

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33933

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700336

研究課題名(和文) Hox変異マウスを糸口にしたトノトピー形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Approaching auditory circuit development using Hox mutant mouse

研究代表者

成田 裕一(Narita, Yuichi)

名古屋文理大学・健康生活学部・准教授

研究者番号：40360614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：音情報が内耳神経(SG)を経て蝸牛神経核(CN)へ伝わる際の神経回路は、音の周波数に対応してトポグラフィックな構造を形成しているが、この構造が形成される仕組みは解明されていなかった。Hox遺伝子に注目して、解析を行ったところ、聴覚回路が形成される時期のCNにおいてHoxa2およびb2が発現している事が明らかになった。そこで、これらのコンディショナル変異マウスを作出し、解剖学レベル、神経活性レベル、および分子レベルでの解析を行った結果、CNへのSG神経投射が不正確になっていることが明らかになった。これらの結果はHox遺伝子の聴覚回路形成における重要な役割を示すものである。

研究成果の概要(英文)：In auditory circuit, sound information from the inner ear is transmitted to the cochlear nucleus (CN) via spiral ganglion (SG) neurons. The connection between these components is organized topographically in frequency-specific manner. But very little has been known how the development of topographic connection is organized. Hox genes are well known for AP axis patterning during early development, but recent evidence suggests their roles in establishment of topographic circuitry. We found that Hoxa2 and b2 are strongly expressed in the mouse CN from the beginning of its formation. Thus, we analyzed the morphological, functional, and molecular consequences of conditional deletion of Hoxa2 and Hoxb2 in CN. We identified SG projection in Hoxa2/Hoxb2 cKO targets significantly broader area in CN both morphologically and functionally. These results suggest a role of Hox genes in topographic connectivity ensuring precision of sound transmission in the auditory circuit.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：Hox 聴覚回路 トノトピー 発生

1. 研究開始当初の背景

聴覚回路の活動は、音の振動が内耳の有毛細胞で感知されることで始まる。その情報は、内耳神経に受け取られ、後脳の蝸牛神経核へと伝わる。音が内耳で受け取られる際に、内耳の構造と音自体の物理的な性質によって、低周波数の音はより頂側の、高周波数の音はより基底側の有毛細胞を刺激する。つまり、この時点で音の周波数情報は内耳の頂-基底軸上の位置情報に翻訳されることになる。この周波数に基づいた位置情報は、内耳神経から蝸牛神経核へ投射される際も維持されており、この構造を「トノトピー」と呼ぶ。マウスの出生直後には、ほぼ正確なトノトピーが既に形成されている事が明らかになっているため、音が聞こえるようになってからの神経活動依存的な refinement よりも、発生段階での分子的なコントロールが、トノトピーの形成には重要であると考えられている。しかし、胎児期におけるトノトピーの解析に関しては、これまで有効な手段がなく、ほとんど解析されたためしなかった。

この問題を解決すべく、研究代表者は新たなトノトピー解析法を確立した。NeuroVue®を神経トレーサーとして使用することにより胎児期での内耳ラベルを可能にするとともに、ラベルされた内耳神経が標的する蝸牛神経核領域の相対サイズを、内耳でのトレーサーの拡散の度合いとの相関で解析することで、定量的な解析を行うことが可能になった。この手法を用いることでトノトピー発生のメカニズムに切り込めるのではないかとというのが本研究を開始する動機であった。

2. 研究の目的

本研究においては、トノトピー発生メカニズムの解析の糸口として *Hox* 遺伝子に注目した。*Hox* はホメオボックスを持つ転写因子群である。胚発生の初期に体軸に沿って順番に発現し、前後軸のパターニングに重要な働きをしていることが、さまざまな生物の研究結

果から示されている。神経組織でも入れ子状の発現パターンを示し、前後軸に沿った神経分化を担っていることが知られている。さらに近年の研究結果から、*Hox* 遺伝子が神経発生の後期においても、より特異的な領域で発現を続けており、その発現が神経回路形成に重要であることが示されるようになった。

そこで、マウス聴覚回路の発生過程において、様々な *Hox* 遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、*Hoxa2* と *Hoxb2* が E13.5 以降の蝸牛神経核に非常に強く発現している事を発見した。E13.5 は、まさに内耳神経からの投射が、蝸牛神経核へ到達し、トノトピー形成が始まるステージである。さらに近年、ヒトにおける *HOXA2* の突然変異が聴覚機能の異常を示すことが報告された (Alasti *et al.* 2008)。これらはいずれも、*Hoxa2*、*Hoxb2* の 2 遺伝子がトノトピー発生において役割を果たしている可能性を示唆するものである。そこで、これら 2 遺伝子の機能解析を行う目的で、蝸牛神経核特異的な *Hoxa2* および *Hoxb2* の二重コンディショナル変異マウス (以下 *Hoxa2/Hoxb2* cK0 と省略) を作出した。本研究においては、*Hoxa2/Hoxb2* cK0 について、解剖学レベル、神経活性レベル、および分子レベルから多角的に解析することにより、トノトピー形成のメカニズムを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

① 解剖学レベルでのトノトピー解析

予想される解剖学的な変化が、質的なもの (神経投射が別な領域を標的とする) ではなく、量的なもの (標的エリアが広がるなど) であると考えられるため、通常の神経ラベル法では解析が困難であった。これが、現在までトノトピーの形成メカニズムについて研究が進んでいない要因でもあったため、研究代表者が確立した胎児期の内耳神経ラベルの定量的解析法を用いて解析を行った。E18.5 の *Hoxa2/Hoxb2* cK0 および対照群マウ

スの固定した頭部を解剖し、内耳の頂部と基部を別々の神経トレーサーで標識し、PFA中で7~10日インキュベートした。その後、内耳および脳幹を取り出して、内耳でのトレーサーの拡散具合を定量するとともに、脳幹のビブラトーム切片を作成し、蝸牛神経核中でトレーサーによりラベルされている領域についても定量し、それらの相関を解析した。*Hoxa2/Hoxb2* cKOと対照群マウス間で比較を行った。

② 神経活性レベルでのトノトピー解析

2つの周波数 8kHz と 15kHz の音刺激を、外部音を遮断したチャンバー内でマウスに90分間与えたものを試料として使用した。cFos抗体を用いた免疫染色により、各音刺激によって活性化された神経細胞を可視化した。通常マウスにおいては、各周波数の音刺激によって蝸牛神経核の一部だけが活性化され、その結果「周波数バンド」という形で観察できることが知られている。*Hoxa2/Hoxb2* cKOマウスにおいても同様の解析を行い、周波数バンドの形状を対照群マウスとの間で比較した。

③ Hox 下流因子についての分子レベルでの解析

Hoxは転写因子であるため、その下流で様々なガイド分子がトノトピーの形成に関与していると考えられた。そこで、トノトピー形成に関わる分子的なメカニズムの解明を目的に、*Hoxa2/b2* cKOの蝸牛神経核における遺伝子発現プロファイルを解析した。まずマイクロアレイやデータベース検索により、Hoxの下流でトノトピー形成に関わる遺伝子の候補を抽出した。次に候補遺伝子の発現プロファイルを、*in situ* ハイブリダイゼーション法および定量PCR法により解析した。候補遺伝子の一つ *ephrinb2* の変異マウスを利用することができたため、解剖学レベルでの解析を行った。

4. 研究成果

① 解剖学レベルでのトノトピー解析

通常の神経標識法では解析が困難であったため、研究代表者が開発した定量的なトノトピー解析法を用い、*Hoxa2/Hoxb2* cKOのトノトピー構造を対照群との間で比較した。その結果、大まかなトノトピー構造に違いはないものの、*Hoxa2/Hoxb2* cKOにおいて、内耳神経が蝸牛神経核に投射する際の標的エリアが相対的に大きくなっていることが明らかになった(図1)。この結果は、*Hoxa2/Hoxb2* cKOのトノ

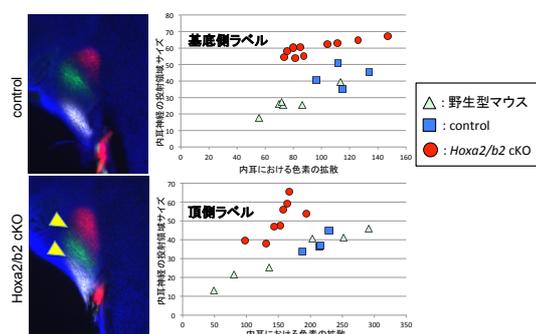


図1 *Hoxa2/b2* cKOマウスにおける定量的トノトピー解析

トピー構造が正確性という面で異常を起こしていることを示す結果である。また、同様の解析を*Hoxa2*または*Hoxb2*単独のcKOについても行った結果、*Hoxa2/Hoxb2* cKOにおいてのみ、顕著な表現型が観察されることを確認した。この結果は、*Hoxa2*および*Hoxb2*が蝸牛神経核においてredundantに働き、トノトピーの正確性に関わる働きを担っている可能性を示すものである。

