

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16918

研究課題名(和文) マウス聴覚における経験依存的可塑性に関するOtx2蛋白質の作用機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of roles of Otx2 homeoprotein in experience-dependent auditory plasticity

研究代表者

枝松 緑 (Edamatsu, Midori)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10735343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生後の聴覚可塑性におけるOtx2の役割を明らかにするため、Cre-loxPシステムを用いて時期特異的なOtx2欠損マウスの作製を行った。また生後発達期において、臨界期が形成される前後ならびに臨界期中のマウス大脳皮質聴覚野を用いて、次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析に使用できる品質および量のRNAを抽出することができた。このRNAを用いて、生後発達依存的な遺伝子発現プロファイルの解析をおこなっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚可塑性の仕組みが解明され、その開始を司る分子が明らかになれば、人工内耳の適用基準の改善や基準に新たな根拠を提供できる。さらに可塑性の再活性化が可能となれば、この原理をもとに人工内耳や聴性脳幹インプラントによる治療、リハビリテーションをさらに発展させることができる。本研究で可塑性のコントロールが可能になれば、将来的にはこのような聴神経や聴覚中枢の障害を修復し、脳の機能を再建する治療法の開発へも繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：It is found in the visual cortex; a homeoprotein called Orthodenticle homeobox (Otx2) is transported specifically into parvalbumin (PV) inhibitory interneurons and play a crucial role in regulating cortical plasticity in the visual cortex by controlling both the onset and closure of the critical period of plasticity for visual sense. However, the roles of Otx2 in the auditory plasticity remain unclear. We generated conditional knockout mice of Otx2 and are analyzing the roles of Otx2 in auditory plasticity. we performed the comprehensive analysis from the cortex developmental point of view using RNA-Seq. In the future, we are planning to perform the functional analysis of these candidate genes.

研究分野：神経科学

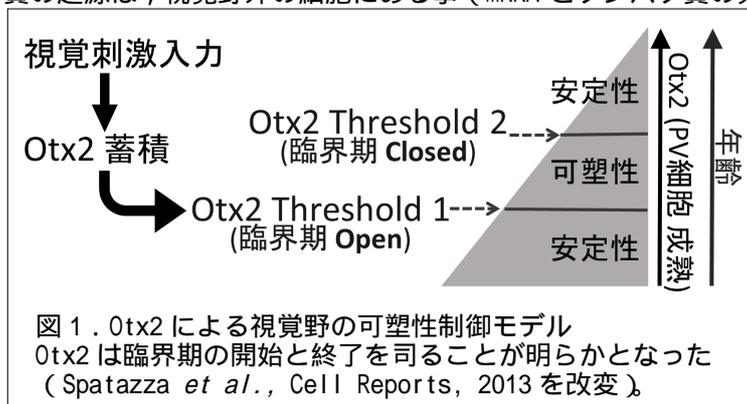
キーワード：聴覚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、高度難聴の治療として人工内耳手術が臨床応用されているが、健聴者と同じように聞きとることができるまでの機能回復は望めない。人工内耳の聴取能には限界があり 100dB 以上の高度難聴が軽度難聴の状態に移行するが、音声言語の聴取、理解、表出などのためには多大な(リ)ハビリテーションが必須であり、それは失聴時期とその期間の長さに大きく依存する。その原因の一つとして、神経の可塑性が年齢とともに低下することが挙げられる。哺乳類の脳機構は出生時は未熟であるが、生後の発達早期に自己の経験を通じて急速に発達する。この時期を臨界期と呼び、様々な外的刺激に応じて、神経回路は柔軟に形成・再構築され(経験依存的可塑性)、成長と共にこの柔軟な神経の可塑性が失われていく。実際、言語習得後の失聴者が人工内耳で言語を聴いている際、一次聴覚野と聴覚連合野の脳血流量は、正常者と同等程度であるが、言語習得前の失聴者では聴覚連合野はほとんど賦活される事はなく、小児が生後の臨界期に音を聴くことが、聴覚連合野の神経回路形成・発達において重要であると考えられている。そして、これまでの研究で、臨界期に特定の周波数の音に曝して動物を飼育すると、その音を特徴周波数(最も低い音圧で応答を起こす音の周波数)とする神経細胞が聴覚野で増える可塑的变化が生じることが明らかとされてきたが(Nakahara *et al.*, PNAS, 2004)、未だ生後早期の経験依存的な聴覚野の可塑性がどのようにして形成されるのか、その制御メカニズムについては不明である。

一方、視覚野においては、臨界期中の視覚経験に依存して眼優位性が可塑的に変化することを利用してこれまで研究が盛んに行われてきた。そして、胎生期の脳形成を司るホメオタンパク質である Orthodenticle Homeobox 2 (Otx2) が生後の視覚野に蓄積することで、視覚野神経細胞のうちパルプアルブミンを持つ特定の抑制性神経細胞が成熟し、臨界期が開始することが報告された(Katagiri *et al.*, Neuron, 2007. Sugiyama *et al.*, Cell, 2008)(図1)。Otx2 は視覚刺激に応じて受容器である網膜と視覚系各神経核において mRNA 発現を認めるが、視覚野においてはタンパク質は局在するにもかかわらず、mRNA 発現は確認できない。このことは、視覚野に蓄積する Otx2 タンパク質の起源は、視覚野外の細胞にある事(mRNA とタンパク質の発現部位の相違)を意味している。また、興味深いことに、Otx2 タンパク質を視覚野に直接投与すると臨界期が変動することが報告された。これは可塑性を司る遺伝子が同定されれば、臨界期を人為的に操作することができる事を意味しており、聴覚野の可塑性を司る因子の同定が新たな治療法の可能性に繋がると考えられる。



一方、Otx2は胎生期の眼

杯に発現し視細胞形成に必須の転写因子として広く知られてきたが、胎生期の内耳にも特異的に発現し、内耳形成においても必須の転写因子であることが報告された(Miyazaki *et al.*, Dev Growth Differ, 2006)。そのため、「Otx2によるパルプアルブミン陽性細胞の成熟」が視覚系と同様に聴覚系においても臨界期制御を担うことが推測される。つまり、聴覚野においても視覚系と同様な Otx2 による経験依存的な可塑性を制御する機構が存在することが強く推測され、Otx2による可塑性制御機構を明らかにし、それを司る因子を同定すれば、聴覚可塑性を人為的に(再)活性化させることも可能になると予想される。これは、脳神経科学的にも新たな知見となることはもちろん、人工内耳治療と併用することで新たな神経ネットワークの構築を促進し聴覚機能の獲得を促す治療法の開発に繋がると考える。

2. 研究の目的

本申請研究では、(1)聴覚可塑性におけるホメオタンパク質 Otx2 の役割を遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。さらに、経験依存的に聴覚可塑性を獲得することから、(2)臨界期前後の聴覚野の遺伝子発現の差異を網羅的に解析し、可塑性制御分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 聴覚可塑性における Otx2 の役割の解明

聴覚可塑性におけるホメオタンパク質 Otx2 の役割を解明するため、生後発達期の聴覚神経核における Otx2 の遺伝子発現およびタンパク質発現を組織学的に検証する。また、生後特異的に Otx2 を欠損させたマウスを作製し、表現型解析を行う。

(2) 可塑性制御分子の探索

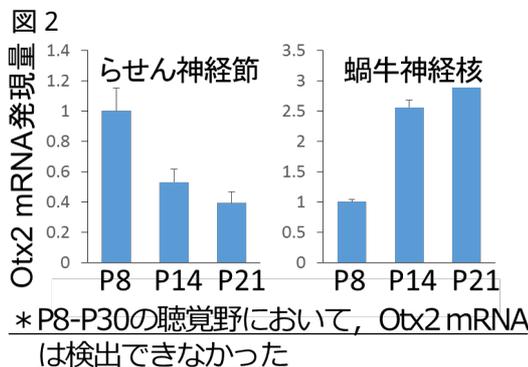
聴覚可塑性は経験依存的に獲得されることから、生後発達期の聴覚系の臨界期が形成される前後ならびに臨界期中の正常マウスの聴覚野の遺伝子発現の差異を網羅的に解析する。さらに聴覚遮断モデルマウス、および Otx2 欠損マウスの聴覚野遺伝子発現との比較を行い、聴覚野の可

塑性制御分子の絞込みを行う。

4. 研究成果

(1) 聴覚系神経核における Otx2 の発現

生後 8 日, 14 日, 21 日のマウスから聴覚系に關与する複数の神経核を採取し, Otx2 mRNA の発現を定量 PCR により調べた。さらに Otx2 タンパク質の発現について, 免疫染色法で解析した。その結果, らせん神経節や蝸牛神経核などの複数の聴覚系神経核では mRNA とタンパク質発現がともに観察された。それに対して, 聴覚野では Otx2 の mRNA 発現は検出されず, タンパク質発現のみが確認された (図 2)。



(2) パルプアルブミン陽性細胞と Otx2 の発現

聴覚野における Otx2 タンパク質とパルプアルブミン陽性細胞の関連を明らかにするため, 生後 21 日および 90 日のマウスの脳の凍結切片を作製し, 免疫染色法によりパルプアルブミンと Otx2 タンパク質の発現について検証した。生後発達に応じてパルプアルブミン細胞数と Otx2 タンパク質の発現が正の相関をもって増加した。

