

嗅上皮の再生における接着分子SgIGSFの発現と局在

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 月岡, 房江 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9747

嗅上皮の再生における接着分子SgIGSFの発現と局在

金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻感覚運動病態学
(旧講座名：耳鼻咽喉科学)
(主任：古川 例)

月 岡 房 江

SgIGSF (Spermatogenic immunoglobulin superfamily) は、マウスの精巣から発見された細胞接着分子であり、精上皮の造精細胞のほか、肺や肝臓の上皮細胞、中枢および末梢神経系の神経細胞の細胞膜に局在する。今回はマウス嗅上皮におけるSgIGSFの発現と局在を調べた。また嗅上皮再生におけるSgIGSFの役割を調べるため、マウスの嗅糸切断後の嗅上皮におけるSgIGSFの発現と局在の変化を、RT-PCR法、Westernプロット法および免疫組織化学により解析した。正常嗅上皮において、SgIGSFはWesternプロットでは中枢神経系におけるような多数のバンドではなく、肺におけるものと同じ約100kDの単一のバンドを示した。免疫染色では嗅細胞およびその軸索である嗅神経に比較的弱い免疫反応性が局在した。嗅糸切断後4日から7日にかけて、嗅細胞が変性消失して嗅上皮は萎縮し、7日から15日にかけて基底細胞から未熟な嗅神経細胞を経て嗅神経が再生し、35日では正常の嗅上皮が回復した。この過程で、RT-PCR法で定量したSgIGSFのmRNAは嗅糸切断後4日では変化なく、7日に著明に増加してピークをつくり、その後減少し、35日後に元の水準に戻った。Westernプロット法において、SgIGSFの蛋白質は切断後7日から増加し、11日にピークを迎え、15日でもレベルを維持し、35日後に元の水準に戻った。免疫組織化学において、SgIGSFの免疫反応の強さは切断後11日の嗅上皮で非常に強くなり、35日で元の水準に戻った。強い免疫反応は主に基底細胞より少し上にある細胞から、未熟な嗅細胞にかけて局在していることが、増殖性の基底細胞のマーカーであるPCNAおよび未熟な嗅細胞のマーカーであるGap43の免疫反応との免疫二重染色によって判明した。これらの結果から、接着分子であるSgIGSFが、嗅上皮の再生において基底細胞が分化しつつ遊走し、未熟な嗅細胞となって突起を伸ばす過程で、生理的役割を担っていることが示唆された。

Key words adhesion molecule, SgIGSF, olfactory nerve, transection, olfactory epithelium, regeneration

嗅上皮は、嗅細胞、支持細胞および基底細胞からなる。嗅細胞は、一次嗅覚ニューロンでありながら生涯を通じて変性と再生を繰り返す双極性の神経細胞であり、樹状突起の先端に嗅小胞を有し、そこから鼻腔方向へ嗅線毛を伸ばしている。嗅細胞の中枢側は無髄性の長い軸索を嗅球に向かって伸ばし、それら軸索は集まって多数の小束をつくり、嗅糸となって篩板を貫き、嗅球の糸球体において二次ニューロンである僧帽細胞の樹状突起とシナプスを形成する¹⁾。マウスの嗅糸切断は、1979年にGraziadeiら²⁾によって報告され、篩板と嗅球の間にテフロンメスを入れることにより嗅神経細胞体や嗅球に障害を与えることなく嗅神経細胞の軸索のみを切断できるモデルである。切断された軸索にワーラー変性が起こった後、嗅細胞はアポトーシスに至り、嗅上皮は萎縮する。しかし増殖性の基底細胞が新たに未熟な嗅細胞に分化し、成熟していくため、神経再生過程を観察することができる。

嗅細胞は、神経細胞でありながら隣接する支持細胞や基底細胞との間でタイト結合、アドヘレンス結合、デスモゾームを含む接着装置を形成する。したがって、嗅細胞の分化および機能において細胞接着分子が何らかの役割を果たしていると思像される。嗅細胞に発現する接着分子として、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) が知られている³⁾。NCAMは神経系全体に強く発現し、嗅上皮では未熟な嗅細胞および成熟した嗅細胞と軸索の膜に局在する⁴⁾。NCAMは発生途上の神経系において神経細胞の遊走、神経線維の伸長、束形成、シナプスの形成や可塑性などに重要な役割を果たすとされる⁵⁾。最近、坐骨神経の再生において神経細胞のNCAM発現が一過性に上昇することが報告され、NCAMは末梢神経系の再生にも関与する可能性が示された⁶⁾。嗅神経の再生においても、嗅球の除去に伴って嗅上皮のNCAM発現が一過性に上昇するという報告⁷⁾が

平成17年11月2日受付, 平成17年12月13日受理

Abbreviations : ANOVA, Analysis of variance; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase; NCAM, neural cell adhesion molecule; Necl-2, nectin-like molecule 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RT-PCR, reverse transcriptase-PCR; SgIGSF, spermatogenic immunoglobulin superfamily; TBS, tris buffered saline

