

## 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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791599

研究課題名（和文）嗅神経細胞の発生・再生におけるネクチン・ファミリーを中心とした分子機構の解明

研究課題名（英文）Roles and modes of nectins in the development and regeneration of the olfactory epithelium

研究代表者

勝沼 紗矢香（SAYAKA KATSUNUMA）

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80457043

研究成果の概要（和文）：

嗅上皮は鼻腔の後上方に位置し、匂いを受容する感覚上皮である。今回の研究で、嗅上皮の発生・再生において、支持細胞と嗅細胞の細胞配列が変化する過程を観察した。我々は嗅上皮の発生過程においてネクチンが異なるパターンで局在していることを明らかにした。さらに異なる種類の接着分子を発現させた細胞を作成したところ、接着分子の違いにより細胞配列が制御されることが示唆された。以上より、嗅上皮の細胞配列変化にネクチンが働いていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The olfactory epithelium, which is located inside the nasal cavity, is a specialized sensory epithelium. In this study, we observed the cellular arrangements of supporting cells and olfactory cells in the developing mouse olfactory epithelium. We found that nectins were distributed in differential and complementary patterns in the apical cell-cell contact sites of the olfactory epithelium. We investigated the effect of a mixed culture experiment of the cells expressing differential adhesion molecules. Various cellular arrangements were formed depending on the adhesion molecules. Thus, we revealed that interactions of nectins are implicated in these cellular rearrangements in the olfactory epithelium.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：嗅上皮

## 1. 研究開始当初の背景

嗅上皮は嗅覚を担う感覚器官であり、再生することが知られているが、嗅上皮がどのように発生・再生するかははまだ

不明な点が多い。嗅上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞で構成され、層構造を形成している。最も表層には一列の支持細胞、その下には数列の嗅細胞、基底膜直

上には基底細胞の細胞体が並ぶ。嗅細胞の発生・再生は、基底細胞が分裂して嗅細胞が生まれることから始まり、嗅細胞はその細胞体を表層へと移動させながら、またその樹状突起を表層へと伸長させながら成熟していく。嗅上皮を頂端面側からみると一面に並んだ支持細胞の間に嗅細胞の樹状突起が突出した特徴的な細胞配列を形成しているが、このような規則的な細胞配列が形成される分子機構と、形成された細胞配列や層構造がどのように機能と結びついているかについては、いまだ十分に明らかにされていない。

嗅上皮の発生・再生過程では、嗅細胞と支持細胞が成熟するに伴って細胞の形を変化させ、頂端面側の細胞が再配列する。発生過程のげっ歯類嗅上皮を頂端面側から観察すると、胎生 14 日頃に支持細胞が不揃いな形で出現し、次第にその大きさと形が整ってくる。基底層で生まれた嗅細胞は、その樹状突起を表層まで伸長させ、胎生 16 日頃には支持細胞に隔てられて、互いに接することのないように配列していく。生後、この樹状突起は支持細胞境界だけでなく、ひとつの支持細胞内に囲いこまれる位置にも存在するようになる。また傷害による再生を誘導したモデルを用いた嗅上皮再生過程でも、発生過程と同様に嗅上皮頂端面側の細胞配列が変化していく。

広く共通した事象として、細胞の運動や形態変化には、細胞接着分子カドヘリン・ネクチンが深く関与することが知られている。ネクチンは生体内で重要な働きをする細胞接着分子の一つであり、ネクチン-1 から-4 まで 4 つのタイプから構成される。ネクチンは細胞内で結合するアフアディンを介して、接着分子カドヘリンと相互作用しながら細胞間接着の形成を促進することが知られており、最近組織の形態形成においてもこれらの接着分子が重要な役割を担うことが報告されているが、嗅上皮の形態形成における接着分子の役割については十分な知見が得られていない。

このような背景をもとに以下のような研究を計画した。

## 2. 研究の目的

発生・再生過程の嗅上皮では嗅細胞と支持細胞が再配列して形態が形成される。細胞接着分子は嗅上皮の形態形成に重要な役割を持つと考えられるが、その機能については明らかにされていない。そこで本研究

では、嗅上皮の形態形成における細胞配列の制御機構の解明と細胞接着分子ネクチンとカドヘリンによる嗅上皮の細胞配列形成機構の解明に焦点を絞り、嗅上皮の発生・再生の分子機構の解明を目指した。

