

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2007 ～ 2009

課題番号： 19590174

研究課題名（和文）内耳の領域化及び形態形成を制御する遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Analysis on the mechanisms of regionalization and morphogenesis of the inner ear

研究代表者

勝 賢二郎（KATSU KENJIRO）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：30363526

研究成果の概要（和文）：我々は分泌性因子 DAN がニワトリ胚の耳胞の背側に発現し、内リンパ管・囊の形成を制御することを明らかにしてきた。耳胞の領域化には、耳胞背側の Dlx5, Gbx2 を介する経路と、耳胞腹側の Otx2 を介する経路が関与すると考えられており、これらが DAN 発現を制御する可能性がある。これを検証するため、Dlx5, Gbx2, Otx2 を耳胞に導入し、DAN の発現変動を検討した。その結果、Gbx2 と Otx2 が DAN の発現を抑制することが判った。Gbx2 と DAN の発現領域は重複するため、DAN 発現の活性化には Gbx2 の効果を打ち消す作用をもつ因子が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：DAN, a secreted molecule of DAN/Cerberus family, is expressed in the dorsal side of the otic vesicle of the chick embryo and regulates the formation of endolymphatic duct and sac. Otic vesicle is patterned by dorsal pathway through Dlx5 and Gbx2, and ventral pathway through Otx2. These two pathways might regulate expression of DAN in the otic vesicle. To test this possibility, we introduced exogenous Dlx5, Gbx2, and Otx2 into the otic vesicle and assessed the expression of DAN. We found that both Gbx2 and Otx2 suppressed DAN. These results suggest that activation of DAN expression requires a factor that cancels the effect of Gbx2 since the area of Gbx2 and DAN expression is largely overlapped in the developing otic vesicles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：解剖学、内耳、内リンパ管・嚢、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

我々の耳は聴覚と平衡覚を担う器官であり、外耳、中耳、内耳から構成される。このうち、内耳は感覚器を持ち、聴覚・平衡覚の中樞を為す重要な構成要素である。内耳は上皮性の袋状構造体である耳胞に由来する。耳胞内の各領域に応じて、独特かつ複雑な形態変化を起こし、最終的に高度に分化した器官を構築する。耳胞という単純な構造体から、膜迷路とも呼ばれる複雑な構造体へ変化する過程を、組織・細胞・分子レベルで解明することは、内耳発生の解明のみならず、前庭水管拡大症などの奇形を伴う難聴の原因を究明する上でも非常に興味深い。

耳胞の形態変化は、それに先行して起こる「耳胞の領域化」に依存する。耳胞の領域化は、耳胞内で領域特異的に発現する転写調節因子によってもたらされる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、通常の耳胞では、分泌性因子である DAN が BMP シグナルを阻害することで、耳胞内の転写因子群を適切な領域に発現させ、背-内側の領域化及びそこに由来する内リンパ管・内リンパ嚢の形成に関与することを示している。我々の研究で未解決な点として、

- (1) DAN の発現制御機構
- (2) DAN の下流で内リンパ管・内リンパ嚢の形成に関与する因子の同定とその作用機序の解明

が挙げられる。本研究期間内では、この2点について解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

用いた実験方法は以下のものである。

- (1) エレクトロポレーションによる遺伝子導入。各種外来因子の発現ベクターを構築し、DAN に対する siRNA は以前に設計・合成したものを使用した。これらをエレクトロポレーションにて 2 日 (Stage 12) 胚の耳胞原基に導入した。発現ベクターは 5 mg/ml、DAN siRNA は 150 μ M の濃度を用い、12 V、100 msec のパルスを 5 回与えた。その後 3 日 (Stage 17) 胚また

