

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861396

研究課題名(和文) 蝸牛の発生・分化を司る遺伝子システムにおけるTis21遺伝子の役割解明

研究課題名(英文) The function of Tis21 gene at development of the cochlea

## 研究代表者

草場 雄基 (Kusaba, Yuki)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70648592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：聴覚において重要な働きを担う蝸牛のラセン神経節細胞の発生・分化のメカニズムについては未だ不明な点が多く、当研究はそのメカニズムの一部を明らかにすることを目的としてTis21遺伝子に着目した。Jackson研究所(アメリカ)より購入したTis21欠失マウスの頭部凍結切片を作製し、免疫染色、in situ hybridizationを施行し、胎生期内耳におけるTis21蛋白の発現について検討を行った。今後は、内耳発生に関与しているとNgn1、NeuroD、Atoh1などの遺伝子との関連についても、免疫染色などを用いて調べる予定である。

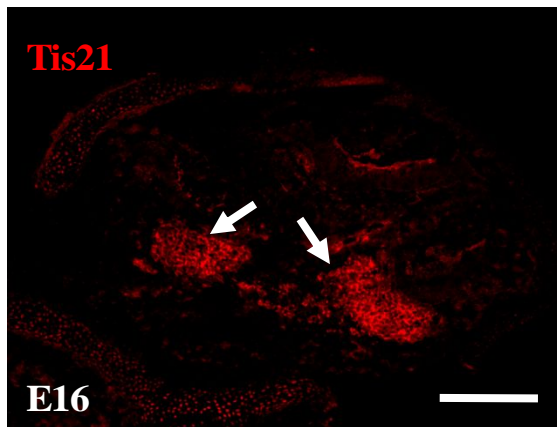
研究成果の概要(英文)：We purchased Tis21 deficient mice from Jackson Laboratory ( the United States ) , underwent immunostaining and in situ hybridization, which examined the expression of Tis21 protein in embryonic inner ear . Morphological assessment of Tis21 deficient mice in the future ( cochlea form , the number of cochlear hair cells , spiral ganglion cell numbers , etc.) carried out , which is scheduled to be examined pathology of dysfunction . In addition , with respect to the context of the gene , such as Ngn1 , NeuroD , Atoh1 and are involved in inner ear development , it is expected to examine using , for example , immunostaining .

研究分野：聴覚

キーワード：Tis21 聴覚

### 1. 研究開始当初の背景

聴覚を司る感覚器である蝸牛には、鼓膜の振動を介し蝸牛内に伝わった機械的エネルギーを電気的エネルギーに変換する内・外有毛細胞、電気的エネルギーを脳へと伝達するラセン神経節細胞が存在している。この蝸牛の発生・分化の分子機構についてはこれまでも精力的に研究されてきたが、特にラセン神経節細胞については不明な点が多く、治療についても確立した方法がないのが現状である。この分子機構の一端を解明するため、われわれは Tis21 遺伝子に着目した。Tis21 遺伝子は BTG/Tob ファミリーと呼ばれる細胞増殖抑制遺伝子群のひとつであり、細胞周期の制御、アポトーシス抑制、脳や小脳における神経細胞の発生・分化を制御などの働きが報告されている。当教室林田らは、野生型ラットにおいて Tis21 がラセン神経節細胞に発現することを報告しているが、Tis21 がラセン神経節細胞の発生・分化において影響を及ぼしているかについては明らかではなかった。今回、われわれは Tis21 欠失マウスに対して、その形態、機能について調べることで Tis21 のラセン神経節細胞の発生・分化における影響について検討することとした。



**図 1：野生型ラット（胎生 16 日）の蝸牛軸断面の免疫染色の写真**

ラセン神経節細胞（矢印）に Tis21 の発現を認める。

### 2. 研究の目的

ラセン神経節細胞の発生・分化の分子機構の一端を解明することを目的として、そこで果たす Tis21 遺伝子の役割について調べる。具体的には、Tis21 欠失マウスにおけるラセン神経節細胞の形態・機能について調べることで、Tis21 がラセン神経節細胞の発生・分化において役割を果たしているかどうかを確認する。また、ラセン神経節細胞の発生・分化におけるキー遺伝子とされている Ngn1、NeuroD1、Atoh1 等との関わりを調べるために、Tis21 欠失マウスにおけるこれらの蛋白の発現についても調べる。

### 3. 研究の方法

Tis21 遺伝子欠失マウスと正常マウスの内耳の形態、機能評価を行う。また、Tis21 欠失マウスにおける Ngn1、NeuroD1、Atoh1 をターゲットとした免疫染色を行い、既知の分子機構との関連を調べる。

Tis21 欠失は Jackson 研究所（アメリカ）から購入したものをを用いる。十分数の個体となるまで繁殖を行い、genotyping を行ったうえで雄の Tis21(-/-)マウスと雌の Tis21(+/-)マウスを交配する。胎生 13.5 日 (E13.5)、E15.5、E18.5 において帝王切開を行い胎児を得る。得られる胎児は Tis21(+/-)あるいは Tis21(-/-) のいずれかとなるため、genotyping にて Tis21(-/-)を選別する。生後 4 日 (P4) のマウスについても同様に genotyping にて Tis21(-/-)を得る。これらの Tis21(-/-)マウスと、正常マウスの頭部の凍結切片を作製し、TUJ1（ラセン神経節細胞のマーカー）と hoechst（核のマーカー）をターゲットとした免疫二重染色を行い、ラセン神経節細胞の形態評価、細胞数のカウントを行う。また、Ngn1、NeuroD1、Atoh1 等をターゲットとした免疫染色も行う。

