

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～ 2011

課題番号：22791596

研究課題名 (和文) ヘッジホッグシグナルによる中耳・外耳発生制御機構

研究課題名 (英文) Hedgehog signaling regulates middle and external ear development

研究代表者 嘉田 真平

(KADA SHINPEI)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：70543263

研究成果の概要 (和文)：

中耳・外耳奇形は頻度の高い先天奇形であるが、その原因遺伝子はわかっていないものが多い。ヘッジホッグシグナルは発生期の形態形成に重要な役割を果たし、その異常は様々な先天異常の発症に関与することが報告されている。ヘッジホッグシグナル経路を構成する遺伝子を欠くノックアウトマウスでは脳、骨、消化管、肺の形成異常を来す事が知られており、近年ヘッジホッグシグナル経路は体性幹細胞の制御にも関与することが指摘されており、発生期だけでなく、成体組織の維持や再生にも関与している事が分かってきている。

ヘッジホッグシグナルと中耳・外耳奇形との関連は明らかになっていないが、我々はヘッジホッグシグナルが中耳・外耳の発生にも関与しているのではと考え、ヘッジホッグシグナルの中耳・外耳形成における役割を明らかにすることを目的として、中耳・外耳でヘッジホッグシグナルが過剰発現するトランスジェニックマウスを作成した。その中耳・外耳の変異を解析したところ、正常マウスに比べ外耳が拡大している所見を認め、ヘッジホッグシグナルが外耳の発生に関与している事が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Hedgehog signaling is reported to play important roles in morphogenesis in the developmental stage of various organs. However, little is known about the roles of hedgehog signaling in the development of middle and external ear. We have developed *Emx2(+/-Cre);Rosa26<sup>SmoM2</sup>* transgenic mice, which overexpress hedgehog signaling in a target organ, and found anomaly of the external ear, which suggests that hedgehog signaling plays some role in the development of the external ear.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

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：中耳、外耳、発生、ヘッジホッグ

### 1. 研究開始当初の背景

中耳・外耳奇形は頻度の高い先天奇形である。中耳、特に耳小骨奇形は伝音性難聴による先天難聴の原因となり言語の発達に影響を及ぼしえるが、その奇形発生メカニズムは複雑であり十分にわかっていない。

ヘッジホッグシグナル伝達経路はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存されており、発生における形態形成や発癌といった生理的・病的な生命現象において重要な役割を演じていることが明らかとなっている。

ヘッジホッグシグナル経路は分泌型タンパク質であるソニックヘッジホッグ (Shh) が Patched-1 (PTCH1) と呼ばれる受容体に結合することから始まる。Shh と PTCH1 の結合によって、Shh 受容体複合体のコンポーネントである Smoothed (Smo) の抑制がはずれ、細胞内にシグナルが伝わり、最終的に Gli 転写因子を介して様々な標的遺伝子の転写が活性化され生理機能を発揮していく。

ヘッジホッグシグナル経路を構成する遺伝子を欠くノックアウトマウスでは脳、骨、消化管、肺の形成異常を来す事が知られている。また近年ヘッジホッグシグナル経路は体性幹細胞の制御にも関わることが指摘されており、造血幹細胞や神経系、乳腺の幹細胞など、様々な組織の体性幹細胞を増殖に導く事が知られている。発生期だけでなく、成体組織の維持や再生にも関与している事が分かっている。

中耳および外耳は第一および第二鰓弓の領域から発生し、その発生には Hoxa1 や Gsc などの遺伝子の関与が報告されているが、これまでヒトにおいてヘッジホッグシグナルが中耳・外耳奇形に寄与しているという報告は国内・国外を含めなかった。

### 2. 研究の目的

ヘッジホッグシグナルの中耳・外耳形成における役割を明らかにすること

### 3. 研究の方法

ある特定の遺伝子の機能を調べるために、その遺伝子が欠落したノックアウトマウスを作成することでその機能欠損を解析するという手法が従来より用いられている。しかしヘッジホッグシグナルに関わる遺伝子のノックアウトマウスは重度の発生異常に

より胎生致死に陥ったりするため中耳・外耳発生特有の異常の観察が難しい。

そこでコンディショナルノックアウトマウス(あるいはトランスジェニックマウス)を利用すれば中耳・外耳発生にかかわるヘッジホッグシグナルの働きを解明させることが出来るのではないかと考え、以下の予備実験を行った。尚、「コンディショナル」とは特定の遺伝子を任意の場所(組織,細胞),任意の時間(胎生期,生後週齢)に目的の遺伝子の発現を欠落(あるいは過剰発現)させるという意味であり、この手法を用いることで胎生致死に陥ることなく目的の組織を解析することが可能となる。

まず目的遺伝子 A をはさむように loxP 配列を導入したマウス 1 [A(floxed/floxed)] を作成する。次に目的の場所(例えば中耳・外耳)に発現することが知られている遺伝子 B (のプロモーターの下流)に組み替え酵素 Cre の遺伝子を挿入したマウス 2 「B(+Cre)」を作成し、マウス 1 とマウス 2 を交配してコンディショナルノックアウトマウス「B(+Cre);A(floxed/floxed)」を作成する。

Cre 酵素は loxP 配列にはさまれた DNA を切り出す働きを持つことが知られており、このコンディショナルノックアウトマウスでは原理的に遺伝子 B が発現している時期・場所で遺伝子 A が欠落する。

