

学位論文

Doctoral Thesis

ラセン神経節細胞の発生・分化に TIS21 遺伝子が必要である
(Neurogenesis of the spiral ganglion cells in the cochlea
requires the transcriptional cofactor TIS21)

山田 卓生

Takao Yamada

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻

頭頸部感覚病態学

指導教員

湯本 英二 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻

耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

2015 年 3 月

学位論文

Doctoral Thesis

論文題名：ラセン神経節細胞の発生・分化に TIS21 遺伝子が必要である
(Neurogenesis of the spiral ganglion cells in the cochlea
requires the transcriptional cofactor TIS21)

筆者名：山田 卓生
Takao Yamada

指導教員名：熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

湯本 英二 教授

審査委員名：神経内科学担当教授 安東 由喜雄 教授
知覚生理学担当教授 宋 文杰 教授
神経分化学担当准教授 太田 訓正 准教授

2015年3月

目次

1. 要旨
2. 発表論文リスト
3. 謝辞
4. 略語一覧
5. 研究の背景と目的
6. 実験方法
7. 実験結果
8. 考察
9. 結語
10. 参考文献

1. 要旨

ラセン神経節細胞は、蝸牛ローゼンタール管の中にその細胞体を有し、蝸牛有毛細胞によって機械的エネルギーから電氣的エネルギーへと変換された音情報を延髄蝸牛神経核へと伝達するという、聴覚機能において極めて重要な役目を担っている。しかし、その発生・分化における分子生物学的なメカニズムは不明な点が多い。このラセン神経節細胞の発生・分化のメカニズムの一端を明らかにすることを目的として TIS21 遺伝子に着目して本研究を行った。

TIS21 遺伝子は BTG/Tob ファミリーと呼ばれる増殖抑制遺伝子群に属し、今までに細胞周期の抑制およびアポトーシスの抑制、癌増殖抑制、小脳における神経細胞の分化の誘導といった働きが報告された。また、当教室林田らは、野生型ラットにおいて、ラセン神経節細胞の前駆細胞である神経芽細胞において TIS21 蛋白が発現し、ラセン神経節細胞に分化する時期に一致して TIS21 蛋白の細胞内局在が変化することを報告した。このことは、ラセン神経節細胞の発生・分化においても TIS21 が何らかの役割を果たしている可能性があることを示していると考えられる。

本研究は、TIS21 遺伝子を GFP に組み替えた遺伝子改変マウス（TIS21 欠失マウス）におけるラセン神経節細胞の形態的評価を行うことにより、ラセン神経節細胞の発生・分化における TIS21 遺伝子の関与を検討することを目的とした。胎生 13.5 日、15.5 日、18.5 日、生後 4 日の TIS21 欠失マウスにおいて、ラセン神経節細胞数の減少を認めた。また、ラセン神経節細胞を収めているローゼンタール管の断面積の減少、伸長の遅れも認めた。これらの結果より TIS21 遺伝子がラセン神経節細胞の発生・分化において不可欠な遺伝子であることが明らかとなった。

2. 発表論文リスト

①関連論文

1. Takao Yamada, Ryosei Minoda, Toru Miwa, Momoko Ise, Hiroki Takeda, Eiji Yumoto.

Neurogenesis of the spiral ganglion cells in the cochlea requires the transcriptional cofactor TIS21.

Neuroscience Letters 584: 265-269, 2015

②. その他の論文

1. 山田 卓生, 蓑田 涼生, 伊勢 桃子, 三輪 徹, 湯本 英二

TIS21遺伝子はマウス蝸牛ラセン神経節細胞の発生・分化に必要である.

耳鼻咽喉科ニューロサイエンス, 28: 74, 2014

2. Toru Miwa, Ryosei Minoda, Momoko Ise, Takao Yamada, Eiji Yumoto

Mouse otocyst transuterine gene transfer restores hearing in mice with connexin 30 deletion-associated hearing loss.

Molecular Therapy 21(6): 1142-1150, 2013

3. 山田 卓生, 増田 聖子, 鮫島 靖浩, 湯本 英二

舌に発生したsolitary fibrous tumorの一例.

口腔咽頭科学 25(2): 197-202, 2012

3. 謝辞

本研究は、熊本大学大学院医学教育部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野
湯本 英二教授のご指導の下に行いました。同教授、直接にご指導いただいた
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野 蓑田 涼生准教授ならびに同教室の皆様に深
く感謝いたします。また、TIS21欠失マウスを供与してくださったW. B. Huttner
博士 (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden,
Germany) に深く感謝いたします。

4. 略語一覽

TIS21 : TPA inducible sequences 21

BTG: B-cell translocation gene

Tob: Transducing molecule of c-ErbB-2

GFP: Green fluorescent protein

FGF: Fibroblast growth factor

BMP: Bone morphogenetic protein

Sox2: SRY (Sex determining region Y)-box 2

Ngn1: Neurogenin 1

NeuroD1: Neurogenic differentiation 1

BTG2: B-cell translocation gene 2

PC3: Pheocromocytoma cell 3

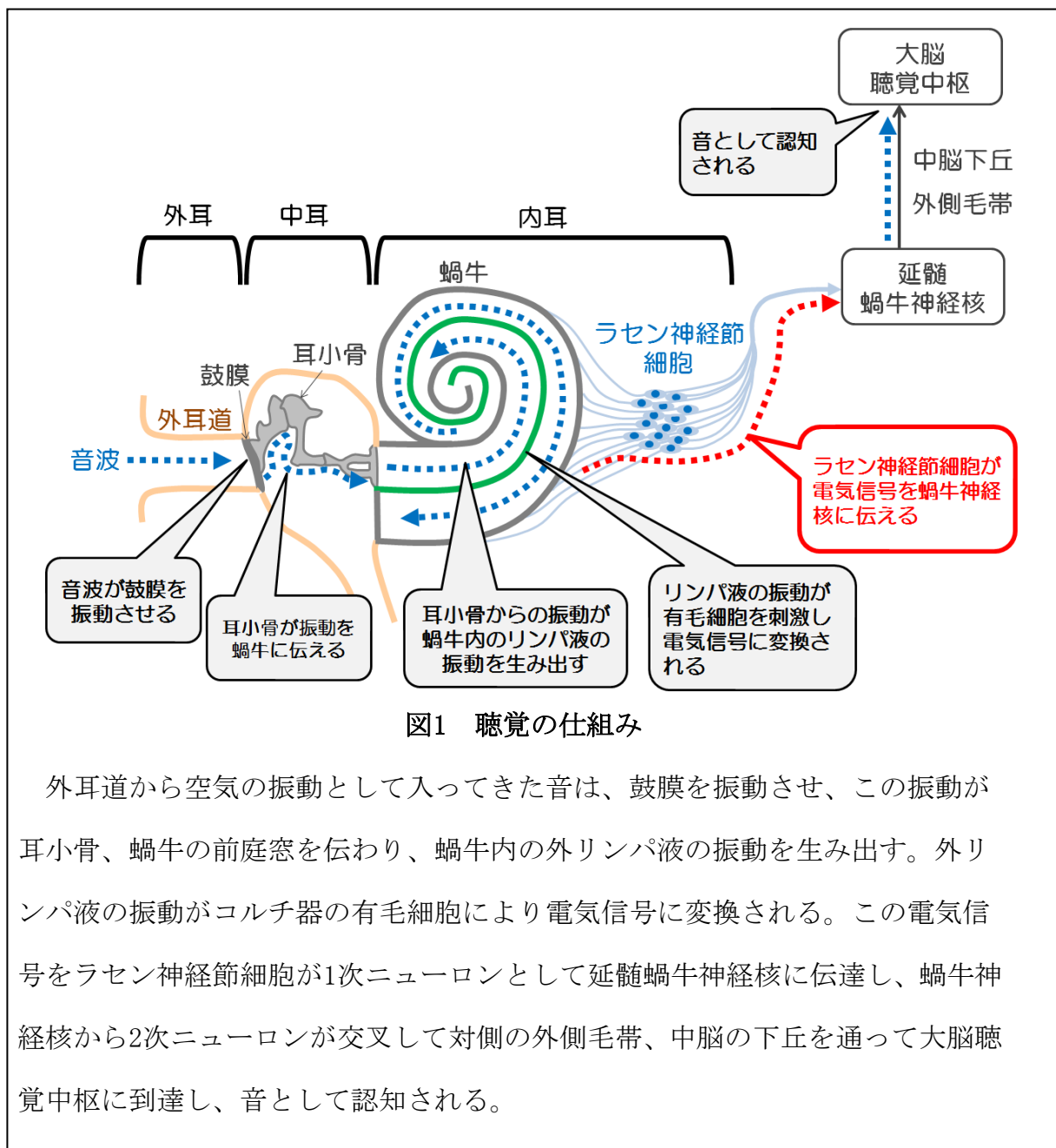
NGF: Nerve growth factor

Math1: Mouse atonal homolog 1

PBS: Phosphate buffered saline

5. 研究の背景と目的

ラセン神経節細胞は蝸牛ローゼンタール管の中に細胞体が存在する双極性細胞であり、末梢側は蝸牛有毛細胞、中枢側は延髄蝸牛神経核まで軸索を伸長している[1]。このラセン神経節細胞は、蝸牛有毛細胞によって機械的エネルギーから電気的エネルギーに変換された音情報を延髄の蝸牛神経核に伝達する（図1）という、聴覚機能において重要な役割を担っているが、その発生過程における分子生物学的なメカニズムについてはまだ不明な点が多い。