② 神経活性レベルでのトノトピー解析

8kHzおよび15kHzの音刺激を90分間与えたマウスの脳幹を用いて、凍結切片を作成した。各周波数によって活性化させた領域(周波数バンド)を可視化するため、数種のcFos抗体を用いて免疫染色条件の確立を行った。確立できた方法を用いて、*Hoxa2/Hoxb2* cKOマウスと対照群マウスについて解析を行った。その結果、*Hoxa2/Hoxb2* cKOマウスにおいて8kHzおよび、15kHzそれぞれに相当する周波数バンドが対照群のものと比較して太くなっている様子が確認できた(図2)。また、8kHzと15kHzの2つ

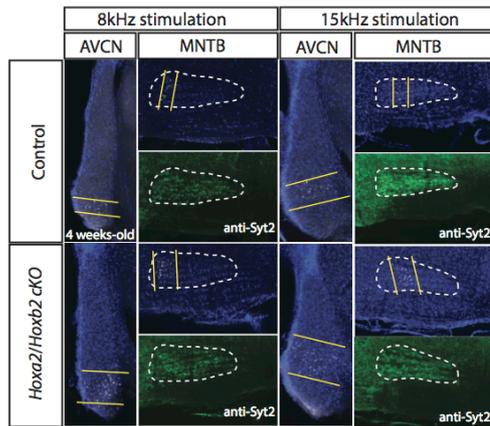


図2 音刺激を与えた後にcFos抗体染色を行った結果
各周波数刺激により活性化された細胞が染色されている

の音刺激を同時に与えた場合に、対象群マウスでは2つの周波数に対応する2本の周波数バンドがはっきり確認できるのに対して、*Hoxa2/Hoxb2* cKOマウスにおいては、それらの境界が不明瞭になり、太い一本のバンドとして観察される、という表現形が確認された。これらの結果はいずれも、解剖学的な解析により明らかになった「内耳神経の蝸牛神経核への投射が不正確になっている」という結果を裏付けるものであり、*Hoxa2*および*Hoxb2*が解剖学的のみならず、機能的な面においてもトノトピーの形成に重要な役割を果たす因子であることを示唆している。

③ Hox 下流因子について分子レベルの解析

Hox 遺伝子の下流で聴覚回路トノトピーの正確性に関わっている因子を同定する目的で、遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、いくつかの候補遺伝子と並んで、軸索ガイダンス因子として知られる *ephrinb2* が Hox の下流因子の候補としてリストアップされた。そこで、*in situ* ハイブリダイゼーションおよび、リアルタイム PCR 法で *ephrinb2* の発現を解析した結果、対照群マウスと比較して *Hoxa2/Hoxb2* cKO マウスにおいては *ephrinb2* の発現が低下していることが確認された(図3)。さらに *ephrinb2* のミュータントマウスを用いて、解剖学的なトノトピー解析を行ったところ、*Hoxa2/Hoxb2* cKO の表現型と同様に、内耳神経から蝸牛神経核へ

の投射が不正確になっていることが確認で

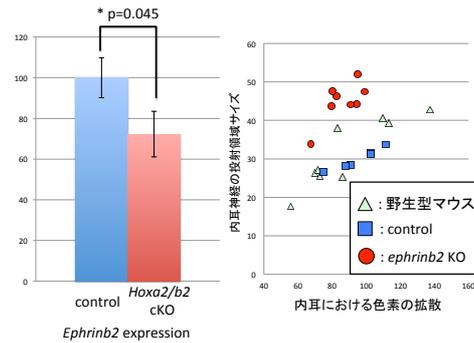


図3 *Hoxa2/b2* cKOにおける*ephrinb2*発現量と、*ephrinb2* KOのトノトピー構造解析きた(図3)。この結果から、*Hoxa2*および*Hoxb2*が持つトノトピーの正確性を形成するための機能には、少なくとも *ephrinb2* による軸索誘導が関わっていることが明らかになった。

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1件)

1. 成田裕一, Kajari Karmakar, Sébastien Ducret, and Filippo M. Rijli, Hox 遺伝子と聴覚回路の発生、岡山実験動物研究会会報、査読無、第30号、2014、11-13

[学会発表] (計2件)

1. Yuichi Narita, Hox gene expression and function in auditory circuit development (聴覚回路発生におけるHox遺伝子の発現と機能)、第36回日本分子生物学会、2013年12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
2. Yuichi Narita, Involvement of Hox Genes in Auditory Circuit Development (聴覚回路形成におけるHox遺伝子の役割)、第35回日本分子生物学会、2012年12月12日、(福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 裕一 (NARITA, Yuichi)

名古屋文理大学・健康生活学部・准教授

研究者番号：40360614