

マウス内耳の半規管形態形成におけるWntシグナルの機能解析：内耳膜迷路はどのようにしてつくられるのか

野田, 哲平
九州大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科

目野, 主税
九州大学医学研究院発生再生医学分野

<https://doi.org/10.15017/27248>

出版情報：福岡醫學雑誌. 104 (7), pp.215-221, 2013-07-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



総 説

マウス内耳の半規管形態形成における Wnt シグナルの機能解析 ～内耳膜迷路はどのようにしてつくられるのか～

¹⁾九州大学医学研究院 発生再生医学分野

²⁾九州大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

野 田 哲 平¹⁾²⁾, 目 野 主 税¹⁾

はじめに

種々の生命現象に必要な分泌蛋白 Wnt によって伝えられるシグナルが内耳発生においても重要な役割を果たしていることが、ここ 10 年ほどの間に明らかにされてきた。マウス内耳発生は、胎生 8 日頃に胚の背側にある神経堤から分泌される Wnt によって感覚上皮前駆細胞であるプラコードが誘導されることで始まる。プラコードは徐々に陥凹し、耳胞とよばれる嚢状構造を形成する。その際に Wnt シグナルは背側で濃度依存性に働き、腹側から入力されるヘッジホッグシグナルと拮抗することで内耳の背腹軸を決定する。即ち、Wnt シグナルは耳胞背側決定因子として働き、将来の半規管や前庭耳石器の発生を誘導する。ここ数年までに行われた研究により耳胞形成期における Wnt シグナルの役割は明らかになったが、その後続く形態形成期、つまり耳胞から複雑な内耳膜迷路が形成される時期における Wnt シグナルの働きは未知であった。この総説では、我々の最近の知見を紹介するとともに、内耳形成と Wnt シグナルについて概説したい。

1. Wnt シグナルとは

Wnt は、個体発生や癌化、幹細胞維持など、種々の生命現象に必要とされる分泌蛋白であり、哺乳類には 19 種類の *Wnt* 遺伝子が存在している¹⁾。細胞外空間へ分泌された Wnt 蛋白は、7 回膜貫通型受容体 Frizzled に結合し、細胞内へシグナルを伝える。Wnt シグナル経路は大きく分けて 3 種類あり、 β -catenin を介する canonical 経路、JNK や RhoA を介し平面細胞極性を司る PCP 経路、細胞内 Ca イオンを介し canonical 経路を抑制する Ca^{2+} 経路である。これらの経路は特定の Wnt リガンドと受容体の組み合わせによって活性化されるが、臓器によって、もしくは時期によってその組み合わせは様々であり不明な点も多い。この総説では最も早くに発見された canonical 経路について述べる。

リガンドは受容体 Frizzled と、共役受容体である LRP5/6 に結合し、細胞内蛋白 Dishvelled を活性化する²⁾。 β -catenin は、リガンドがない状態では Gsk3, Axin, APC からなる複合体によって分解へと導かれ、細胞内濃度が低く抑えられている。リガンドが受容体に結合すると、Dishvelled はこの複合体を抑制し、 β -catenin が分解されなくなる。細胞内濃度が上昇して核へ移行した β -catenin が、転写因子 Tcf や Lef に結合して、特定の遺伝子の発現を促進させる。Wnt シグナルは多段階で厳密に調節されており、細胞外では Wnt シグナルの抑制因子として Sfrp や Dkk が存在する³⁾⁴⁾。1988 年に Wnt が発見されて以来、シグナルを構成する分子が同定され、多くのことが明らかになってきた。しかしながらまだ全貌が解明されたわけではなく、未知の部分も多く残されている。

Teppei NODA¹⁾²⁾ and Chikara MENO¹⁾

¹⁾Department of Developmental Biology, ²⁾Department of Otolaryngology, head and neck surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Analysis of Wnt Signaling During the Morphogenesis of Semicircular Canal in Mouse Inner Ear.

2. 内耳発生

内耳は聴覚と平衡覚を司る器官で、側頭骨の中に複雑な形態の膜迷路として存在する。マウスでは胎生 8.0 日 (E8.0) 頃から内耳発生が開始し、プラコード誘導 (E8.0-8.5)、耳胞形成と細胞運命決定 (E8.5-E10.5)、内耳形態形成 (E10.5-13.5)、有毛細胞分化 (E14.5-) と発生が進行する。内耳発生には多くのシグナル経路が関わっており、Wnt シグナルも例外ではない。外胚葉性の上皮細胞のうち、*Pax2* を発現する細胞群が胚の背側に現れ、神経管からの Fgf シグナルをうけてプラコードと呼ばれる感覚上皮の原基を形成する⁵⁾⁶⁾。canonical Wnt リガンド (Wnt1, 3a) は E8.25 頃に神経管の背側から分泌が開始され、プラコード誘導と維持、そしてそれに引き続き起こる耳胞形成において背腹軸の決定に重要な役割を果たす⁶⁾。背側からの Wnt シグナルと、腹側に位置する脊索から分泌される Shh (ソニックヘッジホッグ) シグナルが拮抗しあい、内耳の背側と腹側を決定する⁷⁾。聴神経のもととなる Cochleo-vestibular ganglion (CVG) は、この頃に耳胞より分かれ、NeuroD1, Ngn1 などの神経誘導遺伝子の働きによって神経細胞へと分化していく。単一の嚢状構造である耳胞は、E11.5 頃から急激に形態変化を遂げる (図 1)。背側では耳胞が扁平化し、向かい合う上皮 (fusion plate) が癒合・消失するというメカニズムにより、辺縁に管腔が取り残されることで三半規管となる⁸⁾。前・後・外側の三半規管形成において fusion plate が融合する順番は動物種によって異なるが、マウスを含む哺乳類では前、後、外側の順であるらしい。腹側では蝸牛管が伸長していき、動物種によって固有の回転を形成する。この時期に分泌因子 BMP や転写因子 Sox などが内耳感覚上皮の発生に重要な役割を果たし、感覚器としての内耳が形成されていく。耳胞形成期に内耳で発現するリガンドである Wnt1, Wnt3a の両者を欠失した 2 重変異マウスでは、内耳の背側全体と腹側の一部が形成されなくなることが知られている。これは、Shh シグナルが優位になることによって耳胞が腹側化したためと考えられている⁷⁾。また、 β -catenin を Cre-loxP 法により内耳のみで欠失させた胚では、耳胞の著しい縮小がみられ⁹⁾、Wnt シグナルが耳胞形成に必要であることが示唆された。

耳胞形成及び背腹軸決定のステージにおける Wnt シグナルの役割はよく調べられているにも関わらず、その後の形態形成期においてどのように働くのかは未知であった。Cre-loxP 法を用いた細胞系譜解析によりプラコード形成期に Wnt シグナルを受容した細胞が耳胞のほとんどの部分に寄与することが知られているので⁷⁾、我々は形態形成期においても Wnt シグナルが何らかの役割を持っているのではないかと考えた。通常のノックアウトマウス法や既存の Cre マウスを利用した Cre-loxP 法では内耳形態形成期における Wnt シグナルの機能解析は不可能であったが、我々は全胚培養法と阻害剤を組み合わせることに



図 1 マウス内耳発生の様子 (Morsli らの文献から改変)
Paint-fill 法によって発生過程における内耳構造が可視化されている。単一の嚢状構造から複雑な内耳膜迷路が形成される。背側は Fusion plate を経て半規管がつくられ、腹側では蝸牛が伸長する。

