

## 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 30 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：22791611  
 研究課題名（和文） PC3 を用いたラットラセン神経節細胞の分化・成熟の誘導  
 研究課題名（英文） Induction of differentiation and maturation in the spiral ganglion cells of rat with PC3  
 研究代表者  
 伊勢 桃子（ISE MOMOKO）  
 熊本大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：20573596

研究成果の概要（和文）：ラセン神経節細胞の発生・分化のメカニズムはこれまで不明であったが、最近我々は増殖抑制遺伝子の一つである PC3 が胎生期の蝸牛ラセン神経節細胞に発現しており、ラセン神経節細胞の分化・成熟に関与している可能性を初めて報告した。本研究は、単離ラセン神経節細胞を用いた PC3 発現抑制の効果を見ることにより、PC3 のラセン神経節細胞の分化・成熟に対する関与をより明確にすることを目的とした。単離ラセン神経節細胞に対して、PC3.siRNA を導入し 3 日間培養後に PC3 タンパクの発現抑制により生じるラセン神経節細胞の形態変化について検討したが、コントロール群と比べて明らかなラセン神経節細胞の形態変化は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：Little is known about the detailed mechanism of the spiral ganglion cells (SGCs) of the rat cochlea developmental process. However, we reported that PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in the SGCs of rat cochlea. In this study, we intend to make a clear relation between PC3 and the differentiation and maturation by examining the effect of suppressed expression of PC3 using the isolation SGCs introduced PC3. siRNA. We observed the morphologic change of the SGCs which occurred because of suppressed expression of PC3 protein, after introducing PC3. siRNA into the SGCs and having cultured the cells for three days. However, there was no significant morphologic change of the SGCs compared with control group.

## 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：再生医学、ラセン神経節細胞、PC3、神経突起

## 1. 研究開始当初の背景

ラセン神経節細胞は、蝸牛有毛細胞によって機械的エネルギーから電氣的エネルギーへ

と変換された音情報を脳へと伝達するという聴覚機能において極めて重要な役目を担っている。耳科臨床において、ラセン神経節細胞の傷害の程度は、補聴器装用者の語音弁

別能、そしてラセン神経節細胞を直接電気刺激することにより聴覚の獲得を行う人工内耳使用者の聴取能にも大きな影響を及ぼすことが知られている。このようにラセン神経節細胞は、神経耳科領域において極めて重要な細胞群であるが、これまでその発生・分化の分子生物学的メカニズムについては明らかではなかった。

神経細胞の発生・分化には、細胞の増殖、増殖の停止、分化という各段階が必要である。このことより、本研究申請者は、BTG/Tobファミリーに属する増殖抑制遺伝子の一つであるPC3に着目し、蝸牛におけるPC3のラセン神経節細胞の発生・分化への関与の可能性について検討を行った。その結果、PC3タンパクは、ラットの胎生期16日目(E16)、E20、生後4日目(P4)の蝸牛ラセン神経節細胞に発現しており、さらにその発現が、E20からP4の間に細胞質から核へと移動をすることを明らかにした(Ise M, Neuroreport, 2010)。このような細胞内の局在の変化が起こるE16からP4は、正にラットラセン神経節細胞が分化を行う時期である。

一方、Tironeはマウス小脳においてPC3の過剰発現を行うことにより小脳顆粒細胞前駆細胞の増殖が抑制され、小脳顆粒細胞への分化が促進したと報告している(Journal of Neurosci, 2004)。Huttnerは、in vivoでの検討の結果から、PC3は“神経細胞の発生のマーカー”(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999)であると結論付けている。これに加えて、細胞内のタンパクの局在の変化は、その機能の発現に極めて重要であることが知られており、その細胞内における局在は、核局在シグナル(NLS)や核輸送シグナル(NES)などのシグナルにより決定される。PC3も、そのアミノ酸配列からNLS、NESをとともに有していることが推測されている(Ise M, Neuroreport, 2010)。すなわち、PC3がNLSとNESを有している可能性と本研究申請者が既に報告している上述した免疫染色法での結果を考え合わせると、ラセン神経節細胞が分化を行う時期に、ラセン神経節細胞内においてその局在を変化させるPC3は、ラセン神経節の分化に深く関与している可能性が示唆される。しかし、過去の報告ではPC3の細胞内での局在が、核である時にPC3が作用するのか、それとも細胞質である時に作用するのかについては、両方の報告があり明確な結論が出ておらず、よってPC3の胎生期のラセン神経節細胞における詳細な作用とそのメカニズムについても不明である。

