



Aberrant cochlear hair cell attachments caused by Nectin-3 deficiency result in hair bundle abnormalities

Fukuda, Terunobu

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6367号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006367>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Aberrant cochlear hair cell attachments caused by Nectin-3 deficiency result in hair bundle abnormalities

Nectin-3 欠損による蝸牛有毛細胞同士の接着は、毛束の異常を引き起こす

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

循環器内科学

(指導教官：平田 健一 教授)

福田 旭伸

背景

上皮細胞の形成、構造、生理機能の維持に細胞内の空間的な極性は不可欠であり、成熟する過程で細胞の平面軸に沿った極性(平面内細胞極性：PCP)と頂底軸に沿った極性(頂底極性：ABP)を形成する。成熟した哺乳類の内耳蝸牛有毛感覚上皮細胞(以後、感覚細胞と表記)が作る繊毛から成る毛束の配向は PCP の典型例である。マウス感覚細胞における繊毛の発生は胎生 15 日前後より始まる。感覚細胞の中央よりチューブリンから成る 1 本のキノシリアが出現し、その周囲にアクチンから成る多数のステレオシリアが出現する。その後、誕生までに、キノシリアは外側方向に移動して外側中央に配置し、ステレオシリアはその移動中に再編成されてキノシリアを中心に対称性に V 字型の毛束を形成する。

上皮細胞間の基底軸に沿った接着は頭頂側から密着結合(TJ)、接着結合(AJ)、接着斑を形成し、ABP の典型例である。アクチン線維を介して細胞骨格の維持に関わる AJ には、カドヘリン-カテニンを介したシステムと Nectin(ネクチン)-アファジン(アファジン)を介したシステムが存在する。カドヘリンは、同種間で接着する細胞間接着分子であるのに対し、4 つのファミリーからなるネクチンは同種間の接着のみならず、異種間での接着を可能とし、異種間での接着の方が接着能が強い。

我々は、マウス蝸牛において感覚細胞と非感覚細胞である支持細胞の異なる 2 種類の細胞が交互に配列して市松模様様を形成する構造に着目し、ネクチン-1 と-3 の異種細胞間接着が市松模様様の細胞配列の形成に関与していることを見出した。ネクチン-1 は感覚細胞に、ネクチン-3 は支持細胞に発現しており、それぞれの遺伝子欠損マウス(ホモ欠損マウス：KO マウス)において、感覚細胞同士が異常接着し、特にネクチン-3 KO マウスにおいて顕著に市松模様様配列が崩れていることが示された。

目的

ネクチン-1 と-3 による異種細胞間接着が PCP の形成に及ぼす影響についてネクチン-3 KO マウスを用いて検討した。

結果

1. ネクチン-3 KO における毛束の極性と形態の異常

毛束の PCP の形成は生誕直後には完成しているため、生誕直後のマウス(以

後、P1 マウスと表記)を用いて毛束の形状を確認した。毛束の形状はキノシリアのマーカーであるチューブリンおよびステレオシリアのマーカーであるアクチン線維に対する蛍光免疫染色で評価した。ネクチン-3 ヘテロ欠損マウスにおいては野生型マウスと同様に毛束の PCP が保持されていたため、ネクチン-3 KO マウスとの比較対象をネクチン-3 ヘテロ欠損マウスとした。ネクチン-3 KO マウスにおいて、異常接着した感覚細胞の毛束の PCP、形態の異常が観察された。キノシリアは接着方向に偏位し、ステレオシリアはV字の対称性構造が崩れ、一部で平坦化し、ステレオシリアで構成される毛束に切れ込みを認めた。これらの異常は走査型電子顕微鏡でも確認された。

2. ネクチン-3 KO マウスにおける毛束形成初期の感覚細胞の異常接着と毛束の発現

ネクチン-3 KO マウスにおける毛束の極性異常が毛束の発生のどの時期から生じているかを検討するため、胎生 16.5 日(以後、E 16.5 と表記)のマウスの解析を行った。マウス蝸牛の発生過程において、蝸牛の渦巻きの頂点は基底部と比較して毛束の発達が遅れており、E 16.5 の蝸牛において、渦巻きの頂点付近では毛束の出現期を、渦巻きの基底部側では毛束が外側へ移動し、より成熟した形態を呈する。毛束の発生に関して、発生の過程を評価できるキノシリアの動きをそのマーカーである γ チューブリンを蛍光免疫染色して解析した。一方で、AJ の構成成分であるネクチン-1 およびアフジンに蛍光免疫染色して接着がどの段階で生じているかを評価した。ネクチン-3 KO マウスにおいて、E16.5 の渦巻きの頂点部では、キノシリアは感覚細胞平面の中心部に局在しており、キノシリアの出現部位は正常であったが、基底部側の成熟した領域ではキノシリアは異常接着方向に偏位していた。一方で、繊毛発現初期の段階からすでにネクチン-1 およびアフジンが細胞間接着部に濃縮していた。これらの結果から、ネクチン-3KO マウスにおいて、毛束の PCP 異常は、キノシリアが細胞平面の中心部から外側方向へ移動する過程で、異常接着方向に誘導されることにより生じることが明らかとなった。

3. ネクチン-3KO マウスにおける毛束の極性と形態の異常における PCP 分子の影響

細胞膜蛋白である Frizzled(Fzd)や Van Gogh-Like(Vangl)などの PCP 分子は細胞平面において非対称性に分布し、それらの遺伝子欠損マウスでは、蝸牛感覚細胞の毛束の極性異常のみならず、蝸牛の渦巻きの頂点側に感覚細胞

が収束し、その全長が短小化することが報告されている。これは、PCP 分子が蝸牛感覚細胞上の毛束の極性に関与する以外に、蝸牛の収斂伸長に関与することを示している。そこで、P1 マウスを用いてネクチン-3 KO マウスの毛束の極性異常に PCP 分子が関与しているのか検討した。ネクチン-3 KO マウスの蝸牛の全長は PCP 分子の遺伝子欠損マウスで認めるような短小化は認めなかった。また、蝸牛の渦巻きの頂点において、蛍光免疫染色にてミオシン-7a 陽性となる感覚細胞の収束は認めなかった。また、Fzd および Vangl の感覚細胞内での非対称性分布に変化は認めなかった。以上より、ネクチン-3 KO マウスにおいて PCP 分子の機能は保持されていることが明らかとなった。

4. ネクチン-3 KO マウスにおける AJ と TJ の局在異常

上皮細胞において、ネクチンによる細胞間接着は、アフジンを介してカドヘリン-カテニンシステムを接着部に誘導して AJ を形成するとともに、TJ の構成成分を誘導して AJ の頂点側に TJ を形成することが *in vitro* 実験で示されている。そこで、P1 マウスを用いて AJ および TJ の分布を解析した。ネクチン、アフジン、E-カドヘリン、 β -カテニンを AJ のマーカーとして、ZO-1 を TJ のマーカーとして蛍光免疫染色を行った。対象マウスにおいては、感覚細胞の全周に均一にシグナルを認める一方で、ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞による異常接着部位に AJ と TJ のシグナルが濃縮していた。ネクチン-1 においては、特に接着部に強く濃縮していた。これは、支持細胞に発現するネクチン-3 が欠損することにより、感覚細胞のみに発現するネクチン-1 の最も強固な接着相手が同種のネクチン-1 であることから、感覚細胞同士が異常接着し、接着部に濃縮したものと考えられた。また、細胞の頂底軸における分布を解析したところ、接着部において基底側に伸展して分布していた。以上より、ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞間の異常接着は、AJ と TJ の構成成分を接着部位に誘導し、局在の分布に影響を与えていることが明らかとなった。

5. ネクチン-3 KO マウスにおける ABP 分子の局在異常

様々な ABP 分子が発生期における ABP の形成に影響を及ぼすことが知られている。ネクチンは、細胞の頂点側の接着因子を制御する ABP 分子である Par-3 や Pals1 関連密着結合蛋白(Patj)との相互作用により、ABP を形成することが *in vitro* 実験で示されている。そこで、P1 マウスを用いて Par-3

と Pals1 の蛍光免疫染色を行った。対象マウスにおいては、Par-3 は感覚細胞の全周に均一にシグナルを認める一方で、ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞間の異常接着部位にシグナルが濃縮していた。また、細胞の頂底軸における分布を解析したところ、接着部において基底側に伸展して分布していた。Pals1 は、対象マウスにおいてステレオシリアの外側に分布している一方で、ネクチン-3 KO マウスにおいてステレオシリアの接着方向への偏位に伴い、Pals1 の分布も接着方向に偏位していた。細胞の頂底軸における分布においては、接着部において基底側への伸展は認めなかった。以上より、ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞間の異常接着は、Par-3 および Pals1 を接着方向に誘導し、局在に影響を与えていることが明らかとなった。

考察

これまで、ショウジョウバエの毛包やマウス感覚細胞の繊毛の PCP の形成に、細胞の平面において非対称性分布を示す PCP 分子が関与していることが遺伝子改変モデルにより示されてきた。ネクチン-3 KO マウスにおいては、PCP 分子の機能は保持されており、PCP 分子による毛束の PCP への影響は否定的であった。近年、細胞の分化に関わる Notch シグナルや、繊毛の運動や物質輸送に関わる蛋白なども PCP の形成に関与していることが遺伝子改変動物を用いて示されている。これらの分子の下流に関わる Rac や PAK シグナル経路への影響が、PCP の形成に影響する可能性が考えられている。ネクチンによる細胞間接着は、Rac を活性化し、続いてアクチンを再構成することが *in vitro* 実験で示されている。ネクチン-3 の欠損により、市松模様様配列が崩れてネクチン-1 による異常な感覚細胞間接着がその下流の Rac や PAK を活性化し、異常接着部位に AJ と TJ の構成分子と ABP 分子、繊毛を構成する分子を誘導することにより、毛束の異常を引き起こすと考えられたが、ネクチン-3 KO マウス感覚細胞における活性化された Rac や PAK の局在を示すことができず、この仮説を証明できなかった。機序は解明できなかったが、ネクチンによる異種細胞間接着が毛束の PCP に影響を及ぼすことが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2481号	氏 名	福田 旭伸
論文題目 Title of Dissertation	<p>Aberrant cochlear hair cell attachments caused by Nectin-3 deficiency result in hair bundle abnormalities</p> <p>Nectin-3 欠損による蝸牛有毛細胞同士の接着は、毛束の異常を引き起こす</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 竹 崎 尚 Chief Examiner</p> <p>副 査 丹 生 健 一 Vice-examiner</p> <p>副 査 勾 坂 敏 朗 Vice-examiner</p>		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