よってこの時期の Wnt シグナルの機能を調べることに成功した。以下にその解析を¹⁰⁾紹介するとともに、内耳発生がどのように遂行されるかを述べる。

3. 内耳形成と Wnt シグナル活性の経時的変化

Wnt シグナルは分泌蛋白 Wnt の拡散によって伝えられるが、その活性はレポーターマウスを用いて解析することが可能である。TOP-gal, BAT-gal など、TCF/LEF 結合配列に *LacZ* を繋げたレポーターマウスライン¹¹⁾が複数作出されている。Wnt シグナルが伝達し β -catenin が核へ移行すると、*LacZ* が転写されて β ガラクトシダーゼが作られ、それを組織化学的に同定することで容易に Wnt シグナルを検出できる。この方法を用いて、プラコード誘導から耳胞形成までの発現解析がなされた⁷⁾。胎生 8.0~8.5 日の間に胚の背側で神経管から分泌された Wnt によって、耳プラコードでシグナル活性がみられる。プラコードが陥凹し耳胞を形成する際に、耳胞の背側領域で Wnt シグナルの活性が持続的に観察される。Wnt シグナルを欠損させると耳胞が正常に形成されないことから、耳胞形成に必須の役割を果たしていることが示唆され、脊索より分泌される Shh との拮抗作用によって耳胞の背側・腹側の軸が形成されていることが明らかとなった。

耳胞が形成された以降の Wnt シグナルの働きについては、前述の理由により判っていなかったため、我々は E10.5 以降の内耳形態形成期の耳胞上皮における Wnt シグナル活性のパターンとその経時的変化を調べた。E10.5 では、E9.5 までと同様に耳胞の背側、つまり将来の前庭および内リンパ管で X-gal 染色が観察された。E11.5 では、X-gal 染色において Wnt 活性は耳胞背内側上皮の全域でみられ、外側領域では減弱していた。E12.2 になると、Wnt シグナル活性は内リンパ管で強く、半規管ではわずかに認められるのみであった。これらの結果から、内耳形態形成期においても Wnt シグナルが耳胞上皮で発現し続けること、そしてその発現が耳胞の背内側へ次第に限局していくことがわかった (図 2)。

では、その活性の変化はどのように制御されているのだろうか。我々は、この時期の内耳における Wnt シグナルの制御機構を明らかにするために、E12.0 胚の内耳切片において、Wnt リガンドに加えて転写因子 (Tcf/Lef) 及び抑制因子 (Sfrps) も含めた Wnt シグナル因子に対する in situ hybridization (ISH) を行った。リガンドは、*Wnt6* が耳胞背側全体で発現しており、*Wnt2b* が内リンパ管に、*Wnt3* (E10.5 から発現開始) と *Wnt9b* (E12.0 から発現開始) が Fusion Plate に、それぞれ限局した発現パターンを示した。*Wnt4* は将来の蝸牛管である耳胞腹側で、非古典的 Wnt である *Wnt5a* は耳胞背側の間葉で発現していた。Wnt の内因性阻害因子である Sfrp と Dkk1 についても調べた。*Sfrp1* は蝸牛管と外側半規管上皮の腹側領域で、*Sfrp2* は後半規管の下端のごく一部の上皮でそれぞれ発現していた。*Sfrp5* は耳胞では発現していなかった。*Dkk1* は将来の蝸牛腹側上皮に、*Sfrp1* よりも限局した発現パターンを示した。一方、*Frzb*

