

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：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592499

研究課題名(和文) 22q11.2欠失症候群の内耳形成異常におけるFGFファミリーシグナルの機能解析

研究課題名(英文) The control of inner ear morphogenesis by FGF genes in mouse models of 22q11.2 deletion syndrome.

研究代表者

谷口 雄一郎 (Yuichiro, Yaguchi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30307475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：内耳の発生過程はOtic placode(内耳原基)に始まり、その後発生とともに内部へ陥入し耳胞を形成する。その中で前後、背側、内外側に沿った三次元的なパターン形成や増殖、細胞死、分化からなる複雑なプロセスを経て高度に分化した器官が構築される。内耳形態形成がFGF(Fibroblast growth factor)シグナルに関与していることがこれまでに報告されているがまだまだ不明な点が多いのが現状である。今回我々はSpry遺伝子改変マウスにおいて内耳蝸牛回転の異常と三半規管の一部欠損を確認し、FGFの過剰発現が内耳形態形成に関与するTBX1活性を阻害することを発見した。

研究成果の概要(英文)：Multiple signaling molecules are involved in development of the ear. Fibroblast growth factor (Fgf) is known to be indispensable for controlling cell fate determination and differentiation during otic development. Here, we report that Spry1 and Spry2 compound mutant embryos, show an abnormal phenotype in the ventral region of the inner ear, including the cochlea. We found neuralization of the otic vesicle is induced in Spry1,2 knockout mouse. Moreover, Tbx1 prevents neural differentiation in the otic vesicle, and we observed a severe defective inner ear phenotype, coupled with strong induction of neural maker genes, in the Spry1,2 knockout ;Tbx1 hetero mouse. Our results suggest excess Fgf signaling inhibits Shh signaling, thereby inhibiting Tbx1 activation to prevent neural differentiation in the otic vesicle.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳発生 FGF 22q11.2欠失症候群

1. 研究開始当初の背景

聴覚及び平衡感覚を司る内耳の発生過程では、外胚葉の一部が肥厚して形成される Otic placode(内耳原基)に始まり、その後発生とともに内部へ陥入し耳胞を形成する。その中で前後、背側、内外側に沿った三次元的なパターン形成や増殖、細胞死、分化からなる複雑なプロセスを経て高度に分化した器官が構築される。これまでに数多くの因子の内耳形態形成への関与が解析されており、ノックアウトマウスを用いた解析では内耳の正常発生に不可欠な遺伝子群が同定されている。その中で内耳形態形成が FGF (Fibroblast growth factor) シグナルに関与していることがこれまでに報告されているがまだまだ不明な点が多いのが現状である。FGF 遺伝子ファミリーはこれまでのところ 22 種類のリガンドと 5 種類の FGF レセプターが存在する上、その機能がお互いに代償されることが知られているため、FGF シグナル全体の機能を遺伝学的に明らかにすることは不可能である。そのため、我々は FGF 共通の抑制因子である *Sprouty* 遺伝子を介して実験を行ってきた。*Sprouty* は内耳をはじめ様々な部位に発現しており *Sprouty* ノックアウトマウスの解析の結果、小脳、内耳及び中耳、胸腺、副甲状腺、腎臓に表現型があることをこれまでに確認している。過去の報告では *Sprouty* 単独のノックアウトマウスは内耳の形態形成に異常を認めないが、今回我々は *Sprouty1* 及び *Sprouty2* のダブルノックアウトマウスを解析することにより内耳蝸牛回転の異常と三半規管の一部欠損を確認した。さらに *Tbx1* ヘテロマウスと交配して得られる *Spry1^{-/-};Spry2^{-/-};Tbx1^{+/-}* マウスではより重篤な表現型を認めることを発見した。*Tbx1* は 22q11.2 欠失症候群(22q11DS)の最も重要な原因遺伝子であることから、*Sprouty* あるいは FGF 遺伝子ファミリーが本症候群における内耳形態異常を引き起こす重要な役割を果たしている可能性が示唆された。22q11DS は、過去に DiGeorge syndrome あるいは velocardiofacial syndrome とも報告されていたが、22 番染色体の欠失が発見され、表現形の異なる同一の遺伝子疾患として理解されている。約 4000 人に 1 人と高頻度で発生することが知られており、第三・第四鰓弓に由来する複数の臓器の発生異常や奇形を特徴としている。多くの症例で難聴を呈し、その約 10~30%程度に内耳奇形を伴う感音難聴が存在することが報告されている。

Spry1^{-/-};Spry2^{-/-};Tbx1^{+/-} マウスの表現型をさらに追及することにより内耳形態形成に関与するさまざまな遺伝子シグナルのネ

ットワークを知ることができ、その成果が本症候群における難聴の原因、さらに様々な遺伝性疾患における難聴治療に対するアプローチに新しい視点を取り入れることが期待できる。