あるが、詳細な研究はなされていない。

今回私が注目したSgIGSFは、2001年にWakayamaら⁸⁾によってマウス精巢の造精細胞表面に発現する接着分子として報告された。SgIGSFはNCAMと同じく免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、造精細胞とセルトリ細胞との接着に関与し、精子発生に生理的役割を果たすと考えられている⁹⁾。マウスにおいてSgIGSFは造精細胞以外に肝細胞および胆管上皮細胞、肺上皮細胞、中枢神経系や末梢神経系のニューロンやグリアにも発現することが、免疫組織化学により示された¹⁰⁾。SgIGSFと同一の蛋白質、または動物種を異にするホモログがIGSF4、TSLC1、RA175、SynCAMなどの名称で報告されている。IGSF4は1999年にヒト染色体11q23.2のヘテロ接合欠損に関連する腫瘍抑制遺伝子の候補として命名された¹¹⁾。この遺伝子は2001年にヒトの非小細胞性肺癌において腫瘍抑制の働きをもつことがわかり、TSLC1と改名された¹²⁾。RA175は2001年にマウス胎児性癌細胞の神経細胞への分化時に高度に発現する遺伝子として同定された¹³⁾。SynCAMは2002年にマウス脳のシナプス形成に関与する遺伝子として単離され、その産物のSynCAMは細胞膜にある接着分子であり、外因性のSynCAMを発現させた培養細胞が初代培養した海馬神経細胞とシナプスを形成することが報告された¹⁴⁾。2003年、SgIGSFを含むこれらの名称を3つの免疫グロブリン様ループを含む細胞外領域を持つ膜貫通蛋白質であるネクチンに似た構造をもつ分子として、Nectin-2 (nectin-like molecule-2)に統一することが提唱された¹⁵⁾。本論文では、以下SgIGSFという名称を用いる。SgIGSFは、Ca²⁺非依存性に同種分子間(ホモフィリック)の結合を行うことが示された¹⁶⁾が、他の接着分子との間で異分子間(ヘテロフィリック)の結合を行う場合もあると考えられている。SgIGSFの発現細胞としては、上記のほか、マウスの肥満細胞が詳細に研究されており、肥満細胞同士、および肥満細胞と線維芽細胞との接着にSgIGSFが働くことが示されている¹⁷⁾。また神経系において、胎生9.5日のマウス脳の感覚上皮、胎生10.5日の神経堤、運動ニューロンのほか、胎生16.5日の嗅上皮にSgIGSFが発現することが最近報告された¹⁸⁾。

本研究において、私はRT-PCR法、Westernプロット法および免疫組織化学法を用いて、成熟マウスの嗅上皮におけるSgIGSFの発現と局在を初めて明らかにした。さらに、嗅糸切断による嗅上皮の再生系におけるSgIGSFの発現と局在の変化を解析し、SgIGSFが嗅細胞の再生に関与していることを示唆する結果を得たので、報告する。

材料および方法

I. 嗅糸切断マウスの作成^{2), 19)}

実験動物として生後8-10週の雄ICRマウス(日本SLC, 浜松)を使用した。ペントバルビタール(ネブタールR, 大日本製薬, 大阪)60 mg/kgの腹腔内投与による麻酔を行い、前頭正中に皮膚切開を入れ、顕微鏡下にマイクロドリルを用いて頭蓋骨前方に小穿孔をつくり、両側嗅球の上面全体を露出させた。嗅球の前方・側方・下方に沿ってテフロンメスを滑らせるようにし、嗅球を保護しながら篩板から頭蓋内に入る嗅糸を切断した。切断後は皮膚を吸収糸にて縫合し閉鎖した。麻酔から完全に回復してからマウスをケージに戻し、室温22℃、12時間明暗サイクル、自由摂食の条件で飼育した。この実験は金沢大学動物実験指針に基づいて行なった。

II. RNA抽出と定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

微量RNAを得るため、Qiagen RNeasy ミニキット^R (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を使用した。対照として未処理のマウスと、嗅糸切断後4日、7日、11日、15日、35日の各時点でのマウスを過剰ネブタールの腹腔内投与により安楽死させた後、頭部を矢状面で切断し、嗅粘膜を剥離した。製品説明書に従い、この試料をグアニジニインソチオシアン酸塩を含むRNA抽出溶液とともにホモジナイザーにて破碎して遠心し、上清をとって70%エタノールを加えてよく混ぜ、スピニングカラムを通してメンブレンに吸着させた。蒸留水にてRNAを溶出し、吸光度測定により定量した。このRNA 2 μgから逆転写反応によりcDNAをつくるため、東洋紡社(大阪)のプロトコルに従って逆転写酵素(Rever Tra Ace[®])および4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸を含む試薬を混合し、30℃で10分反応させた。得られたcDNAについて、まず非定量的PCR反応を行った。SgIGSF cDNAのうち約1100bpを増幅するプライマーセット[®]およびTaq DNAポリメラーゼ(ExTaq; タカラバイオ株式会社, 大津)を用い、94℃で2.5分間処理後、変性反応94℃30秒、アニーリング反応55℃30秒、伸長反応60℃30秒の条件でPCRを28回行い、反応産物をアガロースゲル電気泳動法により解析した。試料の品質を確認するため、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)の発現についても同様な解析を行った。予備実験において、この条件でSgIGSFおよびGAPDHのcDNA増幅は指数関数領域にあることを確認した。次にライトサイクラーquickシステム305S (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, USA)を用いて定量的PCR反応を行い、もとの嗅粘膜試料中のSgIGSF mRNAを定量した。製造者のプロトコルに従ってcDNA、プライマーセット、蛍光色素SYBR Greenを含む試薬を混合し、95℃で10分間処理後、変性反応95℃10秒、アニーリング反応55℃5秒、伸長反応72℃10秒の条件でPCRを50回行い、増幅されたDNA産物を定量した。ライトサイクラーコントロールキットDNA (Roche Diagnostic Co.)を陽性対照とした相対量を、さらにGAPDHの相対量により補正してSgIGSF mRNAの量とした。3回の嗅糸切断実験から得られた各時間6個づつの試料についてPCR反応を行って、平均値と標準偏差を出した。全体を対応のない分散分析(ANOVA, Analysis of variance)で解析し、切断前と切断後各時間の2点間でのSgIGSF mRNA量の平均値の差についてBonferroni法にて検定を行い、P<0.01の場合に有意な差と判定した。プライマーの配列は次の通り。SgIGSF, forward: 5'-TTG CTC ATC ATT CTG GGC CG-3'; reverse: 5'-CAG TCT CGC ATC TCT CCA CC-3'。GAPDH, forward: 5'-TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC-3'; reverse: 5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG CC-3'。

III. Westernプロット

対照として未処置のマウスと、嗅糸切断後4日、7日、11日、15日、35日の各時点でのマウスを安楽死させた後、嗅粘膜を剥離した。この試料を組織溶解液[50mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p40, 0.5% デオキシコロール酸ナトリウム, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic Co.)]とともにホモジナイザーにて破碎してから遠心し、上清を得て蛋白質試料とした。試料の蛋白質濃度をBCA (Bicinchoninate)蛋白質定量キット(Pierce, Rockford, USA)を用いて吸光度測定により定量

した。この蛋白質 20 μ g を 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ポリビニルピロリドン (polyvinylidene difluoride, PVDF) メンブレン (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) にプロットした。5% スキムミルク加 TBS (Tris-buffered saline) (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl) にてブロッキングを行った後に、メンブレンを一次抗体であるウサギ抗 SgIGSF 抗体 (若山友彦博士より供与) 1000 倍希釈と 2 時間反応させた後、0.1% Tween20 加 TBS にて洗浄し、二次抗体である HRP 標識抗ウサギイムノグロブリン抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) 2000 倍希釈と 1 時間反応させた。Electrogenated chemiluminescence (ECL) キット (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) を用いて酵素反応に基づいて目的の蛋白質のバンドを化学発光標識し、X 線フィルムにて検出した。また一次抗体としてウサギ抗 α -Tubulin (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, USA) 10000 倍希釈を用いて、同様にして目的の蛋白質のバンドを検出した。現像した X 線フィルムをスキャナーで画像化し、各バンドの濃度を ImageGauge (富士写真フィルム株式会社, 南足柄) を用いて定量して、SgIGSF/ α -Tubulin のバンド濃度の比をもつてもとの嗅粘膜試料中の SgIGSF 量の指標とした。3 回の嗅糸切断実験においてそれぞれプロットを行い、各時間の SgIGSF 量の切断前に対する相対値を求め、それぞれ 3 回の実験の平均値と標準偏差を出した。全体を対応のない分散分析で解析し、切断前と切断後各時間の 2 点間での SgIGSF 量の平均値の差について Bonferroni 法にて検定を行い、 $P < 0.05$ の場合に有意な差と判定した。

IV. 免疫組織化学

対照として未処置のマウスと嗅糸切断後 4 日, 7 日, 11 日, 15 日, 35 日の各時点のマウスを過剰ネブタール腹腔内投与後に開心して、生理食塩水にて全身灌流した後、4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) にて灌流固定

した。頭部を摘出して皮膚と筋を除去し、0.5M EDTA にて 5 日間脱灰した後、パラフィンに包埋した。厚さ 4 μ m の切片を作成し、シランコーティングスライド (Dako) に貼り付け、乾燥させた。キシレンによる脱パラフィン後、切片を 10 mM クエン酸溶液 (pH 6.0) 中でマイクロウェーブを用いて 100 $^{\circ}$ C 5 分間処理して抗原性を賦活化させた。次に 0.3% 過酸化水素加メタノールで処理して内因性ペルオキシダーゼを失活させた。この切片を 10% 正常ヤギ血清 (Dako) にて 1 時間ブロッキングした後、一次抗体である抗 SgIGSF 抗体 200 倍希釈と 4 $^{\circ}$ C で 1 晩反応させた。TBS による洗浄後、Dako Envision キット (Dako) に含まれる二次抗体である西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase, HRP) 標識抗ウサギイムノグロブリン抗体と室温で 1 時間反応させた。TBS による洗浄後、ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidin tetrahydrochloride と H₂O₂ からなる基質溶液にて 2~3 分間発色反応させ、蒸留水により洗浄した後、ヘマトキシリン溶液で核染色をした。

V. 蛍光免疫二重染色

抗 SgIGSF 抗体による免疫陽性細胞を同定するために、球状基底細胞のマーカーとしてマウス抗増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) モノクローナル抗体 (Dako) および未熟な嗅神経細胞のマーカーとしてマウス抗 Gap43 モノクローナル抗体 (Chemicon, Temecula, USA) と、それぞれ蛍光による免疫二重染色を行った。実験動物と同種であるマウスの一次抗体を用いるため、まずヒストファインマウスステインキット (ニチレイ, 東京) を使用して切片上のマウス非特異抗原のブロッキングを行った。0.1% Tween20 加 TBS にて洗浄後、切片を一次抗体である抗 SgIGSF 抗体 40 倍希釈と抗 PCNA 抗体 50 倍希釈との混合液または抗 Gap43 抗体 100 倍希釈との混合液と 4 $^{\circ}$ C で 1 晩反応させた。0.1% Tween20 加 TBS にて洗浄し、二次抗体であるフルオレッセンイソチオジアン酸

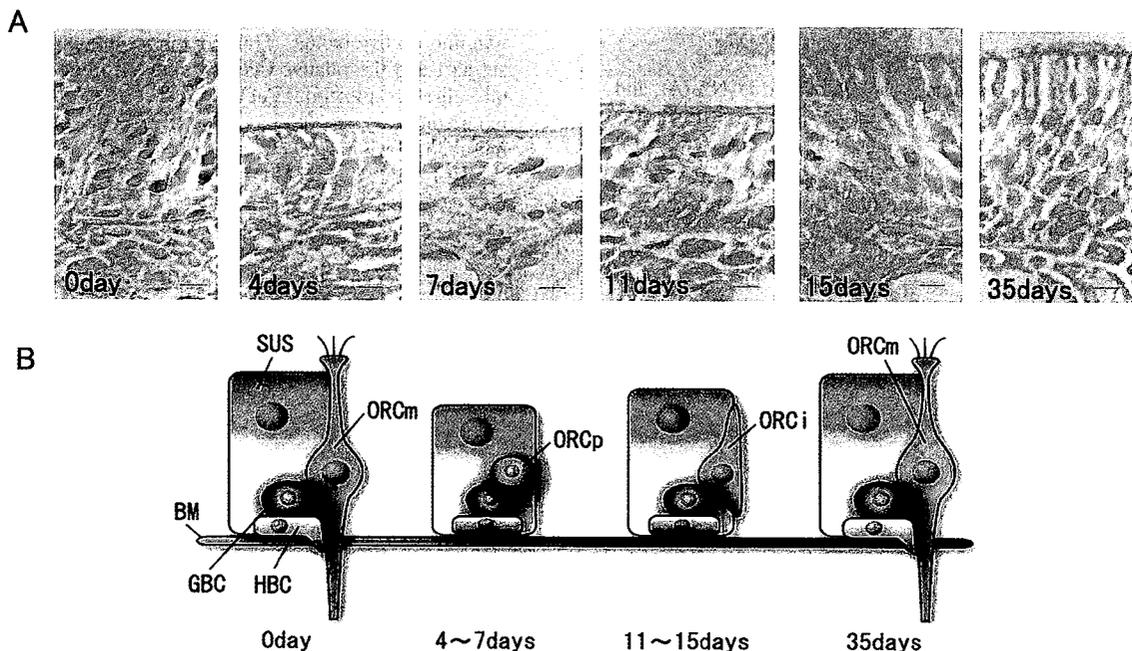


Fig. 1. Regeneration of the olfactory epithelium after olfactory nerve transection. A: The hematoxylin-stained olfactory epithelia 0d, 4d, 7d, 11d, 15d and 35d after transection. Scale bars indicate 100 μ m. B: The cellular composition of the olfactory epithelium 0d, 4-7d, 11-15d and 35d after transection. BM, basement membrane; HBC, horizontal basal cell; GBC, globose basal cell; SUS, sustentacular cell; OLCm, mature olfactory cell; OLCi, immature olfactory cell.

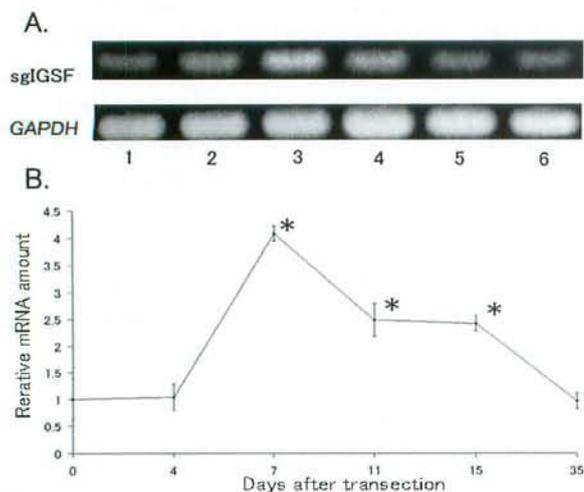


Fig. 2. Quantitative RT-PCR analysis for SgIGSF mRNA and GAPDH mRNA in the olfactory mucosa after olfactory nerve transection. A: Amplified DNA samples at 4d, 7d, 11d, 15d and 35d after transection were electrophoresed on agarose gel and stained with ethidium bromide. B: The relative amount of SgIGSF mRNA against GAPDH mRNA at 0d is set as 1 and the corresponding values at 4d, 7d, 11d, 15d and 35d after transection are plotted. Each point represents $X \pm SD$ of 6 samples. * $P < 0.01$ against 0d value using Bonferroni method following ANOVA.

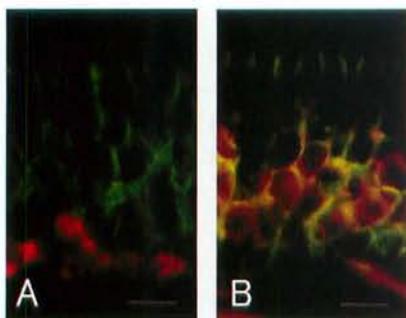


Fig. 5. Double immunostaining for SgIGSF and PCNA (A), and SgIGSF and Gap43 (B) in the olfactory epithelium after olfactory nerve transection. A: Nuclear PCNA (red) and membranous SgIGSF (green) do not occur in the same cells. B: Cytoplasmic Gap43 (red) and membranous SgIGSF (green) coexist in a subpopulation of the cells. Scale bars indicate 100 μ m.

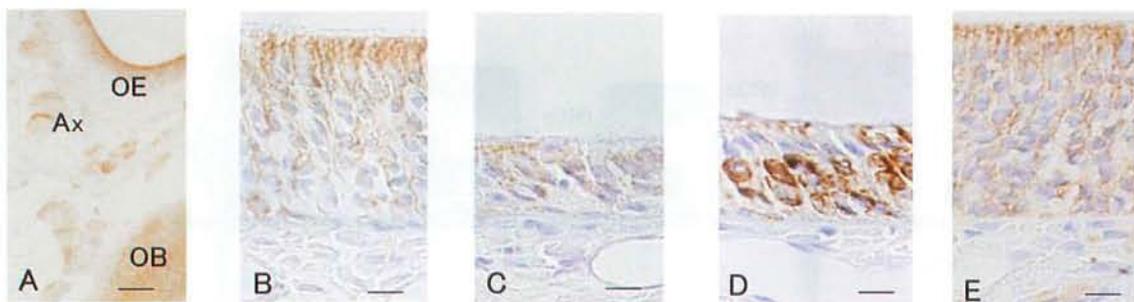


Fig. 4. Immunohistochemical localization of SgIGSF in the olfactory epithelium after olfactory nerve transection. The immunostained olfactory epithelia from mice 0d, 7d, 11d and 15d after transection are shown. OE, olfactory epithelium; Ax, axons; OB, olfactory bulb. Scale bars indicate 500 μ m for 0d and 100 μ m for 7d-15d.

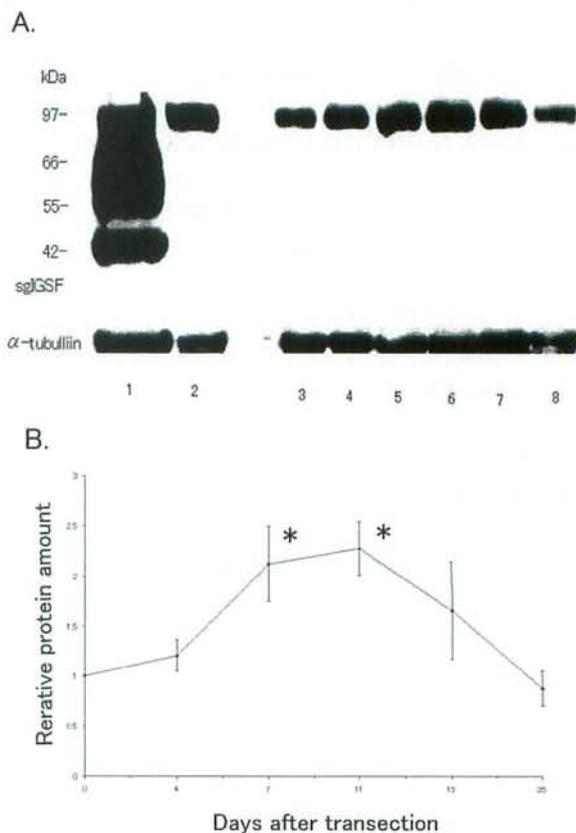


Fig. 3. Western blot analysis for SgIGSF in the olfactory mucosa after olfactory nerve transection. A: The protein samples were electrophoresed, blotted and stained with anti-SgIGSF and anti- α -tubulin antibodies. The lanes represent cerebrum (1) and lung (2) from control mice, and olfactory mucosa from mice 0d (3), 4d (4), 7d (5), 11d (6), 15d (7) and 35d (8) after transection. The molecular weights (kDa) are indicated. The picture shows the representative of 3 separate experiments. B: The relative amount of SgIGSF against α -tubulin was quantitated by the optical density of the immunoreactive bands. The SgIGSF/ α -tubulin value at 0d is set as 1 and the relative values at different time points against 0d value are plotted. Each point represents $X \pm SD$ of 3 experiments. * $P < 0.05$ against 0d value using Bonferroni method following ANOVA.

(fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗ウサギイムノグロブリン抗体 (Rockland, Philadelphia, PA, USA) 50倍希釈とCy3標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (Chemicon) 100倍希釈との混合液と室温で1時間反応させた。0.1%Tween20 TBSにて洗浄後、1mg/ml p-フェニレンジアミン加グリセリンで包埋し、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50/BX-FLA) にて観察した。

成 績

I. 嗅糸切断に伴う嗅上皮の形態変化

嗅粘膜のパラフィン切片をHE染色して観察した結果、嗅糸切断前の対照と比較して嗅糸切断後4日および7日には、嗅上皮は著しく薄くなり、頂上面の嗅線毛が消失し、頂上面と基底膜の中間部にあった嗅細胞の核が消失した (図1 A)。11日から15日にかけて、中間部の細胞が増加して、嗅上皮は次第に厚くなった。35日後には、嗅上皮の厚さ、細胞構成、頂上面の嗅線毛とも対照と同じ程度まで回復した。これらの結果は、過去の文献^{2), 19)}に記載された同じ条件での嗅糸切断後の嗅上皮の変化 (図1 B) と一致した。すなわち、4日から7日にかけて嗅細胞が変性して消失し、7日から15日にかけて基底細胞が未熟な嗅細胞を経て嗅細胞に分化して突起を伸ばし、35日後までに突起を完成して成熟したことを示した。

II. 嗅糸切断に伴う嗅上皮におけるSgIGSF mRNAの発現変化

まず、嗅粘膜におけるSgIGSF mRNA発現を通常の半定量的RT-PCR法により解析した結果を図2 Aに示す。嗅糸切断前の対照および切断後各時間において、mRNAの発現を示すcDNA増幅が認められた。指数関数的な増幅のおこる28サイクルの条件において、対照と比較して切断後7日から11日にかけて発現量が増加する傾向が見られた。そこでさらに正確なmRNA定量のため、定量的RT-PCR法を行った。嗅糸切断前の対照嗅粘膜におけるSgIGSF mRNA量を1とすると、相対的な量は切断後4日では対照と有意差がなかったが、7日で著しく増加し、対照の4.0倍を示した (図2 B)。11日と15日ではピークの約半分にまで減少したが依然として対照より有意に高く、35日後には対照と有意差のない値に戻った。

III. 嗅糸切断に伴う嗅上皮におけるSgIGSF蛋白質の発現変化

Westernプロット法により嗅粘膜のSgIGSF蛋白質発現を解析した結果、免疫抗体と反応する蛋白質は対照マウス的大脑では約100kDaから45kDaまでの複数のサイズを示した (図3 A)。一方、肺では100kDaの単独サイズのバンドが見られた。嗅粘膜において、嗅糸切断前の対照では肺と同じ100kDaの単独サイズの比較的弱いバンドが見られた。蛋白質の量を示すバンドの強さは切断後7日から有意に増加し、11日にピークを迎えて対照の約2.3倍となり、15日にも依然として切断前の対照より有意に強かったが、35日後には対照と有意差のない値に戻った (図3 B)。

IV. 嗅糸切断に伴う嗅上皮におけるSgIGSF蛋白質の局在変化

抗SgIGSF抗体を用いた免疫組織化学により嗅粘膜のSgIGSF蛋白質の局在を解析した結果、対照マウスでの免疫反応は嗅上皮内、および嗅上皮から出る嗅細胞の軸索の束 (嗅神経) に認められた (図4)。このほか嗅球にも免疫反応が存在した。嗅上皮においては、比較的弱い免疫反応が主に成熟した嗅細胞に認められ、特にその頂上側の嗅小胞に局在した。嗅糸切断後7日では、成熟した嗅細胞はほとんどなくなり、弱い免疫反応が基

底細胞やそのすぐ上にある細胞、支持細胞からなる上皮全体に残った。11日では、基底細胞と支持細胞の核の間の領域で増加した細胞に強い免疫反応が局在した。これらの細胞は基底細胞から分化したばかりの細胞と、さらに分化が進んだ未熟な嗅細胞からなると思われた。35日では免疫反応は弱くなり、対照と同じく、主に成熟した嗅細胞に認められた。

嗅糸切断後11日で観察された強いSgIGSF免疫反応を示す細胞の種類をさらに同定するため、増殖性の基底細胞のマーカーであるPCNA²⁰⁾および未熟な神経細胞のマーカーであるGap43²¹⁾への抗体を用い、それぞれ抗SgIGSF抗体との蛍光二重染色を行った (図5)。核PCNA陽性の増殖性基底細胞の膜にはSgIGSFの反応は局在せず、細胞質Gap43陽性の未熟な嗅細胞の膜にSgIGSFの強い反応が局在した。反応は増殖性基底細胞と未熟な神経細胞の間にあるPCNA陰性でGap43陰性の細胞にも認められたので、基底細胞から分化したばかりの細胞から未熟な嗅細胞にかけてSgIGSFが強く発現することが示唆された。

考 察

本研究により、まず正常な成熟マウス嗅上皮に細胞接着分子SgIGSFが発現していること、その主な局在部位は嗅細胞とその突起 (嗅小胞と軸索) であることが初めて明らかになった。これは過去に報告されていない。Westernプロット法により、嗅上皮のSgIGSFは約100kDaの単一の大きさのバンドを示した。これまでの研究によるとSgIGSFは脳では45kDaから100kDaの複数バンド、坐骨神経では45kDaの単一バンド、精巣では120kDaの強いバンドと90kDa, 100kDaの弱いバンド、肺や肝臓では100kDaの単一バンドを示す¹⁰⁾。このような分子量の違いは、蛋白質に付加される糖鎖の量の違いに基づくことがわかっている⁹⁾。今回の結果では、嗅上皮のSgIGSFは神経系のそれとは異なり、肺や肝臓のそれと同じ分子量を示した。このことは、嗅細胞が神経細胞であると同時に上皮細胞である事実と照らし合わせると興味深い。すでにNCAMについては、付加される糖鎖の違いによっていくつかのタイプに分類され、それぞれ別の細胞に発現して独自の生理的役割を演じていることが示唆されている³⁾。SgIGSFにおいても分子量の違うタイプが独自の機能を果たしている可能性がある。

培養細胞にSgIGSFを強制発現させ、培養神経細胞とシナプスを形成させるin vitroの研究において、SgIGSFは相手細胞の膜のSgIGSFと結合すること、すなわちホモフィリックな結合¹⁵⁾を行うことが証明されている。しかしin vivoの神経系におけるSgIGSFを介した神経細胞同士、あるいは神経細胞とグリア間の接着のすべてがホモフィリックな結合であるどうかはわからない。一方、肥満細胞と線維芽細胞間¹⁷⁾や造精細胞とセルトリ細胞間⁹⁾の接着においては、それぞれ後者の細胞にSgIGSFが発現していないので、SgIGSFと他の接着分子とのヘテロフィリックな結合があると考えられる。今回の嗅上皮の場合、嗅糸切断後4日から7日で嗅細胞が変性消失した後の上皮にWesternプロットや免疫組織化学で検出されるSgIGSFが残っていることから、支持細胞や基底細胞にもSgIGSFがある程度発現していることが示唆される。したがって、嗅細胞はSgIGSFのホモフィリックな結合を介して支持細胞や基底細胞と接着している可能性がある。嗅小胞領域に特にSgIGSFの免疫活性が高かったことは、嗅小胞の基部が支持細胞との間タイト結合を形成していること²²⁾と関係あるかもしれない。一方、

別の接着分子とのヘテロフィリックな結合が関与する可能性も否定できない。

次に、嗅糸切断に伴う嗅上皮の萎縮と再生の過程で、SgIGSFの発現が一過性に増加すること、その強いSgIGSF発現は基底細胞から新たな嗅細胞が分化する途上の細胞に局在することが明らかになった。これは過去に報告されていない。定量的PCR法で定量したSgIGSFのmRNAは切断後7日で鋭いピークを描いて増加し、その後は低下したのに対し、Westernプロット法で定量したSgIGSF蛋白質の量は切断後7日から15日にかけて持続して高い値を示し、11日にピークがあった。この違いは、SgIGSFのmRNAが比較的短い寿命を持つために特定の細胞の特定の時期における蛋白質合成能を正確に反映するのに対し、膜蛋白質であるSgIGSFは比較的長い寿命を持ち、mRNA産生が低下した後も細胞体やそこから伸びる突起の細胞膜に蓄積していくと考えれば、説明がつく。

嗅上皮において、基底細胞は基底膜に接した水平基底細胞とその上にある球状基底細胞とに分かれ、このうち球状基底細胞が、嗅上皮のすべての細胞に分化する幹細胞と前駆細胞を含む増殖性の細胞であるとされる²³⁾(図1B)。生理的状態および嗅糸切断で見られる嗅細胞の再生において、球状基底細胞が神経系前駆細胞として増殖した後には分化しつつ上方に遊走して未熟な嗅細胞になり、これが突起を伸ばして嗅細胞として成熟するとされる^{24), 25)}。本研究で細胞同定に用いたマーカーのうち、PCNAは細胞周期に働く核蛋白質であり、分化前の球状基底細胞を標識する²⁰⁾。一方、Gap43はプロテインキナーゼCによりリン酸化を受けるシグナル伝達因子であり、神経細胞の軸索伸長に重要な働きをするとされ、突起を伸ばしつつある未熟な嗅細胞を標識する²¹⁾。今回の結果で、嗅糸切断後11日で見られるSgIGSFの強い免疫反応は、Gap43陽性細胞の細胞膜に局在したほか、PCNA陽性細胞の少し上にあつてGap43陰性の細胞にも見られた。このことから、SgIGSFは神経系前駆細胞である球状基底細胞が増殖をやめて分化と遊走を行う時期から、未熟な嗅細胞として樹状突起や軸索を伸長させる時期にかけての細胞に強く発現することが示唆された。

最後に、嗅上皮再生におけるSgIGSFの役割について考察する。Takaiら²⁶⁾は、細胞の遊走と接着による極性決定におけるSgIGSFの役割について、遊走する細胞同士の膜のSgIGSF(Necl-2)がまずホモフィリックに結合してトランスダイマーをつくることにより、細胞が一時的に接着し、それぞれの細胞でSgIGSFと他の接着分子であるネクチン3がホモダイマーをつくり、相手の細胞との間でSgIGSFとネクチン3の結合によるヘテロフィリックなトランスダイマーが形成され、続いてSgIGSFがネクチン1またはネクチン2に置き換わって、ネクチン同士による細胞間結合がつかられ、最後にカドヘリン同士の結合を含む恒常的な細胞間結合(アドヘレンス結合)がつかれるという仮説を提唱している。嗅上皮再生において、球状基底細胞が増殖後に分化しつつ遊走して未熟な嗅細胞になり、これが突起を伸ばして成熟嗅細胞になり、周囲の細胞との恒常的な細胞間結合を形成するまでの過程での一時的な細胞接着のために、SgIGSFが重要な役割を演じている可能性がある。

さらに、SgIGSFを介した細胞接着に際して、細胞内シグナルが伝達されて細胞骨格や遺伝子に応答を引き起こすメカニズムが考えられる。Ca⁺依存性の細胞接着を行うカドヘリンの場合、細胞内の裏打ち蛋白質であるβカテニンがシグナル伝達因

子として働いて、転写因子であるTCF(T cell factor)/LEF(lymphoid enhancer factor)と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を促進し、細胞増殖、分化、極性の変化を引き起こす²⁷⁾。また免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーでも、L1がアンキリン、NCAM-180がスペクトリンといった裏打ち蛋白質を介して細胞骨格と結合し、軸索伸長や運動能の調節に関与しているという証拠がある²⁸⁾。SgIGSFはその細胞質ドメインによって裏打ち蛋白質のDal-1/Protein4.1BやCASK、シンテニンに結合するとされる²⁶⁾。したがって、今回研究した嗅上皮の再生においても、SgIGSFを介した細胞接着が球状基底細胞の増殖、遊走、分化を促すシグナル伝達に関与している可能性がある。

結 論

以上の結果から、嗅上皮の再生初期に球状基底細胞が分化して遊走し、未熟な嗅神経細胞になり、突起を伸ばして成熟する過程において、接着分子であるSgIGSFが重要な役割を担っていることが示唆された。

1. 嗅上皮のSgIGSFは中枢神経のものとは異なり、肺のものと同じ単一の分子量を示した。
2. 嗅糸切断とともに嗅上皮におけるSgIGSFのmRNAおよび蛋白質の発現は一過性に増加し、それぞれ嗅糸切断後7日および11日にピークを迎えた。
3. SgIGSFの免疫反応は正常の嗅上皮では嗅細胞とその軸索の膜に局在していたが、嗅糸切断後11日では主に球状基底細胞よりやや分化した細胞から未熟な嗅細胞にかけて強い反応が局在した。

