

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670745

研究課題名(和文) 経子宮的マウス内耳へのアプローチ法の確立

研究課題名(英文) Establishment of approach methods to the embryonic mouse inner ears via the uterine walls

研究代表者

蓑田 涼生 (Minoda, Ryosei)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：30284772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期内耳は、内耳発生研究、先天性難聴に対する治療研究を行う上で非常に重要な研究対象である。我々は過去に、E11.5マウス胎児耳胞に対して、in vivoでの遺伝子、タンパク質導入が可能なることをこれまで報告している。これより後期の胎生期内耳においては、子宮壁が肥厚し混濁してくるため、E11.5で行った経子宮壁的なアプローチは実施不可能であった。これに加えて、胎児自体の皮膚、皮下組織が透明でなくなるため、内耳の局在場所を推測が困難であった。本研究では、まず組織切片を用いた体表と内耳の関係を明らかにし、この結果をもとに、E15.5における胎生期内耳へのアプローチが可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： The developing inner ears of mouse are an attractive experimental target in developing treatment modalities for congenital inner ear diseases and to study inner ear development. We have reported on successful gene transfer into the otocysts of E11.5 embryo in the uterine (Miwa & Minoda, Neuroreport 2011, Molecular therapy, 2013). Mouse embryonic inner ears at the later stages are also an interesting experimental target. However, there have been no established strategies to access the embryonic inner ears at latter stages in vivo because both the uterus wall became thick and turbid, and the embryos per se. become turbid at these stages. In this study, we sought to access the feasibility to access the embryonic inner ears.

Consequently, we were able to successfully inject the inner ear of E15.5 embryos through the transparent yolk sac by removing the uterine wall.

研究分野：内耳

キーワード：内耳 胎児 マウス

1. 研究開始当初の背景

申請者は以前より「遺伝性難聴の根本的治療法の開発」を最終目標とした研究を行ってきた。遺伝性難聴の根本的治療は、それを行う時期により 1) 異常な表現型の出現前と 2) 異常な表現型の出現後の 2 つに分けて考える必要がある。申請者はこれまで 1) の治療を目指し、内耳原基である耳胞を対象として研究を行ってきた。その研究成果として、マウス耳胞へのタンパク質の導入について (Miwa and Minoda, Neuroreport 2011 Cover page に採用)、コネキシン 30 欠失マウス耳胞内に正常コネキシン 30 遺伝子を導入することにより難聴の発症が防止できること (Miwa and Minoda, Mol Ther 2013 IF 7.041) などを報告してきた。

分子生物学的実験を行うための実験動物としてマウスは非常に重要であるが、マウス胎仔耳胞へアプローチするためには開腹後子宮を体外に出し、子宮壁を介し耳胞の同定を行い、耳胞内へ注入する必要があるが容易ではない。申請者はこれまでに、マウス耳胞内の細胞に遺伝子・タンパク質導入を行い、それらが導入されたマウスを正常経膈分娩もしくは帝王切開で出産させる技術を独自に確立している (Minoda, ARO Meeting 2002, USA) (Miwa and Minoda, NeuroReport 2011 cover page) (Miwa and Minoda, Mol Ther 2013)。この技術の困難さにより現在までこの技術を有しているのは、世界でオレゴン聴覚研究センターのグループと申請者のグループのみである。オレゴン聴覚研究センターのグループも 2008 年に Atho1 を正常マウス耳胞に遺伝子導入した結果を Nature に発表している。申請者もオレゴン聴覚研究センターのグループも、これまでの胎生期内耳の in vivo 実験においては耳胞のみを研究対象としてきた。その大きな理由の一つは、胎生 11.5 日 (E11.5) マウス胎仔においては頭部側面の血管を指標にすることにより輪郭の見えない耳胞へもアプローチが可能であるが、これ以降のステージの胎仔では、確立した指標が存在せず経子宮的内耳へのアプローチは極めて困難であるためである。このように耳胞形成以降の内耳へ経子宮的アプローチできないことは、遺伝性難聴治療に関する研究の大きな律速要因となってきた。

2. 研究の目的

本研究においては、マウス胎仔における内耳の局在と頭部表面の解剖を詳細に形態学的に評価することにより、胎生 12 日以降の子宮内胎仔内耳へのアプローチ方法を確立することを目的としている。また、これまで申請者が行ってきた胎生 11.5 日マウス内耳へのアプローチについても器具の改良により簡便な方法の確立を試みる。

3. 研究の方法

1) 耳胞へのアプローチ法の改良

□従来申請者は、E11.5 のマウス子宮を全身麻酔下に体外に引き出し、下方からファイバ

ー光源で照らし、自作した器具で胎仔の頭部を軽く圧迫しながら、血管を指標に耳胞の位置を推測し、マイクロマニピュレーターを操作してガラス電極を介して耳胞内へ注入していた。この手技においてカギとなるのは、胎仔頭部の固定と子宮壁を軽く圧迫して胎仔頭部と子宮壁との距離をなくすことである。これまでは自作の器具を用いてこれを行っていたが、柔らかい胎仔を押しつぶさないように、しかも、血管が確認できる程度に圧迫し、反対の手でマニピュレーターを操作する手技は、習得が最も難しい。そこで今回は手技をより容易にするために次の工夫を行うこととした。E11.5 胎仔が存在している子宮のサイズと胎仔のサイズを計測し、3D プリンターを用いて子宮を胎仔の側面から挟み込むような形状の透明なケースを作成する。

2) 胎生期内耳へのステレオタクティックアプローチ

□正常マウス頭部の切片を作成し、各発生段階毎の体表から内耳までの距離の計測、内耳の位置の同定に有用と思われる血管、体表の隆起などと内耳の位置関係を計測し指標とする。これら指標をもとに子宮内の胎仔にステレオタクティックにアプローチする。頭部全体の径を参考に組織の収縮率を考慮し、頭部切片上の内耳の位置から生体での内耳の位置を決定する。

□実験 1) と同じ要領で、3D プリンター (今回申請) を用いて作成した透明なケースに子宮ごと胎仔両側面からはさみこみ、胎仔が子宮内で動かないようにする。下方からファイバー光源で照らしながら胎仔頭部を観察し、ステレオタクティック装置とインジェクション装置 (今回申請) を使い、ガラス電極を用いて内耳内にファストグリーンの注入を行う。これにて内耳へのアプローチが可能になったことが確認できた後に、申請者が行った過去の実験と同様の方法を用いてマーカー遺伝子として GFP 遺伝子を内耳へ注入後、エレクトロポレーション法を用いて導入し、GFP の発現の有無について凍結切片を作成して評価する (Miwa and Minoda, Mol Ther 2013)。

3) 内耳 EGFP 発現マウスを用いた蛍光実体顕微鏡下での内耳の同定とアプローチ

□GtROSA26-GFP マウスと Pax2cre マウス (Pax2cre が存在する部分のみが GFP で光る) を交配し実験に用いる。このマウスは endogenous paired box gene 2 (Pax2) の上流に EGFP が組み込んであり、Homozygous マウスは Pax2 の発現が消失するため致死的であるが、Heterozygous は Pax2 の発現する領域に EGFP の発現を有し、表現型は正常であることが知られている。Pax2 遺伝子は正常マウスにおいて内耳全体に発現するため、このマウスは内耳全体から蛍光を発する。この特徴を内耳の同定に利用する。

□全身麻酔を行った各発生段階の妊娠マウスの腹部を切開し、子宮を体外に引出した後、熊本大学の共用実験施設にある蛍光実体顕

微鏡装置を用い、胎生期内耳の同定とアプローチを試みる。

4) 小動物用の超音波高解像度イメージングシステムを用いたマウス胎生期内耳の同定とアプローチ

□全身麻酔を行った各発生段階の妊娠マウスの腹部を切開し、子宮を体外に引出した後、熊本大学の共用実験施設にある小動物用の超音波高解像度イメージングシステムを用い、胎生期内耳の同定とアプローチを試みる。

4. 研究成果

実験 1) 3Dプリンターを用いて、インジェクションを行うためのケースを多数試作し、実験を行ったが、子宮内の胎児の固定が容易ではなく、ケースにより挟み込むことにより、インジェクション成功率を上昇させるのが困難であると考えた。

実験 2) E11 から E15 までの凍結切片を作製し、体表から半規管、前庭、蝸牛までの角度、距離について検討を行った。その結果、角度、距離についても個体によるばらつきがあるが、それぞれの値について個体別の中央値を選択することにより、ある程度の確立でそれぞれの部位で定型的にインジェクションを行うことは可能であると思われた。これに加えて、胎生後期に従い肥厚、混濁する子宮壁の一部を切開し yolk sac 表面を露出することにより、子宮内の胎児体表が透見できることがわかった。

