

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 3 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791567

研究課題名（和文） 内耳発生における転写因子 GATA3 の機能解析

研究課題名（英文） The functional analysis of a transcriptional factor GATA3 in an inner ear development.

研究代表者

星野 朝文（HOSHINO TOMOFUMI）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00550534

研究成果の概要（和文）：

マウス胎仔の耳胞や内耳でGATA3が発現することから、GATA3が内耳の発生過程において重要な機能を担っていると考えられる。今までにも*Gata3*ノックアウトマウスを用いた実験が試みられたが、さまざまな実験上の制限から十分な解析ができず、今回はトランスジェニックレスキュー法という新たな方法を用いて、解析を行った。このマウスの一部では内耳低形成の表現型がみられ、GATA3が内耳の発生過程において重要な機能を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Because the transcriptional factor GATA3 express in otic vesicles and inner ears, it is suggested that GATA3 is important for the developmental pathway of the inner ear. Little is known about the function of GATA3 in developmental pathway because of lethality of *Gata3* knockout mouse. Then, we used the new approach, a transgenic rescue technique. This clarified that part of *Gata3*-null-ears occurs to inner ear malformation. This result indicates GATA3 is indispensable to form the inner ear from the otic vesicle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：転写因子、GATA3、内耳、発生

1. 研究開始当初の背景

転写因子 $math1$ は内耳発生過程に関与する転写因子として知られているが、障害された有毛細胞に $math1$ を過剰発現させることで、有毛細胞の再生を惹起したという報告は、今まで不可能とされてきた内耳再生研究を大きく発展させたものとして注目を浴びている。さらに、近年の発生工学分野、再生工学分野の発展により、内耳発生に関与する転写因子の機能に着目した内耳再生研究が盛んに行われている。

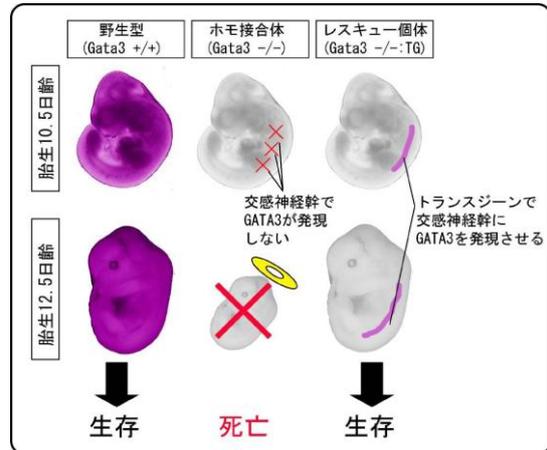
2. 研究の目的

転写因子は、発生過程において時空間特異的な遺伝子発現を精密に制御することで、器官発生統御の中心的役割を担っている。このような発生過程に重要な転写因子群の中に、DNA 上のGATA 配列を特異的に認識するGATA 因子群がある。GATA3 はGATA 因子群に属する転写因子で、ヒトのHDR 症候群（副甲状腺機能低下症，感音難聴，腎泌尿器奇形）の原因遺伝子として同定されていること、 $Gata3$ ノックアウトマウスのヘテロ接合体では、蝸牛組織異常を伴った難聴の表現型を呈することから、内耳において何らかの機能を担っていることが示唆されている。一方、内耳発生過程において、発生初期（胎生9.5日齢）からGATA3 が発現していることから、発生過程においてもGATA3 が何らかの機能を担っている可能性が示唆されている。しかし、ヘテロ接合体の解析では、内耳の巨視的形態（蝸牛がらせん状になること）には異常はみられず、GATA3 の機能欠損の解析ツールとして不十分である。また、GATA3 の発現が完全に欠損している $Gata3$ ノックアウトマウスのホモ接合体は、内耳発生初期（胎生10.5日齢）に死亡してしまい、解析することは困難である。

3. 研究の方法

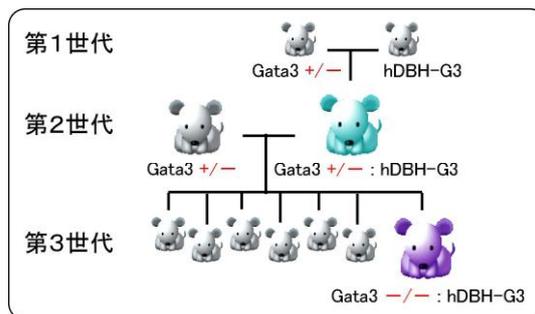
GATA3 は胎生期の交感神経幹に発現しカテコールアミン産生に重要な転写因子であるため、 $Gata3$ ノックアウトマウスのホモ接合体は交感神経系の機能不全により胎生早期に致死となる。研究協力者の解析から、交感神経系組織にGATA3 を発現させることにより、胎生致死を回避できることが明らかになっており（概念図参照）、この方法をトランスジェニックレスキュー法という。また、この胎生致死を回避できたマウス（レスキュー個体と呼ぶ）は、口蓋の形成異常および腎低形成により出生直後に死亡するが、出生直前までの解析は可能であり、内耳におけるGATA3 の機能を完全に欠損させた実験動物として用いることができる。