上記 (1) および (2) の結果から, 視覚系と同様に聴覚系においても Otx2 mRNA とタンパク質の発現部位に相違があった。視覚系と同様に, 聴覚刺激経験に応じて聴覚野以外の細胞で産生された Otx2 が, 何らかの経路を介して聴覚野で蓄積される可能性が示唆された。

(3) 遺伝子改変マウスの作製

生後の聴覚可塑性における Otx2 の役割を明らかにするため, Cre/loxP システムを用いて時期特異的な Otx2 欠損マウスの作製を試みた。Cre/loxP システムとは, loxP 配列と呼ばれる DNA 配列に対し DNA 組換え酵素 Cre が働くことにより生じる部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験系である。Otx2 の exon1 とプロモーター部分が loxP で挟まれている Otx2 flox マウスと, 特異的プロモーターの制御下で Cre を発現するトランスジェニック動物 (本研究では Rosa26 Cre-ERT2 マウス) を交配した。得られた動物個体内ではタモキシフェン投与によりプロモーターが働く部位のみ遺伝子を欠損させることができる。Otx2 は胎生期に脳を作るホメオタンパク質であり, 初期発生において欠損すると脳全体が失われることが報告されている (Tian *et al.*, Dev Biol., 2002)。また, 胎生期の内耳にも特異的に発現し, 内耳形成においても必須の転写因子であることが報告されている (Miyazaki *et al.*, Dev Growth Differ., 2006)。そのため本研究では, 生後にタモキシフェン投与を行い Otx2 欠損の影響を解析する。現在は聴覚系臨界期と照し合せ, タモキシフェンを投与する時期を検討している。

(4) 聴覚可塑性制御分子の探索

聴覚野の可塑性制御関連分子の抽出と同定を目的に, 生後発達期において, 臨界期が形成される前後ならびに臨界期中のマウス大脳皮質聴覚野からレーザーマイクロダイセクションにより組織を回収した。次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析に使用できる量および品質の RNA を抽出するため, 回収量および方法を検討した。この RNA を用いて, 生後発達依存的な遺伝子発現プロファイルの解析をおこなっている。臨界期に発現が上昇し, 臨界期終了と同時に発現が低下する分子を抽出し, 聴覚野の可塑性制御関連分子を絞り込む予定である。さらに (3) で作製したタモキシフェン誘導型の Otx2 欠損マウス, および (5) の音刺激遮断モデルマウスでも同様に RNA-Seq 解析を行い, Otx2 の下流で働く遺伝子の絞り込みを行う予定である。

(5) 経験依存的な遺伝子発現プロファイルの構築

臨界期における神経の可塑性の誘導には外来刺激が必要であることから, 音刺激を人為的に遮断し, 可塑性を抑制したマウスの解析を行う。このためにまずは, シアノアクリレートによる聴覚遮断モデルマウスの作製を行った。今後は, 両側外耳道遮断を行ったマウスの脳切片から LMD を用いて聴覚野を採取し, mRNA を回収し, (4) でおこなった実験と同様に RNA-Seq により正常マウスのもとの網羅的比較解析を行うことで, 聴覚野の可塑性制御関連分子の絞り込みを行う予定である。

(6) 可塑性制御分子の組織学的発現解析

実験 (4) で抽出された分子に関して, 実際に臨界期の聴覚野で発現し, 臨界期前後で発現が抑制されているかを, *in situ* hybridization による遺伝子発現イメージングで検証するため ViewRNA Tissue Assay Kit を用いた実験系の確立を行った。マウス脳を 4%PFA で固定後, パラフィン切片を作製し, まずは実験系のコントロールとして Gapdh 遺伝子の発現解析を行った。問題なく陽性シグナルが検出されたため, 今後は実験 (4) で絞り込まれた遺伝子について本手法で発現解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

(1) Edamatsu M., Miyano R., Fujikawa A., Fujii F., Hori T., Sakaba T., Oohashi T., Hapln4/Bral2 is a selective regulator for formation and transmission of GABAergic synapses between Purkinje and deep cerebellar nuclei neurons. J Neurochem, 147: 748-763, 2018. (査読有) DOI:10.1111/jnc.14571

(2) Edamatsu M., Kondo Y., Ando M., Differential localizations of the myo-inositol transporters HMIT and SMIT1 in the cochlear stria vascularis. Neurosci Lett, 674: 88-93, 2018. (査読有) DOI:10.1016/j.neulet.2018.03.028

〔学会発表〕(計 1件)

(1) Edamatsu M., Hori T., Oohashi T., Functional role of the extracellular matrix molecule Hapln4/Bral2 at the calyx of Held synapse. The 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2018年7月26日-29日. 神戸.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://okayama.pure.elsevier.com/en/persons/midori-edamatsu>

<http://www.okayama-u-mbb.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。