

令和元年6月21日現在

機関番号：33933

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26430026

研究課題名(和文) ロンボメア構造を手がかりに蝸牛神経核cell type分化の分子機構を解明する

研究課題名(英文) Rhombomeric origin and differentiation of the cochlear nucleus cell types

研究代表者

成田 裕一 (Nartita, Yuichi)

名古屋文理大学・健康生活学部・教授

研究者番号：40360614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：一部のロンボメアのみが遺伝的に標識されたマウスを作成し、これらの標識と免疫染色による蝸牛神経核cell type判別を組み合わせることで、cell typeのうちのいくつかが特定のロンボメア由来であることを明らかにすることができた。さらに、ロンボメア情報が改変されたミュータントマウスにおけるcell typeの分布を調べた結果、改変されたロンボメア由来と考えられる一部のcell typeが欠損しているケースを見つけることができた。これらの結果はいずれも本研究で立てた「ロンボメア構造がcell type分化の鍵になっているのではないか」という仮説と合致するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚障害の多くは内耳や内耳神経の異常によるものであるが、症状が進行したケースでは、蝸牛神経核の神経細胞も壊死している場合がある。現在、このような場合には、有効な治療法がない状態であるが、本研究で解明の手がかりをつかむことができた蝸牛神経核のcell type分化の分子メカニズムが解明できれば、ES細胞やiPS細胞から多様なcell typeを再生することが可能になる。このように、本研究で得られた知見は、将来的な聴覚再生医療の手法確立の目的にも有用なものである。

研究成果の概要(英文)：Using multiple antibody staining over the mouse whose specific rhombomere was genetically labelled, it is clarified that a part of the cochlear nucleus cell types differentiates from specific rhombomere. By analyzing the cell type distribution in the cochlear nucleus in the mutant mice whose rhombomeric information were modified, the lack of a part of cell types was found. All the results in this study support the hypothesis that the rhombomeric origin is the key in the differentiation of the cell types in the cochlear nucleus.

研究分野：神経発生学 進化発生学 生化学

キーワード：蝸牛神経核 ロンボメア How

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内耳で感知された音情報は、内耳神経によって、後脳の蝸牛神経核へと伝えられる。その後いくつかの並列回路を経て、様々な音情報が抽出される。複数の並列回路へ情報を伝達するために、蝸牛神経核には多様な細胞種 (cell type) が含まれている。並列回路への伝達を行うのは興奮性神経だけであるが、興奮性の cell type だけでも 6 種類以上が報告されている。

これらの cell type は、細胞体の形態の違いによって分類されている。しかしそれに加えて、(表 1) に示すように、神経投射する経路、標的とする領域、刺激を受けた際の活動パターンも異なっている。

例えば、spherical cell は

表 1 蝸牛神経核に含まれる主な興奮性神経の種類と特徴

cell type	投射経路	主な投射先	活動パターン
spherical cell	台形体 (TB)	内側上オリブ核 (MSO)	
globular cell	台形体 (TB)	外側上オリブ核 (LSO) および 台形体内側核 (MNTB)	
octopus cell	中間聴条 (IAS)	外側毛帯腹側核 (VNLL)	
fusiform cell	背側聴条 (DAS)	中脳の下丘 (IC)	

TB 経路を通して、両側の MSO に投射するが、この回路により両耳に届く音のタイミングの違いが解析され、音源の位置同定に役立っている。一方、fusiform cell は DAS 経路を通り、中脳の IC に直接投射することにより、音の周波数情報の解析に重要な役割を果たしていると考えられている。このように、蝸牛神経核の cell type は音についての様々な情報を抽出するための重要な分岐点である。

発生過程に目を向けてみると、蝸牛神経核の興奮性神経は後脳レベルの「rhombic lip」と呼ばれる領域に起源を持つことが明らかになっている (図 1、Fujiyama et al. 2009 など)。

また、後脳は、その発生初期にロンボメアと呼ばれる分節構造をつくることが知られている (図 1)。マウスのロンボメアにはロンボメア 1~7 (r1~r7) の 7 分節あり、それぞれの分節から異なるセットの神経が分化する。このステップには、Hox 遺伝子が異なる組み合わせで各ロンボメアに

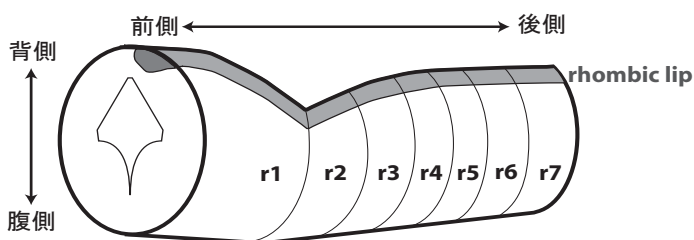


図 1 後脳のロンボメア構造と rhombic lip

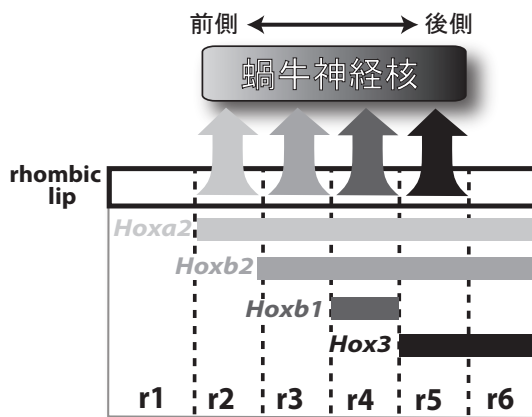


図 2 後脳ロンボメアでの Hox 発現と蝸牛神経核の形成

発現することが重要である(図2)。例えば *Hoxb1* は r4 でのみ発現しており、それにより r4 から発生する脳神経は顔面神経へと分化する。

先行研究の結果から、蝸牛神経核の興奮性神経は、r2~r5 に由来することが明らかになっている(図2、Farago et al. 2006, Fujiyama et al. 2009)。しかし、上で示したような、cell type 間の分化がどのような発生メカニズムの違いによるのかは全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

cell type の分布を主要なものだけ抜き出して見ると、蝸牛神経核の前後軸に沿って大きく分布に偏りがあることが分かる(図3)。そして、この前後軸に沿った分節的な分布パターンは、後脳の発生初期に見られる分節構造「ロンボメア」を思い起こさせるものである。

そこで、蝸牛神経核の主要 cell type の分化の鍵となるのは、発生初期に見られるロンボメア構造なのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するために、発生段階でのロンボメア情報と cell type 分化の関係性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

蝸牛神経核の cell type の判別は、glutamate 抗体、calbindin 抗体、calretinin 抗体などの複数のマーカー抗体の組み合わせでの多重免疫染色、および細胞体の形態観察により行った。研究協力者の研究室で作出された r2-特異的、r4-特異的、r3 および r5-特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを LacZ レポーターマウスと交配することにより、各ロンボメアに由来する神経細胞を LacZ で標識した。得られたマウスを cell type の解析が容易になる生後 21 日以降まで発育させ、還流固定した。凍結切片を作成し、LacZ 抗体と cell タイプのマーカー抗体で、2重もしくは3重染色することで、ロンボメアからの由来と cell type 分化の関係を解析した。

また、ロンボメアの情報が増えることが明らかになっている数種の Hox の変異マウス(Goddard et al. 1996, Studer et al. 1996, Gavalas et al. 1997, Gaufo et al. 2003)を用いて、蝸牛神経核での cell type の分布がどのように変化しているか解析を行った。

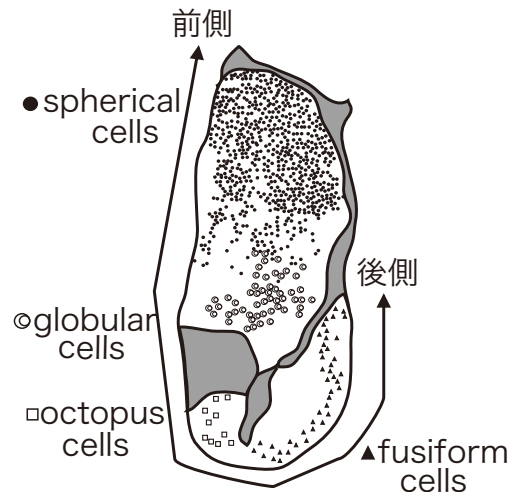


図3 主な cell type の分布

4. 研究成果

生後 21-28 日齢のマウスの脳を還流固定し、凍結切片を作成した。glutamate 抗体、calbindin 抗体、calretinin 抗体などを用いて多重免疫染色を行うことにより、蝸牛神経核の cell type を識別できる条件を整えた。続いて、ロンボメア 2 番のみ、4 番のみ、または 3 番と 5 番が遺伝的に標識された変異マウスを作成し、これらの標識と、マーカー抗体を用いた多重免疫染色および、細胞体の形態観察による cell type 判別を組み合わせることで、蝸牛神経核 cell type のうちのいくつかが特定のロンボメアに由来を持つことを明らかにすることができた (図 4)。