2. 研究の目的

22q11.2 欠失症候群は染色体欠失を原因とし複数の臓器の発生異常や奇形を特徴とする症候群で、その多くが難聴をきたし約 10~30%程度に感音難聴が存在する。これまでの我々の研究成果から FGF シグナルの抑制因子である *Sprouty* 遺伝子が本症の内耳形態異常に関与している可能性が高いと考えている。我々の作製した難聴モデルマウス (*Spry1^{-/-};Spry2^{-/-};Tbx1^{+/-}*) の表現型をさらに追及することにより内耳形態形成に関与するさまざまな遺伝子シグナルのネットワークを知ることができ、その成果が本症候群における難聴の原因究明、さらに新しい治療のアプローチとして分子標的薬を用いた治療の可能性につながることを期待する。

3. 研究の方法

以下の研究を行い、結果を統合し 22q11.2 deletion 症候群における FGF シグナルの役割とその遺伝子ネットワークについて明らかにし、臨床応用が可能な治療のアプローチを検討した。

- 1) *Sprouty1;2dk* と *Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスの表現型を詳細に解析: Cre/loxP システムを用いてノックアウトマウスを作製し、蝸牛、三半規管の形態さらにコルチ器、血管条、ラセン神経節の形態変化を免疫組織学的手法、paint fill 法及び MRI で解析
- 2) 22q11.2 DS の内耳発生における遺伝子の解析: *Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスにおける FGF ファミリー遺伝子及び内耳発生関連遺伝子の発現および機能解析
- 3) 22q11.2 DS の難聴治療に関するアプローチの検討: 表現型から得られたデータをもとにして分子標的薬 (FGF 受容体拮抗剤等) を用いた治療アプローチを検討。
- 4) *Sprouty1;2dko* マウス作製: Cre/loxP システムを利用し β アクチンプロモーターを有する β cre²*spry1;2^{+/-}* マウスと *Spry1;2flox/flox(Spry1;2f/f)* マウスを交配する。これにより得られる *Spry1;2^{+/-}*

マウスをコントロールとし *Spry1;2dko* マウスと比較検討

- 5) *Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウス作製 : $\beta\text{cre}^2\text{spry1;2};\text{Tbx1}^{+/-}$ マウスと *Spry1;2flox/flox(Spry1;2f/f)* マウスを交配する。コントロールとして *Spry1;2^{+/-}* マウスを用いて *Spry1;2dko*、*Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスと比較検討した。
- 6) 作製したマウスの内耳、中耳形態について解析 : *Spry1;2dko* は胎生致死のため 15.5 ~ 17.5 日胚を採取し Paint-fill method 及び MRI にて内耳の形態を比較検討する。耳小骨に関してはアルシヤンブルー、アリザリンレッド染色を施行し解析
- 7) マウス胚 (15.5 から 17.5 日胚) の凍結切片を作成し、免疫組織化学染色を行いコルチ器、特に有毛細胞、支持細胞、さらに血管条、ラセン靭帯について解析する。加えて電子顕微鏡による解析 (SEM,TEM)
- 8) マウス胚 (8.5 から 11.5 日胚) の組織切片を作製し耳胞及び咽頭弓、咽頭嚢の形態観察を行った : 22q11.2 欠失症候群では主に第 3、4 鰓弓に由来する複数の臓器の発生異常が原因であるためこの部位を中心に詳細な検討を行った。
- 9) *Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスにおける FGF シグナル及びその下流因子の関与について In situ hybridization (ISH) 法にて観察。 *Fgf3, Fgf8, Fgf10* は内耳発生に重要とされており、これらの発現及び FGF の下流標的因子である *Erm, Pea3* さらに FGFR の発現、耳胞マーカーである *Dlx5, Pax2, Tbx1, Otx1, Otx2, Bmp4, Msx1, Lfng* の発現及び機能解析、さらにニューロン前駆組織のマーカーである *NeuroD, Neurogenin1* の発現を解析
- 10) Shh シグナル及びその下流標的因子の解析 : *Shh, Gli1, 2, 3, Ptc* の発現及びその下流に關与する *Cyp26a1, b1, c1* の発現を ISH 法で解析。 Shh 及び FGF シグナルの発現を解析することで二つのシグナル間の遺伝的相互作用を明らかにした。
- 11) 増殖、細胞死、分化についての解析 : 細胞増殖に関しては Ph3 抗体、Ki67 抗

体を用い、アポトーシスに関しては Caspase3 抗体を用いて免疫組織染色を施行。 FGF シグナルが過剰になることでどのように細胞増殖、分化あるいはアポトーシスに影響を与えるか検討を行った。