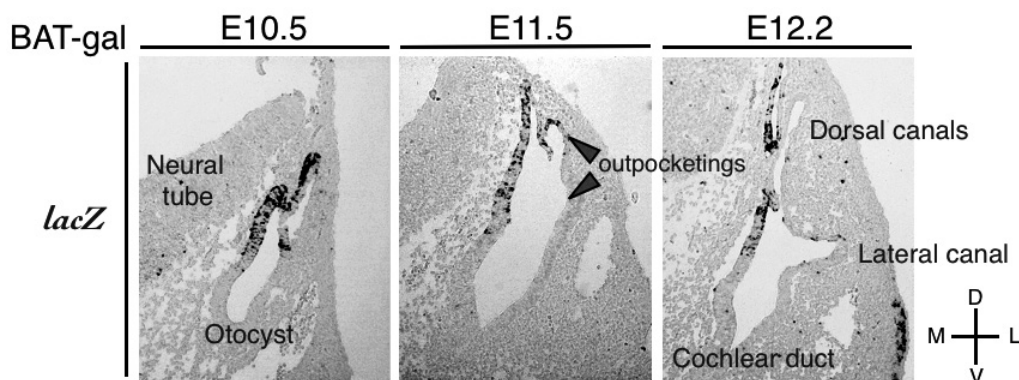


図 2 耳胞における Wnt シグナル活性の経時変化 (筆者らの文献を改変)

Wnt レポーターマウス BAT-gal を用いて *LacZ* に対する in situ hybridization を行った。Wnt シグナル活性は背側全体から徐々に内側へ限局していく。D ; dorsal, V ; ventral, M ; medial, L ; lateral.

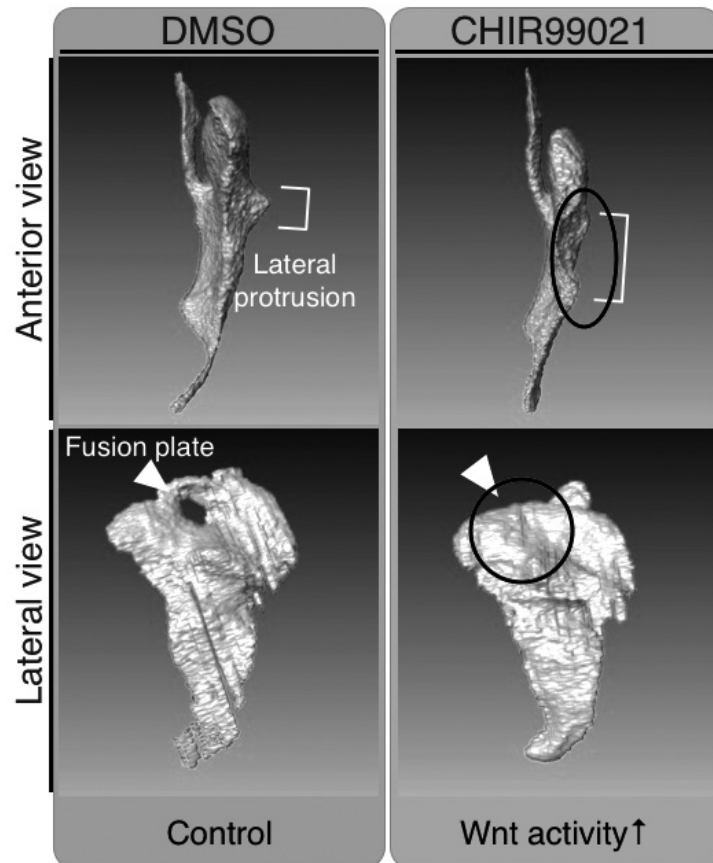


図3 Wnt シグナルの亢進による耳胞の形態変化（筆者らの文献を改変）
連続切片の三次元再構成により形態変化を可視化した。CHIR99021 添加培養により Wnt シグナルが亢進すると、外側半規管突出と前半規管の fusion plate 形成が妨げられる。

(*Sfrp3*) は耳胞背側の間葉に幅広く発現していた。次に β -catenin のシグナルを伝える転写因子 Tcf/Lef について調べたところ、*Tcf1* は耳胞背側上皮で、*Lef1* は背側上皮と腹側の間葉で、*Tcf3* と *Tcf4* は耳胞上皮全体で発現していた。これらの結果から、主に背側上皮で古典的 Wnt リガンドが、腹側上皮や耳胞周囲の間葉で非古典的 Wnt リガンドや抑制因子が発現していることが明らかになり、その結果として BAT-gal で示される Wnt シグナル活性は耳胞背内側に限局することが示唆された。

