

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名

神谷 和作

これまでマウス聴覚系では、胎生期に全ての神経細胞や有毛細胞等の分裂が終了し、これらを生涯維持すると考えられてきた。しかし、本研究では bromodeoxyuridine 連続投与等の手法により、生後に起こるらせん神経節でのニューロンの新生 (14 日齢まで) およびアポトーシス (10 日齢まで) を確認した。ABR (聴性脳幹反応) 測定では、音刺激の入力開始は生後 12 日齢であり、上記のニューロン新生は機能的に成熟した時期 (12 日齢以降) においても起こっていることが明らかとなった。また、幼若マウスは GER (Greater Epithelial Ridge) と呼ばれる有毛細胞の前駆体細胞塊を持つ。本研究ではこの GER 細胞が 7 日齢を中心に上皮側が劇的なアポトーシスにより消失することを明らかにした。さらに 12 日齢までに GER 細胞の一部が基底側から細胞新生をすることを発見した。これにより GER 細胞が有毛細胞への発生運命の決まった増殖能の高い細胞塊であることが確認され、再生治療への応用が期待できる。

また、上記のアポトーシスが Caspase3 の活性を経て起こることを確認し、この欠損により聴覚系に異常が生じると推測して Caspase3 欠損マウス (-/-) の聴覚機能および蝸牛構造の解析を行った。その結果、Caspase3 (-/-) が高度な難聴であることが ABR により示された。さらに、2 週齢で有毛細胞およびらせん神経節細胞数はほぼ正常であったが、5 週齢ではこれらの多くが消失していたこと等から、この聴覚障害が胎生期の形態形成よりもむしろ本研究にて発見されたような生後のアポトーシスに大きく関わっていると考えられる。

また、外部からの音刺激の入力が 12 日齢に始まるという上記の結果から、音刺激依存的に発現が増加する遺伝子を Differential Display (DD) 法により解析した。生後 11 日齢、13 日齢および成熟個体を比較したところ、生後 13 日齢にのみ発現している遺伝子や生後 13 日齢と成熟個体にしか発現していない遺伝子が多数あることを発見し、生後 12 週齢を境に遺伝子発現パターンに大きな変化があることが示唆された。これらは音刺激の入力に適応した可塑的变化であると推測される。変化のあった遺伝子をクローニングし、その配列から多くの既知遺伝子および機能的には未知の遺伝子が同定された。多くの遺伝子は機能的には未知である cDNA クローンであったが、生後 11 日齢から 13 日齢にかけて発現が増加する遺伝子の一つにマウス TIS7 の mRNA が同定された。この遺伝子は、ニューロンへの分化の際に発現することが知られており、音刺激に適応したらせん神経節細胞への分化に関与している可能性が示唆された。

生後 11 日齢、13 日齢、成熟個体の蝸牛 mRNA を比較することにより、聴覚の可塑性だけではなく、発育、加齢に関わる遺伝子も容易に同定することができた。このシステムは、蝸牛組織内の様々なステージにおける遺伝子発現の変化を解析する有用な方法であると考えられる。

また、この実験によって、幼若期の蝸牛で成熟個体に比べて高レベルの mRNA 発現を示す遺伝子として Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I-alpha (Pip5k1a) が同定さ

れた。Pip5k1a は Phosphatidylinositol 経路において様々な細胞機能や細胞内シグナル伝達に関与していることが知られており、近年ではアクチン重合による細胞骨格の再構成を制御していることが数多く報告されている。RT-PCR における定量的解析では、12 日齢および 13 日齢は、4 週齢に比べて 75%以上 Pip5k1a の mRNA 発現が高いことが示され、この高レベルの mRNA 発現が生後初期の発達において特異的に起こっていることが示された。抗 Pip5k1a モノクローナル抗体による免疫組織化学的検索では、哺乳期マウス (11 および 13 日齢) の外有毛細胞のクチクラ板および GER の領域に多く存在することが示された。これにより、Pip5k1a が哺乳期におけるアクチン重合による細胞骨格の再構成、外有毛細胞の感覚毛の維持に関わっている可能性が示唆された。また、Radiation Hybrid 法による解析では、Pip5k1a は第 19 染色体のセントロメアから約 17.5cM の位置の限定された領域に位置づけられた。この領域はマウスの難聴遺伝子 dn の領域のごく近傍に位置し、Pip5k1a が dn の有力な候補遺伝子であると考えられる。これらのことから、Pip5k1a は生後初期の蝸牛の発育においてきわめて重要な役割を担っていることが示唆された。

以上を要するに、本論文は生後の蝸牛組織が音刺激の入力開始の前後において、音に対応した可塑性変化をはじめとする様々な変化を引き起こし、これらが正常聴覚の形成には必須であることが明らかにしたものであり、その成果は学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値のあるものと認めた。