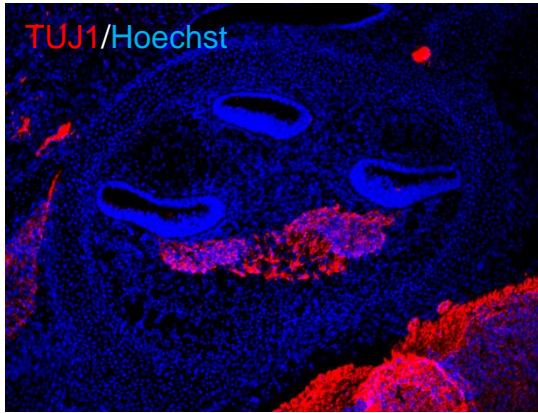
### 4. 研究成果

Jackson 研究所（アメリカ）より Tis21 欠失マウスを購入し、繁殖を行った。野生型マウスと比較して妊孕性が非常に低く、なかなか十分数の個体を得られなかった。比較的妊孕性の高いペアを選別して、繰り返し繁殖を行う方法を取った。出産した Tis21 欠失マウスは genotyping を行い Tis21(-/-)マウスと Tis21(+/-)に分けた。十分数の Tis21 欠失マウスが得られた後、Tis21(-/-)マウスと Tis21(+/-)マウスを交配させ、妊娠マウスに対して E13.5、E15.5、E18.5 において帝王切開を行い、P4 において自然出産にて Tis21 欠失マウスを得た。得られたマウスに対して genotyping を行い、Tis21(-/-)マウスを選別した。これらのマウスの頭部凍結切片を作製し、TUJ1 と hoechst をターゲットとした免疫二重染色を行った。（図 2-4）

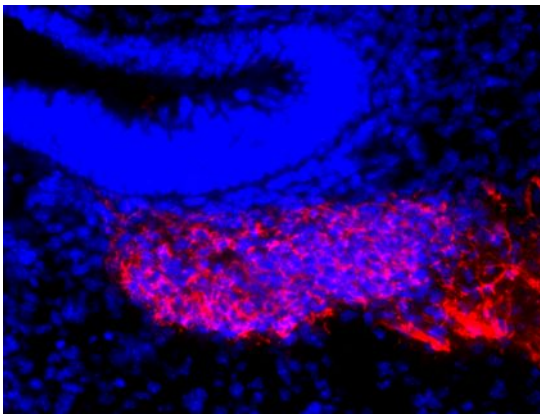
正常マウスと比較して、肉眼的には明らかな形態異常は認めなかったが、今後は蝸牛の断面積、ラセン神経節の断面積の測定も行い、統計的解析を行う予定である。

また、Tis21 欠失マウスにおけるラセン神経節数の測定も行った。免疫染色の写真を ImageJ に取り込み、TUJ1 と Hechst の両方の発現がある細胞をラセン神経節細胞と定義してカウントした。（表 1）

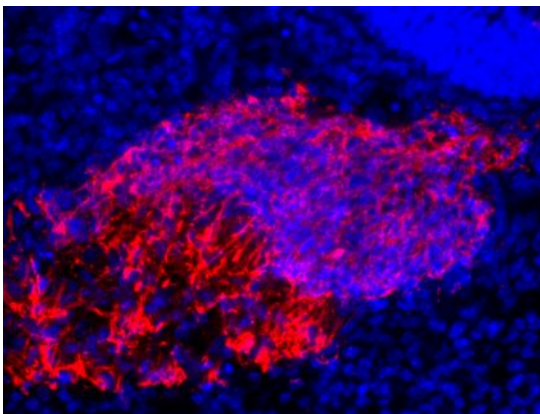
今後、対象個体数を増やして統計的解析を行う予定である。



**図 2 : Tis21 欠失マウスの蝸牛形態**  
 正常マウスと比較して明らかな形態異常は認めなかった。



**図 3 : Tis21 欠失マウスのラセン神経節の形態 (基底回転部)**



**図 4 : Tis21 欠失マウスのラセン神経節の形態 (中回転部)**  
 基底回転、中回転部とも正常マウスと比較して明らかな形態異常を認めなかった。

slide No.	マウス日齢	ラセン神経節細胞数		
		基底回転	中回転	頂回転
1	E13.5	118	119	0
2		126	120	0
3		89	116	0
平均		111	118.3	0

**表 1 ; Tis21 欠失マウスのラセン神経節細胞数**

また、Tis21 欠失マウスにおける Ngn1、NeuroD、Atoh1 をターゲットとした免疫染色も試行しており、至適条件を探索中である。

#### 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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]  
 出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

[ その他 ]  
 ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
 草場 雄基 ( KUSABA, Yuki )  
 熊本大学 医学部附属病院 医員  
 研究者番号 : 70648592

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

蓑田 涼生 (MINODA, Ryosei)  
熊本大学大学院 生命科学研究部 准教授  
研究者番号: 30284772

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

(4)研究協力者

竹田 大樹 (TAKEDA, Hiroki)  
熊本大学大学院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学  
大学院生