4. 阻害剤を用いた Wnt シグナルの機能解析

内耳形態形成において、Wnt シグナルの活性が徐々に限局していくことはどのような意味を持っているのだろうか。既存のノックアウトマウス法や Cre リコンビナーゼを用いるコンディショナルノックアウト法では耳胞そのものが低形成となるために内耳発生後期の解析が困難であった。その問題を回避するため、我々は全胚培養法の培地に阻害剤を添加することにより Wnt シグナルを亢進または抑制する実験を行った。全胚培養法は 1990 年頃に確立された方法で、ラット血清を加えた培地に胎盤ごと取り出した胚を浮遊回転培養することによって、一定の時間正常に発生を進めることができる。

Wnt シグナルを亢進させるために、現在最も特異性の高い Gsk3 阻害剤である CHIR99021¹²⁾ を用いた。Gsk3 β 阻害により細胞質内での β -catenin 分解が抑制され、結果として核へ移行する量が増加するため Wnt シグナルが亢進する。一方、抑制には Tankyrase 阻害剤である XAV939 を用いた。Tankyrase は β -catenin を分解する complex の構成因子である Axin の阻害因子であり生理的には β -catenin を安定化させる方向に働くため、これを阻害すると細胞質内の β -catenin 量が低下し、Wnt シグナルが抑制される¹³⁾。

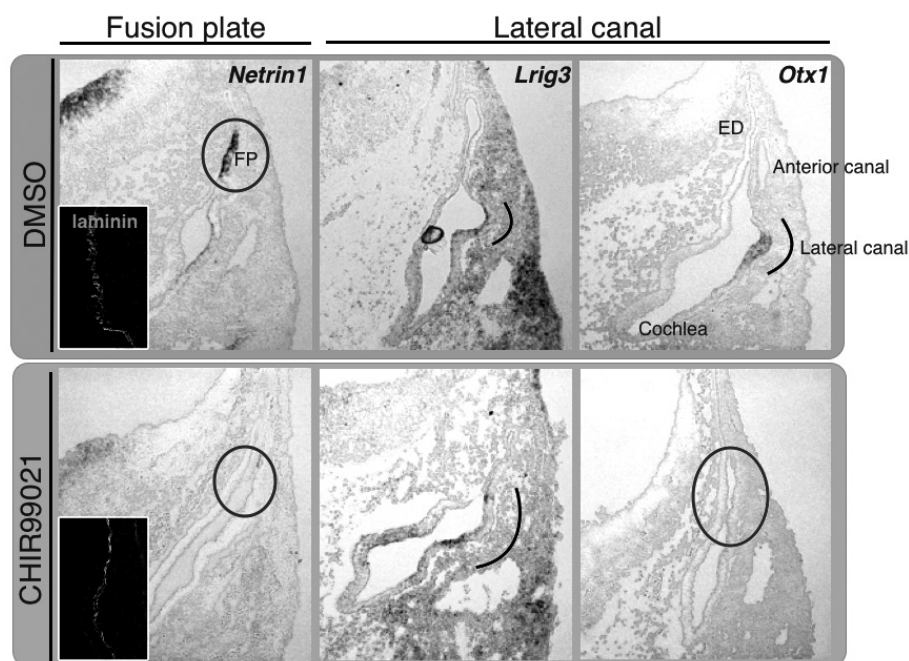


図4 内耳発生に關与する遺伝子発現の Wnt シグナルとの關連 (筆者らの文献を改変)
CHIR99021 添加培養により内耳關連遺伝子の発現が變化する。(左) *Netrin1* の発現が減弱し基底膜崩壊が阻害される。(中) 外側半規管の fusion plate を調節する因子 *Lrig3* は Wnt シグナル亢進によって発現領域が拡大する。(右) 外側半規管発生に必要な転写因子 *Otx1* は Wnt シグナル亢進によって発現が減弱する。

