

# Restriction of Wnt signaling in the dorsal otocyst determines semicircular canal formation in the mouse embryo

野田, 哲平  
九州大学大学院医学研究院発生再生医学分野

<https://doi.org/10.15017/21729>

---

出版情報 : Kyushu University, 2011, 博士 (医学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 : (C) 2011 Elsevier Inc.

The mouse inner ear develops from a simple epithelial pouch, the otocyst, with the dorsal and ventral portions giving rise to the vestibule and cochlea, respectively. The otocyst undergoes a morphological change to generate flattened saclike structures, known as outpocketings, in the dorsal and lateral regions. The semicircular canals of the vestibule form from the periphery of the outpocketings, with the central region (the fusion plate) undergoing de-epithelialization and disappearing. However, little is known of the mechanism that orchestrates formation of the semicircular canals. We now show that the area of canonical Wnt signaling changes dynamically in the dorsal otocyst during its morphogenesis. The genes for several Wnt ligands were found to be expressed in the dorsal otocyst according to specific patterns, whereas those for secreted inhibitors of Wnt ligands were expressed exclusively in the ventral otocyst. With the use of whole-embryo culture in combination with potent modulators of canonical Wnt signaling, we found that forced persistence of such signaling resulted in impaired formation both of the lateral outpocketing and of the fusion plates of the dorsal outpocketing. Canonical Wnt signaling was found to suppress Netrin1 expression and to preserve the integrity of the outpocketing epithelium. In addition, inhibition of canonical Wnt signaling reduced the size of the otocyst, likely through suppression of cell proliferation and promotion of apoptosis. Our stage-specific functional analysis suggests that strict regulation of canonical Wnt signaling in the dorsal otocyst orchestrates the process of semicircular canal formation.

内耳発生は、プラコードと呼ばれる感覚上皮前駆細胞の誘導から始まり、種々の因子によって複雑な調節を受ける。プラコードが陥凹し耳胞と呼ばれる嚢状の構造となり、背側は平衡覚を司る前庭・半規管へ、腹側は聴覚を担う蝸牛へと形態形成が進む。殊に半規管形態形成は、耳胞の背側・外側において上皮の頂面同士が近接し癒合・消失することで最外縁のみが半規管として取り残されるというダイナミックな形態変化を経るため、そのトポロジーは大変興味深いものである。

Wnt シグナルのうちβカテニンによって伝えられる canonical 経路が、内耳発生において耳プラコード誘導、耳胞軸情報の付与と細胞運命の決定に重要な役割を果たすことはこれまでに知られていたが、Wnt シグナルの変異マウスでは内耳そのものが形成されなくなるため、その後の内耳膜迷路形成における Wnt シグナルの役割は未知であった。

筆者らはまず Wnt シグナル活性が経時的に耳胞背側において内側へ限局していくことを見出し、その実体となるリガンドや分泌性抑制因子、転写調節因子などの発現パターンを詳細に解析した。その結果、Wnt シグナルの限局がリガンドと抑制因子のバランスによって成り立っていると推察した。

次いで Wnt シグナルの機能解析を、全胚培養法と薬剤 (Wnt シグナル経路に特異的に働く阻害剤)を組み合わせて行った。この方法により任意の時期での Wnt の機能を

調べることが可能となった。Wnt シグナルを亢進させた胚では外側半規管低形成と前後半規管形成遅延という形態異常がみられ、Wnt シグナルを抑制した胚では形態変化はみられなかったが耳胞の大きさが減少していた。耳胞における細胞死・細胞増殖を観察すると、外側半規管予定領域において有意に薬剤による変化がみられ、Wnt シグナルが耳胞の細胞数を調節している可能性が示唆された。

内耳形成に必須の遺伝子の Wnt シグナルとの関連について調べた。外側半規管形成に必須な転写因子 *Otx1* が Wnt シグナルの亢進によって抑制されており、外側半規管低形成は *Otx1* の発現抑制を介している可能性が考えられた。また、基底膜断片化によって耳胞上皮の癒合消失を担う *Netrin1* の発現は過剰な Wnt シグナルによって抑制され、*Netrin1* と拮抗する *Lrig3* は Wnt シグナル亢進によって発現領域の拡大がみられたため、これらの相互作用によって担われる半規管形成が、Wnt シグナルによって制御されている可能性が示唆された。実際に基底膜の断片化と脱上皮化が、耳胞外側の上皮で起こっており、これらが Wnt シグナルの亢進によって阻害されることを明らかにした。

以上の実験結果から、Wnt シグナルが耳胞背側において適切に抑制されることが、正常な内耳形態形成に必要であり、その活性の限局は分泌性抑制因子とのバランス等によって制御されている可能性が示唆された。