トランスジェニックレスキュー法の概念図

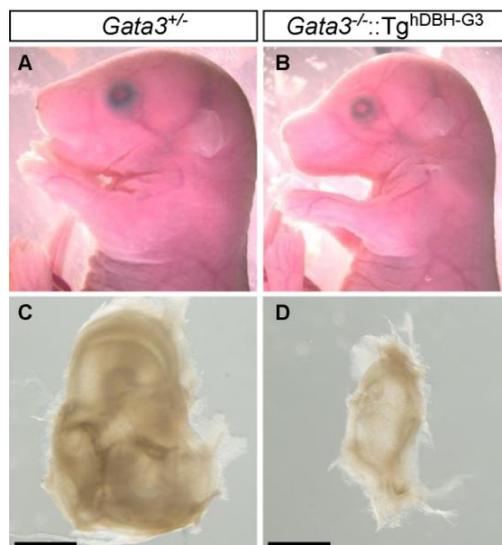


4. 研究成果

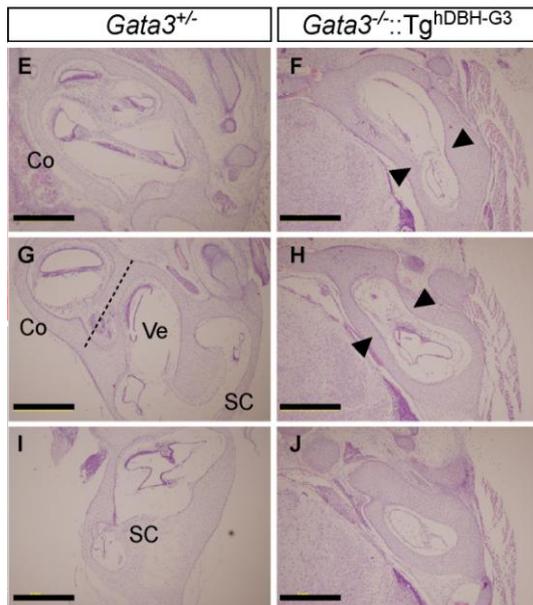
このレスキュー個体を得るために、 $Gata3$ ノックアウトマウス（下図の $Gata3 +/-$ ）と、交感神経系組織にGATA3 を発現させることができるトランスジェニックマウス（下図のhDBH-G3）を下記のように交配した。



この組み合わせで交配を行い、第2世代の母親を妊娠中に帝王切開すると、目的のレスキュー個体の胎児が得られる。まずは、胎生18.5日齢のレスキュー個体を解析すると、下記のような内耳の低形成の表現型がみられた。



更に、この内耳を摘出した後に、パラホルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋した後、薄切しヘマトキシリン染色したのが下記の写真である。



上記に示すようなマウスの内耳低形成を呈することについて、ヒト内耳奇形の一亜型であるMichele型奇形でも同様に、内耳構造が単一腔の形態となる。内耳は、単に球形をした細胞集団である耳胞（内耳原器）から、蝸牛・前庭・半規管を含む複雑な立体構造へと劇的に変化することがわかっているが、Michele型奇形のような重度の形成異常が、GATA3単独の機能異常により惹起されることは、GATA3が内耳発生におけるマスター遺伝子である可能性を示唆している。ヒトMichele型奇形については、いまだその原因は解明されておらず、その成因にGATA3、或いはその下流遺伝子が関わっている可能性も十分に考えられる。

そこで、マウスの耳胞の形成される胎生10.5日とそれ以降のマウス内耳の形態を、レスキュー個体を用いて経時的に解析した。ただ、レスキュー個体も完全にトランスジーンでGATA3の欠損による致死性を回避させるわけではなく、メンデル則に沿った出産でなかったため、更に解析は極めて困難であった。その結果、胎生10.5日齢と11.5日齢の胎児の一部で耳胞の低形成の表現型がみられた。しかし、その表現型は全てのレスキュー個体でみられたわけではなく、浸透率はそれほど高くなかったため、解析数を増やして検討を行っているが、現在のところ再現性は得られていない。そこで、現在も解析を続行しているところであり、今後の結果が期待される。

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5件)

- ① Hoshino T, Tabuchi K, Nishimura B, Tanaka S, Nakayama M, Ishii T, Warabi E, Yanagawa T, Shimizu R, Yamamoto M, Hara A, Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読あり, Vol. 415, 2011, 94-98
- ② Tabuchi K, Hoshino T, Hirose Y, Hayashi K, Nishimura B, Nakayama M, Hara A, Age-related hearing loss and expression of antioxidant enzymes in BDF1 mice. *Acta Otolaryngol.*, 査読あり, Vol. 131, 2011, 1020-1024
- ③ Ohgami N, Ida-Eto M, Shimotake T, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M., c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 査読あり, Vol. 107, 2010, 13051-13056
- ④ Hoshino T, Tabuchi K, Hara A., Effects of NSAIDs on the Inner Ear: Possible Involvement in Cochlear Protection. *Pharmaceuticals*, 査読あり, Vol. 3, 2010, 1286-1295
- ⑤ Tanaka S, Tabuchi K, Hoshino T, Murashita H, Tsuji S, Hara A, Protective effects of exogenous GM-1 ganglioside on acoustic injury of the mouse cochlea. *Neurosci. Lett.*, 査読あり, Vol. 473, 2010, 237-241

[学会発表] (計3件)

- ① 星野朝文、原 晃、聴力改善手術における術前検査の有用性、日本耳科学会学術講演会、2011年11月24日、沖縄コンベンションセンター
- ② 星野朝文、原 晃、阿久津博義、高野晋吾、村下秀和、内視鏡下経鼻下垂体手術後の鼻腔形態について、日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2011年5月19日、国立京都国際会館
- ③ Hoshino T, Tabuchi K, Hara A, Expression of Antioxidant Enzymes in Aged Mice, Sixth international symposium on Meniere's disease and inner ear disorders, 2010年11月14日、国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 朝文 (HOSHINO TOMOFUMI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：00550534

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

林 健太郎 (HAYASHI KENTARO)
筑波大学・人間総合科学研究科・研究生

田淵 経司 (TABUCHI KEIJI)
筑波大学・医学医療系・講師

原 晃 (HARA AKIRA)
筑波大学・医学医療系・教授

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授