この方法を用い、BAT-gal 胚を E11.5 から 18 時間培養した。この時期に耳胞は外側半規管予定領域の突出と前後の半規管の Fusion plate 形成によるダイナミックな変化を経て、内耳膜迷路の大まかな形態が形づくられる。これらの胚で *LacZ* の ISH を行い、薬剤添加による Wnt シグナル活性の变化を検証した。

対照培養胚では *LacZ* の発現は内リンパ管で強く、半規管の管部でも弱く認められ、未培養胚と同じであった。CHIR99021 添加培養胚では、正常胚で微弱なレポーター活性がみられた外側半規管部で強いシグナル活性を認めたほか、前後半規管の fusion plate でもレポーター活性の上昇を認めた。耳胞の形態に着目すると、特筆すべきことに外側半規管の突出が正常胚のそれに比べて不十分で、背腹方向に外側半規管が拡大し fusion plate 形成が遅れていた。また、半数以上の胚で前半規管の fusion plate 形成遅延も認めた(図3)。これらの結果から、Wnt シグナルは内耳発生の初期には耳胞の背側化に必要であるが、後期にはシグナルを内側に限局させる仕組みが存在し、これが破綻すると半規管形態形成が影響を受けることが示唆された。対して XAV939 添加培養胚では、耳胞全体で X-gal の染色を認めず、Wnt シグナルが抑制されていることが示されたが、形態的には耳胞サイズのわずかな縮小を認めるのみで、明らかな形態変化はみられなかった。全胚培養は発生を進行できる期間が限られているため、E11.5 における Wnt シグナルの抑制効果は十分に評価できておらず、今後の検討課題である。

5. 耳胞マーカー遺伝子の変化と基底膜

内耳形態形成には種々の遺伝子が関与しているが、耳胞においてこれらの遺伝子発現が Wnt シグナルによって制御されているかどうかは不明であった。そこで我々は、耳胞で発現し内耳形態形成に重要な役割を果たす遺伝子の発現に変化があるかどうかを調べるために ISH を行った(図4)。CHIR99021 処理胚で前半規管の fusion plate 形成に遅延がみられたため、同部位に発現し fusion plate 形成に必須の遺伝子である *Netrin1*¹⁴⁾ の発現を調べたところ、CHIR99021 添加培養胚で減弱を認めた。一方 XAV939 添加培養胚では変化がなかった。*Netrin1* のノックアウト胚では Fusion plate を裏打ちする基底膜崩壊が起こらず、結果として上皮の癒合が阻害されるが、Wnt シグナルが亢進したときにも同様の変化が起こっていること

を Laminin の免疫染色で確認した。Netrin1 は Laminin 様ドメインと、Wnt シグナルの拮抗因子である Sfrp と共通のドメインからなる分泌蛋白であり、Wnt シグナルと相互作用する可能性も考えられる。一方、E10.5 から fusion plate で発現し間葉細胞の増殖を促す Fgf9 は、この時期では Wnt シグナルとの相関はみられなかった。

次に、CHIR99021 添加培養胚で低形成となる外側半規管に着目した。Lrig3 は、主に外側半規管で発現し、受容体チロシンキナーゼ (RTK) を介して Netrin1 の発現を抑制することにより将来の半規管での基底膜崩壊を防ぐ遺伝子であるが¹⁵⁾、興味深いことに CHIR99021 添加培養胚でその発現領域が拡大し、XAV939 添加培養胚で発現が減弱していた。また、外側半規管に限局するホメオボックス転写因子 Otx1¹⁶⁾ の発現は、Cre-loxP を用いた遺伝学的解析と同様に、Wnt シグナルの亢進によって減弱していた。外側から蝸牛にかけてのマーカーである Tbx1 は、Wnt シグナルの変化とは無関係であった。

以上の結果により、CHIR99021 添加培養胚では Lrig3 の発現亢進と Netrin1 や Otx1 の発現減弱に伴って Fusion plate の形成遅延や外側半規管の形態異常を示すことが示唆された。従って、Wnt シグナルが耳胞の背外側領域において正しく抑制されることが、内耳形態形成に必須の役割を果たしていると考えられた。

