成の指標として最もよく知られているのがコ

ルチ器有毛細胞の不動毛の向きである。一方、PCPシグナル因子の欠損は収斂的伸長を阻害することが知られている。収斂的伸長は、細胞が互いの隙間に入り込むように動くことによって、組織の幅が狭まり縦方向に伸長する形態変化である。収斂的伸長と平面内極性形成とが、PCPシグナル経路のもとでどのようにコントロールされているか、現時点で詳細は不明で、今後の全容解明が待たれている。Dlg1 KOマウスでは、コルチ器有毛細胞の不動毛の向きは正常であったにもかかわらず、有毛細胞の配列が異常だったことから、収斂的伸長に異常があったと推測される。Dlg1はいわゆる平面内極性形成には関わらず、収斂的伸長だけを特異的に制御するのかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Atsushi Yokoyama, Ryuji Nomura, Masafumi Kurosumi, Atsushi Shimomura, Takanori Onouchi, Akiko Iizuka-Kogo, Ron Smits, Riccardo Fodde, Mitsuyasu Itoh, Takao Senda
Some fine-structural findings on the thyroid gland in Apc1638T/1638T mice that express a C-terminus lacking truncated Apc.
Medical molecular morphology (査読有) 45: 161-167, 2012
- ② Atsushi Yokoyama, Ryuji Nomura, Masafumi Kurosumi, Atsushi Shimomura, Takanori Onouchi, Akiko Iizuka-Kogo, Ron Smits, Naohisa Oda, Riccardo Fodde, Mitsuyasu Itoh, Takao Senda
The C-terminal domain of the adenomatous polyposis coli (Apc) protein is involved in thyroid morphogenesis and function
Medical Molecular Morphology (査読有) 44(4): 207-212, 2011
- ③ Masatomo Kusaka, Yuko Katoh-Fukui, Hidesato Ogawa, Kanako Miyabayashi, Takashi Baba, Noriyuki Sugiyama, Yukihiko Sugimoto, Yasushi Okuno, Ryuji Kodama, Akiko Iizuka-Kogo, Takao Senda, Shinichi Aizawa, Ken-ichirou Morohashi
Abnormal epithelial cell polarity and

ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads.

Endocrinology (査読有) 151(12): 5893 - 904. 2010

- ④ Yoshimi Hasegawa, Akiko Iizuka-Kogo, Tetsu Akiyama, and Takao Senda
High Expression of Pitx-2 in the ICAT-deficient Metanephros Leads to Developmental Arrest.
Acta Histochem Cytochem. (査読有) 43(2): 51-59, 2010

[学会発表] (計4件)

- ① 向後晶子、千田隆夫、松崎利行
Dlg1 は収斂的伸長 (convergent extension) 機構による組織の伸長に必要なである (ポスター)
第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 サポートホール高松・かがわ国際会議場 (高松、2013. 3. 29)
- ② 向後晶子、日置達也、千田隆夫
Dlg1 遺伝子欠損マウス表現型の発症メカニズムの解析 (ポスター)
第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学 (甲府、2012. 3. 26)
- ③ 向後晶子、千田隆夫
Dlg1 KO マウスにおける内耳有毛細胞の異常 (口演)
日本解剖学会第71回中部支部学術講演会、名古屋大学 (名古屋、2011. 10. 15)
- ④ 向後晶子、千田隆夫
Dlg1 は心臓流出路の中隔形成に必要なである (誌上発表)
第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2011. 3. 28)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/bioreg/bioreg-metabolism/113.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向後 晶子 (KOGO AKIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20340242

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし