

Title	Mapping of Notch Activation during Cochlear Development in Mice : Implications for Determination of Prosensory Domain and Cell Fate Diversification
Author(s)	村田, 潤子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47384">https://hdl.handle.net/11094/47384</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	村田潤子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20656 号
学位授与年月日	平成 18 年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Mapping of Notch Activation during Cochlear Development in Mice : Implications for Determination of Prosensory Domain and Cell Fate Diversification (マウス蝸牛発生におけるノッチ活性化部位の検討：感覚上皮分化予定領域の決定と細胞分化での 2 つの機能が示唆された)
論文審査委員	(主査) 教授 久保 武  (副査) 教授 仲野 徹 教授 近藤 寿人

### 論文内容の要旨

#### [目的]

Notch シグナルは種を超えて広く保存され、ほ乳類では中枢神経系、膵臓、感覚器などの発生・分化における機能が知られている。特に内耳では Notch シグナルは「側方抑制」を通して感覚細胞である有毛細胞とこれを支える支持細胞の分化を制御している可能性が、主にノックアウトマウスを使った研究から示唆されてきた。しかしほ乳類内耳発生において実際にいつどのような部位でリガンドによる Notch 活性化が起きて、Notch シグナルが機能しているかについては過去に報告がなかった。我々は今回 Notch 活性化の時空間的パターンの詳細を明らかにし、内耳の中でも特に蝸牛をモデルとしてその発生における Notch シグナルの役割について検討した。

#### [方法ならびに成績]

- (1) 胎生 12.5 日齢 (E12.5) から生後 7 日齢 (P7) までの CBA/N マウスの側頭骨を固定し凍結切片を作成した。隣接細胞の Notch リガンドによって Notch1 が活性化されると  $\gamma$ -secretase によって細胞内領域 (N1-ICD) が切り出され、核内に移行してエフェクターの発現を制御する。今回我々は N1-ICD のみを特異的に認識し、full-length の Notch1 は認識しない抗体 (actN1 抗体) を用いた免疫染色法によって Notch1 の活性化パターンを検討した。増殖細胞のマーカーである PCNA、Notch リガンドのひとつである Jagged1、有毛細胞前駆細胞のマーカーである Math1 のそれぞれに対する抗体、および Notch1 の C-末端を認識する抗 Notch1 抗体との蛍光抗体法による二重染色を施行した。
- (2) E12.5 から E14.5 の時期には有毛細胞前駆細胞である Math1 陽性細胞はまだ観察されないが、活性化 Notch1 (actN1) の弱い発現が蝸牛上皮の蝸牛軸側 (内側) にびまん性に観察され、この領域は Jagged1 陽性の領域と強い関連性があり、両者がそれぞれの発現を強め合うような形式で、最終的に E15.5 以降では支持細胞に分化予定の細胞へと発現が限局されていった。この時期の Jagged1 をリガンドとする弱い Notch1 の活性化が有毛細胞と支持細胞で構成される蝸牛感覚上皮 (コルチ器) 分化予定領域の決定に重要な働きをしていると考えられた。
- (3) E15.5 には Math1 陽性の有毛細胞前細胞が観察されるようになったが、Math1 陽性細胞に隣接した細胞で強い

actN1 の発現がみられた。Notch1 が強く活性化されている細胞は E17.5 にかけて支持細胞に分化していくことが確認された。一方 Math1 陽性細胞は PCNA 陰性かつ actN1 陰性であった。すなわち有毛細胞前駆細胞では既に最終分裂が終了し、Notch1 の活性化はみられなかった。従ってこの時期に観察された強い Notch1 活性化は、有毛細胞へ分化予定の細胞が Notch リガンド (Delta1, Jagged2) を発現して隣接細胞の Notch を活性化し、側方抑制によって有毛細胞への分化は阻害され支持細胞へと分化するというこれまでの説を支持する結果となった。

(4) 支持細胞系列における Notch1 の活性化は永続的ではなく P0 では強い活性化がみられたが、P3 では非常に弱くなり、P7 では actN1 の発現が確認できなくなった。

[総括]

我々は時空間的な Notch1 活性化パターンを明らかにすることで、Notch シグナルが内耳発生において側方抑制を通して有毛細胞と支持細胞の分化を制御しているという、これまで報告されてきた説を支持する結果を得た。さらにより早期の段階では、Notch シグナルが Jagged1 による弱い Notch1 の活性化を通して、感覚上皮分化予定領域の決定でも一定の機能を果たしていることが示唆された。また生後には支持細胞へ分化予定の細胞は既に決定されているにもかかわらず、一過性の強い Notch1 の活性化が支持細胞系列にみられたことから、Notch1 の活性化が支持細胞の最終分化、成熟にも必要であると予想された。以上より Notch シグナルはほ乳類の内耳発生において時期によって異なった複数の重要な機能を有し、これまで報告されてきた側方抑制による細胞分化制御もその中に含まれると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

ほ乳類内耳発生において Notch シグナル伝達系は「側方抑制」を通して細胞分化を制御している可能性が、主にノックアウトマウスを使った研究から示唆されてきた。しかし実際にいつどのような部位で Notch1 の活性化が起きているかについては過去に報告がなかった。申請者は今回活性化 Notch1 (actN1) を特異的に認識する抗体 (actN1 抗体) を用いた免疫組織化学的方法により Notch1 活性化の時空間的なパターンの詳細を明らかにし、内耳発生での Notch シグナル伝達系の役割を検討した。

E12.5 から E14.5 の時期に actN1 の弱い発現が蝸牛上皮の蝸牛軸側 (内側) にびまん性に観察され、この領域は Jagged1 陽性の領域と強い関連性があり、両者がそれぞれの発現を強め合うような形式で、最終的に E15.5 以降では支持細胞に分化予定の細胞へと発現が限局されていった。従ってこの時期の Jagged1 をリガンドとする弱い Notch1 の活性化は、側方抑制以外のむしろ側方誘導を示唆するようなメカニズムによって、蝸牛感覚上皮 (コルチ器) 分化予定領域の決定に重要な働きをしていると考えられた。E15.5 には Math1 陽性の有毛細胞前細胞が観察されるようになったが、Math1 陽性細胞に隣接した細胞で強い actN1 の発現がみられた。Notch1 が強く活性化されている細胞は E17.5 にかけて支持細胞に分化していくことも確認された。従ってこの時期に観察された強い Notch1 活性化は、有毛細胞へ分化予定の細胞が Notch リガンド (Delta1, Jagged2) を発現して隣接細胞の Notch を活性化し、これらの細胞では側方抑制によって有毛細胞への分化は阻害され支持細胞へと分化するというこれまで報告されてきた細胞分化における側方抑制説を支持する結果となった。支持細胞系列における Notch1 の活性化は永続的ではなく、P0 では強い活性化がみられたが、P3 では非常に弱くなり、P7 では actN1 の発現が確認できなくなった。この結果から一過性の強い Notch1 の活性化が支持細胞の最終分化においても何らかの機能を果たしていることが示唆された。

本研究は内耳発生において今まで不明であった Notch シグナルの時空間的な活性化状態を明らかにし、またほ乳類内耳発生において Notch シグナル伝達系が Jagged1 をリガンドとして側方抑制以外の作用を通して感覚上皮予定領域の決定において重要な機能を果たしている可能性を示し得た点で、独創的・先進的な研究であると評価できる。本研究によって初めて明らかになった発生過程における Notch1 の活性化状態に関する情報と解析方法は、ほ乳類内耳発生を制御する分子メカニズムの解明に役立ち、結果として内耳再生医療への貢献が期待されることから博士 (医学) の授与に値すると判定された。