## 2. 研究の目的

1) 単離ラセン神経節細胞を用いた in vitro の系で、siRNA (small interfering RNA) による

PC3の発現抑制とPC3遺伝子導入による過剰発現を行い、その後の形態的变化について検討を行う。PC3.siRNAの導入、PC3の導入には、ラセン神経節細胞に対し高い感染能を有し(Dazert S, Int J Dev Neurosci, 1997)、効率よく一過性の遺伝子導入とRNAi実験が可能であることが報告されているアデノウイルスベクターを用いる。

1-1) これまでの研究申請者が行ったラットを用いた実験結果とラセン神経節細胞の発生・分化の時期を考慮して、E14、E16、E20、P4のラットからラセン神経節細胞を単離し、PC3タンパクの細胞内局在を確認する。E20以前の胎児由来のラセン神経節細胞においては、細胞質にPC3タンパクが局在していると考えられ、P4ラット由来の単離ラセン神経節細胞においては核にPC3タンパクが局在していると考えられる。これら単離ラセン神経節細胞にPC3.siRNAを導入し、3日間培養後にPC3タンパクの発現抑制により生じるラセン神経節細胞の形態変化について、ネガティブコントロールであるsiRNAを導入したコントロール群と比較検討する。

1-2) 目的1-1と同様にラット胎児からラセン神経節細胞を単離し、これら単離ラセン神経節細胞に対して、アデノウイルスベクターを用いてPC3遺伝子を導入する。その後3日間培養し、PC3タンパクの過剰発現により生じるラセン神経節細胞の形態変化について、ネガティブコントロールアデノウイルスベクターを導入したコントロールと比較検討する。

2) PC3は、細胞の分化を誘導することに加え、細胞のアポトーシスを抑制する作用を有しており、これらの作用は神経成長因子(NGF)を加えることにより増強されることが報告されている(Puisieux Oncogene, 2002)。この結果を踏まえて、本研究においてはさらに、アポトーシスによる細胞死を起こすことが知られているシスプラチン添加による単離ラセン神経節細胞障害モデルを用いて、PC3のアポトーシスの抑制効果を検討を行う。

## 3. 研究の方法

1) E14、E16、E20、P4のラットから単離したラセン神経節細胞にPC3.siRNAを導入し、ラセン神経節細胞の成熟に対する効果を形態評価する。

E14、E16、E20、P4の正常ラットからラセン神経節を採取し、トリプシン処理によって細胞単位に単離する。単離直後と1日間37℃、

CO25%の環境下で培養する培養後の細胞内局在を確認し、その局在が変化しないことを確認する。PC3 に対する siRNA を組み込んだアデノウイルスベクター (AV.PC3 siRNA) を作成し、PC3 の細胞内局在が変化しないことを確認の上、37°C、CO25%の環境下で1日培養後、ラセン神経節細胞に AV.PC3 siRNA を加えさらに3日間培養する。コントロールとしてどの遺伝子の転写産物もターゲットとしない配列の siRNA および GFP をコードしたアデノウイルスベクターベクターを用いる。AV.PC3 siRNA 導入群、コントロール群について、ラセン神経節細胞のマーカーである抗 TUJ1 抗体を用いて免疫染色を行いラセン神経節細胞を同定し、ヘキスト染色、抗ニューロフィラメント抗体を用いて、神経突起の伸長、細胞の大きさ、N/C 比を成熟の指標として NIH イメージを用いて測定する、これに加え増殖細胞のマーカーである抗 Ki-67 抗体を用い分裂状態の細胞数カウントする。それぞれの結果は統計学的に評価する。E14、E16、E20、P4 のラットから単離したラセン神経性細胞に PC3.siRNA を導入し、ラセン神経節細胞の成熟に対する効果を形態評価する。

2) ラット胎児からラセン神経性細胞を単離し、アデノウイルスベクターを用いて PC3 の過剰発現を行い、その効果を評価する。

PC3 および GFP を組み込んだアデノウイルスベクターを培養液に加えることにより、単離培養ラセン神経節細胞に遺伝子導入する。コントロール群として GFP のみ組み込まれたアデノウイルスベクターベクターを用いる。導入後、37°C、CO25%の環境下で3日間培養を行う。PC3 導入群、コントロール群に対し、抗 TUJ1 抗体を用いてラセン神経節細胞を同定し、これらの細胞の中で GFP のシグナルを認めるもの (=遺伝子が導入されたもの) に対して NIH イメージを用いて神経突起の長さ、細胞体の大きさを測定し、さらに N/C 比を測定する。さらにこれに加え増殖細胞のマーカーである抗 Ki-67 抗体を用い分裂状態の細胞数をカウントする。それぞれの結果は統計学的に評価する。

3) シスプラチン添加による傷害前もしくは後にアデノウイルスベクターを用いて PC3 を過剰発現させ、その後の生存細胞数を評価する。

生後5日目のラセン神経節細胞を単離培養し、培養液にシスプラチンを加えることによりラセン神経節細胞の傷害モデルを作成し、ラセン神経節細胞におけるアポトーシスの有無を確認する。

A) PC3 および GFP を導入したアデノウイルスベクター群

B) GFP のみを導入したアデノウイルスベクター群 (コントロール群)

C) A) +NGF 群

D) C) +NGF 群

E) NGF のみ群

上記の5群を作成し、さらに傷害されたラセン神経節細胞にそれぞれを導入もしくは、37°C、二酸化炭素5%の環境下で3日間培養を行う。抗 TUJ1 抗体を用いた免疫染色と FLICA in vitro apoptosis detection kit を用いた染色を同時に行い、アポトーシスとネクローシスを起こしている細胞数を別々にカウントし、群間比較を行う。

上記の遺伝子導入実験については、当学内の P2 実験施設内で全て行うこととする。

#### 4. 研究成果

胎生14日目、胎生16日目、胎生20日目、生後4日目の正常ラットからラセン神経節を採取し、トリプシン処理によって細胞単位に単離し、単離培養ラセン神経節細胞における PC3 の細胞内局在の確認を行うために、単離直後と1日間37°C、CO25%の環境下でその局在が変化しないことを確認した。胎生20日目では PC3 は細胞質に、生後4日目では核にその局在を認め、培養1日後もこの局在に変化はなかったことを確認できたが、胎生14日目、胎生16日目のラットラセン神経節細胞については、培養条件の確立に至らなかった。そこで、培養条件が確立している胎生20日目および生後4日目のラセン神経節細胞に対して、PC3.siRNA を導入し、3日間培養後に PC3 タンパクの発現抑制により生じるラセン神経節細胞の形態変化について検討したが、コントロール群と比べて明らかなラセン神経節細胞の形態変化は認めなかった。現在、PC3 および GFP を組み込んだアデノウイルスベクターを培養液に加えることにより、単離培養ラセン神経節細胞に PC3 を導入し、コントロール群と神経突起の長さ、細胞体の大きさを比較検討中である。

#### 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1件)

①Ise M. PC3<sup>TIS21/BTG2</sup> expression pattern in rat cochlea. 35<sup>th</sup> the Association for Research of Otolaryngology Midwinter

Meeting.2012.2.25-29、サンディエゴ、米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 桃子 (ISE MOMOKO)  
熊本大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：20573596

(2) 連携研究者

蓑田 涼生 (MINODA RYOSEI)  
熊本大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30284772

三輪 徹 (MIWA TORU)  
熊本大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：70535591