

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06511

研究課題名(和文)胎生期内耳における遺伝子発現調節による遺伝子動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of gene dynamics due to regulation of gene expression in embryonic inner ear

研究代表者

三輪 徹 (Miwa, Toru)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70535591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期内耳(耳胞)へDach1を標的とするshort hairpin RNA(shRNA)プラスミドを導入し、内耳特異的Dach1遺伝子発現抑制モデルマウスの作成に成功した。本マウスの胎生期15日目(E15)の頭部を摘出し、in situ hybridizationを用いてDach1発現を確認したところ、Dach1の消失を認め、さらに、Dach1遺伝子に関連すると予想され、蝸牛血管条形成に強く影響を与えられられるPax6、Igf1遺伝子の発現減少を認めた。また、本マウスの成熟期蝸牛では、野生型マウスと比較して蝸牛血管条が菲薄化している所見を認めた。

研究成果の概要(英文)：We performed transuterine Dach1 targeted shRNA(shRNA-Dach1) gene transfer into the otocyst of wild-type mice to generate the inner ear specific Dach1 knockdown mice. Reporter gene (eGFP) expressed in the treated ear at embryonic day 15 (E15) and E18. No expression of Dach1 mRNA observed in the treated inner ear at E15 and E18. Pax6 and Igf1 mRNA expression reduced in the treated side at E15. At postnatal day 30 (P30), stria vascularis was thinned in the shRNA-Dach1 knockdown mice compared to wild-type mice.

研究分野：内耳基礎研究

キーワード：内耳基礎 内耳発生 聴覚機能 蝸牛血管条

1. 研究開始当初の背景

聴覚と平衡覚を司る感覚器である内耳は、全て胎生期において上皮性の袋状構造体である耳胞より形成される。この形成過程において、耳胞内腔上皮の各領域が最終的に内耳のどの構造に分化するかは、領域特異的に発現する転写調節因子および転写補助因子によって決定される。この事実はよく知られているが、未だ不明な点が多い。そこで本研究においては、Dachshund Family Transcription Factor 1(Dach1)遺伝子に着目し、マウス胎生期における内耳形成のメカニズムの一端を明らかにすることを旨とする。

Dach1 遺伝子は、ショウジョウバエの dachshund gene(dac)の哺乳類ホモログとして同定された(Mardon, Dev 1994)。ショウジョウバエにおいては、dac 遺伝子の欠損によりショウジョウバエの眼、四肢が低形成となることが報告されている(Davis, Mol Cell Biol 2001)。また、ショウジョウバエの脳インスリン産生細胞(IPCs)を用いた in vitro の研究から、dac は転写調節因子 Eyeless(Ey)と複合体を形成し、インスリン様成長因子 dilp5 遺伝子のプロモーター領域に結合し、協調的にインスリン分泌を制御することで、各組織の分化を促進すると考えられている(Okamoto, PNAS 2011)。一方、正常マウス胎生期内耳において Dach1 は、胎生 12 日(E12)の耳胞背側および E15 の蝸牛管外側(蝸牛血管条に分化する領域)に発現することが報告されている(Ayres, Genomics 2001)。また、E15.5 正常マウス胎生期内耳における Ey、dilp5 遺伝子のマウスホモログである Pax6、Igf1 遺伝子の発現について in situ hybridization 法を用いて検討を行い、Dach1 の発現部位と同じ蝸牛管外側に Pax6、Igf1 遺伝子も発現することを既に確認している。これらマウスにおいて所見とショウジョウバエにおいて既に明らかとなっている知見を考え合わせると、マウスにおいてもショウジョウバエ IPCs と同様に Pax6、Igf1 遺伝子を介して、マウス蝸牛血管条発生に関与していることが強く示唆される。このことを明らかにするためには Dach1 ノックアウトマウスを用いた研究が有用であると考え、Dach1 ノックアウトマウスは致死であるため(Davis, Mol Cell Biol 2001)、その詳細については未だ不明である。

上述の如く目的の遺伝子の欠損が致死である場合、臓器特異的な発現抑制モデル(コンディショナルノックアウト:cKO)マウスを作製し実験を行うことが多いが、一般的に用いられる作製方法では、その作製に時間、費用を要することが知られている。そこで、本研究においては、我々が従来より報告してきた方法を用いて、耳胞への遺伝子導入による内耳特異的な遺伝子発現抑制モデルを作製する。今回用いる内耳特異的な遺伝子発現抑制モデルマウスは、耳胞への遺伝子導入の技術的困難さを除けば、従来の cKO マウス作製に

比べ、その作製は簡便であり、時間、費用面において大きなメリットがある。申請者はこれまでに、in vivo でのマウス耳胞内腔への物質の投与技術、そして、耳胞内腔を覆う細胞とその周囲の細胞に対して遺伝子導入を行う技術を確立しており、この技術を用いた研究成果を報告してきた(Miwa and Minoda, NeuroReport 2011 cover page, Miwa and Minoda, Mol Ther 2013, Miwa and Minoda, Gene therapy 2015 review paper)。その中で申請者らは、遺伝子サイレンシングに用いられる short hairpin RNA (shRNA) プラスミドを E11.5 の耳胞へ導入することで、標的遺伝子の内耳内での発現が著明に抑制されることを報告している(Miwa and Minoda, Mol Ther 2013)。今回の研究は、本技術を用いて、Dach1 遺伝子を標的とする shRNA(shRNA-Dach1)を用いた内耳特異的な発現抑制モデルマウス(以下、内耳特異的な Dach1 ノックダウン(KD)マウスと記載する)を作成し実験を行う。今回検討対象とする Dach1 遺伝子は正常マウスでは E12 に発現開始する(Ayres JA, Genomics 2001)ため、shRNA-Dach1 の遺伝子を E11.5 に導入することにより、内耳における Dach1 の確実な発現抑制が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、内耳形成に重要な役割をもつことが示唆されている Dach1 遺伝子に着目して研究を行う。Dach1 欠失マウスは致死であることから(Davis, Mol Cell Biol 2001)、申請者らがこれまでに確立してきた胎生期内耳(耳胞)への遺伝子導入による内耳特異的な遺伝子発現抑制モデルマウスを作成して検討を行う。具体的には、正常マウス耳胞に、Dach1 を標的とする short hairpin RNA(shRNA) プラスミドを導入し、内耳特異的な Dach1 発現抑制モデルマウスを作成し、内耳形態の変化と関連遺伝子の動態を解析する。このことを通して、正常マウス胎生期内耳形成のメカニズムの一端を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

- 1) 正常マウスの E11.5 耳胞に対して、Reporter 遺伝子として eGFP を付与した shRNA-Dach1 プラスミドベクターを導入し、E15、E18、生後 30 日(P30)で形態学的評価を行った。
- 2) E15、E18 の時点で、処置したマウス胎児を摘出し、固定後凍結切片を作成した。DIG プロブを用いた In situ hybridization を用いて胎生期内耳形態の変化と関連遺伝子 Pax6、Igf1 の動態を解析した。
- 3) 生後マウス頭部離断後、蝸牛を摘出し、脱灰・固定した後、凍結切片を作成した。蝸牛血管条を観察するため、免疫組織染色法により形態学的評価を行った。

4. 研究成果

1) eGFP を付与した shRNA-Dach1 を野生型マウスの胎生期内耳に注入し、エレクトロポレーション法にて遺伝子導入を行ったところ、E15においてeGFPのシグナルを内耳蝸牛内に確認した(図1)。

2) 本マウスのE15において、in situ hybridization を用いて Dach1 発現を確認したところ、Dach1 の消失を認め(図2)、内耳特異的 Dach1 KD マウスであることを確認した。

3) E15 の時点で Dach1 遺伝子に関連すると予想される遺伝子の動態を in situ hybridization で確認したところ、聴覚の維持に重要な役割を持つ蝸牛血管条形成に強く影響する Igf1 mRNA のシグナル強度の減少を認めた(図3)。Pax6 については未公表とする。

4) また、本マウスの成熟期蝸牛(生後30日、P30)では、野生型マウスと比較して蝸牛血管条が菲薄化する所見を認めた(図4)。

図1: E15の蝸牛凍結切片。蝸牛上皮にeGFP(緑)の発現を認める。

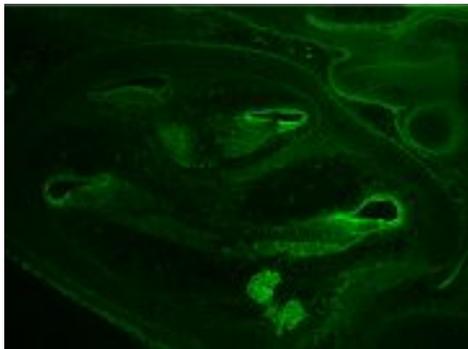


図2: E15におけるshRNA-Dach1導入マウス蝸牛上皮ではDach1 mRNAシグナルの消失を認める(上矢頭)。正常マウス蝸牛上皮(下矢頭)。

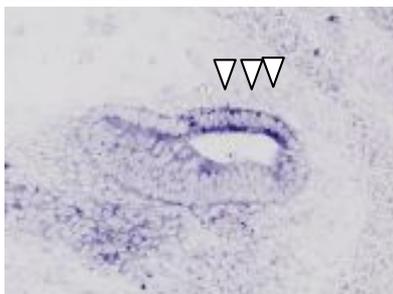
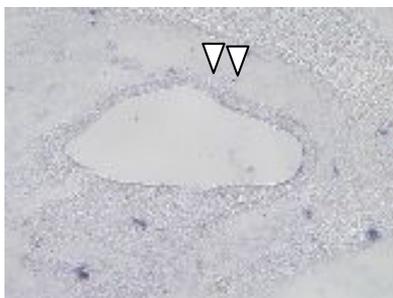


図3: E15におけるshRNA-Dach1導入マウス蝸牛上皮ではIgf1 mRNAシグナルの減少を認める(上矢頭)。正常マウス蝸牛上皮(下矢頭)。

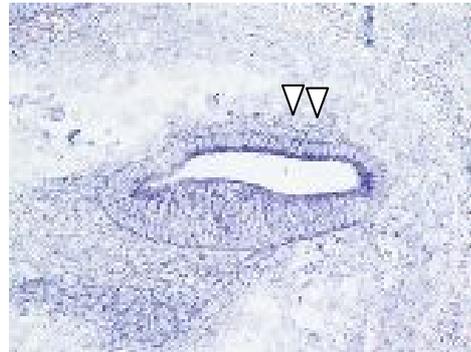
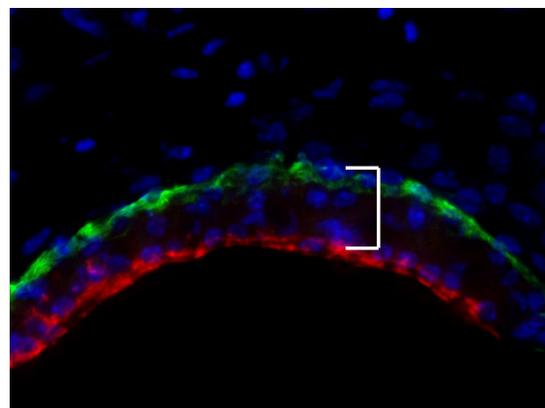
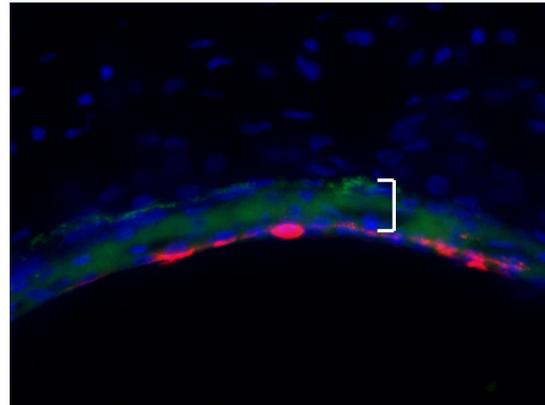


図4: P30におけるshRNA-Dach1導入マウスの蝸牛血管条では、菲薄化を認める(上)。正常マウス蝸牛血管条(下)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1) Takeda H, Minoda R, Miwa T, Yamada T, Ise M. Transplanting mouse induced pluripotent stem cells into mouse otocysts in vivo. Neuroscience Letters 584, 153-158, 2017

2) Takeda H, Kurioka T, Kaitosuka T, Tomizawa K, Matsunobu K, Hakim F, Mizutari K, Miwa T, Yamada T, Ise M, Shiotani A, Yumoto E, Minoda R. Protein transduction therapy into cochleae via the round window niche in guinea pigs. Molecular Therapy - Meth&Cli Dev 3, 16055, 2016(online)

3) Shibata S*, Miwa T*, Wu HH, Levitt P, Ohyama T. Hepatocyte Growth Factor-c-MET Signaling Mediates the Development of Nonsensory Structures of the Mammalian Cochlea and Hearing. The Journal of Neuroscience 36(31), 4410-15, 2016
*:equal contributor.

4) Minoda R, Miwa T, Ise M, Takeda H. Potential treatments for genetic hearing loss in humans: Current conundrums. Gene Therapy 22(8).603-9, 2015

[学会発表](計 1 件)

Miwa T, Ohyama T, Shibata S, Minoda R, Yumoto E. Roles of HGF/MET signaling in the mouse cochlea. 52th Inner Ear Biology Workshop, Rome, Italy, Sep.2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権] なし

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 三輪 徹 (Miwa Toru)
熊本大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
非常勤診療医師
研究者番号：70535591

(2)研究分担者 (なし)

研究者番号：

(3)連携研究者 (なし)

研究者番号：

(4)研究協力者 (なし)