嗅上皮の発生・再生機構を明らかにすることは、将来の感覚器の再生医療の礎となるだけでなく、発生における形態形成機構の分子基盤を明らかにする上でも非常に重要な問題であり、鼻科学分野はもちろんのこと、発生生物学分野にも大きな貢献ができることを期待できる。

## 3. 研究の方法

嗅上皮の発生・再生における細胞接着分子の機能を明らかにする目的で、(1) 嗅上皮の形態形成における細胞配列の制御機構 (2) 細胞接着分子ネクチンとカドヘリンによる嗅上皮の細胞配列形成機構、に着目して研究をすすめた。これまでの知見と我々のデータから、ネクチンとカドヘリンによる選択的な細胞間接着が嗅上皮の形態形成を制御している可能性を想定し、培養細胞を用いた細胞選別実験と、ノックアウトマウスを用いた組織レベルの研究を組み合わせることにより、嗅上皮の形態形成機構を統合的に検討した。

(1) ネクチンが、嗅細胞の樹状突起を嗅上皮表層に突出させる過程で重要な役割を担っている可能性を想定した。ネクチン KO マウス嗅上皮では、発生・再生過程での嗅細胞の形態変化の異常と、それに伴って層構造と頂端面側の細胞配列に異常が生じると予想される。発生・再生過程におけるネクチン KO マウス嗅上皮において、いつどのように構造異常や接着分子の発現異常が生じるかを検証することで、接着分子が嗅上皮の形態形成を制御する機構を明らかにする。

上記の可能性を検証する目的で、鼻腔の薄切標本と嗅上皮ホールマウント標本を用いて、層構造と嗅上皮頂端面の細胞配列を蛍光免疫染色の手法を用いて観察した。また再生を誘導するモデルとして、抗甲状腺薬チアマゾール投与による嗅上皮再生モデルを作成することにより検証した。このモデルは、げっ歯類に抗甲状腺薬チアマゾールを腹腔内投与すると、嗅上皮が基底細胞直上の層から脱落し、数日後より再生が開始され、約 4 週間後にはほぼ投与前の

状態まで再生するという、嗅上皮再生モデルとして非常に有用な方法であり、安定した手技を確立してきてきた。また、発生における嗅上皮頂端面の細胞配列形成の過程とこのモデルでの再生における細胞配列形成の過程は類似しており、嗅上皮の形態形成においてこの再生モデルは極めて有用であった。

(2) 嗅上皮の頂端面側では嗅細胞が支持細胞に隔てられて互いに接することなく配列している。ネクチンやカドヘリンは細胞間の識別や選別にも関与することから、両者が発現する相補的な接着分子の組み合わせによって、嗅上皮の細胞の再配列が行われ、このような特徴的な配列が形成されている可能性がある。細胞が接着分子を介して互いを認識・選別してどのように細胞配列を形成するかを培養細胞を用いて検証することによって、接着分子が嗅上皮頂端面側の細胞配列を制御する機構を明らかにする。

上記の可能性を検証する目的で、培養細胞を用いた細胞混合実験を行った。接着分子をもたない培養細胞に任意の接着分子を発現させ培養皿上でこれらの細胞を混合培養し、細胞が接着分子を介して形成する細胞配列を蛍光免疫染色の手法を用いて観察した。