は 4 日 (Stage 22) 胚まで飼育し、サンプルとした。

- (2) シグナル伝達阻害剤の添加培養。各種シグナル伝達阻害剤を培地に添加し、2 日 (Stage 12) 胚を 3 日 (Stage 17) 胚または 4 日 (Stage 22) 胚まで培養し、サンプルとした。
- (3) in situ hybridization。発現を確認したい遺伝子の cDNA より RNA probe を合成し、凍結切片または whole-mount のサンプルに対して in situ hybridization を行った。
- (4) 免疫組織染色。エレクトロポレーションで遺伝子導入したサンプルについては、in situ hybridization 後に抗 GFP 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、外来遺伝子が導入された細胞を同定した。
- (5) cDNA cloning。DAN の下流因子を同定する目的で、既知の転写調節因子群、シグナル因子群、Aquaporin の primer を設計し PCR により cDNA 断片を cloning した。これらをもとに RNA probe を合成し、2 日 (Stage 12) 胚から 8 日 (Stage 34) 胚の耳胞に対して whole-mount in situ hybridization を行った。

4. 研究成果

(1) 耳胞における DAN の発現制御機構

耳胞内に発現する転写調節因子による DAN の発現制御。

耳胞の領域化には、背側神経管由来のシグナルから Dlx5, Gbx2 を介する経路と、腹側神経管や脊索由来のシグナルから Pax2, Otx2 を介する経路が関与すると考えられており、これら転写因子群が DAN 発現を制御する可能性がある。これを検証するため、Dlx5, Gbx2, Pax2, Otx2 の発現ベクターを構築して電気穿孔法により 2 日 (Stage 12) 胚の耳胞に導入し、4 日 (Stage 22) 胚の DAN 発現変動を in situ hybridization により検出した。Gbx2 は耳胞の背・内側部に発現し、その大部分は DAN の発現域と重複するため、DAN の発現を促進することが予想された。意外なことに、Gbx2 を過剰に発現させた結果、DAN の発現が抑制されることがわかった (n=3/3)。DAN 以外の遺伝子発現に対する影響を同時に調べたところ、Dlx5, Pax2, Otx2 の発現も抑制さ

れた (n=3/3)。

Otx2 は耳胞の腹側部に発現し、DAN の発現域とは、ほぼ相補的な位置関係にある。このことから、Otx2 は DAN の発現を抑制することが予想された。Otx2 を過剰に発現させた結果、DAN の発現が抑制されることが判った (n=3/3)。DAN 以外の遺伝子発現に対する影響も同時に調べたところ、Dlx5、Pax2、Gbx2 の発現も抑制されることが判った (n=3/3)。

Gbx2 と Otx2 は転写抑制因子として作用することが複数の実験系で実証されており、耳胞においても相互に転写抑制効果を持つことが示されている。当研究により得られた、Otx2 による DAN、Dlx5、Pax2、Gbx2 に対する転写抑制効果は過去の報告と一致しており、従って今回の結果は支持される。

一方、Gbx2 による DAN、Dlx5、Pax2 の抑制効果は、Gbx2 自体が転写抑制因子であるという点からは支持されるが、これだけではこれら転写因子の発現域が重複するという事実を説明できない。このことから、DAN、Dlx5、Pax2 発現の活性化には Gbx2 の効果を打ち消す作用をもつ因子が必要であることが示唆された。