【背景】

上皮細胞の形成、構造、生理機能の維持に細胞内の空間的な極性は不可欠であり、成熟する過程で細胞の平面軸に沿った極性（平面内細胞極性：PCP）と頂底軸に沿った極性（頂底極性：ABP）を形成する。成熟した哺乳類の内耳蝸牛有毛感覚上皮細胞（以後、感覚細胞と表記）が作る繊毛から成る毛束の配向はPCPの典型例であり、繊毛の発生は胎生15日前後より始まる。感覚細胞の中央より1本のキノシリアが出現し、その周囲にアクチンから成る多数のステレオシリアが出現する。その後、キノシリアは外側方向に移動して外側中央に配置し、ステレオシリアはその移動中に再編成されてキノシリアを中心に対称性にV字型の毛束を形成する。

本研究者は、マウス蝸牛において感覚細胞と非感覚細胞である支持細胞の異なる2種類の細胞が交互に配列して市松模様を形成する構造に着目し、ネクチン-1と-3による異種細胞間接着がPCPの形成に及ぼす影響についてネクチン-3 遺伝子破壊（KO）マウスを用いて検討した。

【方法および結果】

1. ネクチン-3 KOにおける毛束の極性と形態の異常

毛束のPCPの形成は、生誕直後のマウス（以後、P1マウスと表記）を用いて毛束の形状を確認した。ネクチン-3 KOマウスにおいて、異常接着した感覚細胞の毛束のPCP、形態の異常が観察された。キノシリアは接着方向に偏位し、ステレオシリアはV字の対称性構造が崩れていた。

2. ネクチン-3 KOマウスにおける毛束形成初期の感覚細胞の異常接着と毛束の発現

ネクチン-3 KOマウスにおける毛束の極性異常が毛束の発生のどの時期から生じているかを検討するため、胎生16.5日（以後、E16.5と表記）のマウスの解析を行ったところ、ネクチン-3 KOマウスにおいて、毛束のPCP異常は、キノシリアが細胞平面の中心部から外側方向へ移動する過程で、異常接着方向に誘導されることにより生じることが明らかとなった。

3. ネクチン-3 KOマウスにおける毛束の極性と形態の異常におけるPCP分子の影響

細胞膜蛋白であるFrizzled (Fzd) や Van Gogh-Like (Vangl) などのPCP分子は細胞平面において非対称性に分布し、それらの遺伝子欠損マウスでは、蝸牛感覚細胞の毛束の極性異常のみならず、蝸牛の渦巻きの頂点側に感覚細胞が収束し、その全長が短小化することが報告されている。ネクチン-3 KOマウスの蝸牛の全長はPCP分子の遺伝子欠損マウスで認めるような短小化や、蝸牛の渦巻きの頂点における感覚細胞の収束は認めなかった。以上より、ネクチン-3 KOマウスにおいてPCP分子の機能は保持されていることが明らかとなった。

4. ネクチン-3 KO マウスにおける接着結合 (AJ) と密着結合 (TJ) の局在異常

P1 マウスを用いて AJ および TJ の分布を解析した。ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞による異常接着部位に AJ と TJ のシグナルが濃縮していた。ネクチン-1 においては、特に接着部に強く濃縮していた。これは、支持細胞に発現するネクチン-3 が欠損することにより、感覚細胞のみに発現するネクチン-1 の最も強固な接着相手が同種のネクチン-1 であることから、感覚細胞同士が異常接着し、接着部に濃縮したものと考えられた。

5. ネクチン-3 KO マウスにおける ABP 分子の局在異常

ネクチンは、細胞の頂点側の接着因子を制御する ABP 分子である Par-3 や Pals1 関連密着結合蛋白 (Patj) との相互作用により、ABP を形成することが *in vitro* 実験で示されている。そこで、P1 マウスを用いて Par-3 と Pals1 の蛍光免疫染色を行ったところ、ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞間の異常接着部位にシグナルが濃縮していた。ネクチン-3 KO マウスにおいて、感覚細胞間の異常接着は、Par-3 および Pals1 を接着方向に誘導し、局在に影響を与えていることが明らかとなった。

【結論】

本研究は、ネクチンによる異種細胞間接着が毛束の平面内細胞極性に影響を及ぼすことを示したものであり、平面内細胞極性を形成する分子メカニズムを明らかにする上で重要な成果であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。