嗅上皮再生過程における細胞接着分子SgIGSFの発現と局在を、マウス嗅糸切断モデルを用いて定量的及び形態学的に検討した。

文 献

- 1) Graziadei PP. The ultrastructure of vertebrate olfactory mucosa. In I Friedmann (eds), The ultrastructure of sensory organs, 1 st ed, p267-305, North-Holland & American Elsevier, Amsterdam & New York, 1973
- 2) Graziadei GA, Graziadei PP. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. J Neurocytol 8:197-213, 1979
- 3) Rougon G, Hobert O. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. Annu Rev Neurosci 26:207-38, 2003
- 4) Whitesides JG 3rd, LaMantia AS. Differential adhesion and the initial assembly of the mammalian olfactory nerve. J Comp Neurol 373:240-54, 1996
- 5) Ronn LC, Hartz BP, Bock E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. Exp Gerontol 33:853-864, 1998
- 6) Thornton MR, Mantovani C, Birchall MA, Terenghi G. Quantification of N-CAM and N-cadherin in axotomized and crushed rat sciatic nerve. J Anat 206:69-78, 2005
- 7) Yamashita H, Kawata K, Takahashi M. Upregulation of neural growth-associated protein and neural cell adhesion

- molecule in mouse olfactory epithelium and axons after unilateral removal of the olfactory bulb. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255:441-445, 1998
- 8) Wakayama T, Ohashi K, Mizuno K, Iseki S. Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells. *Mol Reprod Dev* 60:158-164, 2001
- 9) Wakayama T, Koami H, Ariga H, Kobayashi D, Sai Y, Tsuji A, Yamamoto M, Iseki S. Expression and functional characterization of the adhesion molecule spermatogenic immunoglobulin superfamily in the mouse testis. *Biol Reprod* 68:1755-63, 2003
- 10) Wakayama T, Koami H, Yamamoto M, Iseki S. Expression of the adhesion molecule spermatogenic immunoglobulin superfamily in the mouse. *Acta Histochem Cytochem* 37:365-371, 2004
- 11) Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Soeda E, Sakaki Y, Ohki M. A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23. *Genomics* 62:139-146, 1999
- 12) Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27:427-30, 2001
- 13) Urase K, Soyama A, Fujita E, Momoi T. Expression of RA175 mRNA, a new member of the immunoglobulin superfamily, in developing mouse brain. *Neuroreport* 12:3217-3221, 2001
- 14) Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531, 2002
- 15) Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, Satoh K, Takeuchi M, Imai T, Monden M, Takai Y. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem* 278:35421-7, 2003
- 16) Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, Murakami Y. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 277:31014-31019, 2002
- 17) Ito A, Jippo T, Wakayama T, Morii E, Koma Y, Onda H, Nojima H, Iseki S, Kitamura Y. SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF. *Blood* 101:2601-2608, 2003
- 18) Fujita E, Urase K, Soyama A, Kouroku Y, Momoi T. Distribution of RA175/TSLC1/SynCAM, a member of the immunoglobulin superfamily, in the developing nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 154:199-209, 2005
- 19) Yee KK, Rawson NE. Immunolocalization of retinoic acid receptors in the mammalian olfactory system and the effects of olfactory denervation on receptor distribution. *Neuroscience* 131:733-43, 2005
- 20) Ohta Y, Ichimura K. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109:1046-1048, 2000
- 21) Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispens WH, Margolis FL. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 9:683-691, 1989
- 22) Miragall F, Krause D, de Vries U, Dermietzel R. Expression of the tight junction protein ZO-1 in the olfactory system: presence of ZO-1 on olfactory sensory neurons and glial cells. *J Comp Neurol* 341:433-481, 1994
- 23) Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol* 400:469-486, 1998.
- 24) Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269:33-49, 2002
- 25) Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* 306:309-316, 2005
- 26) Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci* 94:655-67, 2003
- 27) Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810, 2004
- 28) Thiery JP. The Ig superfamily of adhesion molecules. In T Kreis, R Vale (eds), *Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*, second ed, p125-128, A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press, New York, 1999

Expression and localization of the adhesion molecule SgIGSF in the regeneration of the olfactory epithelium

Fusae Tsukioka, Department of Otorhinolaryngology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med. Soc., **115**, 21 – 28 (2006)

Key words adhesion molecule, SgIGSF, olfactory nerve, transection, olfactory epithelium, regeneration

Abstract

SgIGSF (Spermatogenic immunoglobulin superfamily) is a cell adhesion molecule originally discovered in the mouse testis. SgIGSF is expressed not only in spermatogenic cells but also in lung and liver epithelial cells and in neurons and glia, where it is localized to cell membrane. In the present study, I examined the expression and localization of SgIGSF in the mouse olfactory epithelium before and after transection of the olfactory nerves by use of RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry. In normal olfactory epithelium, SgIGSF showed 100 kDa in molecular weight, which was identical with that in the lung but different from that in the brain. SgIGSF was localized primarily on the membrane of olfactory cells and their axons. After olfactory nerve transection, the mature olfactory cells disappeared in 4-7 days but was regenerated in 7-15 days by proliferation and migration of basal cells followed by differentiation of basal cells to immature olfactory cells and maturation of immature olfactory cells. During this period, both the mRNA and protein for SgIGSF showed a transient increase, with the peak levels at 7 days and 11 days, respectively, after the transection. By immunohistochemistry, the strong immunoreactivity for SgIGSF after 7-11 days was localized to the membrane of migrating basal cells and immature olfactory cells. These results suggested that, during the regeneration of olfactory epithelium, the adhesion molecule SgIGSF plays physiological roles in migration, differentiation and maturation of olfactory cells and their progenitors.