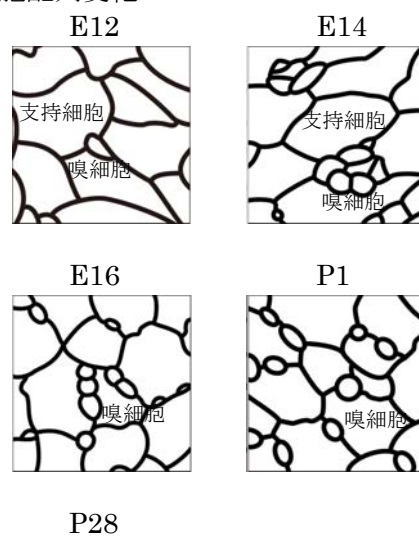
#### 4. 研究成果

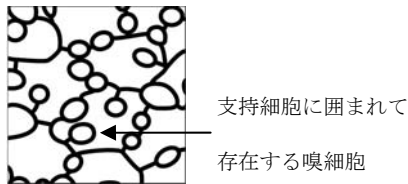
申請者は、従来汎用されている嗅上皮の薄切標本に加え、新たにホールマウント標本での観察技術を確認した。薄切標本は嗅上皮の層構造の観察に適しているが、その一方、頂端面側の細胞配列について得られる情報は極めて限定的であり、また各々の細胞が発現している接着分子の同定についても断定的な情報が得られにくい。申請者のこれまでの研究により、嗅上皮ホールマウント標本を用いることで嗅上皮を頂端面側からみた細胞配列において新しい知見が得ることができた。さらにこの手法によって、嗅上皮を構成する支持細胞と嗅細胞が異なる種類のネクチンとカドヘリンを特徴的なパターンで発現することを明らかにし、この結果から培養細胞による細胞配列機構の検証を行うまでに至った。また、薄切標本とホールマウント標本の両方を用いること

で、嗅細胞の形の変化や嗅上皮層構造と頂端面側の細胞配列の両面から情報を得ることができる。ネクチンは嗅細胞の樹状突起を嗅上皮表層に突出させる過程で重要な役割を担っている可能性が高く、この機構を明らかにするためには薄切標本とホールマウント標本を用いて総合的に検証し、嗅細胞の形の変化とそれに伴う層構造と頂端面の細胞配列形成をより空間的に解析することが必要であった。

まず、嗅上皮の発生過程における細胞配列変化を明らかにするため、マウス嗅上皮頂端面側の細胞配列変化を発生過程において嗅上皮ホールマウント標本を用いて観察した(図1)。胎生12日目には支持細胞境界において嗅細胞樹状突起がわずかに観察され、胎生14日目になると樹状突起は支持細胞境界にクラスターを作って存在していた。胎生16日目になると嗅細胞樹状突起は支持細胞境界に1列に並ぶようになり、さらにステージが進むと、これら樹状突起は接着を解消して支持細胞境界に単独に存在するようになった。成熟してくると、樹状突起の中には支持細胞に囲まれる形で存在するものもみられるようになった。このように嗅上皮が頂端面側の細胞配列を変化させながら発生・成熟していく経過を嗅上皮ホールマウント標本を用いて明らかにした。

図1 嗅上皮発生過程における頂端面側の細胞配列変化





続いてこれら嗅上皮における細胞配列変化に接着分子が関わっているかどうか検討するために、まず、成熟マウス嗅上皮におけるカドヘリンとネクチンの発現を蛍光免疫染色の手法を用いて観察した。その結果、嗅上皮を構成する支持細胞と嗅細胞では異なるタイプのカドヘリンとネクチンが特徴的なパターンで発現していることが明らかになった。

E-カドヘリンは支持細胞に、N-カドヘリンは主に嗅細胞に発現しており、相補的な発現をしていた(図2)。ネクチン-1は成熟マウス嗅上皮にはほとんど発現していなかった。ネクチン-2は嗅細胞と支持細胞の両方に発現しており、ネクチン-3は支持細胞に発現していた(図3)。

図2 嗅上皮におけるカドヘリンの局在

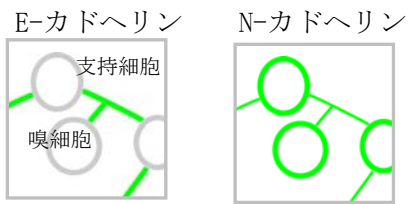
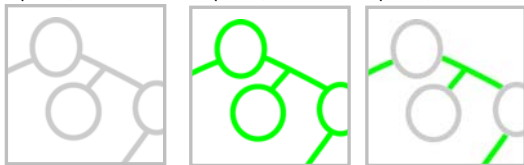
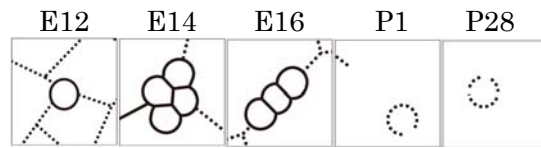


図3 嗅上皮におけるネクチンの局在  
ネクチン-1    ネクチン-2    ネクチン-3



続いて嗅上皮頂端面側における細胞配列変化すなわち細胞移動においてこれらの接着分子がどのように関与しているか検討するために、嗅上皮発生過程におけるカドヘリンとネクチンの局在を蛍光免疫染色の手法を用いて観察した。その結果、発生過程の嗅上皮において、カドヘリンとネクチンの発現パターンが経時的に変化することが明らかになった。ネクチン-1の発現は胎生期にすべての細胞境界に発現するものの、成熟期ではほとんど発現がみられなかった(図4)。

