

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791777

研究課題名(和文) 嗅上皮の発生・再生における形態形成を制御する細胞接着分子の機能解析

研究課題名(英文) The role of adhesion molecules in morphogenesis of the olfactory epithelium during development and regeneration

研究代表者

勝沼 紗矢香 (Katsunuma, Sayaka)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80457043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：嗅上皮頂端面側では、嗅細胞と支持細胞が特徴的な細胞配列を形成しているが、その形成機序は不明である。申請者は接着分子に着目し、嗅上皮の細胞配列形成機序を明らかにした。マウス嗅上皮の発生・再生過程において、嗅細胞と支持細胞は再配列すること、細胞が接着分子ネクチンとカドヘリンを特徴的なパターンで発現し、これら欠損マウス嗅上皮における細胞配列の異常を明らかにした。細胞配列形成における接着分子の働きを検証するため、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て培養皿上で細胞混合培養を行ったところ、特徴的な細胞配列を形成した。以上より、嗅上皮の細胞配列形成に接着分子が寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the apical surface of the olfactory epithelium (OE), olfactory cells and supporting cells are arranged in a characteristic mosaic pattern. However, how the cellular pattern is established is still unclear. We clarified the role of adhesion molecules in the cellular patterning of the OE. During development and regeneration of the OE, olfactory cells and supporting cells became rearranged, which expressed various types of adhesion molecules, nectins and cadherins, in various patterns. In the OE of nectin-KO mice, the cellular pattern was disturbed. To validate the role of adhesion molecules in the cellular pattern formation of the OE, we performed mixed cell culture experiments. Optional genes of adhesion molecules were transferred to cell lines without each adhesion molecule. These cells were arranged into characteristic mosaic pattern in culture. These results suggest that adhesion molecules contribute to the cellular pattern formation of the OE.

研究分野：8310

科研費の分科・細目：2

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・再生するかはい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。申請者はこれまでの研究により、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ことを明らかにしてきた(図1)(未発表データ)。発生過程のマウス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。また薬物投与により再生を誘導したモデルマウス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ことを明らかにしてきた(未発表データ)。このような細胞の運動や形態変化には、細胞接着分子が深く関与することが知られている。細胞間接着には、カドヘリンの他にネクチンが関与しており、ネクチンは細胞内で結合するアフアディンを介して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。また最近の研究により、内耳コルチ器の秩序だった細胞配列の形成にネクチンが必須であることが明らかとされている。そこで、マウス嗅上皮におけるネクチンやカドヘリンの蛋白局在を観察したところ、嗅細胞と支持細胞の細胞境界に、異なるタイプのネクチンやカドヘリンが特徴的なパターンで局在していることが明らかとなった。また、発生初期のマウス嗅上皮や、投薬による再生を誘導したマウス嗅上皮を観察したとこ

ろ、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、発生初期や再生時には細胞側面にも局在していた(未発表データ)。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。また嗅上皮頂端面では、嗅細胞は支持細胞に隔てられて互いに接することがない。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が知られていることから、両者が発現する相補的な接着分子の組み合わせにより細胞の再配列が行われ、特徴的な配列が形成されている可能性がある。しかし、これらの分子機構はいまだ明らかにされていない。このような研究背景のもとに本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

嗅上皮は、機能の異なる嗅細胞と支持細胞が層構造を形成し、頂端面側からみると嗅細胞と支持細胞が特徴的な細胞配列を形成している。しかしこれらの層構造と細胞配列がどのように形成され、機能と結びついているかは十分に解明されていない。また接着分子は細胞間の接着を介して細胞の運動や形態変化に深く関与することが知られており、申請者のこれまでの研究でマウス嗅上皮の発生・再生過程において、嗅細胞と支持細胞が異なる接着分子を特徴的なパターンで発現し、これらの細胞が分化後に再配列することが分かってきた。本計画では、接着分子が嗅上皮の発生・再生過程で果たす役割を検証し、嗅上皮の形態形成の機構を解明する。

## 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る。これまでの研究結果から、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する。

本研究では、以下の3点において具体的な工夫を行った。まず1点目として、申請者は、嗅上皮ホルマウント標本による嗅上皮頂端面側の構造の観察技術を確立し用い

ていることである。従来汎用されている嗅上皮の薄切標本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られた(図1)。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という着想に至った。従来の薄切標本とホルマウント標本を用いて総合的に検証し、頂端面側の細胞配列形成をより空間的に解析することができた。2点目として、申請者は嗅上皮再生モデルマウスの作製に習熟しており、同モデルマウスを用いた点である。嗅上皮再生過程の観察には、嗅上皮再生モデルがよく用いられる。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。嗅上皮再生モデルとして非常に有用な方法であり、申請者のこれまでの研究で、マウスのモデル作成において安定した手技を確立している。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、嗅上皮の形態形成の解析において、この再生モデルは極めて有用であることがわかった。3点目として、細胞混合培養実験による細胞選別現象の検証を行った点である。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て培養皿上で細胞混合培養を行った。細胞選別現象を検証することで、接着分子が嗅上皮頂端面側の細胞配列形成に果たす役割を明らかにした。これらの工夫を用いながら、研究を進めた。

#### 4. 研究成果

申請者のこれまでの研究により、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形成を行うこと、および、嗅上皮では様々な細胞接着分子が細胞ごとに異なる発現をしていることを明らかとしてきた。内耳の例と同様に、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。

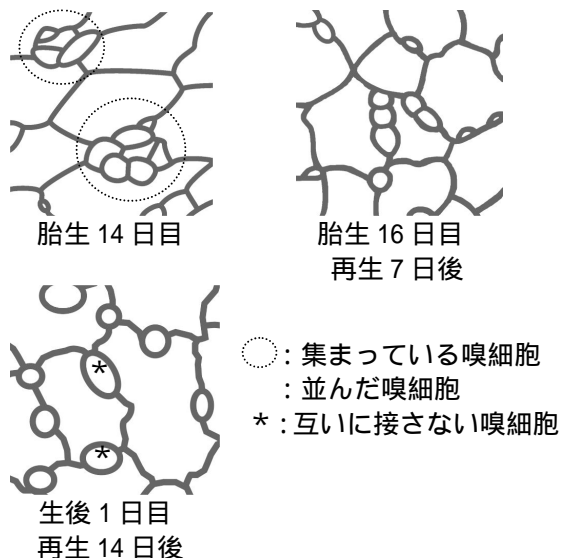


図1: 発生・再生過程における嗅上皮の細胞配列変化

そこで本研究では、以下の2点に焦点を絞り、組織と細胞の両レベルから嗅上皮の発生・再生の分子機構を目指した。組織レベルでは、嗅上皮の形態形成における細胞配列の制御機構を、細胞レベルでは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を検証した。

まず、組織レベルの検証として、嗅上皮の細胞配列形成におけるネクチンとカドヘリンの働きを検証するために、ネクチン及びカドヘリンの細胞内結合分子である  $\alpha$ N カテニンのノックアウトマウス嗅上皮を解析したところ、これらノックアウトマウスの嗅上皮では支持細胞と嗅細胞の配列が乱れていた。通常生後マウスの嗅上皮頂端面側では、嗅細胞樹状突起は支持細胞に隔てられて互いに接することなく存在する。しかし、これらノックアウトマウス嗅上皮では、接着したままの嗅細胞樹状突起が多数存在していた。この嗅上皮頂端面側における細胞配列の異常の程度は  $\alpha$ N カテニンノックアウトマウスで顕著であった(図2)(未発表データ)。

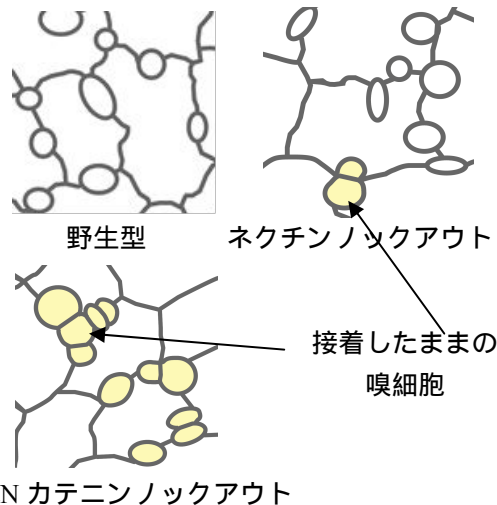
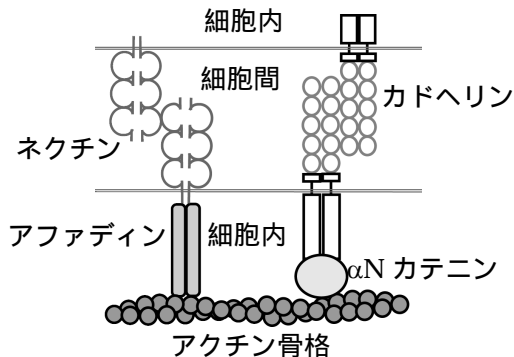


図2: ネクチン並びに  $\alpha$ N カテニンノックアウトマウス嗅上皮の細胞配列

続いて、嗅上皮頂端面側の細胞配列におけるネクチン、カドヘリンの働きを検証するために、これらノックアウトマウス嗅上皮におけるネクチン並びにカドヘリンの蛋白局在の変化を解析したところ、これら分子の局在が変化していることがわかった。このことから、嗅上皮頂端面側の細胞配列形成において、接着分子並びに接着分子間の相互作用が示唆された。そこで、ネクチンとカドヘリンが嗅上皮においてどの細胞に発現しているか確定するために、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、これら接着分子の転写RNAを検出した。その結果、異なるタイプのカドヘリンが、嗅細胞と支持細胞にそれぞれ特徴的に発現していることが分かった。現在ネクチンの発現を確認中である。

ネクチンは細胞内結合分子であるアファディンを通じてアクチン骨格と結合し、カドヘリンは細胞内結合分子であるカテニンを通じてアクチン骨格と結合することで、両者はアクチン骨格を介して相互作用しながら細胞間接着の形成や運動、形態の変化を促進することが *in vitro* の実験で示されている(図3)。そこで、申請者は、嗅上皮の細胞配列に



- ・カドヘリンとネクチンは、それぞれ細胞内結合分子であるαNカテニン並びにアファディンを通じてアクチン骨格と結合する。
- ・両者は細胞と細胞を接着するだけでなく、アクチン骨格を介して互いに協調して働き、細胞の運動や形態変化に深く関与するといわれている。

図3：細胞間接着と細胞間接着分子

におけるネクチン並びにカドヘリンの働きをさらに検討するために、また両者の相互作用を検証するために、マウス嗅上皮においてネアファディンおよびカドヘリンを欠損させて嗅上皮頂端面側の細胞配列に対する影響を解析することを計画した。アファディン並びに古典的カドヘリンのノックアウトマウスは胎生致死であることから、嗅細胞に特異的に発現しているタンパク質であるOlfactory Marker Proteinの発現下でCre酵素を発現するトランスジェニックマウスを用いて、嗅細胞特異的にアファディンとカドヘリンを欠損させる方法を計画し実行した

(図4)。その結果、嗅細胞においてアファディンおよびカドヘリンが欠損したコンディショナルノックアウトマウスが作成できたことを確認している。現在、これらマウス嗅上皮の解析を進めている。

