

氏名(本籍)	ほしのともふみの 星野朝文(群馬県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第4791号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	転写因子 GATA-2 の聴器における機能解析

主査	筑波大学教授	医学博士	松村明
副査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学准教授	医学博士	高野晋吾
副査	筑波大学講師	医学博士	遠藤隆志

論文の内容の要旨

目的：難聴は、それ自体は生命を直接脅かすことはないが、社会生活を送る上での生活の質（Quality of Life）を大きく低下させる点から、重要な疾患であると考えられる。難聴患者は日本の総人口の10～20%を占め、今後の加齢性難聴の増加を考慮すると、その罹患数はさらに増加するものと考えられるが、確立された治療法が少なく、新しい治療法の開発が望まれている。最近、遺伝子治療によりマウス内耳の有毛細胞を再生するという論文が発表され、感音難聴の責任領域である内耳の有毛細胞が再生させることができる可能性が示された。その背景として、近年の分子発生生物学の発展により、聴器発生の制御メカニズムが分子レベルで解明されつつあることが挙げられるが、いまだその一端を見ているのみに過ぎず、さらなる解析を進めることが望まれている。

GATA-2はGATA転写因子群の一つで、聴器、神経系、血液、泌尿器などに発現する。GATA-2は、胎生期（胎生10.5日齢）に、耳胞と神経管に発現し、聴器形成において重要な機能を担うと考えられている。そこで本研究は、神経管特異的な*Gata2*遺伝子破壊マウスを作製し、神経管に発現するGATA-2が耳胞分化と聴覚機能に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

対象と方法：*Gata2*遺伝子破壊マウスは造血機能不全により胎生10.5日齢で死亡し、胎生後期や成体での解析ができないことから、Cre/loxPシステムを用いた条件付遺伝子破壊（conditional knockout：CKO）マウスを用いることで、神経管特異的に*Gata2*の遺伝子破壊を行い、胎生後期以降の機能を解析することとした。

対象の*Gata2*CKOマウスは、以下に示す3種類の遺伝子改変マウスを交配させて作製した。①*Gata2*遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein：GFP）を挿入した*Gata2*GFP-KI（Knock-in）アレルをもつ*Gata2*GFP/+マウス ②Creリコンビナーゼにより*Gata2*遺伝子が破壊されるよう設計された*Gata2*floxアレルをもつ*Gata2*flox/+マウス③Nestinプロモーター制御下にCreリコンビナーゼを発現させるよう設計されたNestin-Creトランスジーン（Nes-Tg）をもつNestin-Creマウスである。

*Gata2*CEO（*Gata2*flox/GFP::Nes-Tg）マウスの全般的な表現型として体表観察、行動観察、経時的体重測定を行なった。聴力評価の方法として、10週齢のマウスを用いて聴性脳幹反応（auditory brainstem response：ABR）検査を行ない、ABR閾値を測定した。また、聴力低下の原因部位を探索するため、胎児期

に GATA-2 が発現する耳胞・神経管から分化した組織である内耳と脳幹の組織学的解析を行った。次に、胎生期のロンボメア 4 の欠損の有無を見るため、GATA-2 の発現パターンを GFP 蛍光観察で可視化し、あわせてロンボメア 4 の特異的なマーカーである *Hoxb1* プローブで whole mount *in situ* hybridization (WISH) を行った。

結果：*Gata2* CKO マウスはメンデル則に従って出生し、外見上・行動上の明らかな異常は認めなかった。聴力評価では、*Gata2* CKO マウスは Nes-Tg を持たないコントロールマウス (*Gata2 flox/GFP*) とともに野生型アレルをもつコントロールマウス (*Gata2 flox/+::Nes-Tg*) に比べ ABR 反応閾値の上昇がみられ、聴力低下を示した。聴力低下の原因部位を探るために行った内耳と脳幹の組織学的解析では、聴力低下を示した *Gata2* CKO マウスと Nes-Tg を持たないコントロールマウス (*Gata2 flox/GFP*) の両者に蝸牛のラセン神経節細胞数の減少を認めた。一方、蝸牛有毛細胞の形態に異常はみられず、脳幹の蝸牛神経核の大きさの減少も明解には認めなかった。また、出生直後の *Gata2* CKO マウスの解析で、すでにラセン神経節細胞の減少を認めていた。

耳胞の分化に対する神経管の役割について、ロンボメアの欠損で内耳形成異常が報告されていることから、胎生期のロンボメアの評価を行った。胎生 10.5 日齢の胎児マウスを GFP 蛍光観察したところ、コントロールマウス (*Gata2 GFP/+*) では、ロンボメア 4 とそこから耳胞へ神経を伸ばしている神経線維で GFP 蛍光が強く観察されたのに対し、*Gata2* CKO マウスと Nes-Tg を持たないコントロールマウス (*Gata2 flox/GFP*) ではこれらの GFP 蛍光が消失しており、*Gata2 flox/GFP* マウスも機能的にノックダウンマウスになっていることが示唆された。次に、*Hoxb1* プローブを用いた WISH でロンボメア 4 の可視化を行ったが、いずれにもロンボメア 4 自体の欠損はみられなかった。このことから、*Gata2* CKO マウスの表現型は、ロンボメアの欠損による内耳形成異常でないことが示された。

Gata2 CKO マウスと Nes-Tg を持たない *Gata2 flox/GFP* マウスの GFP 蛍光観察では、両マウスでロンボメア 4 とそこから耳胞へ神経を伸ばしている神経線維で GFP 蛍光の消失が見られており、これが難聴の原因である可能性が示唆されるが、神経管以外の部位の微細な GATA-2 欠損の影響をみている可能性も否定できない結果となった。

考察：*Gata2* CKO マウスは、聴力低下を示すことが明らかとなった。また、その原因として、ラセン神経節細胞の減少が関与する可能性が示されたが、この変化は出生直後にも見られることから、発生過程のラセン神経節細胞の分化増殖に GATA-2 が関与していることが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は聴器由来の難聴という病態に対してその成因の解明を行った基礎的研究であり、はじめて GATA-2 の役割について検討したきわめて意義深い研究であり、今後の治療の確立に向けて重要な知見が得られたと考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。