

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861550

研究課題名(和文)内耳感覚上皮発生におけるGSK3情報伝達系の役割と細胞配列パターン形成

研究課題名(英文)Role of the GSK3 signaling in development and cellular patterning of the cochlear sensory epithelium

研究代表者

岡野 高之(Okano, Takayuki)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：60642931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：GSK3の蝸牛感覚上皮の発生における役割を探求するため、胎生期マウス蝸牛の器官培養を4日間行い、培養液中にGSK3阻害薬を投与することにより、GSK3伝達系が阻害された際の表現型を解析した。GSK3は内毛細胞および内柱細胞の領域を拡大するとともに、対照的に外毛細胞の領域を縮小した。細胞系列の追跡により、外毛細胞領域の細胞が、内毛細胞の運命決定を獲得することが判明した。またこれらの効果はBMP4の発現が低下することによりもたらされることが解明された。これらの結果は蝸牛の感覚上皮の発生における内側-外側の軸に沿った細胞配列パターンの決定に必須とされる分子メカニズムの解明に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：To determine whether GSK3 plays a role in medio-lateral patterning within the OC, multiple GSK3 antagonists were tested in vitro in cochlear explants. Inhibition of GSK3 leads to a dramatic increase in the size of the medial domain and a proportional decrease in the size of the lateral domain. Lineage tracing reveals that this shift occurs as a result of lateral cells adopting a medial cell fate. This is significantly different from the changes observed in response to activation of canonical Wnt signaling; an increase in the number of overall hair cells. We have demonstrated that BMP4, an inducer of the lateral OC domain, and its downstream targets are reduced following GSK3 inhibition and that ectopic BMP4 treatment partially rescues the shift in lateral to medial cell fate. This work will help to elucidate the molecular mechanisms that are necessary for patterning the OC along the medio-lateral axis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：蝸牛 発生 細胞配列

1. 研究開始当初の背景

イモリでは成体となってからも失われた手肢が再生することがよく知られており、中でも興味深いのは、再生された器官において、例えば手であれば手掌手背の方向や親指から小指の順序に示されるような、遠位近位、前後および腹背の軸に沿った組織の極性や配列パターンが必ず保たれていることである。イモリがある臓器の切断面から組織を再生する際に、そのごく初期に再生芽の細胞の極性や配列パターンが決定されると考えられているが、この決定に関わる因子は統合的な理解に至っておらず、その多くは未だ不明である。

臓器の極性に関わる因子が臓器の機能に与える影響は、いくつかのヒト先天性疾患において知られている。Kartagener 症候群では内臓逆位や不妊、気道粘膜上皮の不全を来し、また Bardet-Biedl 症候群では知的発達遅滞、心血管奇形、嚢胞腎など多彩な症状を示す。これらの事実は、臓器の極性の存在はその臓器が正常に機能するために重要であることを意味する。

近年の研究で iPS 細胞(induced pluripotent stem cells)などの幹細胞を目的の種類細胞に分化させる可能性や方法が明らかにされており(Zhang, et al., 2009, Choi, et al., 2009)、iPS 細胞を内耳有毛細胞への分化誘導することも実現可能となってきた(Oshima, et al., 2010)。しかし今後ヒト幹細胞から分化させた細胞をまとめあげ一つの機能する臓器を構築するためには、まだいくつかの解決すべき問題点がある。なかでも幹細胞が分化する過程でどのように組織の極性や細胞配列パターンを(再)獲得していくかについては、未知の部分が多い。

臓器の極性や細胞配列パターンという点において、哺乳類の蝸牛はユニークな器官である。蝸牛は内耳の中の音受容を行う器官であり、蝸牛感覚上皮には感覚細胞である有毛細胞が2種類(IHCとOHC)と、有毛細胞の周囲に存在し代謝や力学的保持に関わる支持細胞が少なくとも6種類存在する。そしてそれら多種の細胞が整然と内側(medial)/外側(lateral)の軸に沿って順番に配列されたパターンが一単位を形成する。この一単位が細長く伸びたシート状の蝸牛感覚上皮内で、遠位(distal)/近位(proximal)の軸に沿って繰り返し配列される。さらに有毛細胞の頂面に存在する。不動毛束は規則正しく外側に向いており、平面内での極性(planar cell polarity: PCP) が厳密に制御されている。