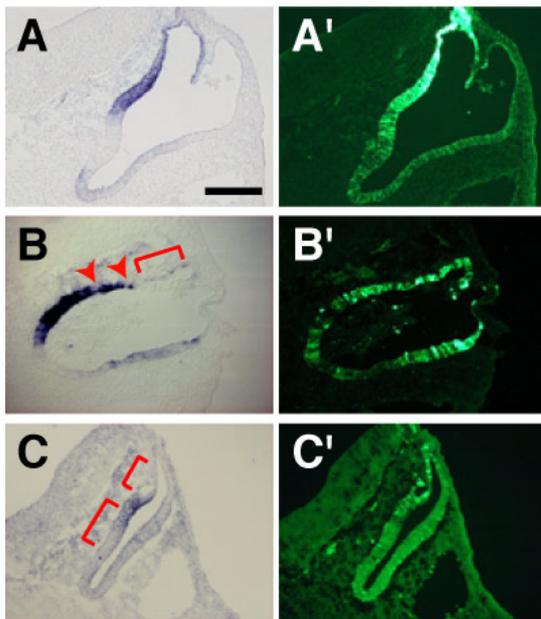


図1 . Gbx2, Otx2 による DAN 発現制御。2 日 (Stage 12) 胚の耳胞に、(A) Control, (B) Gbx2, (C) Otx2 発現ベクターを導入し、4 日 (Stage 23) 胚の時点で DAN 発現を検出した。(A'-C') それぞれ A-C の GFP 蛍光を示す。Gbx2, Otx2 とともに、DAN 発現を抑制した。赤矢尻は点状に DAN の発現が消失した部分。赤括弧は耳胞の広い領域で DAN の発現が消失した部分。スケールバー: 100 μm 。

DAN 発現に対するシグナル分子の効果。耳胞内外から DAN の発現を制御しうるシグナ

ル経路を同定する目的で、分泌性シグナル因子をしみ込ませたビーズを 2 日 (Stage 12) 胚の耳胞近傍に移植し、3 日 (Stage 17) 胚または 4 日 (Stage 22) 胚まで培養した。使用したシグナル分子とその濃度は、Shh (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, n=5)、BMP7 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, n=8)、Wnt3a (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, n=4) とし、コントロールには BSA/PBS (n=10) を用いた。サンプリングの後、耳胞における DAN の発現を in situ hybridization にて確認した。しかしながら、これらのシグナル分子は DAN の発現に影響を与えなかった。

DAN 発現に対するシグナル伝達経路の阻害効果。

やはり耳胞内外から DAN の発現を制御しうるシグナル経路を同定する目的で、各種シグナル伝達阻害剤の存在下で、2 日 (Stage 12) 胚を 3 日 (Stage 17) 胚または 4 日 (Stage 22) 胚まで培養した。阻害剤は cyclopamine (Shh シグナル阻害剤, 50 μM , n=3)、DAPT (Notch シグナル阻害剤, 100 μM , n=8)、SU5402 (FGF シグナル阻害剤, 30 μM , n=5)、citral (レチノイン酸合成酵素阻害剤, 50 μM , n=5)、DEAB (レチノイン酸合成酵素阻害剤, 50 μM , n=5) とし、コントロールには DMSO (n=9) を用いた。サンプリングの後、耳胞における DAN の発現を in situ hybridization にて確認した。しかしながら、これら阻害剤は DAN の発現に影響を与えなかった。

また、2 日 (Stage 12) 胚の耳胞に対して、dominant negative Lef1 を用いて Wnt シグナル経路阻害を (n=3)、dominant negative FGF receptor 2 を用いて FGF シグナル経路阻害を (n=3)、constitutively-active Smo を用いて Shh シグナル経路の活性化を (n=3) 人為的に誘発し、4 日 (Stage 22) 胚の耳胞における DAN 発現変動を in situ hybridization により検討した。しかしながら、これらは DAN の発現に影響を与えなかった。

(2) ニワトリ胚耳胞に発現する遺伝子の発現解析。

DAN の下流因子を同定する目的で、新たに Foxi1a, 1b, 1c, Aquaporin-1, -3, -4, -7, -8, -9, -11, -12, Angiopoietin-like protein-1, -2, -3, -4, -7 の cDNA をクローニングした。これらを用いて、2 日 (Stage 12) 胚から 8 日 (Stage 34) 胚の耳胞に対して whole-mount in situ hybridization を行い、発現パターンを解析した。これらのうち、Foxi1a, 1b, 1c, Aquaporin-1, -3, -4, -7, -8, -9, -11, -12 については、耳胞に発現を確認することができなかった。