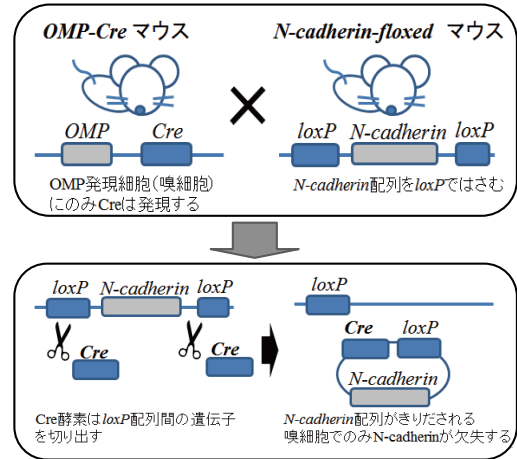


図4：嗅細胞におけるN-カドヘリン条件付きノックアウト

続いて申請者は、マウス嗅上皮頂端面側の細胞配列形成におけるネクチン並びにカドヘリンの機能を検証するために、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を行った。これまでの申請者の研究で、支持細胞と嗅細胞には、異なる種類の細胞接着分子が細胞ごとに異なるパターンで発現していることを明らかとしてきた。実験では、ノックアウトマウスの嗅上皮における細胞配列以上を再現する目的で、ネクチン、カテニン、カドヘリン各々が欠損している細胞株を準備した。これらの細胞株に任意のネクチン、カドヘリン、カテニンを発現させるために、それぞれの遺伝子をもったプラスミドを作成し、細胞株に遺伝子導入をした。嗅細胞で発現している接着分子を発現させた細胞と、支持細胞に発現している接着分子を発現させた細胞を作成し、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経時的に観察したところ、細胞は特徴的な配列を形成した(図5)。この結果は、細胞間接着分子の違いが嗅上皮の支持細胞と嗅細胞の配列形成に寄与していることを示している。

支持細胞のモデル

嗅細胞のモデル

混合培養

細胞配列形成

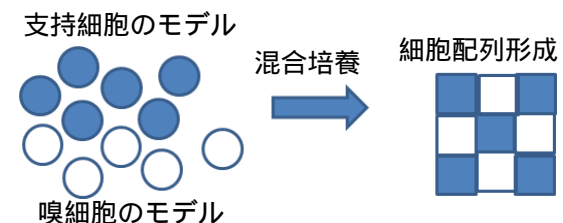


図5：細胞混合培養実験による細胞配列形成

以上の研究成果は、2013 年開催された第 31 回ニューロサイエンス研究会（大阪）並びに、The 16<sup>th</sup> Asian Reseach Symposium in Rhinology（Tokyo）にて発表した。

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）

丹生健一、勝沼紗矢香、福田有里子。【味覚・嗅覚診療の最前線】嗅覚障害の再生医療（解説/特集）日本医師会雑誌. 142 巻 12 号 Page2640（2014.3） 査読なし。

勝沼紗矢香、丹生健一。【においと嗅覚障害】嗅覚系の解剖と生理（解説/特集）耳鼻咽喉科・頭頸部外科. 85 巻 12 号 Page948-953（2013.11） 査読なし。

〔学会発表〕（計 3 件）

— 勝沼紗矢香（7 人中 1 番目）、丹生健一（7 人中 7 番目）ら。神経変性疾患と嗅覚障害。第 52 回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会臨床シンポジウム, 2013 年 9 月 27 日。（招待講演）福井市。

— Katsunuma S, Togashi H, Nibu K, Takai Y. Nectins regulate the mosaic cellular pattern formation in the olfactory epithelium. The 16<sup>th</sup> Asian Reseach Symposium in Rhinology, 2013.8.31. 東京都。（招待講演）

— Katsunuma S, Togashi H, Nibu K, Takai Y. Nectins regulate the mosaic cellular pattern formation in the olfactory epithelium. 第 31 回ニューロサイエンス研究会, 2013 年 8 月 24 日. 大阪市。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝沼 紗矢香（Katsunuma, Sayaka）

神戸大学 医学部附属病院・助教

研究者番号：80457043

研究者番号：

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：80457043