蝸牛感覚上皮の極性や細胞配列パターンの組織化は聴覚機能に必須であり、様々な転

写因子や成長因子により制御されていると考えられているが、その多くは未だ解明されていない。胎生期蝸牛の細胞配列パターン形成を制御すると考えられる様々な候補遺伝子の中から、GSK3 情報伝達系の役割に着目した。

2. 研究の目的

GSK3 情報伝達系は Wnt, Shh, そして IGF や FGF などの受容体型チロシンキナーゼなどの入力を受けて、細胞の分化や極性の形成に関わるとされている (Kim, et al., 2009, Kim and Kimmel, 2006)。しかし内耳においては発生最初期の耳板領域決定に関する報告 (Ohyama, et al. 2006) や前庭感覚上皮の細胞分裂に関する報告 (Lu and Corwin, 2008) がみられるのみであり、GSK3 情報伝達系が発生期の蝸牛において果たす役割は依然として不明の点が多い。

本研究では発生期のマウス蝸牛感覚上皮における GSK3 情報伝達系の役割を明らかにし、感覚上皮内の細胞配列パターンの形成における GSK3 と他の情報伝達系の相互作用を解明することを目指す。具体的には以下3点を明らかにすることを目的とする。

A. 発生期の蝸牛感覚上皮における GSK3 情報伝達系の役割の解明

蝸牛器官培養系を用いて表現型を解析する。

B. GSK3 情報伝達系の下流で作用する(もしくは相互作用を持つ)分子の同定

GSK3 情報伝達系の抑制を行い遺伝子発現の変化を RNA シークエンスにより網羅的に検索を行う。

C. 細胞配列パターン形成に関わる分子と GSK3 情報伝達系との相互作用の解明

BMP 情報伝達系を含め、GSK3 情報伝達系との相互作用を持つ他の情報伝達系を同定する。

3. 研究の方法

実験1: 器官培養系を用いた GSK3 情報伝達系の機能解析

蝸牛器官培養系において薬剤を用いて GSK3 情報伝達系の抑制を行い、GSK3 情報伝達系の機能解析を行う。具体的にはマウス胎児の蝸牛を胎生13日目に取り出し GSK3 阻害剤の存在下に器官培養を行う。GSK3 の阻害剤としては CHIR99021 および BIO-actoxime を用いる。2種類の薬剤を用いる事により、阻害剤の非特異的な影響を排除できる。

胎生13日目では、マウス蝸牛の感覚上皮の分化が開始する直前であり、感覚上皮内の前駆細胞は均一であるが、その後数日でこれらの前駆細胞が数種類の細胞に分化し同時に整然と並んだ細胞配列パターンを形成する。蝸牛器官培養系では、この感覚上皮内の細胞の分化と配列パターン形成が *in vivo* とほぼ同じように進行し、蝸牛の発生を再現できる。本実験ではまず、GSK3 阻害剤の存在下に器官培養を行い、細胞配列パターンや蝸牛

感覚上皮の分化について表現型を組織学的に解析する。また蝸牛内の表現型に関わる遺伝子発現の変化を定量的PCRなどを用いて解析する。

実験2: GSK3 情報伝達系と相互作用を持つ新規標的遺伝子の同定

臓器極性の制御機構と細胞配列パターンにおいて GSK3 情報伝達系の下流で作用する、もしくは相互作用をもつ新規候補遺伝子を同定するため、器官培養系で GSK3 を阻害した蝸牛を用い RNA シークエンスを行う

実験3: 細胞配列パターン制御において GSK3 と相互作用する候補遺伝子の機能的解析

GSK3 および BMP 情報伝達系の相互作用を器官培養系で検討する。近年の報告 (Fuentealba, et al., 2007) をふまえ、GSK3 および BMP 情報伝達系の抑制/賦活化を行った際の Smad のリン酸化をウェスタンブロットで解析し、GSK3/BMP 双方の情報伝達系の入力と蝸牛の表現型の出力との間の統合的理解を目指す。