- 12) *Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスにおける蝸牛前庭神経節の解析 : Neurofilament 抗体を用いて 10.5 ~ 11.5 日胚の免疫組織染色を行い、 *NeuroD, Neurogenin1, Lfng* の発現を ISH 法にて確認した
- 13) *Sprouty1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスに対するレスキュー実験 : *Fgf8^{+/-}, Fgf3^{+/-}, Fgf10^{+/-}* マウスと交配し FGF の発現を減少させ変異体を回復できるかどうか検討。さらに Shh シグナルとの関与が予想されるため、 Shh 下流因子を用いてレスキュー実験を行った。

4 . 研究成果

1) *Spry1;2dko* および *Spry1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスの内耳発生における組織学的検討を詳細に行い、 paintfill 法にて *Spry1;2dko* マウスではコントロールと比較して蝸牛が低形成であり、半規管の欠損も認められた (Figure 1) さらに卵形嚢、球形嚢を含めた前庭系は著明に拡大していた。

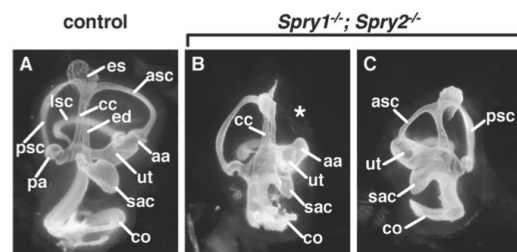


Figure1

2) *Spry1;2dko;Tbx1^{+/-}* マウスの作成に成功し、形態的により重篤な表現型を認めることを発見した (Figure 2) 。

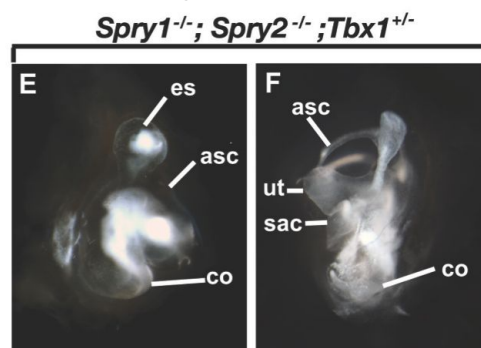


Figure2

3) *Spry1;2dko* マウスでは Pax2 の発現は前方と後方に分離し背側の発現は消失していた。

Dlx5 はコントロールに比較し耳胞後方で発現が増強、拡大していた(Figure3)
Spry1;2dko;Tbx1+/- マウスでは Dlx5 は耳胞後方でさらに発現が増強し、Pax2 の発現は減弱していた。これらの結果より過剰な FGF シグナル及び Tbx 1 の interaction が耳胞上皮に影響を与えている可能性があらと考えられた。

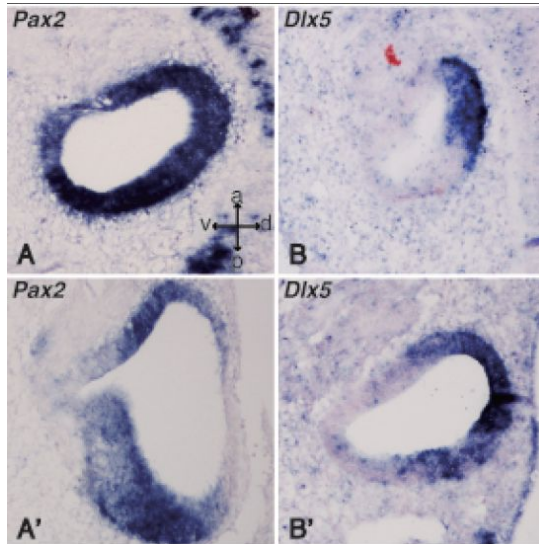


Figure3

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)

Yuichiro Yaguchi, Tian yu, Katherine Shim, Bernice Morrow, M.Albert Basson
 The control of inner ear morphogenesis by sprouty and Tbx1 genes in mouse models of 22q11.2deletion syndrome.
 28th politzer society meeting.
 2011.9.28. Greece

広川 恵里沙, 辰巳 徳史, 谷口 雄一郎, 岡部 正隆. 組織切片からの三次元再構築から見る内耳発生機構の解析。日本耳科学会 2013年11月24日 宮崎

〔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

谷口 雄一郎 (YAGUCHI Yuichiro)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号: 30307475

(2)研究分担者

岡部 正隆 (OKABE Masataka)
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 10300716

(3) 研究分担者

辰巳 徳史 (TATSUMI Norifumi)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 60514528

(4) 研究分担者

宇田川友克 (UDAGAWA Tomokatsu)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 60328292