E12.5 マウス胎児

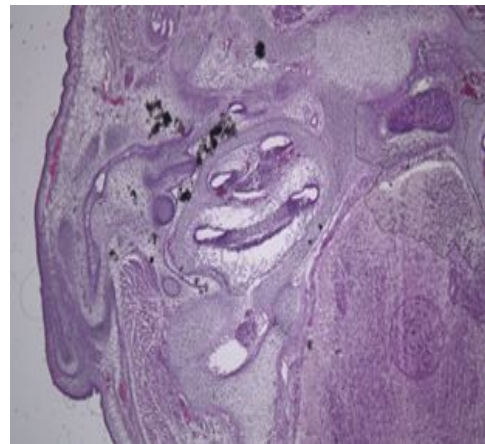
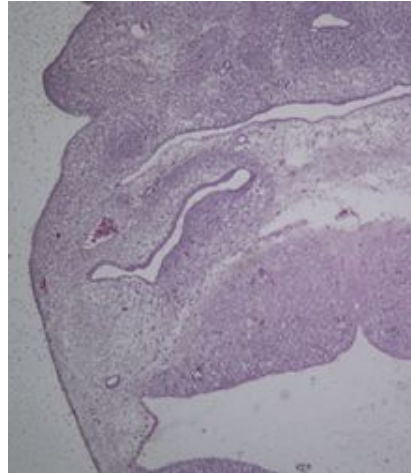


E15.5 マウス胎児

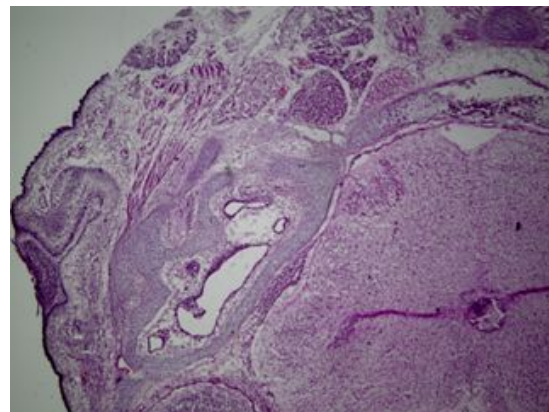


E12.5 胎児軸位断

E15.5 胎児軸位断



胎児冠状断



切片による検討の結果、総じて蝸牛までの距離より前庭系組織空間までの距離の方が短かった。また、前庭系組織空間は E15.5 において最も大きかった。以上の結果をもとに、E15.5 の内耳に物質投与を行った。全身麻酔後妊娠マウスの胎児を体外に引出し、胎児を入れた子宮壁の一部を破り、yolk sac を露出させた。yolk sac を介して、胎児耳介の後上部よりガラス管を刺入し、9 アルギニンを付加した GFP(9R-CPP) を内耳内腔に投与した。24 時間後に凍結切片を作製し、GFP の発現を

確認すると、内耳内に広く GFP の発現を認めた。

実験3) GtROSA26-GFP マウスと Pax2cre マウス (Pax2cre が存在する部分のみが GFP で光る) の交配を行ったが、内耳における GFP の発現が不良であり、蛍光実態顕微鏡での内耳の同定は困難であった。

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)

Potential treatments for genetic hearing loss in humans: current conundrums.

Minoda R, Miwa T, Ise M, Takeda H.

Gene Ther. 2015 Aug;22(8):603-9. doi:

10.1038/gt.2015.27. Epub 2015 Mar 17.

Review.

[学会発表](計 2 件)

1. Minoda R, Takeda H, Miwa T, Yumoto E
Electroporation-Mediated
Transuterine Gene Transfer into Mouse
Otocysts (EUGO) utilizing NEPA21
electroporator
52th Inner Ear Biology Workshop
2015.9.12-15

2. Takeda H, Minoda R, Miwa T, Yamada T,
Ise M, Yumoto E Mouse derived cell
transplantation into the mouse otocyst
in vivo
52th Inner Ear Biology Workshop
2015.9.12-15

[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

蓑田涼生 (MINODA, Ryosei)

熊本大学院生命科学研究部

耳鼻咽喉科・頭頸部外科 准教授

研究者番号: 30284772

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

村上大造 (MURAKAMI, Daizo)

熊本大学医学部附属病院

耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

研究者番号: 0398212

伊勢桃子 (ISE, Momoko)

熊本大学医学部附属病院

耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

研究者番号: 20573596