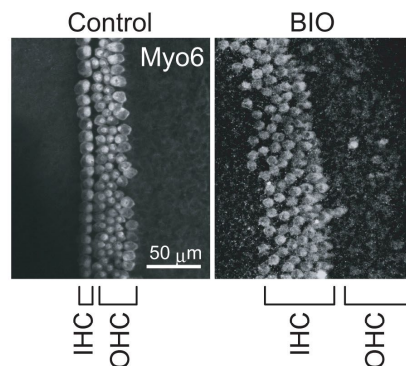
4. 研究成果

胎生 13 日目のマウス蝸牛を取り出して感覚上皮の器官培養を 4 日間行い、培養液中に GSK3 阻害薬 (BIO) を投与することにより、GSK3 伝達系が阻害された際の表現型を解析した。Control 群では内有毛細胞 (IHC) 1 列と外有毛細胞 (OHC) 3 列が規則正しく配列するが、BIO 群では約 4 列に過形成した IHC の異常なパターンが観察された。GSK3 伝達系の阻害により、内有毛細胞および内柱細胞の領域を拡大するとともに、対照的に外有毛細胞の領域を縮小し、細胞配列パターンの変化を認めた (図 A)。

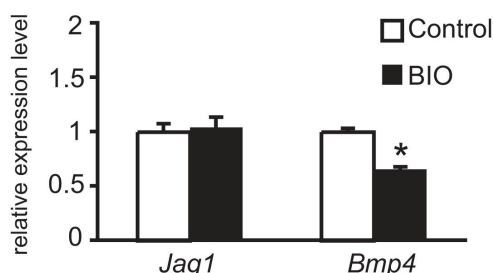
同様の表現型は、他の GSK3 阻害薬である CHIR99021 を用いたときも同様であり、阻害薬の非特異的な効果ではなく、確かに GSK3 伝達系の阻害による効果であることが確認された。

上記のデータにより、GSK3 伝達系の阻害により内有毛細胞の増加が、外有毛細胞の減少と引き換えに生じている可能性が示唆された。蝸牛器官培養 1 個あたりの有毛細胞の定量を行ったところ、CHIR99021 で処理した蝸牛では、内有毛細胞が 773.7 ± 44.1 個で、外有毛細胞は 509 ± 45.1 であった。それに対して Control 群では内有毛細胞が 350.8 ± 18.4 個であり、外有毛細胞 925.7 ± 89.3 個であった。内有毛細胞と外有毛細胞の合計は CHIR99021 群で 1282 ± 66.3 に対して、Control 群は 1276 ± 102.3 と有意な差を認めなかった。同様に BIO を用いた GSK3 伝達系の阻害でも、Control 群で内有毛細胞 353.7 ± 12.8 個と外有毛細胞 837.3 ± 73.8 個、合計 1191 ± 86.0 個であったのに対して、BIO 群では内有毛細胞 602.3 ± 40.9 個、外有毛細胞 428.3 ± 40.7 個、合計 1030 ± 19.1 個であった。これらの結果は GSK3

A



B



伝達系の阻害が内有毛細胞と外有毛細胞の運命決定に影響していることを示すと考えられた。

さらに、細胞系列の追跡により、GSK3 伝達系の阻害により、外有毛細胞領域の細胞が転換し、内有毛細胞の運命決定を獲得することが判明した。内有毛細胞に特異的なタンパクである FGF8 のプロモーター制御下で GFP が発現するように遺伝子を改変したマウスを用いて、上記と同様に GSK3 阻害薬を用いたマウス蝸牛の器官培養を行うと、FGF8-GFP 陽性細胞が増加しており、内有毛細胞の運命決定を獲得していることが示された。これに対して感覚上皮の予定領域である、Jag1/ Sox2 陽性細胞の総数は変化していなかった。

有毛細胞の総数については変化がなかったが、支持細胞の運命決定の変化を検討する為に、同じく GSK3 阻害薬を用いた器官培養で柱細胞と Deiters 細胞の検討を行った。柱細胞は p75 の免疫染色で検討をおこなったが、CHIR99021 で処理された蝸牛でも基底部分から頂部まで p75 陽性の柱細胞が整然と形成されており、GSK 伝達系の阻害は柱細胞の運命決定や発生には影響を及ぼさないことが示された。同じく外有毛細胞の側面に存在する Deiters 細胞の発生過程を Prox1 の免疫染色で検討した。蝸牛 1 個あたりの Prox1 陽性の Deiters 細胞は、Control 群では 1710 ± 49.7 個であったのに対して、CHIR99021 群では 1804 ± 82.7 個であり、有意な差を認めなかった。これらの検討により、GSK3 伝達系は有毛細胞の運命決定に影響する一方で、少なくとも柱細胞や Deiters 細胞の支持細胞の運命決定には関わらないことが示された。