野生型マウスにおいて、胎生7.5日に菱脳レベルの表皮外胚葉が肥厚して耳板が形成され、耳板が間質に陥入し、胎生9日に開口部が閉鎖して表皮から切り離された嚢状の器官である耳胞が形成される（図2） [2, 3]。

その後、FGF、Wnt、BMPなどの遺伝子群の働きにより、胎生9日に耳胞が、将来ラセン神経節細胞や蝸牛有毛細胞に分化するPre-neurosensory domainと、それ以外の支持細胞、ラセン靭帯細胞、血管条細胞などに分化するNon-sensory domainに分けられる [4-6]。さらにSox2遺伝子の働きによりPre-neurosensory domainのうち、将来ラセン神経節細胞に分化する領域であるNeurogenic domainが決定され、蝸牛ラセン神経節細胞の前駆細胞である神経芽細胞が形成される [7]。その後、Ngn1、NeuroD1遺伝子の働きにより胎生9.5日から胎生14.5日にかけてNeurogenic domainから神経芽細胞が離層し、間質腹内側に遊走してラセン神経節が形成される [8]。そして、ラセン神経節は胎生12.5日から胎生17日にかけてラセン状に伸長していく。また、胎生9.5日から神経芽細胞は増殖を開始し、胎生12日から胎生16日にかけて基底回転部から頂回転部にかけて順に増殖を停止してラセン神経節細胞への分化を開始し、最終的に生後14日までに全回転において分化を終えて成熟ラセン神経節細胞となる（図3） [2, 9, 10]。

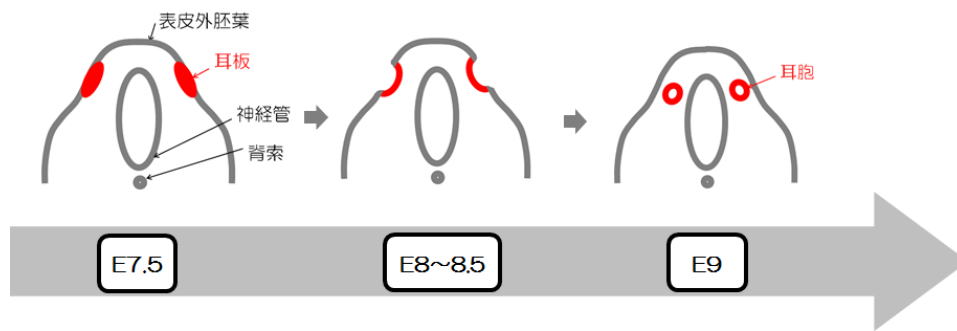


図2 ラセン神経節細胞の発生・分化 (1)

胎生7.5日に表皮外胚葉が肥厚して耳板を形成する。その後、耳板が間質に陥入し、胎生9日に開口部が閉鎖して表皮から切り離されて耳胞が形成される

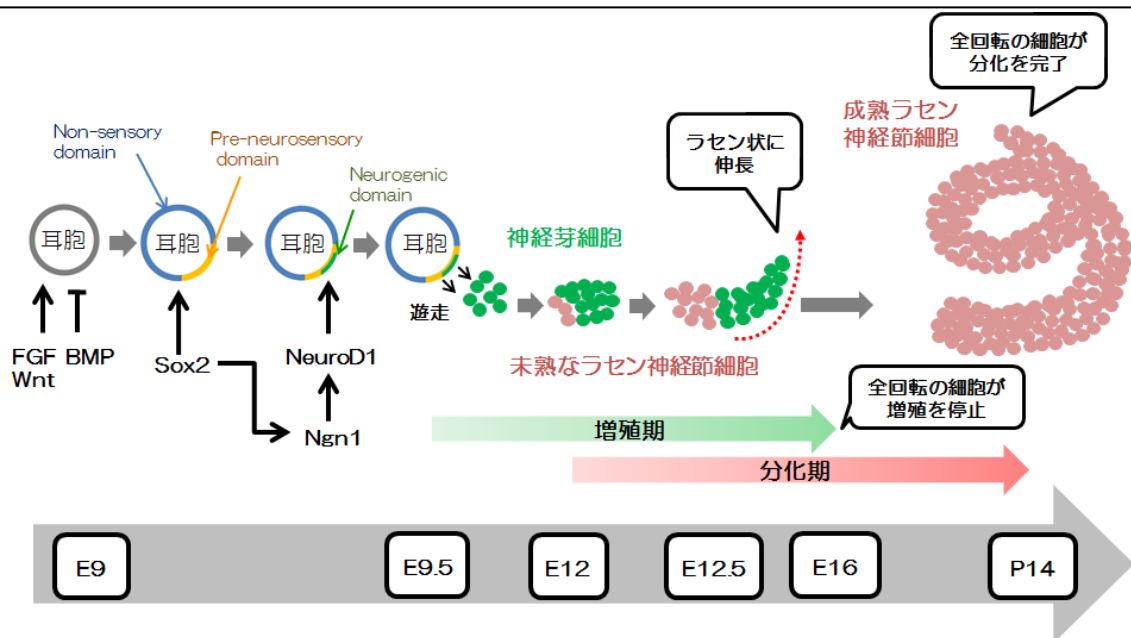


図3 ラセン神経節細胞の発生・分化 (2)

胎生9.5日から胎生14.5日にかけてNeurogenic domainから神経芽細胞が離層、間質腹内側に遊走してラセン神経節が形成されると同時に、胎生12.5日から胎生17日にかけてラセン状に伸長する。また、神経芽細胞は胎生9.5日から増殖を開始し、胎生12日から胎生16日にかけて基底回転部から頂回転部にかけて順に増殖を停止してラセン神経節細胞への分化を開始し、生後14日までに全ての細胞が成熟ラセン神経節細胞となる。

TIS21遺伝子は、BTG/Tobファミリーと呼ばれる増殖抑制遺伝子群に属する遺伝子であり、マウスではTIS21、ヒトではBTG2、ラットではPC3と呼ばれ、これらは全て相同体の関係にある[11]。TIS21は、当初PC12細胞（ラット褐色細胞腫由来細胞）が神経成長因子NGFに応答して神経細胞様に分化する際に発現が誘導される遺伝子として報告された[12]。また、WEHI-231細胞（マウスリンパ腫細胞）を用いた研究において細胞増殖抑制作用を有し[13]、PC12細胞を用いた研究においてアポトーシス抑制作用を有していることが報告されている[14]。そして、マウスの小脳においてTIS21がNeuroD1、Math1を介して小脳顆粒細胞の分化を制御していると報告されている[15-17]。

一方、蝸牛においては、当教室林田らが、ラットの蝸牛ローゼンタール管の神経芽細胞においてTIS21蛋白が発現し、ラセン神経節細胞への分化時期に一致してTIS21蛋白の局在が細胞質から核へと移行することを報告している[19]。このような核、細胞質間の局在の移行はアポトーシス抑制遺伝子として知られるp21にも見られ、核から細胞質に局在移行してアポトーシス抑制機能を発現することが報告されている[20-22]。このように蛋白の細胞内局在はその機能と密接に関係していることが知られており、TIS21も神経芽細胞において、その細胞内局在を変化させることによってラセン神経節細胞への分化に何らかの作用を有している可能性が考えられる。

本研究においては、TIS21のラセン神経節細胞の発生・分化における関与について、より明確にするために、TIS21欠失マウスにおける形態変化について検討を行った。

6. 研究方法

6-1. 動物

実験動物には、TIS21遺伝子の代わりにGFPを組み込んだTIS21欠失GFPノックインC57BL/6マウス（以下、TIS21欠失マウスと記す）、野生型C57BL/6マウスを用いた。実験に関する動物の取り扱いは、熊本大学動物実験指針に定められた方法を用い、また、熊本大学動物資源開発研究センター使用心得に従った。