Angiopoietin-like protein に関して、5 種の遺伝子のうち、Angiopoietin-like protein-4 が背側耳胞に発現することを見出した(図2)。この領域は将来内リンパ管・嚢を形成する領域であり、DAN の発現域とも重複する。また、この発現は一過性であり、4 日(Stage 23)胚にのみ確認された。

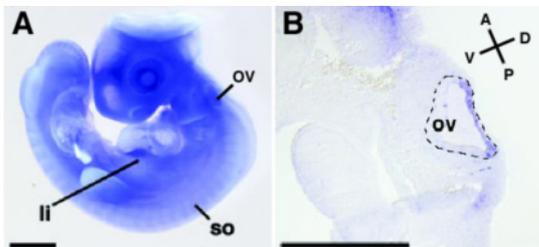


図2. ニワトリ4日(Stage 23)胚におけるAngiopoietin-like protein-4の発現パターン。(A)全体像。耳胞の他、肝臓や体節部に発現する。(B)耳胞(点線部)の縦断切片図。背側領域に発現が見られる。スケールバー：(A)1.0 mm; (B)0.5 mm。OV, 耳胞; li, 肝臓; so, 体節; A, 前方; P, 後方; D, 背側; V, 腹側。

今回の結果より、新たな領域特異的マーカー遺伝子を発見することができた。これに加えて、Angiopoietin-like proteinは血管新生や脂質代謝に関わる因子であることから、これらの事象と耳胞発生との連携が想定できる。両者の関連性に着眼した研究は、これまで成されていないため、今後の耳胞発生の研究の発展につながることを期待される。

(3) DAN の下流で内リンパ管・内リンパ嚢の形成に関与する因子の同定。

DAN の機能阻害により発現が変化する遺伝子は、DAN の下流で機能することが期待される。そこで、2日(Stage 12)胚の耳胞に DANsiRNA を導入して48時間後(Stage 21前後)に胚を固定し、in situ hybridizationにより各遺伝子の発現変動を検討した。調べた既知遺伝子は SOHo1, Pax2, Nkx5.1, Msx1, Sox10, Gbx2, Fgf16, Otx2, Dach1, Dach2, Six1, Six4, Dlx5, Lfng, Wnt2b, Wnt3a, Wnt6, Otokeratinである。このうち発現変動が確認されたのは、我々が既に報告している Msx1 と Nkx5.1 の2種の遺伝子だけであった。これら以外の遺伝子については、DAN の機能抑制による発現変動を確認することができなかった。

(4) 内リンパ管・嚢形成における Dlx5, Msx1 の機能解析。

Dlx と Msx は、協同して細胞増殖・分化を制御することが示されており、両者のバランスの維持が内リンパ管・嚢形成に重要であると予想される。そこで、Dlx5, Msx1 両遺伝子の発現ベクターを作製し、エレクトロポレーションにより2日(Stage 12)胚の耳胞原基に導入した。その後4日(Stage 22)胚の内耳領域特異的な遺伝子発現が変動するか否かを調べた。しかしながら、Dlx5 と Msx1 の発現には影響を与えなかった(n=3)。他の遺伝子群 Gbx2, Pax2, Otx2, DAN についても発現変動の有無を調べたが、これも観察することができなかった(n=3)。これらの結果から、Dlx5 と Msx1 は、少なくとも転写レベルの制御は行っていないことが示唆された。しかしながら、両者がタンパク質レベルで相互作用する可能性も考えられ、これは今後の課題となる。

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1件)

Niki, D., Katsu, K., Yokouchi, Y. (2009) Ontogeny of Angiopoietin-like protein 1, 2, 3, 4, 5, and 7 genes during chick embryonic development. *Development, Growth and Differentiation*, 51. 821-832 査読有

[学会発表](計1件)

勝賢二郎、横内 裕二

「ニワトリ胚耳胞における DAN の発現制御」
第114回日本解剖学会総会・全国学術集会
2009年3月28日-30日、岡山理科大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝賢二郎 (KATSU KENJIRO)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：30363526