GSK3 の阻害による有毛細胞の配列の変化に加えて、もう一つの顕著な表現型として、器官培養系の蝸牛感覚上皮の長さが GSK3 阻害により明らかに伸長していることが挙げられる。Control 群では $1519 \pm 58.1 \mu\text{m}$ であっ

たのに対して、CHIR99021 群の蝸牛の感覚上皮の全長は $1746 \pm 58.0 \mu\text{m}$ であり、統計学的に有意な差が見られた。Sox2 陽性細胞集団の感覚上皮予定領域での細胞分裂は細胞の運命決定に先立ち厳密に制御されており、細胞配列や運命決定に重要である。感覚上皮の伸長が細胞分裂の増加や細胞分裂期間の延長を伴うか否かについて、次に検討した。BrdU 存在下で CHIR99021 を投与した器官培養を行い、感覚上皮内での細胞分裂について検討した。胎生 13.5 日目に取り出したマウス蝸牛感覚上皮を培養し、培養開始から 24 時間 BrdU 存在下で培養して、そのうち BrdU を洗い流したもの (Day0-1) と、培養開始から通常の培養を行い 24 時間後に BrdU を加えたもの (Day1-2) で、それぞれ CHIR99021 を加えた群と加えない Control 群で検討をおこなった。Day0-1 では、Control では 53.8 ± 9.5 個の BrdU 陽性細胞が認められたのに対して、CHIR99021 群では 88.8 ± 4.8 個であった。同様に Day1-2 では、Control では 8.5 ± 2.2 個であったのに対して、CHIR99021 群では 54.3 ± 10.2 個であった。Day0-1 および Day1-2 のどちらの期間においても細胞分裂の指標である BrdU 陽性細胞は有意に CHIR99021 群で増加しており、これらの結果により GSK3 伝達系の阻害は細胞分裂を増加、または細胞分裂の期間の延長をもたらす、これらを通して感覚上皮の伸長を促進することが分かった。また器官培養した蝸牛を用いて CyclinD1 の遺伝子の発現量を qPCR で定量した。CyclinD1 は細胞分裂のチェックポイントを進めるのに必須の分子であり、その発現量の変化は組織内での細胞分裂の変化を反映する。CHIR99021 で処理した蝸牛感覚上皮内では Control 群と比較して CyclinD1 の発現量が 1.32 倍に増加しており、統計学的に有意な上昇を認めた。また CyclinD1 に拮抗する細胞分裂を抑制するタンパクである p27Kip1 の発現量は同じく qPCR での定量で有意に低下していた。Jacques らの先行研究での LiCl で GSK3 を阻害した際の CyclinD1 の発現量の変化とほぼ同様の結果が得られており、GSK3 伝達系の阻害は、CyclinD1 の発現量増加と p27Kip1 の発現低下を通して、細胞分裂の増加や細胞分裂期間の延長に寄与することが分かった。

GSK3 は Wnt 古典的経路の下流分子としてよく知られており、GSK3 の阻害は Wnt 古典的経路を活性化すると考えられてきた。ところが近年の研究で GSK3 は Wnt 古典的経路以外にも Hedgehog や IGF1 など様々な伝達系のメディエーターであることが分かって来ている。われわれは次に GSK3 の阻害と Wnt 古典的経路の活性化を蝸牛器官培養で行い、表現型を検討した。上記のように GSK3 の阻害では内毛細胞の数が増加するのと引き換えに外毛細胞の数は減少する。これに対して Wnt 古典的経路の活性化薬物である Wnt