6-2. 免疫染色

TIS21欠失マウスについては、W. B. Huttner博士(Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany)より供与された胎生13.5日、胎生15.5日、胎生18.5日、生後4日の凍結組織を用いた。この組織は、TIS21欠失マウスをケタミン、キシラジンで深麻酔してから断頭した後に4%パラホルムアルデヒドに24時間浸漬して組織固定を行い、その後に10%、20%、30%のスクロース溶液に順に浸漬させてから、OCTコンパウンドに浸漬し、急速凍結したものである。

野生型マウスについては、TIS21欠失マウスと同様の方法で凍結組織を作製した。胎生期マウスに対しては目的の妊娠日の母親マウスに対し、ケタミン（120mg/kg, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan）およびキシラジン（4mg/kg, Wako-Junyaku, Osaka, Japan）を腹腔内投与し十分に麻酔をした後、帝王切開を施行し、子宮より胎児を摘出した。摘出した胎児および生後直後のマウスについては妊娠マウスと同様にケタミンとキシラジンの腹腔内投与にて麻酔を行った。断頭後、4%パラホルムアルデヒドに24時間浸漬して組織固定を行い、その後に10%、20%、30%のスクロース溶液に順に浸漬してから、OCTコンパウン

ド(Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)に浸漬し、液体窒素を用いて急速凍結した。

TIS21欠失マウス、野生型マウスの凍結組織よりクライオスタット (HM505E, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて蝸牛軸に沿った断面で8 μ m厚の連続切片を作製した。作製した凍結切片は4%パラホルムアルデヒドにて15分間固定し、PBSで3回洗浄した後、室温にて5%ヤギ血清および0.1%Triton Xを含むPBSで30分間インキュベートした。一次抗体として、神経細胞の細胞骨格である β III-チューブリンをターゲットとするTuj-1抗体を用いた。200倍に希釈したマウス抗Tuj-1抗体 (COVANCE, New Jersey, USA) を4°Cで一晩反応させ、PBSにて3回洗浄した後、二次抗体として200倍に希釈したAlexa Fluor 555標識のヤギ抗マウス抗体 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) を2時間反応させ、蛍光染色を行った。核染色は1000倍に希釈したヘキスト (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いた。その後、画像解析装置が付属している蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-9000, Osaka, Japan) にて撮像した。

6-3. ローゼンタール管の面積の測定

撮影した画像のうち、マウスの蝸牛1個あたり、蝸牛軸の中心に近い3つの切片をランダムに選択した。これらの画像をImageJソフトウェア (NIH, Maryland, USA)に取り込み、蝸牛管の近傍の、基底回転部、中回転部、頂回転部のそれぞれのラセン神経節細胞が塊を形成している部分 (図4c) の外周をローゼンタール管と定義し、滑らかな曲線で取り囲んでその範囲の面積をImageJの面積測定機能を用いて測定した。3つの切片における面積の平均を、その蝸牛の面積とした。TIS21欠失マウス、野生型マウスにおいてそれぞれ4匹、合計8個の蝸牛について同様の計測を行った。

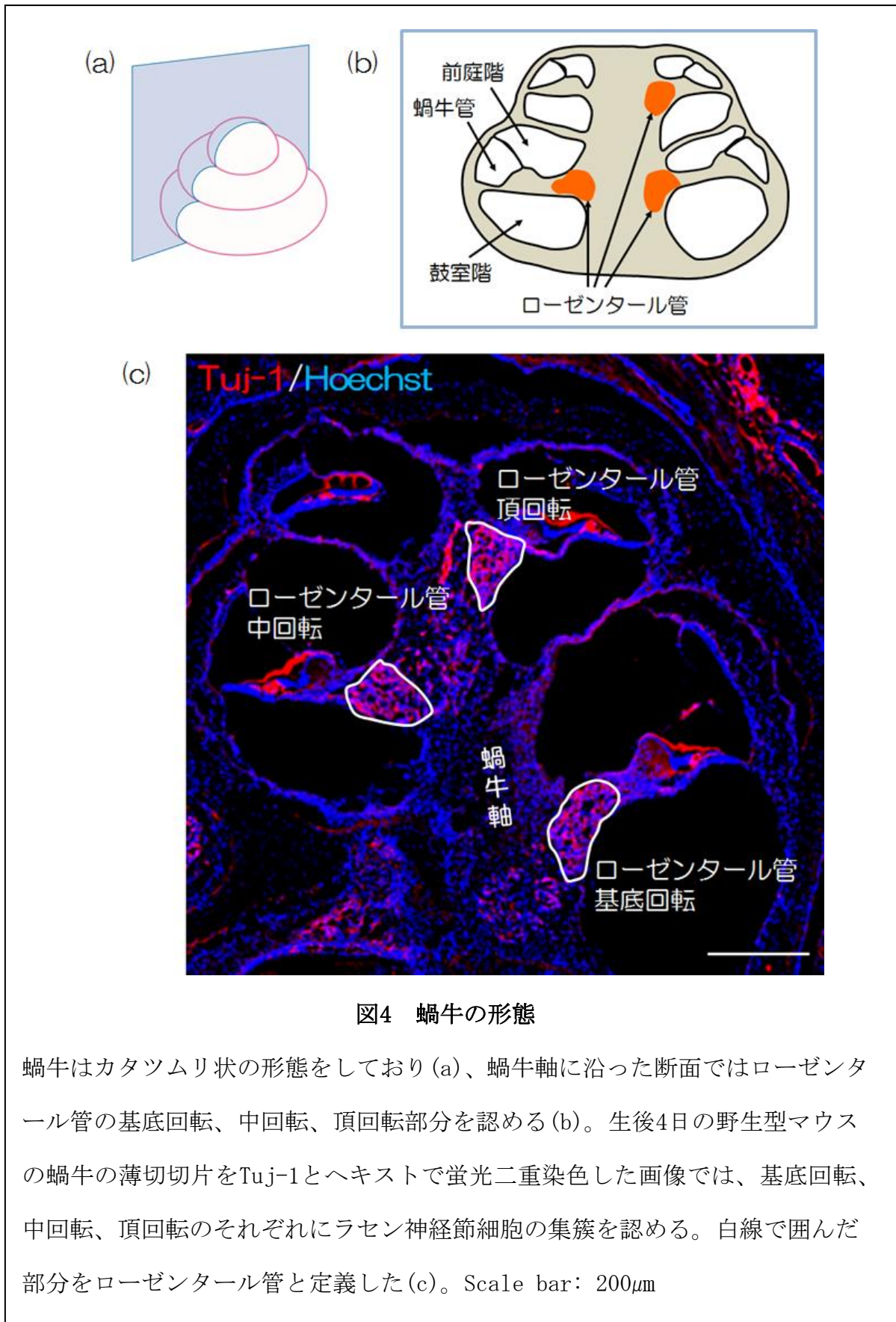


図4 蝸牛の形態

蝸牛はカタツムリ状の形態をしており (a)、蝸牛軸に沿った断面ではローゼンタール管の基底回転、中回転、頂回転部分を認める (b)。生後4日の野生型マウスの蝸牛の薄切切片をTuj-1とヘキストで蛍光二重染色した画像では、基底回転、中回転、頂回転のそれぞれにラセン神経節細胞の集簇を認める。白線で囲んだ部分をローゼンタール管と定義した (c)。Scale bar: 200 μ m

6-4. ラセン神経節細胞数の測定

ローゼンタール管の面積の測定と同様に、マウスの蝸牛1個あたり、蝸牛軸の中心部にある3つの切片をランダムに選び、ペイントソフトウェア (Microsoft, Washington, USA) に取り込んだ。ローゼンタール管の中に存在し、Tuj-1とヘキストの両方で染色されている細胞をラセン神経節細胞と定義し、用手的にカウントした。重複カウントを防ぐために、カウントした細胞にはチェックマークを描き込んだ (図5)。3つの切片における細胞数の平均を、その蝸牛の細胞数とした。また、ローゼンタール管の単位面積あたりの細胞数 (細胞密度) も算出した。

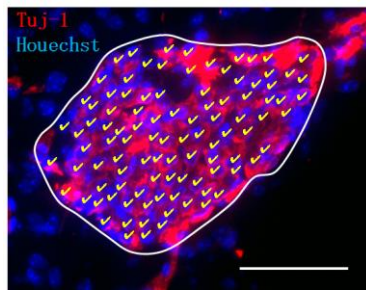


図5 ラセン神経節細胞のカウント

ローゼンタール管内にある、Tuj1とヘキストの両方で染まっている細胞をラセン神経節細胞と定義し、カウントした。重複カウントを防ぐために、カウントした細胞はチェックマークを付けた。Scale bar: 50 μ m

6-5. ラセン神経節細胞のアポトーシスの評価

胎生14.5日のTIS21欠失マウス、野生型マウスをそれぞれ2匹、4耳ずつ用いた。Tuj-1とヘキストの二重染色の際と同様に8mm厚の連続切片を作成し、4%パラホルムアルデヒドにて15分間固定し、PBSで3回洗浄し、室温にて5%ヤギ血清およ

