

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791635

研究課題名（和文） マイクロダイセクションを用いた発生中の血管条におけるメラノサイト
分化誘導機構探索研究課題名（英文） Analysis of melanocytes induction mechanism in the developing stria
vascularis by microdissection

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

研究成果の概要（和文）：

神経堤細胞に特異的に発現する Pax3 を欠失させたマウス胚の内耳を観察したところ、神経管の閉鎖不全の有無に関係なく、発生中の血管条中間細胞領域に神経堤細胞が多数存在した。しかしながら、この領域のメラノサイトマーカーの mRNA 発現は顕著に減少していた。これらの研究成果は「Pax3 は、神経堤細胞が発生中の血管条中間細胞領域へ遊走するには必要ない、しかし、神経堤細胞が血管条メラノサイトへ分化するには関与している」ことを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We found that neural crest cells (NCCs) localize at the intermediate cell region of the developing stria vascularis in Pax3 null mice. However, mRNA expression of melanocyte differentiation marker is remarkably reduced in the developing stria vascularis of Pax3 null mice. These results suggest that Pax3 is not required for NCCs migration into the mouse stria vascularis, but, is responsible for differentiation of NCCs in the mouse stria vascularis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：血管条、メラノサイト、神経堤細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経堤細胞は遊走しながら血管条メラノサイトに分化していくと考えられているが、発生中の遊走過程は詳細には理解されていない。

(2) 内耳へ遊走中の神経堤細胞の分化段階は理解されていない。

(3) 神経堤細胞に特異的に発現する *Pax3* は先天性高度感音難聴を合併する Waardenburg 症候群 I 型の原因遺伝子である。この *Pax3* の完全な欠失が内耳の発生に及ぼす影響は明らかとなっていない。

(4) *Pax3* 遺伝子変異症例が先天性高度感音難聴を患うメカニズムは理解されていない。

2. 研究の目的

(1) 発生中の内耳に遊走する神経堤細胞の挙動を明らかにする。

(2) 遊走中の神経堤細胞の分化段階を明らかにする。

(3) *Pax3* の完全な欠失が内耳の発生に及ぼす影響を明らかにする。

(4) Waardenburg 症候群 I 型の病態解明に向けて、*Pax3* 遺伝子変異症例が先天性高度感音難聴を患うメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 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 GFP レポーターマウスの交雑（以後、*Wnt1-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堤細胞の挙動を観察した

（*Cre-loxP* システムによりこの交雑の神経堤細胞は永続的に蛍光色素 GFP で標識される）。*Wnt1-Cre*; GFP マウスの蝸牛軸切片を作製して、抗 GFP 抗体を用いて免疫組織化学法により神経堤細胞の遊走過程を観察した。

(2) (1)の同一切片上で、メラノブラストマーカー *Dct* の mRNA の発現局在を観察するために、*in situ hybridization* 法を用いて抗 GFP 抗体の二重染色を行なった。

(3) *Pax3* ノックアウトマウスである *Pax3* Cre/+ マウスと GFP レポーターマウス

（*CAG-CAT-EGFP*）を交配して得られる *Pax3* Cre/+ ; *CAG-CAT-EGFP* マウス（以後、PCG マウスとする）の発生中の内耳の観察を行なった。PCG マウスは *Cre-loxP* システムにより過去に *Pax3* を発現した細胞にレポーター遺伝子 *GFP* を永久的に発現させる。すなわち、過去に神経堤で *Pax3* または *Cre* リコンビナーゼを発現していた細胞が内耳に遊走してきたことを証明できる。*Pax3* 蛋白発現量が 50% に低下している PCG マウス同士を交配して、胎生 18.5 日の *Pax3* 蛋白発現量が 0% のマウス胚を観察した。

(4) (3) のマウス胚蝸牛軸切片を作製して、GFP 陽性細胞の局在と分化マーカーの発現解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 内耳発生初期に GFP で標識した神経堤細胞

胞が「神経堤から耳胞腹正中側の近傍と耳胞背側に遊走する経路」の存在を示唆する像が得られた。

(2) *Dct* と GFP が double positive な細胞ばかりでなく、*Dct* が発現していない GFP 陽性細胞が耳胞背側に混在していた。このことは内耳に遊走中の神経堤細胞は様々な分化段階を呈することを示唆している。

(3) Pax3 蛋白発現量が 0% のマウス胚の中には神経管の閉鎖不全に伴い、内耳の発生が途中で停止しているものがあつた。この現象は Pax3 遺伝子変異マウス同士を交配して得たマウス胚の過去の報告と同様の現象である。しかしながら、神経管の閉鎖不全の有無に関係なく、内耳が形態的にはほぼ正常発生しているものも存在した。この結果は「Pax3 が欠失すると正常な内耳発生が起こり得ない」という従来のコンセンサスを打ち崩す知見である。

(4) 発生中の血管条中間細胞領域に GFP 陽性細胞が多数存在した。しかしながら、メラノサイトマーカーである *Dct*、*Kir4.1* の発現は共に減少していた。これらの研究成果は「Pax3 は、神経堤細胞が発生中の血管条中間細胞領域へ遊走するには必要ない、しかし、神経堤細胞が血管条メラノサイトへ分化するには関与している」ことを示唆している。*Pax3* 遺伝子変異症例が先天性高度感音難聴を患うのは、神経堤細胞が Pax3 の機能異常により血管条メラノサイトに分化できないため、聴覚に必須の内リンパ電位が低下している可能性が考えられた。

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. Tomokatsu Udagawa, Norifumi Tatsumi,

Toshiaki Tachibana, Yoshikatsu Negishi, Hiroki Saijo, Toshiki Kobayashi, Yuichiro Yaguchi, Hiromi Kojima, Hiroshi Moriyama, Masataka Okabe. Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 is localized at the calyx endings of vestibular afferents. *Neuroscience*. in press. 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

1. Tomokatsu Udagawa, Norifumi Tatsumi, Toshiaki Tachibana, Hiroki Saijo, Toshiki Kobayashi, Yuichiro Yaguchi, Hiromi Kojima, Hiroshi Moriyama, Masataka Okabe. Inward rectifier K⁺ channel Kir4.1 (Kcnj10) is expressed not only in glial cells but also in neurons of the mouse vestibular system. 第 3 4 回日本分子生物学会. 2011 年 12 月 13 日 (横浜市).

2. 宇田川友克、辰巳徳史、小林俊樹、小島博己、岡部正隆、森山寛. 発生中の内耳へ遊走する神経堤由来細胞の挙動追跡. 第 9 回側頭骨疾患研究会. 2011 年 1 月 8 日 (新潟市).

[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

(4)研究協力者

宇田川 友克 (UDAGAWA TOMOKATSU)

東京慈恵会医科大学・医学研究科・大学院生