activator を用いて、胎生 13.5 日からの蝸牛の器官培養を 4 日間行くと、内毛細胞および外毛細胞が共に増加しており、有毛細胞の総数も Wnt activator で処理した蝸牛では有意に増加していた。これらの結果により GSK3 伝達系の阻害による蝸牛の表現型と Wnt 古典経路の活性化による蝸牛の表現型は異なり、GSK3 伝達系の阻害が単に Wnt 古典経路の活性化を示すものではないという可能性が示唆された。同様に有毛細胞の運命決定に重要であり有毛細胞に特異的に発現する Atoh1 の発現量を qPCR で定量したところ、Wnt activator で処理した蝸牛器官培養では Atoh1 の発現量が 1.5 倍と有意に上昇していたのに対して、GSK3 伝達系の阻害薬 CHIR99021 で処理した蝸牛器官培養では Atoh1 の発現量には変化が見られなかった。Atoh1 の発現量の差異は、Wnt activator 群と CHIR99021 群の有毛細胞の総数の変化の相違を反映すると考えられ、Wnt 古典的経路の活性化は感覚上皮予定領域の増加とともに有毛細胞の総数を増加させる一方、GSK3 伝達系の阻害では表現型が異なり、有毛細胞の総数には変化がないことが示された。

蝸牛の内毛細胞と外毛細胞の運命決定は蝸牛感覚上皮の内側-外側方向の軸に沿って分泌される因子の濃度勾配によって生じるとい説があり、この仮説に則して、内側からの濃度勾配で感覚上皮の運命決定に関わる FGF10 と外側からの濃度勾配が生ずるとされる Bmp4 の定量について検討を行った。CHIR99021 で処理し GSK3 伝達系を阻害した蝸牛では Bmp4 の発現量は有意に減少したのに対して、Wnt activator で Wnt 古典的経路を活性化した蝸牛では Bmp4 の発現量は変化が見られなかった。これに対して FGF10 の発現量は Control 群、CHIR99021 群、Wnt activator 群で有意な変化を認めなかった。GSK3 伝達系の阻害による外毛細胞の減少と引き換えに内毛細胞が増加する効果は Bmp4 の発現が低下することによりもたらされることが解明され、GSK3 の下流の遺伝子として Bmp4 が発生期の蝸牛感覚上皮の運命決定に重要な役割を果たすことが示唆された (図 B)。またこれに対して、胎生 13 日目までに感覚上皮予定領域の運命決定に重要な役割を果たす Jag1 の発現量に変化はなかった。さらに既に細胞分裂が終了し細胞の運命決定が終了した胎生 14 日目や胎生 16 日目の蝸牛を用いた器官培養で同じく CHIR99021 を用いて、GSK3 伝達系を阻害した際にも、やはり Bmp4 の発現は減少しており、すでに Bmp4 を発現する細胞の運命決定が行われたあとも GSK3 伝達系の阻害により Bmp4 の発現低下が見られることは、Bmp4 発現細胞の減少ではなく、Bmp4 遺伝子発現の調節因子として、GSK3 が重要な役割を果たすことが示唆された。またこれらのことは、GSK3 伝達系が阻害された際の表現型について、感覚上皮予定領域の括

大ではなく、運命決定や細胞配列パターンの変化であることを示している。

最後に Bmp4 タンパクを培養液中に追加し、同様に CHIR990021 で GSK3 伝達系を阻害して胎生 13 日目から取り出した蝸牛感覚上皮を 4 日間培養したところ、内有毛細胞領域の拡大と外有毛細胞領域の縮小という表現型が救済され、一部では正常に近い形態となった。

これら一連の結果は、蝸牛の感覚上皮の発生における内側-外側の軸に沿った細胞配列パターンの決定に必須とされる分子メカニズムの解明に大きく貢献するものである。また蝸牛感覚上皮の細胞配列パターンの決定には、GSK3 - Bmp4 の制御が重要であることが新規に示された。

本研究期間中には GSK3 の遺伝子改変マウスを用いて In vivo の表現型を検討しようと試みたが、期間中に解析をすることができなかった。今後の検討課題である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) Kathryn L. Ellis, Takayuki Okano, Matthew W. Kelley. GSK3 Regulates Hair Cell Fates in the Sensory Epithelium of the Cochlea. 2017 Feb, 40th Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, MD, USA

〔図書〕(計 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

岡野 高之 (Takayuki Okano)

京都大学大学院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科、特定病院助教

研究者番号：60642931

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Matthey W. Kelley (NIDCD/ NIH, Bethesda, MD, USA)