図4 嗅上皮発生過程におけるネクチン-1の局在

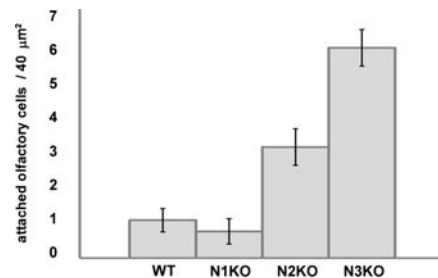


これらの結果から、ネクチンが嗅上皮発生過程の細胞移動に重要な働きをすることが想定された。

そこで、嗅上皮におけるネクチンの働きを検討するため、ネクチンノックアウトマウス嗅上皮の形態を解析した。ネクチンノックアウトマウス嗅上皮では、成熟嗅上皮においても接着したままの嗅細胞が異常な頻度で観察された。嗅上皮頂端面側の支持細胞と嗅細胞による細胞配列に異常がみられたことから(図5)、嗅上皮の細胞配列の形成にネクチンが寄与していることが示唆された。

さらに、発現する接着分子の組み合わせ

図5 ネクチン KO マウスにおける異常嗅細胞の割合



せで、嗅上皮と支持細胞の配列が制御される可能性を検証する目的で、培養細胞を用いた細胞混合実験を行った。接着分子をもたない培養細胞に接着分子ネクチン・カドヘリンを発現させ培養皿上で混合培養した。細胞が接着分子を介して形成する細胞配列を蛍光免疫染色の手法を用いて観察し、接着分子の種類により細胞配列が制御されることが示唆された。

嗅上皮の発生・再生過程において、嗅細胞は基底細胞から生まれ、細胞体を上皮表層へ移動させながら、また樹状突起を上皮表面へ伸長させながら成熟する。その過程において接着分子がどのように関わっているか検討した。

まず嗅細胞樹状突起の形態変化を観察するために、細胞側面に濃縮する分子を用

いて蛍光免疫染色を行った。胎生期にみられる頂端面側からみると接着している嗅細胞樹状突起は、頂端面側より深部では接着していないこと、また成熟嗅細胞の樹状突起は、頂端面側にごく近い位置でのみ支持細胞に囲まれて存在し、深部では支持細胞境界に存在することを、明らかにした。

嗅細胞の成熟に伴っておきる基底から頂端面側の細胞体移動にネクチンが関与しているか検討するために、嗅上皮再生モデルにおけるネクチンの発現を観察した。ネクチンは成熟した嗅上皮では頂端面側の細胞境界にしか観察されないが、発現初期や再生時には細胞側面にも発現していた。すなわちネクチンが細胞側面に発現する時期と嗅細胞樹状突起が接着して伸長する時期はほぼ一致しており、ネクチンが樹状突起を嗅上皮表層に突出されるために重要な役割を担っている可能性が高い。

そこでネクチン KO マウスの成熟嗅上皮を観察したところ、嗅上皮の層構造に異常がみられた。このことから、嗅上皮内における嗅細胞の移動にネクチンが重要な働きを担っていることが示唆された。

#### 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2件)

① Natsumi Uehara, Hitoshi Tanimoto, Tasuku Nishikawa, Kiyoshi Doi, Sayaka Katsunuma, Hidehito Kimura, Eiji Kohmura, Ken-ichi Nibu  
Vestibular dysfunction and compensation after removal of acoustic neuroma.  
Journal and Vestibular Research  
2011;21(5):289-95.

② Ochi N, Doi K, Uranagase M, Nishikawa T, Katsunuma S, Nibu K.  
Bone marrow stem cell transplantation to olfactory epithelium.  
Ann Otol Rhinol Laryngol. 2010 Aug;119(8):535-40.

[学会発表] (計2件)

① Roles and modes of action of nectins and cadherins in the morphogenesis of the olfactory epithelium  
Sayaka Katsunuma  
11th Japan-Taiwan Conference on Otolary

ngology-Head and Neck Surgery (招待講演)  
2011年11月9日 神戸(日本)

② 嗅上皮の形態形成と再生における細胞接着分子の機能  
勝沼 紗矢香  
日本鼻科学会 2010年8月25日 仙台(日本)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
勝沼 紗矢香 (SAYAKA KATSUNUMA)  
神戸大学・医学部附属病院 助教  
研究者番号: 80457043

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者