そこで特定の領域でヘッジホッグシグナリングが持続発現するようデザインされた Emx2(+Cre);Rosa26SmoM2 マウスを作成し、その中耳・内耳を解析した。

### 4. 研究成果

A: まず Emx2(+Cre)マウスの Cre 発現活性を解析したところ中耳発生に関わる第一・第二鰓弓にその活性が認められ、また、発生が進むと中耳の一部、外耳道・耳介に認められた。(図1、図2)

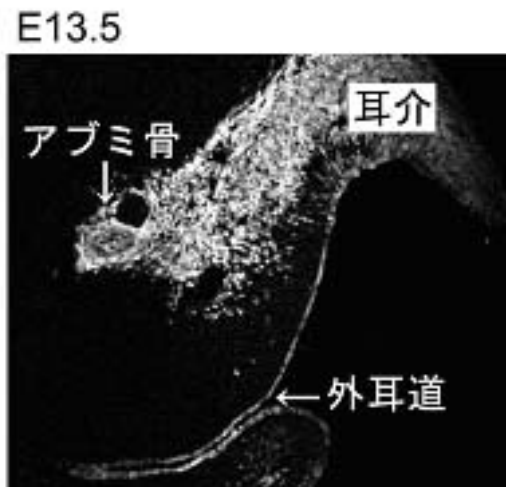
Emx2(+Cre)と Rosa26SmoM2 を交配させた Emx2(+Cre);Rosa26SmoM2 マウスは中耳・外耳発生に関わる第一・第二鰓弓でヘッジホッグシグナルが発現し続けるものであることが予想された。

図 1



(胎生 12.5 日の  $Emx2(+/Cre)$  マウスにおける Cre 発現活性 (白)。胎生 12.5 日では、第一鰓弓、第二鰓弓が発達し、また内耳の原基の形態が明瞭になってくるが、中耳、耳介、外耳の形態形成はまだ始まっていない。第一鰓弓、第二鰓弓に Cre 活性が見られ、また内耳においても活性を認める。)

図 2



(胎生 13.5 日の  $Emx2(+/Cre)$  マウスにおける Cre 発現活性 (白)。胎生 13.5 日では中耳・外耳の発生が進み、外耳道が明瞭となり、また耳小骨の一つであるアブミ骨の形態も明瞭となる。発生が進むにつれ、アブミ骨など中耳の一部のほか、外耳道、耳介にも Cre 活性を認められる。)

B : 次にヘッジホッグシグナル過剰発現の中耳・外耳発生への影響を確認するためこの  $Emx2(+/Cre);Rosa26SmoM2$  マウスを

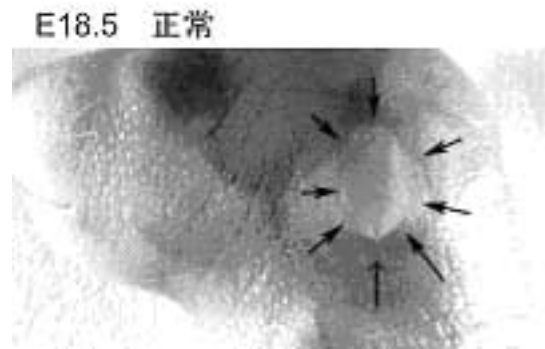
作成した。

このマウスは  $Emx2(+/Cre)$  で Cre 活性のある部分で  $Smo$  の発現が欠落するようデザインされたマウスである。 $Smo$  はソニックヘッジ経路に対し抑制性に働くことが分かっており、 $Smo$  の発現が欠落することで、ソニックヘッジシグナルは過剰発現することとなる。

マウスの作成においては  $Emx2(+/Cre)$  と  $Rosa26SmoM2$  を交配させ、理論確率 4 分の 1 で  $Emx2(+/Cre);Rosa26SmoM2$  を得た。

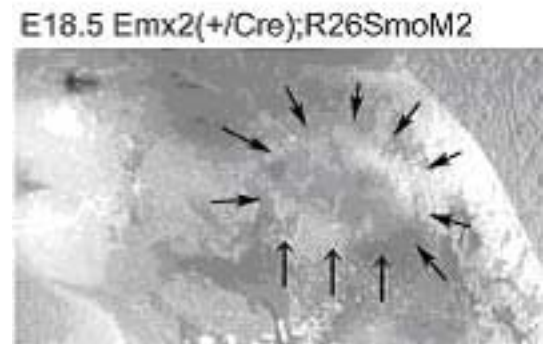
こうして得られた  $Emx2(+/Cre);Rosa26SmoM2$  マウスの表現型を調べたところ、正常胎仔 (図 3) に比べ  $Emx2(+/Cre);Rosa26SmoM2$  マウスでは耳介が大きく発達していることがわかった (図 4)。

図 3



(正常 18.5 日の胎仔の耳介。正常胎仔では胎生 13.5 日ごろより耳介の形態形成が始まり、胎生 18.5 日では明瞭な耳介が完成する。)

図 4



(胎生 18.5 日における  $Emx2(+/Cre);Rosa26SmoM2$  マウスの耳介。正常胎仔に比べ、ヘッジホッグシグナルが過剰発現している  $Emx2(+/Cre);Rosa26SmoM2$  マウスでは、耳介の明瞭な拡大を認める。)

本研究によりヘッジホッグシグナルが過剰発現すると耳介が大きく拡大することが分かった。以上の結果により、ヘッジホッグシグナリングが中耳・外耳の発生に寄与していることが明らかとなった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

嘉田 真平 (KADA SHINPEI)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：70543263