

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22791610  
 研究課題名（和文） PC3 遺伝子改変マウスを用いた蝸牛ラセン神経節細胞の発生・分化メカニズムの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of the development of spiral ganglion cells utilizing PC3-GFP knock-in mice  
 研究代表者  
 山田 卓生 (YAMADA TAKAO)  
 熊本大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：90573593

研究成果の概要（和文）：蝸牛ラセン神経節の発生のメカニズムを明らかにすることを目的として、神経発生のマーカー遺伝子として報告されている PC3 遺伝子に着目した。PC3 遺伝子改変マウスのヘテロ接合体において蝸牛ラセン神経節細胞に PC3 が発現していること、ホモ接合体においてラセン神経節細胞の数が減少していることを確認し、PC3 がラセン神経節細胞の発生・分化に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the development mechanism of cochlear spiral ganglion cells, we investigated the PC3 gene. PC3 gene was expressed at the spiral ganglion cells of heterozygous PC3-GFP knock-in mice. Spiral ganglion cells were decreased in homozygous PC3-GFP knock-in mice. The results indicate that PC3 gene is involved in the development of spiral ganglion cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

キーワード：耳科学

## 1. 研究開始当初の背景

蝸牛のラセン神経節細胞は聴覚において重要な役割を担っているが、その発生における分子学的メカニズムは依然として多くの部分が不明である。われわれは、このメカニズムの一端を解明することを目的として、PC3 遺伝子 (TIS21 遺伝子のオーソログ) に着目した。PC3 は BTG/Tob ファミリーと呼ばれる増殖抑制遺伝子群のひとつであり、マウス小脳、脳において神経細胞の発生・分化に関与していると報告されている。われわれは 2010

年に、胎生期ラットの蝸牛ラセン神経節細胞に PC3 が発現していることを抗 PC3 抗体を用いた免疫化学染色を用いて明らかにしている。さらに、PC3 蛋白がラセン神経節細胞の増殖期にあたる胎生 16 日目～20 日目には細胞質に限局して発現し、分化期にあたる生後 4 日目～7 日目には核にも発現していることを確認した。これは、PC3 が細胞内における局在を変化させながら細胞の発生・分化に関与している可能性を示唆していると考えられる。

## 2. 研究の目的

PC3 がラセン神経節細胞の発生・分化に関わっていることを明らかにすること。

## 3. 研究の方法

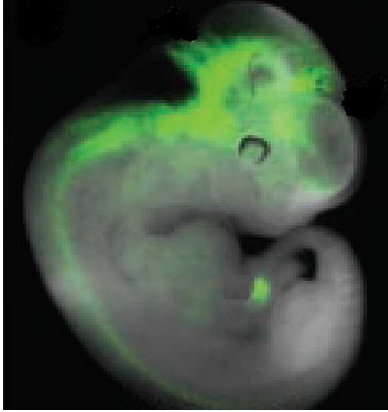
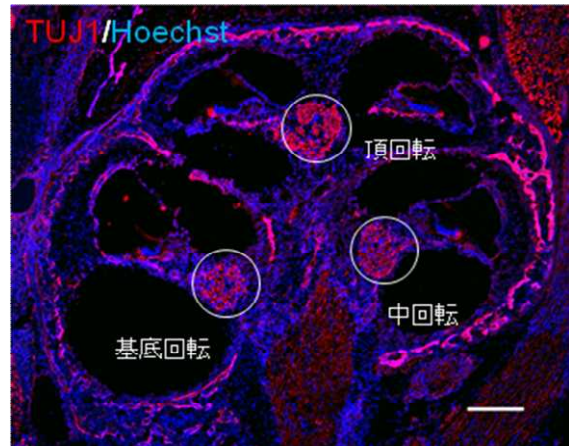


図 1 : PC3-GFP ノックインマウス (胎生 13.5 日目)

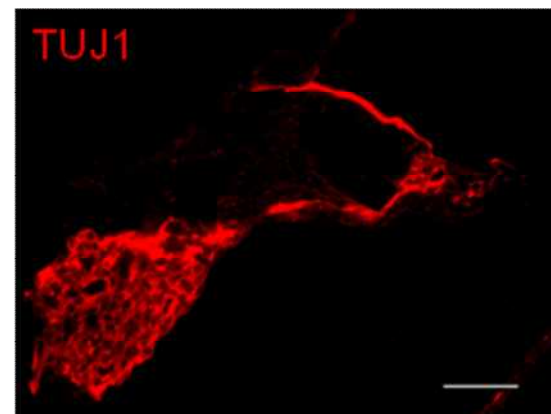
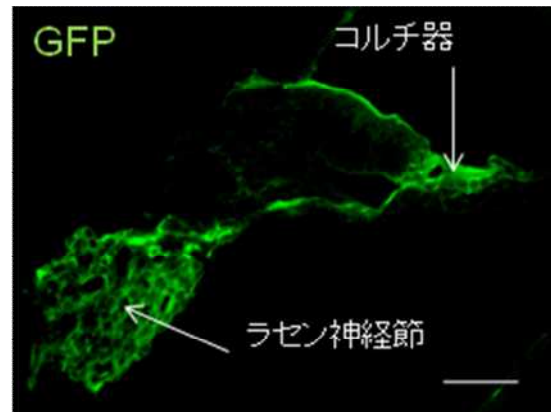
PC3 遺伝子のかわりに GFP を組み込んだ PC3-GFP ノックインマウスを用いた。PC3 対立遺伝子の一方のみを GFP に置き換えたマウス (以後、PC3(+/-GFP)マウスと表記)、両方の PC3 遺伝子を GFP に置き換えたマウス (以後、PC3(-GFP/-GFP)マウスと表記)に加え、コントロールとして野生型マウス (以後、PC3(+/-)マウスと表記)を用いた。日齢は胎生 15.5 日目 (E15.5)、胎生 18.5 日目 (E18.5)、生後 4 日目 (P4) のものを用いた。これらのマウスの頭部の凍結切片を作成し、ラセン神経節のマーカーとして  $\beta$  III-チューブリン (以後、TUJ1 と表記)、核のマーカーとしてヘキストの多重免疫化学染色を施行した。これらの切片を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP (PC3 遺伝子) の発現の有無の有無について調べた。また、PC3 遺伝子の欠失によるラセン神経節細胞の発達における影響を評価する目的で、PC3(-GFP/-GFP)マウスと PC3(+/-)マウスのラセン神経節細胞の数を測定し、比較した。細胞数の測定は、蝸牛軸に沿って蝸牛を切断したときに現れる 3 つのラセン神経節の断面 (基底側から基底回転部、中回転部、頂回転部と表記) においてそれぞれ行い、それらの和を蝸牛全体の細胞数とした。また、測定する細胞は TUJ1 とヘキストが両方とも陽性となっている細胞のみとした。これらの操作を PC3(-GFP/-GFP)マウスと PC3(+/-)マウス 4 匹 (8 耳) ずつにおいて行い、マン・ホイットニー検定を用いて統計学的に比較した。



(Scale bar: 200  $\mu$ m)

図 1 : 蝸牛軸断面の免疫化学染色の写真  
白丸で囲まれた部分がラセン神経節の断面である。3 つの断面での細胞数の和を 1 切片あたりの細胞数とした。

## 4. 研究成果



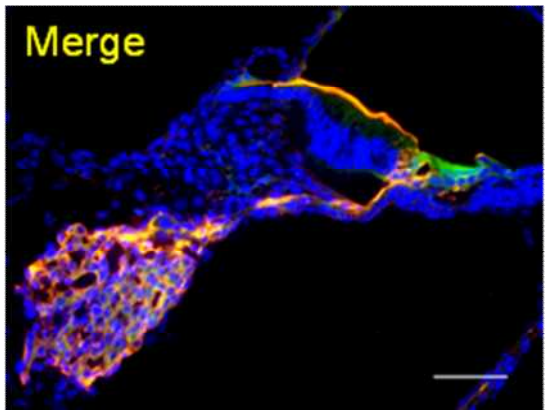
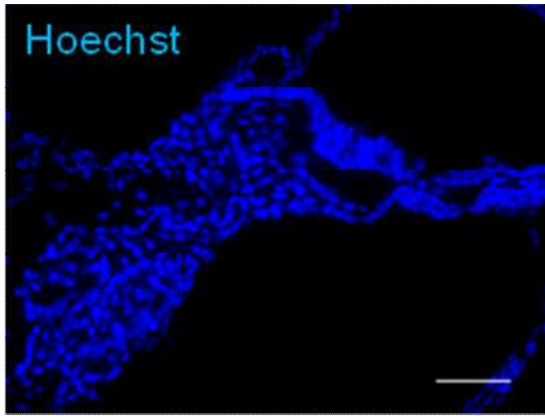
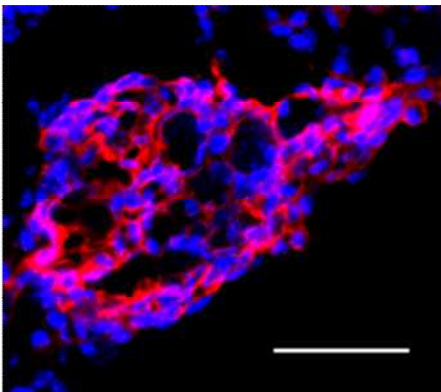
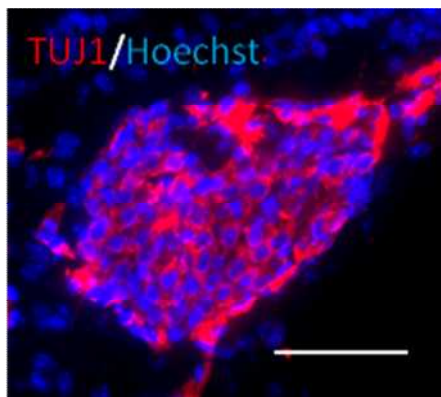


図 2 : ラセン神経節における GFP の発現  
ラセン神経節細胞、コルチ器 (有毛細胞) において GFP の発現を認める。



(Scale bars: 50  $\mu$ m)

図 3 : ラセン神経節の形態

上段が PC3 (+/+) マウスのラセン神経節、下段が PC3 (-GFP/-GFP) マウスのラセン神経節である。いずれも E18.5 のものである。PC3 (-GFP/-GFP) マウスのラセン神経節では細胞の縮小、細胞数の減少がみられる。

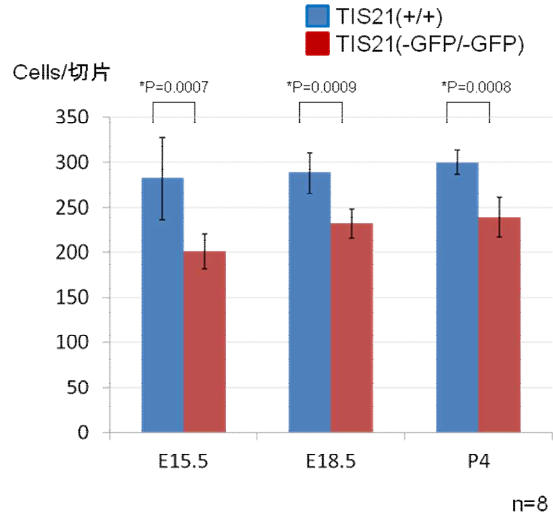


図 4 : ラセン神経節の細胞数

E15.5)、E18.5)、P4 のいずれのステージにおいても、PC3 (-GFP/-GFP) マウスのラセン神経節細胞数の減少を認めた。

PC3 (+/-GFP) マウスのラセン神経節細胞において、ラセン神経節細胞に GFP の発現を認めた。これは、マウスにおいても PC3 がラセン神経節に発現することを示している。今後はラットで行ったのと同様に免疫化学染色により PC3 蛋白の局在の変化を調べる必要があると考えられる。

また、PC3 (-GFP/-GFP) マウスにおいて、ラセン神経節細胞の数の減少を認めた。ラセン神経節細胞の発生におけるキー遺伝子として Neurog1、NeuroD1 などの遺伝子が報告されているが、これらの遺伝子欠失マウスではラセン神経節細胞の消失あるいは減少がみられることが確認されている。PC3 も同様にラセン神経節細胞の発生に関与していると考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 山田 卓生、三輪 徹、伊勢 桃子、蓑田 涼生、湯本英二

Tis21 is involved in development of spiral ganglion cells  
36th MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology  
2013.2.19、Baltimore Marriott Waterfront Hotel (アメリカ合衆国 ボルチモア)

②山田 卓生、三輪 徹、伊勢 桃子、蓑田 涼生、湯本 英二  
Tis21 遺伝子改変マウスの蝸牛ラセン神経節細胞における Tis21 の発現  
日本耳科学会、2012.10.5、名古屋国際会議場 (名古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 卓生 (YAMADA TAKAO)  
熊本大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：90573593