び0.1%Triton Xを含むPBSで30分間インキュベートした。一次抗体として200倍に希釈したマウス抗Tuj-1抗体 (COVANCE, New Jersey, USA) を4°Cで一晩反応させ、PBSにて3回洗浄した後、二次抗体として200倍に希釈したAlexa Fluor 350標識のヤギ抗マウス抗体 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) を2時間反応させ、蛍光染色を行った。TUNEL染色はIn Situ Cell Death Detection Kit, TMR red(Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan)を用いて行い、蛍光顕微鏡にて撮像した。画像をペイントソフトウェアに取り込み、重複がないようにチェックマークを入れながらローゼンタール管内のTUNEL陽性細胞のカウントを行った。

6-6. 統計学的解析

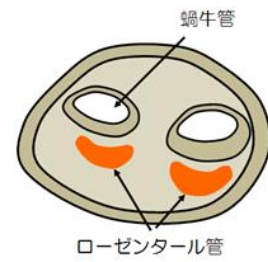
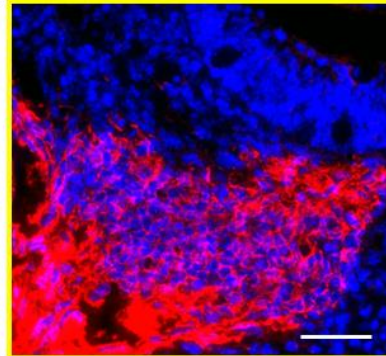
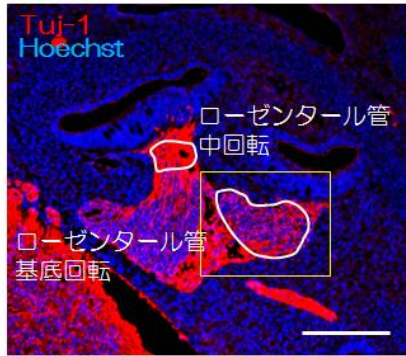
TIS21欠失マウス、野生型マウスそれぞれのローゼンタール管の面積、ラセン神経節細胞数、ラセン神経節の細胞密度、TUNEL陽性細胞について、マン・ホイットニーのU検定を用いて解析した。

7. 研究結果

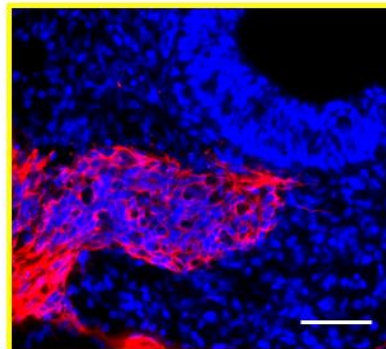
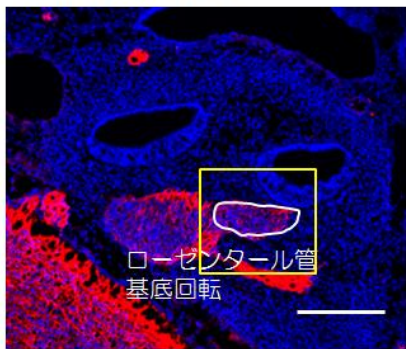
7-1. ローゼンタール管の形態について

胎生13.5日、胎生15.5日、胎生18.5日、生後4日のTIS21欠失マウス、野生型マウスの蝸牛薄切切片を用いてTuj-1とヘキストによる蛍光二重染色を行った代表例を図6-図9に示す。前述の通り、野生型マウスにおいては、ローゼンタール管は胎生12.5日から蝸牛軸を中心にしてラセン状に頂上に向かって伸長するとされている[2]。本研究では胎生15.5日～生後4日において野生型マウス、TIS21欠失マウスの全ての蝸牛において、頂回転まで伸長しているのが確認できた（図7-9）。胎生13.5日では、野生型マウスは2個体、4耳において基底回転、中回転でローゼンタール管を認めたのに対し、TIS21欠失マウスでは全ての個体、耳において基底回転にのみにしかローゼンタール管を認めなかった。このことから、TIS21欠失マウスにおいてはローゼンタール管の発達に遅れがある可能性が考えられた。

野生型マウス



TIS21欠失マウス

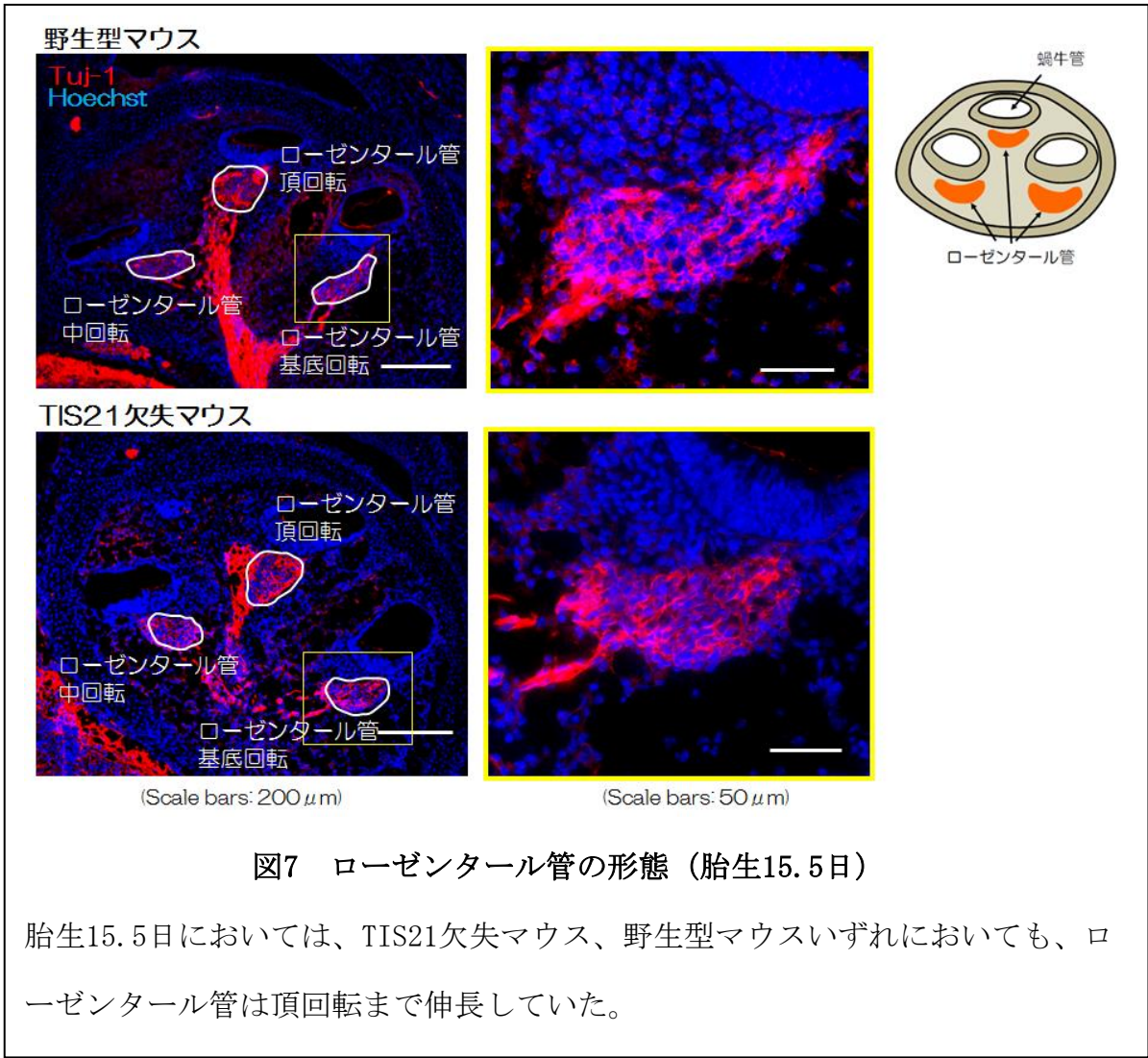


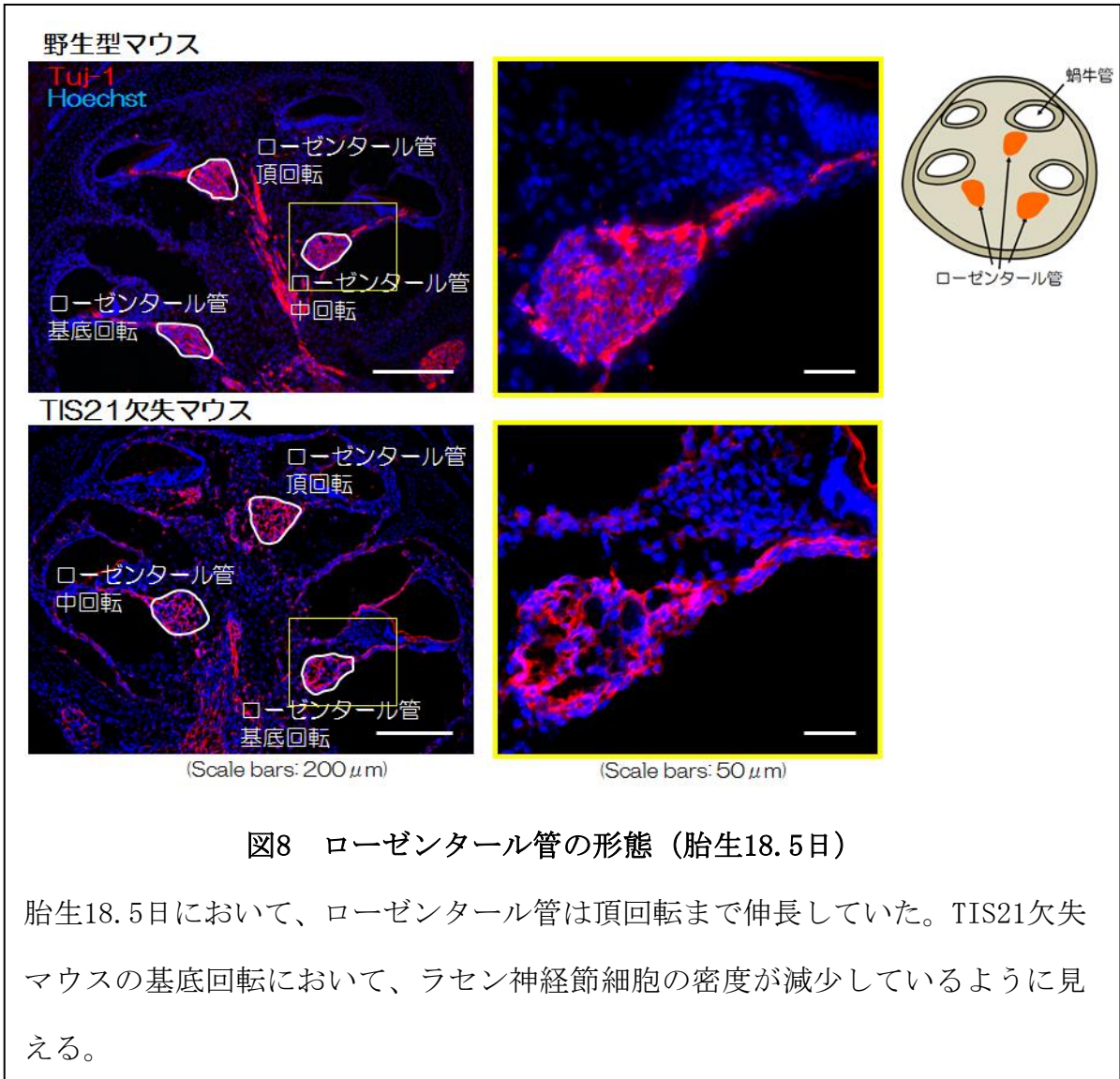
(Scale bars: 200 μ m)

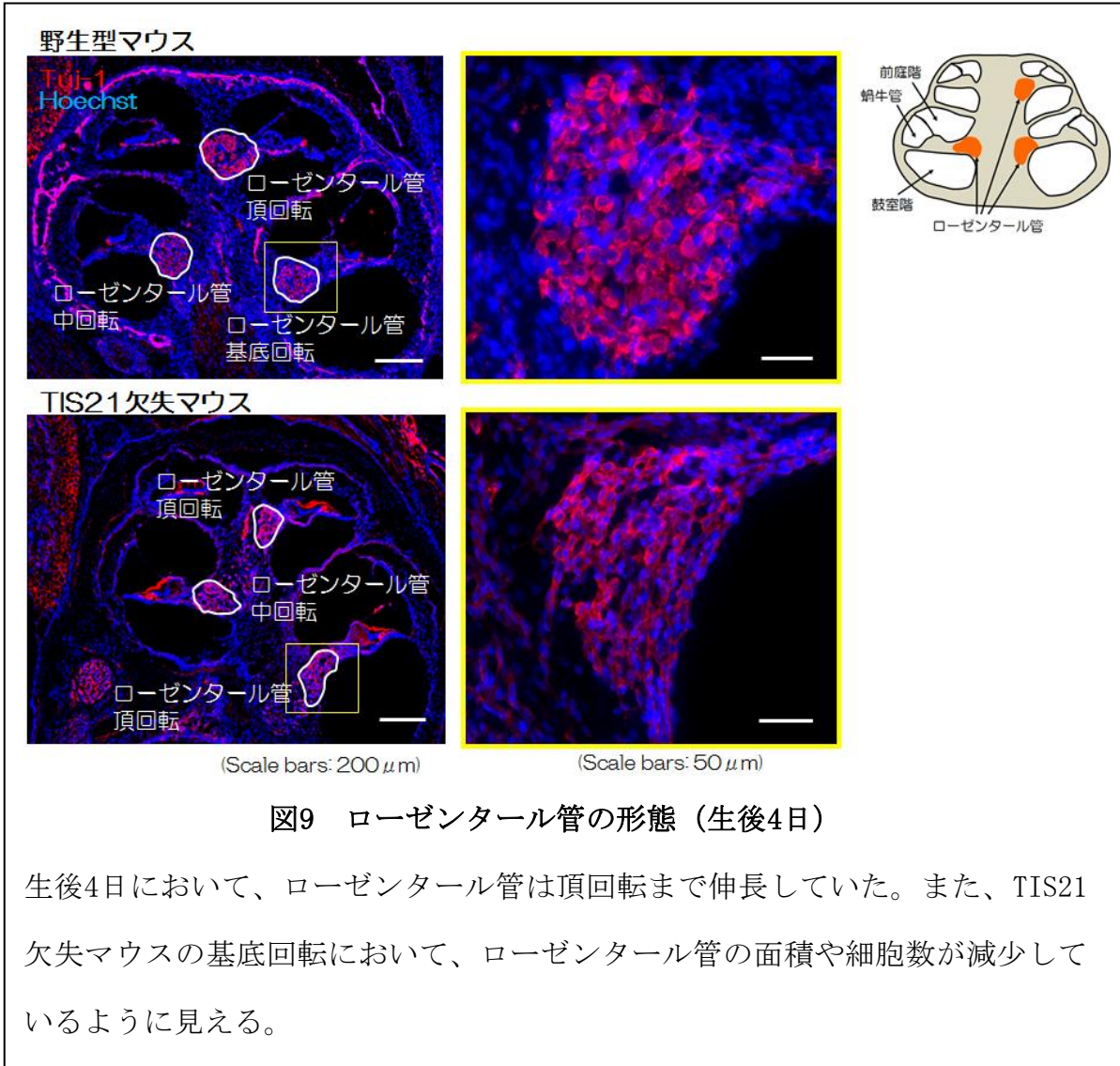
(Scale bars: 50 μ m)

図6 ローゼンタール管の形態 (胎生13.5日)

胎生13.5日において、野生型マウスでは基底回転と中回転にローゼンタール管を認めたが、TIS21欠失マウスでは基底回転のみにしか認めなかった。







7-2. ローゼンタール管の面積について

TIS21欠失マウスにおいては、全回転の合計面積は胎生13.5日で $8,281 \pm 429 \mu\text{m}^2$ 、胎生15.5日で $20,035 \pm 1,698 \mu\text{m}^2$ 、胎生18.5日で $30,975 \pm 3,423 \mu\text{m}^2$ 、生後4日で $39,143 \pm 4,470 \mu\text{m}^2$ であった。対して、野生型マウスにおいては、胎生13.5日で $13,446 \pm 5,167 \mu\text{m}^2$ 、胎生15.5日で $2,6780 \pm 4,250 \mu\text{m}^2$ 、胎生18.5日で $29,443 \pm 7,428 \mu\text{m}^2$ 、生後4日で $54,935 \pm 3,671 \mu\text{m}^2$ であった。前述の通り、胎生13.5日において、野生型マウスでは8耳のうち4耳において基底回転と中回転とローゼンタール管を認めたのに対し、TIS21欠失マウスでは8耳全てにおいて基底回転にのみにしかローゼンタール管を認めず、中回転ではローゼンタール管の面積の有意な減少を認めたが、全回転の合計面積においては有意差を認めなかった。胎生15.5日と生後4日においては、TIS21欠失マウスにおいて、全ての回転で有意に面積が減少しており、全回転の合計面積でも有意差を認めた。胎生18.5日では、全ての回転においてTIS21欠失マウスと野生型マウスのローゼンタール管の面積に有意差はなく、全回転の合計面積でも有意差を認めなかった (図8)。

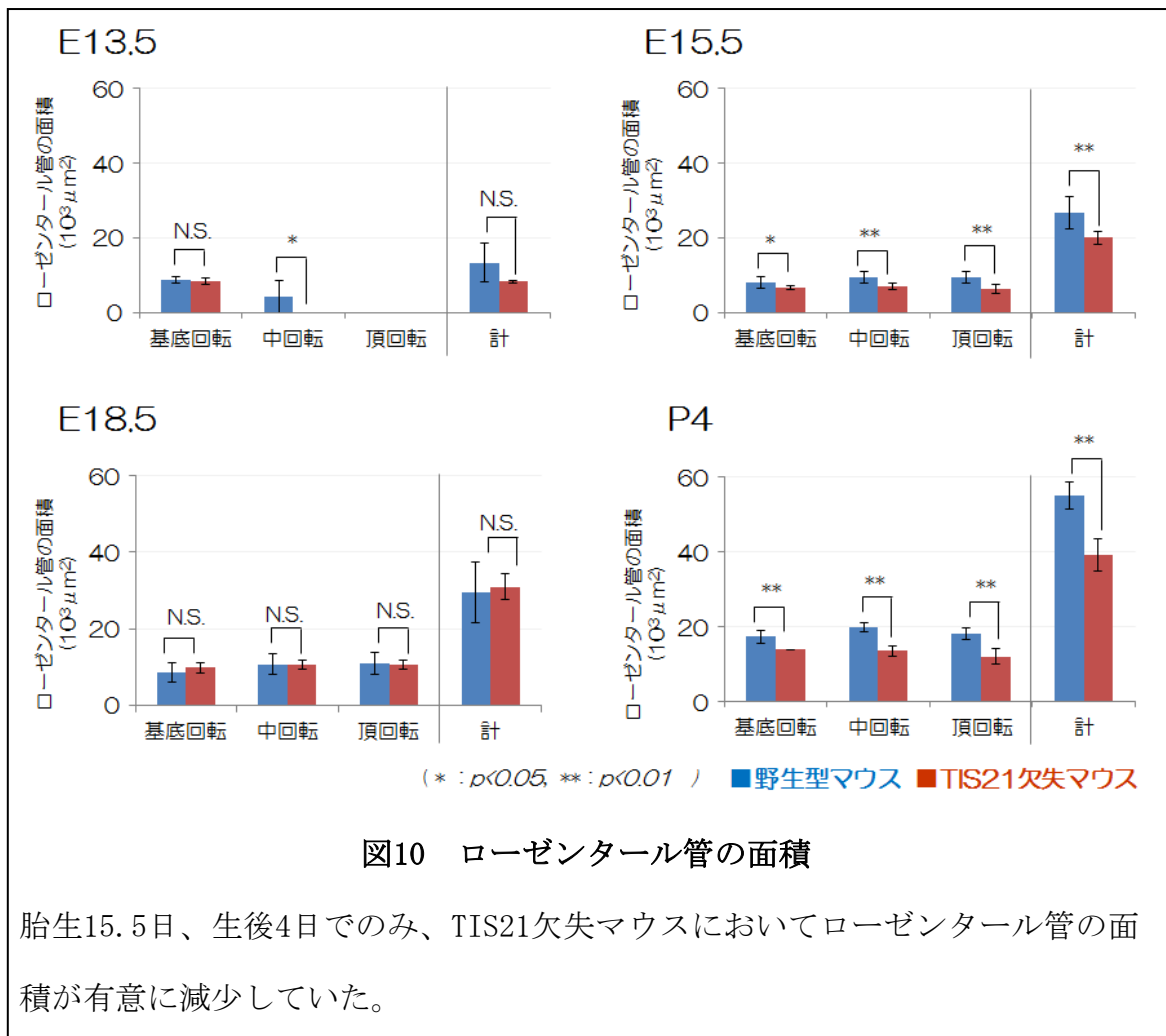


図10 ローゼンタール管の面積

胎生15.5日、生後4日でのみ、TIS21欠失マウスにおいてローゼンタール管の面積が有意に減少していた。

7-3. ラセン神経節細胞数について

TIS21欠失マウスにおいて、全回転におけるラセン神経節細胞の合計数は、胎生13.5日で 78 ± 4.3 個、胎生15.5日で 201 ± 19.8 個、胎生18.5日で 232 ± 16.2 個、生後4日で 239 ± 21.7 個であった。対して野生型マウスにおいては、胎生13.5日で 140 ± 60.7 個、胎生15.5日で 282 ± 45.9 個、胎生18.5日で 288 ± 22.5 個、生後4日で 300 ± 13.6 個であった。TIS21欠失マウスの全ての日齢、全ての回転において有意にラセン神経節細胞数が減少していた（図11）。

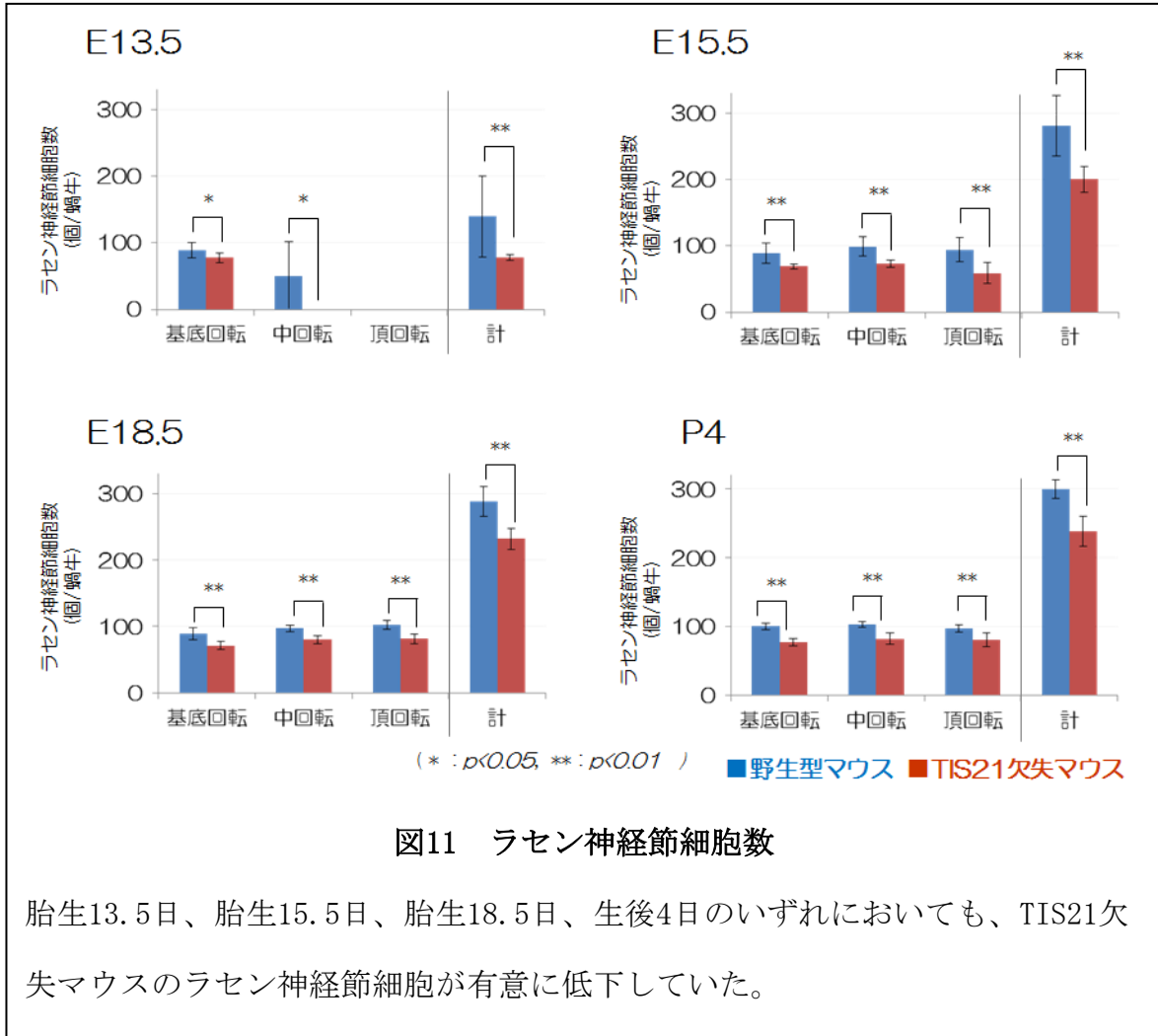


図11 ラセン神経節細胞数

胎生13.5日、胎生15.5日、胎生18.5日、生後4日のいずれにおいても、TIS21欠失マウスのラセン神経節細胞が有意に低下していた。

7-4. ラセン神経節細胞の細胞密度について

ローゼンタール管の単位面積あたりのラセン神経節細胞（細胞密度）についても検討を行った。全回転における細胞密度について、TIS21欠失マウスにおいては胎生13.5日で 0.0093 ± 0.0005 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)、胎生15.5日で 0.0100 ± 0.0007 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)、胎生18.5日で 0.0100 ± 0.001 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)、生後4日で 0.0061 ± 0.0006 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)であった。野生型マウスでは胎生13.5日で 0.0104 ± 0.0011 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)、胎生15.5日で 0.0106 ± 0.0015 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)、胎生18.5日で 0.0102 ± 0.0018 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)、生後4日で 0.0055 ± 0.0005 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)であった。胎生13.5日においては、基底回転では有意差を認めず、中回転、頂回転についてはTIS21欠失マウスにおいてローゼンタール管が存在しなかったため検討対象外とした。胎生15.5日においては、全ての回転において細胞密度の有意差は認めず、全回転の合計においても有意差を認めなかった。胎生18.5日においては、全ての回転においてTIS21欠失マウスの細胞密度の減少を認め、全回転の合計でも有意差を認めた。生後4日では、中回転と頂回転においてTIS21欠失マウスの細胞密度が有意に増加していたが、全回転の合計では有意差は認めなかった（図12）。

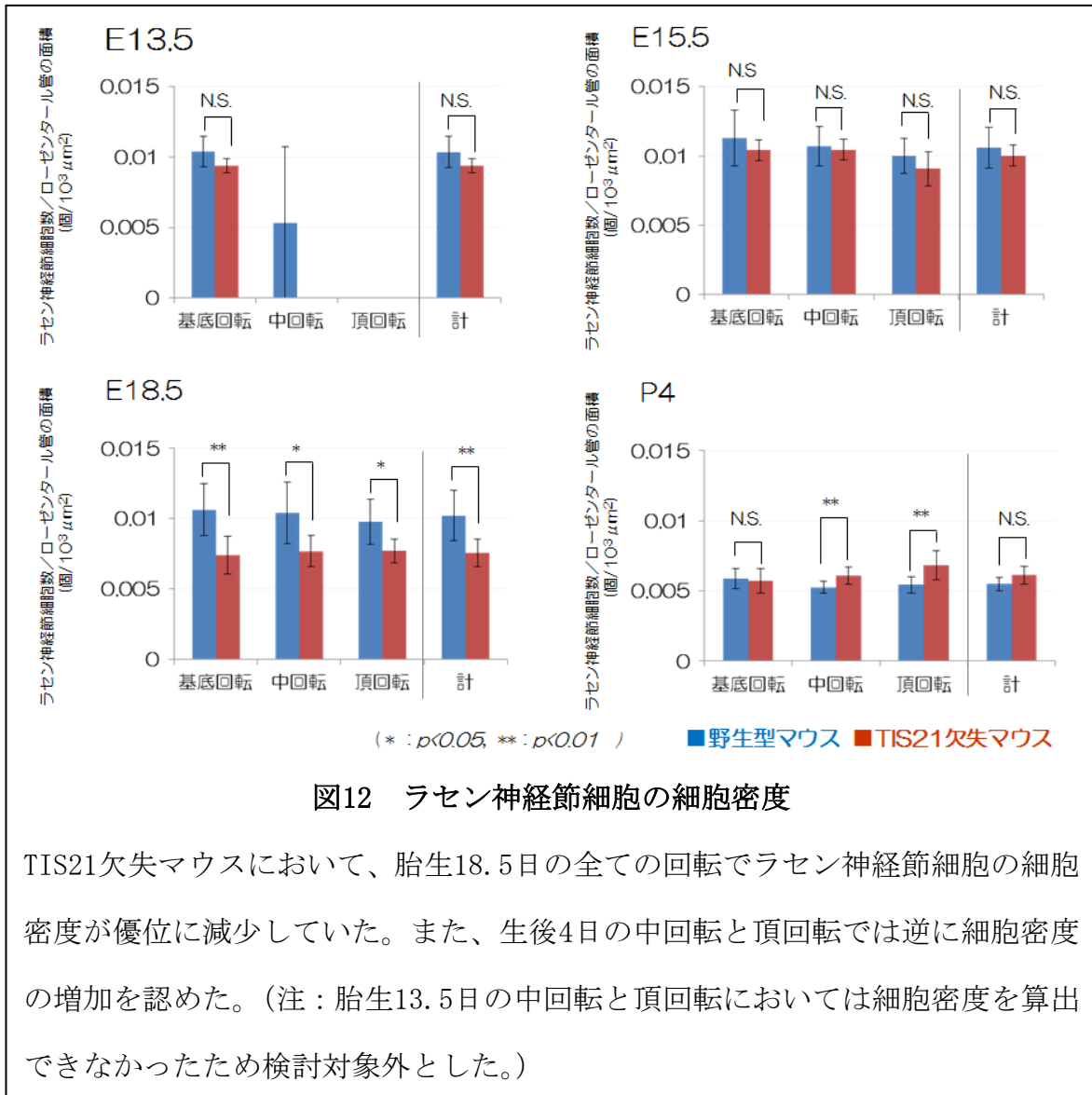


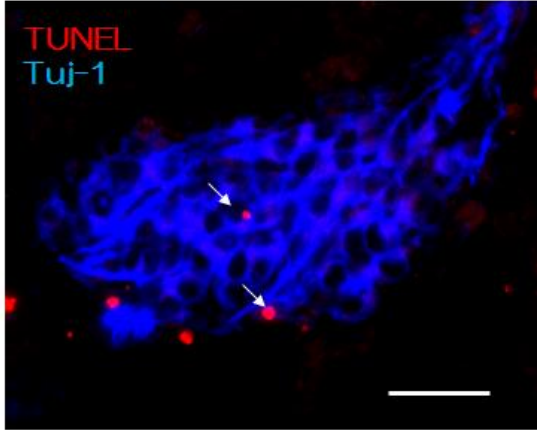
図12 ラセン神経節細胞の細胞密度

TIS21欠失マウスにおいて、胎生18.5日の全ての回転でラセン神経節細胞の細胞密度が優位に減少していた。また、生後4日の中回転と頂回転では逆に細胞密度の増加を認めた。(注：胎生13.5日の中回転と頂回転においては細胞密度を算出できなかったため検討対象外とした。)

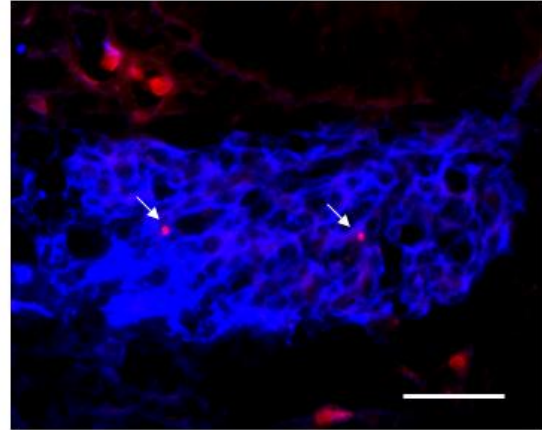
7-5. ラセン神経節細胞のアポトーシスについて

胎生14.5日のTIS21欠失マウス、野生型マウスに対して蝸牛の薄切切片のTUNELとTuj-1による蛍光二重染色を行った代表例を図13に示す。TIS21欠失マウス、野生型マウスのいずれにおいてもTUNEL陽性細胞をごく少数認めた。TUNEL陽性細胞数については、TIS21欠失マウスにおいて基底回転で 2.0 ± 0.7 個、中回転で 2.0 ± 0.5 個、頂回転で 0.5 ± 0.7 個、野生型マウスにおいて基底回転で 2.5 ± 0.5 個、中回転で 0.5 ± 0.5 個、頂回転で0個であった。全ての回転においてTIS21欠失マウスと野生型マウスの間で有意差は認めなかった（図14）。

野生型マウス



TIS21欠失マウス



(Scale bars: 50 μ m)

図13 ラセン神経節細胞のTUNEL染色の所見

胎生14.5日のTIS21欠失マウス、野生型マウスのローゼンタール管基底回転部分の代表例の所見を示す。いずれのマウスにおいてもTUNEL陽性細胞（矢印）をごく少数認めた。

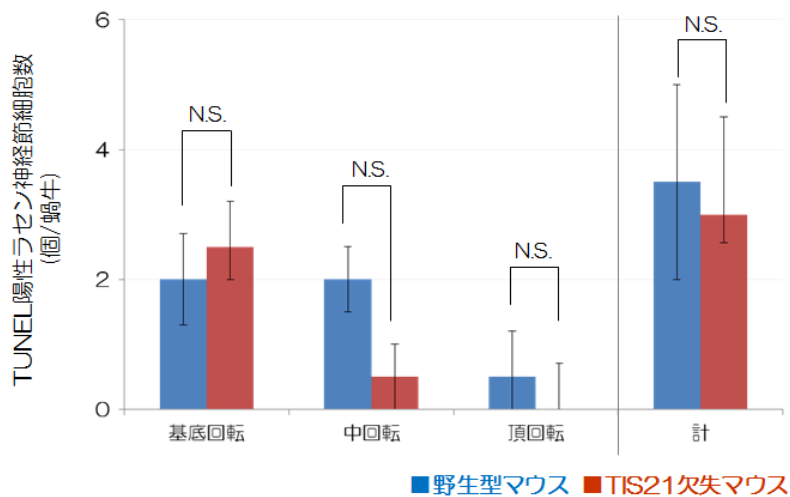


図14 TUNEL陽性ラセン神経節細胞数

胎生14.5日において、TIS21欠失マウスと野生型マウスのラセン神経節細胞のアポトーシス細胞数に有意差は認めなかった。

8. 考察

本研究において、TIS21欠失マウスの胎生13.5日から生後4日におけるラセン神経節細胞数の減少、胎生15.5日と生後4日におけるローゼンタール管の断面積の縮小といった形態的異常を認めたことから、TIS21がラセン神経節細胞の発生・分化において重要な役割を果たしていることは明らかと考える。

前述の通り、ラセン神経節細胞の前駆細胞である神経芽細胞は胎生9.5日から胎生14.5日にかけて、耳胞から離層（delamination）し、耳胞腹内側の間質に遊走（migration）してラセン神経節を形成する。この間、胎生9.5日から増殖を開始し、胎生12日から胎生16日にかけて基底回転部分から頂回転へと増殖を停止し分化期に移行する。本研究では、胎生13.5日の時点でTIS21欠失マウスのラセン神経節細胞の減少を認めたことから、①神経芽細胞の耳胞からの離層が阻害され、ラセン神経節を形成する細胞が減少した、②神経芽細胞の増殖が異常亢進してラセン神経節細胞への分化が阻害された、③ラセン神経節細胞に分化後に細胞が減少した、という3通りのメカニズムでラセン神経節細胞が減少した可能性が考えられる。次に、これら3つのメカニズムの可能性について考察する。

耳胞上皮からの神経芽細胞の離層を制御する遺伝子として、前述の通りNgn1、NeuroD1が報告されているが、成体マウスにおける、嗅覚情報を処理する働きを持つ嗅球介在ニューロンの発生・分化においては、TIS21はNeuroD1の上流で働くことが報告されている[23]。ラセン神経節細胞の発生・分化においてもTIS21がNeuroD1の上流で働くと仮定すると、本研究において、TIS21欠失マウスの神経芽細胞におけるNeuroD1の発現が抑制され、耳胞からの離層が抑制されてラセン神経節を形成する細胞が減少し、結果としてラセン神経節細胞数が減少した

可能性が考えられる（メカニズム①）。

また、前述の嗅球介在ニューロンの発生・分化において、大脳の側脳室周囲の脳室下帯において神経芽細胞が形成され、神経芽細胞が嗅球へと遊走し、その後成熟細胞である嗅球介在ニューロンに分化することが報告されている[24]。それに対し、TIS21欠失マウスでは、脳室下帯の神経芽細胞が増加すること、嗅球の嗅球介在ニューロンが減少すること、神経芽細胞の遊走能に変化はないことが確認されている。同時に、神経芽細胞におけるCyclin D1やCyclin Eなどの細胞周期促進因子の発現が増強し、BMP4やSmad1、Smad8などの神経分化誘導因子の発現が減弱することも確認されている[23]。すなわち、嗅球介在ニューロンの発生・分化において、TIS21は神経芽細胞の細胞周期を停止させ、さらに神経分化への誘導因子を発現させることにより、増殖期から分化期への移行を制御していると考えられる。ラセン神経節細胞の発生・分化においてもTIS21が同様の働きを持つとすると、TIS21欠失マウスでは神経芽細胞の増殖亢進、ラセン神経節細胞への分化が抑制が起こり、その結果、胎生13.5日以降にラセン神経節細胞が減少した可能性が考えられる（メカニズム②）。

前述の如く、TIS21は抗アポトーシス作用を持つことが知られている[14]。よって、TIS21欠失マウスにおいてアポトーシスが亢進し、神経芽細胞から分化した後のラセン神経節細胞が減少した可能性が考えられる（メカニズム③）。しかし、今回の検討において胎生14.5日のTIS21欠失マウスのラセン神経節細胞のアポトーシスの亢進は認められなかったことから、メカニズム③でラセン神経節細胞が減少した可能性は低いものと考えられる。

以上より、胎生13.5日以降のラセン神経節細胞の減少はメカニズム①あるいは②のいずれかが原因である可能性が高いと考えられる。そのため、今回検討対象とした胎生13.5日より早い時期、すなわち胎生9.5日から胎生13日における

神経芽細胞数、神経芽細胞の局在、ラセン神経節細胞数などの変化について検討を行うことで明らかにできると考える。また、TIS21欠失による機能変化についての検討も必要であると考えている。最近Jackson研究所よりTIS21欠失マウスの入手が可能となったため、現在入手して実験を行うための準備を行っており、上記の点について引き続き検討を行っていきたいと考えている。

9. 結語

TIS21欠失マウスにおいてラセン神経節細胞数の減少、ラセン神経節細胞を収めているローゼンタール管の面積の減少、ローゼンタール管の伸長の遅れを認めた。この結果よりTIS21遺伝子がラセン神経節細胞の発生・分化において不可欠な遺伝子であることが明らかとなった。

10. 参考文献

1. Whitehead, M.C. and D.K. Morest, *The development of innervation patterns in the avian cochlea*. Neuroscience, 1985. **14**(1): p. 255-76.
2. Ruben, R.J., *Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses*. Acta Otolaryngol, 1967: p. Suppl 220:1-44.
3. Kelley, M.W., *Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(11): p. 837-49.
4. Alsina, B., et al., *FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo*. Dev Biol, 2004. **267**(1): p. 119-34.
5. Abello, G., et al., *Independent regulation of Sox3 and Lmx1b by FGF and BMP signaling influences the neurogenic and non-neurogenic domains in the chick otic placode*. Dev Biol, 2010. **339**(1): p. 166-78.
6. Ohya, T., et al., *Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis*. Development, 2006. **133**(5): p. 865-75.
7. Dabdoub, A., et al., *Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18396-401.
8. Ma, Q., et al., *neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia*. Neuron, 1998. **20**(3): p. 469-82.
9. Coate, T.M. and M.W. Kelley, *Making connections in the inner ear: recent insights into the development of spiral ganglion neurons and their connectivity with sensory hair cells*. Semin Cell Dev Biol, 2013. **24**(5): p. 460-9.
10. Bruce, L.L., et al., *The development of vestibulocochlear efferents and cochlear afferents in mice*. Int J Dev Neurosci, 1997. **15**(4-5): p. 671-92.
11. Tirone, F., *The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair?* J Cell Physiol, 2001. **187**(2): p. 155-65.
12. Bradbury, A., et al., *Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3353-7.
13. Hata, K., K. Nishijima, and J. Mizuguchi, *Role for Btg1 and Btg2 in growth arrest of WEHI-231 cells through arginine methylation following membrane immunoglobulin engagement*. Exp Cell Res, 2007. **313**(11): p. 2356-66.
14. el-Ghissassi, F., et al., *BTG2(TIS21/PC3) induces neuronal differentiation and*

- prevents apoptosis of terminally differentiated PC12 cells.* Oncogene, 2002. **21**(44): p. 6772-78.
15. Canzoniere, D., et al., *Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1.* J Neurosci, 2004. **24**(13): p. 3355-69.
 16. Ben-Arie, N., et al., *Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons.* Nature, 1997. **390**(6656): p. 169-72.
 17. Miyata, T., T. Maeda, and J.E. Lee, *NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus.* Genes Dev, 1999. **13**(13): p. 1647-52.
 18. Iacopetti, P., et al., *Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4639-44.
 19. Hayashida, M., et al., *PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in spiral ganglion neurons.* Neuroreport, 2010. **21**(2): p. 90-3.
 20. Asada, M., et al., *Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 8236-43.
 21. Shim, J., et al., *A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases.* Nature, 1996. **381**(6585): p. 804-6.
 22. Suzuki, A., et al., *Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3842-7.
 23. Farioli-Vecchioli, S., et al., *Tis21 is required for adult neurogenesis in the subventricular zone and for olfactory behavior regulating cyclins, BMP4, Hes1/5 and Ids.* Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 98.
 24. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.* Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.