

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791810

研究課題名(和文)内耳発生後期に必要なラセン靭帯分化誘導シグナルの解明

研究課題名(英文) Analysis of spiral ligament induction mechanism in the late phase of inner ear development

研究代表者

小林 俊樹 (Kobayashi, Toshiaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70570183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：内耳発生後期のPax3遺伝子変異マウス胚において、神経上皮細胞と神経堤細胞は血管条中間細胞予定領域に遊走するにも関わらず、ラセン靭帯予定領域の縮小が認められた。ラセン靭帯予定領域にCx26の発現は認められたが、減弱していた。また、ラセン靭帯分化誘導因子Tbx18陽性細胞も、ラセン靭帯予定領域に存在するが、減少していた。これらの結果から、ラセン靭帯の成熟には胎生期の転写因子Pax3の発現が関与し、血管条中間細胞からのシグナルが必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the prospective region of the spiral ligament is reduction in Pax3 gene mutation mice, although neuroepithelial cells and neural crest cells migrate into the intermediate cell region of the developing stria vascularis. Cx26 protein and Tbx18 mRNA expression, spiral ligament induction markers, are reduced in the developing spiral ligament of Pax3 gene mutation mice. These results suggest that Pax3 is related in the maturation of spiral ligament, and the induction signal from the intermediate cells of stria vascularis may be required for it.

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：内耳発生

1. 研究開始当初の背景

ラセン靭帯と血管条は蝸牛側壁を構成する。蝸牛側壁は生後に成熟して、聴覚に必須な内リンパ電位の源となることが知られている。内リンパ電位の獲得には血管条と共にラセン靭帯の正常発生が必要である。マウスでは、前駆細胞(未熟な蝸牛間葉細胞)がラセン靭帯構成細胞(ファイブロサイト)へと分化するのは出生直前からであるが、この内耳発生後期のラセン靭帯分化誘導シグナルは明らかとなっていない。出生直前からラセン靭帯予定領域の未熟な蝸牛間葉細胞に Fgf レセプター 4 (Fgfr4) 等が突然発現し始めることが知られているが、分子生物学的なメカニズムは未だ不明である。すなわち、ラセン靭帯分化誘導機構は詳細に理解されていない。将来の血管条中間細胞となる神経上皮細胞と神経堤細胞に発現する遺伝子として転写因子である *Pax3* 遺伝子が知られている。*Pax3* 遺伝子は先天性感音難聴と色素沈着異常等を合併する Waardenburg 症候群 1 型の原因遺伝子として報告されている。Waardenburg 症候群 2 型の先天性高度感音難聴の原因は原因遺伝子である *Mitf* 遺伝子の変異に伴い、血管条へ遊走する神経堤細胞の発生異常が関与していることが示唆されている。一方、Waardenburg 症候群 1 型の原因遺伝子である *Pax3* 遺伝子の変異に伴う内耳病態生理は詳細には理解されていない。研究代表者らは以前より、*Pax3* ノックアウトマウスを用いて Waardenburg 症候群 1 型の内耳病態生理に関する検討を行ってきた。これらの知見から本研究の着想に至ったアイデアとして、出生直前の未熟な蝸牛間葉細胞をファイブロサイトへと分化させるのは内耳発生後期における血管条の発生現象が重要な役割を演じているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

マウスの内耳発生において、出生直前の未熟な蝸牛間葉細胞をファイブロサイトへと分

化させるのは血管条基底細胞の成熟が重要であることが知られている。一方、マウス内耳発生後期のラセン靭帯と血管条中間細胞との関係については詳細に理解されていない。この未知なる発生生物学的事象を探求する目的で、血管条中間細胞の発生現象が発生中のラセン靭帯に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

内耳発生後期におけるラセン靭帯と血管条の成熟についての関係を観察した。この実験には、将来の血管条中間細胞メラノサイトとなる神経堤細胞に発現する転写因子 *Pax3* の遺伝子変異マウス二系統を用いた。

*Pax3^{Cre/+}*マウス：*Pax3* 遺伝子がノックアウト(KO)されている遺伝子改変マウスである。

*Pax3^{Cre/+}*マウスと *loxP* 配列が組み込まれた GFP レポーターマウスの交雑(以後、*Pax3^{Cre/+}; GFP* マウスとする)を用いて、発生中の内耳蝸牛に遊走する神経上皮細胞の挙動を可視化した(*Cre-loxP* システムによりこの交雑の神経上皮細胞は永続的に蛍光色素 GFP で標識される)。