おわりに

Wnt シグナルは生命現象のさまざまな局面で重要な役割を果たすが、内耳発生においても耳プラコード誘導から耳胞形成、半規管形態形成に関与していることがわかってきた。また、新規レポーターマウスを用いた近年の研究で、これまで活性が無いと考えられていた形態形成期の蝸牛においても Wnt シグナル活性が観察され、その機能解析が一部の施設で進められている¹⁷⁾。幹細胞マーカーである Lgr5 が Wnt シグナルの下流遺伝子として働き、有毛細胞発生に関与するらしいことが提唱されている¹⁸⁾。Wnt シグナルの発見から 25 年を経た今でもなお、内耳発生の分野ではホットな研究対象である。

参 考 文 献

- 1) Cadigan KM and Nusse R : Wnt signaling : a common theme in animal development. Genes Dev. 11 : 3286-3305, 1997.
- 2) Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ and Skarnes WC : An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. Nature 407 : 535-538, 2000.
- 3) Finch PW, He X, Kelley MJ, Üren A, Schaudies RP, Popescu NC, Rudikoff S, Aaronson SA, Varmus HE and Rubin JS : Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 6770-6775, 1997.
- 4) Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C and Niehrs C : Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. Nature 391 : 357-362, 1998.
- 5) Ladher RK, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL and Schoenwolf GC : FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. Genes Dev. 19 : 603-613, 2005.
- 6) Ohyama T, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D and Groves AK : Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. Development 133 : 865-875, 2006.
- 7) Riccomagno MM, Takada S and Epstein DJ : Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. Genes Dev. 19 : 1612-1623, 2005.
- 8) Martin P and Swanson GJ : Descriptive and experimental analysis of the epithelial remodellings that control semicircular canal formation in the developing mouse inner ear. Dev. Biol. 159 : 549-558, 1993.
- 9) Freyer L and Morrow BE : Canonical Wnt signaling modulates Tbx1, Eya1, and Six1 expression, restricting neurogenesis in the otic vesicle. Dev. Dyn. 239 : 1708-1722, 2010.
- 10) Noda T, Oki S, Harada T, Kitajima K, Komune S and Meno C : Restriction of Wnt signaling in the dorsal otocyst determines semicircular canal formation in the mouse embryo. Dev. Biol. 362 : 83-93, 2012.
- 11) Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, Volpin D, Bressan GM and Piccolo S : Mapping Wnt/ β -catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 : 3299-3304, 2003.

- 12] Cline GW, Johnson K, Regittnig W, Perret P, Tozzo E, Xiao L, Damico C and Shulman GI : Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Diabetes* 51 : 2903-2910, 2002.
- 13) Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A and Cong F : Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461 : 614-620, 2009.
- 14] Salminen M, Meyer BI, Bober E and Gruss P : Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* 127 : 13-22, 2000.
- 15) Abraira VE, Del Rio T, Tucker AF, Slonimsky J, Keirnes HL and Goodrich LV : Cross-repressive interactions between *Lrig3* and *netrin 1* shape the architecture of the inner ear. *Development* 135 : 4091-4099, 2008.
- 16] Morsli H, Tuorto F, Choo D, Postiglione MP, Simeone A and Wu DK : *Otx1* and *Otx2* activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development* 126 : 2335-2343, 1999.
- 17) Jacques BE, Puligilla C, Weichert RM, Ferrer-Vaquer A, Hadjantonakis A-K, Kelley MW and Dabdoub A : A dual function for canonical Wnt/ β -catenin signaling in the developing mammalian cochlea. *Development* 139 : 4395-4404, 2012.
- 18) Chai R, Xia A, Wang T, Jan TA, Hayashi T, Bermingham-McDonogh O and Cheng AG : Dynamic Expression of *Lgr5*, a Wnt Target Gene, in the Developing and Mature Mouse Cochlea. *JARO* 12 : 455-469, 2011.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)