さらに、早い発生段階でのロンボメア情報と、蝸牛神経核 cell type の分化の関係性について解析するために、ロンボメア構造に異常を持つミュータントマウスを用いた多重免疫染色法により、

多重免疫染色

細胞体の形態観察

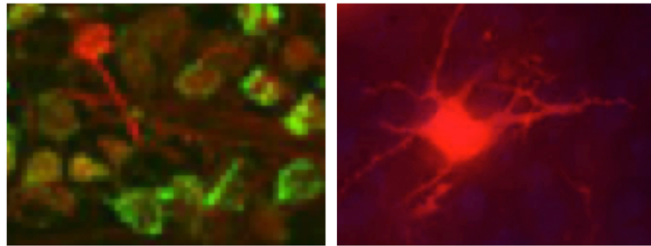


図4 蝸牛神経核 cell type の判別の例

蝸牛神経核 cell type の分布を調べた (図 5)。その結果、改変されたロンボメア由来と考えられる一部の cell type が欠損しているケースを見つけることができた。このことは、本研究で立てた「ロンボメア構造が cell type 分化の鍵になっているのではないか」という仮説と合致するものである。

今後は、研究期間中に完結することができなかった 1. Hox ミュータントのバックグラウンドで、各ロンボメア特異的 Cre マウスを mGFP レポーターマウスと組み合わせることにより、cell type のアイデンティティが変

WT

Hox mutant

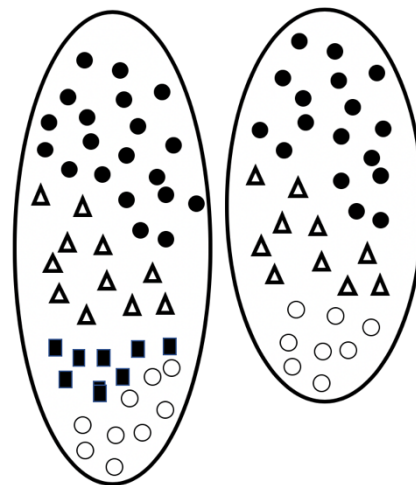


図5 野生型とHoxミュータントの蝸牛神経核における cell type 分布

化したと考えられる神経細胞からの投射を解析する。2. これらの神経細胞の活動パターンをホールセル・パッチクランプ法により記録する。ことを完結することにより、ロンボメア情報が神経細胞の形態のみならず投射パターンや活動パターンにも影響を与えているのかを明らかにしていく予定である。

<引用文献>

①Fujiyama T, Yamada M *et al.* (2009) Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, Ptf1a and Atoh1. *Development* 136, 2049-2058.

②Farago AF, Rajeshwar B *et al.* (2006) Assembly of the brainstem cochlear nuclear complex is revealed by intersectional and subtractive genetic fate maps. *Neuron* 50, 205-218.

③Goddard, J. M., Rossel, M., Manley, N. R., and Capecchi, M. R. (1996). Mice with targeted disruption of Hoxb-1 fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* 122, 3217–3228.

④Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R. (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* 384, 630–634.

⑤Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* 124, 3693–3702.

⑥Gaufo, G. O., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (2003). Hox3 genes coordinate mechanisms of genetic suppression and activation in the generation of branchial and somatic motoneurons. *Development* 130, 5191–5201.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Karmakar, K., Narita, Y., Fadok, J., Ducret, S., Loche, A., Kitazawa, T., Genoud, C., Di Meglio, T., Thierry, R., Bacelo, J., Lüthi, A., Rijli, F.M..(2017) Hox2 Genes Are Required for Tonotopic Map Precision and Sound Discrimination in the Mouse Auditory Brainstem. *Cell Reports* 18(1):185-197. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.021.

〔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 :

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： Filippo RIJLI (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research)

※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。