Sp-d マウス：*Pax3* 遺伝子配列に 1 塩基変異を有する自然発症マウスである。*Sp-d* マウスと *Wnt1-Cre; GFP* マウス(神経堤細胞に特異的発現を示す *Wnt1* 遺伝子のプロモーター下で Cre リコンビナーゼが発現するトランスジェニックマウスと *loxP* 配列が組み込まれた GFP レポーターマウスの交雑)の交雑(以後、*Wnt1-Cre; Sp-d; GFP* マウスとする)を用いて、発生中の内耳蝸牛に遊走する神経堤細胞の挙動を可視化した。

本研究で用いた *Pax3* 遺伝子変異マウスは二系統共に横隔膜の発生異常に伴い、出生致死となるため、出生直前のステージである胎生 18.5 日を研究対象とした。

4. 研究成果

(1)胎生 18.5 日のパラフィン切片を作製し、HE 染色にて蝸牛形態を観察したところ、*Pax3^{Cre/+}; GFP* マウスと *Wnt1-Cre; Sp-d; GFP* マウスのラセン靭帯予定領域の縮小が認められた。

(2)胎生 18.5 日の凍結切片を作製し、タンパクの発現局在を観察する手法である免疫組織化学法を行った。蝸牛側壁において、血管条辺縁細胞マーカー S100 に寄り添うように GFP 陽性細胞が飛び石状に観察された。Pax3 の遺伝子変異が存在しても、神経上皮細胞と神経堤細胞は血管条中間細胞予定領域に遊走することがわかった。また、若干ではあるが GFP 陽性細胞は Nestin 陽性のラセン靭帯予定領域にも存在した。ラセン靭帯の構成細胞は内耳近傍の間葉細胞だけではなく、神経上皮細胞と神経堤細胞も含まれている可能性が考えられた。次に、ラセン靭帯ファイブロサイトマーカーの一つ Cx26 の発現解析を行った。Cx26 をコードする GJB2 遺伝子は先天性難聴の原因遺伝子最も多いことが知られている。ラセン靭帯予定領域に Cx26 の発現は認められたが、減弱していた。Pax3 遺伝子も先天性難聴を合併する Waardenburg 症候群 1 型の原因遺伝子として知られており、ラセン靭帯の発生異常が関与しているのかもしれない。

これらの研究成果から、ラセン靭帯ファイブロサイトの正常発生には将来の血管条中間細胞メラノサイトとなる神経上皮細胞と神経堤細胞における転写因子 Pax3 の発現量が関与しており、内耳発生後期に必要なラセン靭帯分化誘導シグナルは血管条中間細胞から分泌されている可能性が示唆された。

(3) mRNA の発現局在を観察する手法である *in situ* hybridization 法を用いて、胎生 18.5 日の蝸牛側壁の遺伝子発現解析を行った。血管条中間細胞マーカーである Dct の発現パターンを観察したところ、血管条辺縁細胞に寄り添うように Dct の発現が飛び石状に認められ、血管条中間細胞はメラノサイトに分化していると考えられた。次に、ラセン靭帯マーカー Tbx18 の発現解析を行った。Tbx18 は、血管条中間細胞であるメラノサイトと接する間葉細胞ファイブロサイトを間葉上皮転換させるのに、重要な役割を演じていることが知られている。Tbx18 陽性細胞は、ラセン靭帯予定領域に存在するが、減少していた。これらの結果から、ラセン靭帯の成熟には血

管条中間細胞からのシグナルが必要である可能性が示唆された。本研究で用いた Pax3 遺伝子変異マウスは出生致死となるため、ラセン靭帯の代表的な生理学的実験手法である内リンパ電位を計測することはできない。この問題を解決するため出生後の Pax3 遺伝子変異モデルを観察可能にする実験系の開発に現在取り組んでいる。

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0件)

[学会発表](計2件)

1. Tomokatsu Udagawa, Norifumi Tatsumi, Toshiki Kobayashi, Masahiro Rikitake, Yuichiro Yaguchi, Hiromi Kojima, Hiroshi Moriyama, Masataka Okabe. Neural crest cells invade the vesicle derived epithelium. 第35回日本分子生物学会. 2012年12月11日(福岡市).
2. Tomokatsu Udagawa, Norifumi Tatsumi, Toshiki Kobayashi, Yuichiro Yaguchi, Hiromi Kojima, Hiroshi Moriyama, Masataka Okabe. Neural crest cells migrate into the vesicle derived epithelium. 第20回日世界耳鼻咽喉科学会. 2013年6月1日~5日(ソウル市).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 俊樹 (KOBAYASHI TOSHIKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：70570183

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし