

氏名	おかのじゅんこ 岡野純子
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2968号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Transforming growth factor beta2 promotes the formation of the mouse cochleovestibular ganglion in organ culture (Transforming growth factor beta2はマウス器官培養において蝸牛前庭神経節の形成を促進する)
論文調査委員	(主査) 教授 伊藤 壽一      教授 金子 武嗣      教授 瀬原 淳子

### 論文内容の要旨

内耳は、聴覚及び平衡感覚を司る感覚器であり、体内でも最も複雑な器官の一つである。その発生は、皮膚外胚葉が肥厚してできる耳プラコードが陥入して形成される偽上皮一層から成る球状の構造物である耳胞に由来する。内耳構造物が、全て耳胞から発生するという事実は驚くべきことであるが、耳胞初期に、耳胞を構成する上皮の一部が、神経芽細胞となって耳胞から一旦離れる現象(遊走)がみられる。これは葉裂(delamination)と呼ばれ、耳胞に隣接した一塊の細胞集団は最終的に蝸牛前庭神経節に分化する。従来、葉裂に関与する分子の解析はノックアウトマウスを用いた実験が多数を占めていた。今回、経時的に顕微鏡下にて容易に観察できる利点をもつ耳胞の器官培養を用いて葉裂のメカニズムと内耳発生におけるその意義の解明を試みた。

初めに、葉裂する細胞が上皮性を一旦失う現象と、上皮-間葉形質転換(Epithelial-mesenchymal transformation (EMT))の類似性に着目し、EMTに関与する分子の一つである Transforming growth factor beta2 (TGFβ2) の mRNA が、マウス胎生9.5日から10.5日の耳胞期において耳胞上皮に発現し、そのうち前腹側外側領域は葉裂している蝸牛前庭神経前駆細胞のマーカである NeuroD の発現領域と一部重複することを確認した。また、耳胞上皮に TGFβ タイプ1 とタイプ2 のレセプターが存在し、耳胞上皮と蝸牛前庭神経節内に TGFβ2 のシグナルが細胞内にあることを示唆するリン酸化 Smad2 の局在を認めた。これらは、TGFβ2 が蝸牛前庭神経節の形成において何らかの役割を果たすことを示すものである。さらに、マウス胎生10.5日の耳胞培養で、培養開始4時間後から TGFβ2 を添加したところ、蝸牛前庭神経節形成が観察され(対照群では形成されなかった)、培養終了時(16時間後)に対照群と比較し有意に蝸牛前庭神経節が増大していた。また、TGFβ タイプ1レセプターを阻害する SB431542 添加群では、対照群と比べ有意に蝸牛前庭神経節が縮小していた。この実験により、TGFβ2 添加により、耳胞から葉裂する細胞が増えたか、或るいは葉裂後に増殖する神経前駆細胞が増えたと考えられた。そこで、細胞増殖のマーカであるリン酸化ヒストン3抗体を用いて培養終了後の耳胞及び蝸牛前庭神経節の免疫染色を行ったところ、両群で明らかな差を認めなかった。

EMT に重要な役割を果たし、TGFβ の下流にあるとされている転写因子の一つである Slug について耳胞培養を用いて調べたところ、TGFβ 添加群では Slug の mRNA 発現量が培養開始2時間後をピークとして4時間後、6時間後には対照群と比べ有意に減少していた。即ち、Slug が EMT の際に上昇するという従来の報告とは逆の結果を得た。これは、Slug の上昇が形質転換した細胞群では一過性であるため、今回の実験系ではとらえられなかったか、或いは耳胞における葉裂は EMT とは異なる現象であることを示唆するものであり、それゆえ TGFβ シグナル下では Slug は、例えば神経堤細胞で見られる EMT における役割とは違った働きをしていることが推定された。

### 論文審査の結果の要旨

内耳の原基である耳胞の初期に、耳胞を構成する上皮の一部が遊走し、耳胞に隣接して蝸牛前庭神経節(CVG)を形成

する（葉裂）。今回、葉裂のメカニズムの解明を試みた。

初めに、上皮-間葉形質転換（EMT）に関与する分子の一つである Transforming growth factor beta2 (TGFβ2) の mRNA が耳胞上皮に発現し、そのうち前腹側外側領域は葉裂している神経前駆細胞のマーカである NeuroD の発現領域と一部重複していた。また、耳胞上皮に TGFβ レセプターが存在し、リン酸化 Smad2 が局在することを認めた。さらに、10.5日マウス胎児の耳胞培養系に TGFβ2 を添加したところ、対照群と比較し有意に CVG が増大した。また、TGFβ を阻害する SB431542 添加群では、CVG の形成が有意に抑制された。そこで TGFβ2 により耳胞から葉裂する細胞が増えたか、或いは葉裂後に増殖する神経前駆細胞が増えたかを調べるため、細胞増殖のマーカであるリン酸化ヒストン 3 抗体で免疫染色を行ったところ、両群で明らかな差を認めなかった。TGFβ の下流にあるとされる転写因子 Slug の mRNA 発現量は、TGFβ 添加群で有意に減少していた。即ち、Slug が EMT の際に上昇するという従来の報告とは逆の結果を得た。これは、耳胞の分化過程に見られる葉裂は EMT とは異なる現象であることを示唆するものである。以上の研究は葉裂のメカニズム解明に貢献し、内耳発生における意義に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成18年2月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。