

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16925

研究課題名(和文) Wntシグナルを介した聴神経再生の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular Basis of Wnt Signaling Mediated Auditory Nerve Regeneration

研究代表者

野田 哲平(NODA, Teppei)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20707179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルを介した聴神経再生の分子基盤の解明に際し、まず新規WntシグナルレポーターであるWntVISを用いてWntシグナル活性の時空間的解析を行った。蝸牛コルチ器、前庭、そしてラセン神経節におけるWntシグナル活性は、胚発生において耳胞から内耳が形成される時期以外は不明であったが、本研究によりWntシグナルが蝸牛支持細胞、前庭有毛細胞、前庭支持細胞、そしてラセン神経節ニューロンで活性を持つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難聴者は全世界で4億7千万人にのぼるとされ、その対策と治療法の開発は喫緊の課題である。感音難聴は内耳性難聴と後迷路性難聴に分けられ、前者には人工内耳という最も普及した人工臓器が治療法として確立されている。一方で神経性の難聴である後迷路性難聴に対しては対処法がなく、神経再生は耳科医にとって取り組むべき課題であった。神経再生の方法として細胞移植や遺伝子導入による分化転換などが挙げられるが、細胞がもつ増殖能の賦活化も有効な手段のひとつである。神経細胞は増殖能を生後まもなく喪失し、複数の因子によって制御されていることが想定される。本研究はWntシグナルの調節により神経再生へアプローチするものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular basis of Wnt signaling-mediated auditory nerve regeneration, we first performed a spatiotemporal analysis of Wnt signaling activity using WntVIS, a novel Wnt signaling reporter. Wnt signaling activity in the Organ of Corti, vestibule, and spiral ganglion was unknown except during the formation of the inner ear from the otocyst during embryogenesis. This study revealed that Wnt signaling is active in cochlear supporting cells, vestibular hair cells, vestibular supporting cells, and spiral ganglion neurons.

研究分野：耳科学

キーワード：聴神経 内耳

1. 研究開始当初の背景

全世界に難聴者は4億7000万人存在すると言われており(WHO統計)、全人口の5%に相当する。その原因は胎児期のウイルス感染や遺伝性、中耳炎、薬剤性、音響外傷など多岐にわたるが、治療により改善可能なものはその一部にとどまる。特に内耳及びその電気信号を中枢聴覚野に伝える聴覚神経の障害は、これらの細胞が哺乳類では可塑性を持たないことから治療困難であり、補聴器や人工内耳などのデバイスによる対症療法が主である。ラセン神経節細胞(SGN; Spiral Ganglion Neuron)は、コルチ器(Organ of Corti)にある有毛細胞からの刺激を受け取り中枢の聴神経へと伝達するグルタミン酸作動性のニューロンであり、そのラセン神経節細胞が一次性もしくは有毛細胞障害後二次性に障害されることで、後迷路性難聴をひきおこす。後迷路性難聴は内耳性難聴よりも言語聴取が劣り、人工内耳による治療でも代償が困難であるため、QOLの著しい低下を招く。しかしながら、蝸牛有毛細胞の再生研究に対し、ラセン神経節細胞再生の研究は、その重要性に比して進んでいない。

近年ではiPS細胞を含む幹細胞培養技術および再生医療の進歩が著しいが、脊髄などの中枢神経と比してラセン神経節の再生は内耳の複雑な解剖学的特徴から、外部からの神経幹細胞移植による正常構造の再構築が困難をきわめており、現実的なラセン神経節再生に対するアプローチとしては以下の2つが考えられる。

1) 内在性神経幹細胞を同定・分化誘導させ、目的の細胞へ分化させる

2) 非神経細胞を分化転換させ(*in vivo* direct reprogramming)、目的の細胞へ分化させる

このような特定の標的細胞への誘導には、標的細胞の発生を理解し、その一部を模倣することが重要になると考えられている。内耳発生においては、その発生過程を制御するシグナル経路として代表的なものにWntシグナルがあり、報告者自身も研究対象としてきた。これまでに前庭や蝸牛の発生(*Gen Dev*; 2005, *Development*; 2012)、コルチ器の支持細胞における発現(*J Neurosci*; 2012)などが報告されており、報告者も半規管形成におけるWntシグナルの機能解析(*Dev Biol*; 2012)、蝸牛有毛細胞発生におけるWntシグナル因子の網羅的発現解析(*PLoS One*; 2016)、およびWntシグナル抑制性受容体蛋白Kremen1の機能解析(*Sci Rep*; 2016)により、Wntシグナルの適切な活性調節が内耳発生において重要であることを明らかにしてきた。ラセン神経節細胞に関するWntシグナル関連の文献は有毛細胞のそれに比し少ないものの、成体哺乳類でWnt受容体Frizzledの発現解析を行った報告(*Neurosci*; 2009)や、Wnt1蛋白が神経分化を促進したとする報告(*Cell Transplant*; 2014)、ラセン神経節と前庭神経節の比較をマイクロアレイで行ったデータベースなどがあるが、Wntシグナルの活性自体を細胞レベルで報告したものは皆無であった。本研究ではそこにスポットライトをあて、解析を行うこととした。

2. 研究の目的

内耳発生への理解をさらに深めることが、内耳再生への近道である。本研究では、聴覚一次ニューロンであるラセン神経節細胞の発生から分化成熟の各段階におけるWntシグナル活性の時空間的発現パターン解析を、感度の高いWntシグナルの新規レポーターマウス(WntVis; 理化学研究所供与)を用いて*in vivo*に評価することとした。また、ラセン神経節細胞のトランスクリプトーム解析を行い、Wntシグナルを含む内耳発生・再生関連遺伝子の発現解析を行うことで、ラセン神経節細胞の遺伝子発現プロファイルを作成することを目的とした。

上記を踏まえ、内耳より剖出したラセン神経節の器官培養を行い、Wnt シグナルがラセン神経節ニューロンにどのように働くのかを解明するための機能解析を行う方針とした。

3. 研究の方法

Wnt シグナル活性を線形に single cell レベルで可視化できる新規レポーターマウスである R26-WntVis (*Genes Cells*; 2016)を用いた。ラセン神経節細胞は胎生初期に内耳原基である耳胞から神経前駆細胞が分離後、蝸牛発生とともに分化成熟し、複雑な構造および機能を獲得する。一方でシュワン細胞は神経堤から遊走した前駆細胞がラセン神経節の外周から進入しニューロン周囲へ分布する (*Dev Biol*; 2013)。この各発生段階においての Wnt シグナル活性の時空間的発現パターン解析を行った。ラセン神経節前駆細胞が耳胞から分離する胎生 10 日から神経の分化成熟がおおよそ完了する出生後 30 日までの各段階の内耳を採取し、Wnt シグナル下流の転写因子結合領域に接続された GFP 蛋白の発現を single cell レベルの解像度で調べる。神経マーカーの β -tubulin や有毛細胞マーカーである Myo7a、コルチ器の支持細胞・ラセン神経節シュワン細胞マーカーである Sox2 や、増殖細胞マーカーである Ki67 などと共染色を行った。

また、留学中に行ったラセン神経節細胞を FACS (蛍光活性化細胞ソーティング)して RNA-seq にかける実験のデータを用い、Wnt シグナル関連因子の差異を調べた。同様に採取したシュワン細胞と遺伝子発現様式を比較することで、細胞の分化増殖に関わる因子として Wnt シグナルが関与しているかどうかを検討した。

4. 研究成果

論文執筆中のため概要のみ示す。上記 Wnt レポーターマウス、R26-WntVIS を用いて、Embryonic day (E)11 から Postnatal day (P)30 までの蝸牛と前庭における Wnt シグナル活性の時空間的解析を行った。E11 から P30 は、内耳が耳胞形成に始まって形態形成を遂げ機能的に完成するまでの期間である。これまでの報告と同様に、E11 では Wnt シグナルは耳胞背側で活性を持つことを確認した。外側の前庭感覚上皮予定領域 (Sox2 陽性細胞。Tuj1 陽性神経細胞の接続も認める)においても Wnt シグナル活性が弱いながら認められた。さらに、既存のレポーターマウス BAT-gal を用いた X-gal 染色法では検出できなかった、耳胞内腹側の蝸牛感覚上皮予定領域での Wnt シグナル活性を確認した。

この高感度な Wnt シグナルレポーターマウスを用いて、蝸牛有毛細胞、前庭有毛細胞、そしてラセン神経節における Wnt シグナル活性の変化を初めて調べた。最初にコルチ器における Wnt シグナル活性の変遷をみた。E15 の時点ですでに Wnt シグナルは蝸牛感覚上皮前駆細胞では活性がみられない。E17 (コルチ器の形態が完成に近づき、内毛細胞 1 列、外毛細胞 3 列が区別される)では、有毛細胞には Wnt シグナル活性を認めないが、支持細胞の一部で活性を認めた。P0 (Sox2 の発現が有毛細胞で減弱し、支持細胞で強く認められる時期)では、Wnt シグナル活性は支持細胞の一部で持続していた。マウスが聴覚を獲得する P15 では、有毛細胞に活性はない一方で、支持細胞の一部で活性が維持されていた。成体同様の発生段階になる P30 でも同様であった。

哺乳類蝸牛有毛細胞は成体になると再生能を喪失するが、前庭有毛細胞はある程度の再生能を保持していることが知られている。前庭における Wnt シグナル活性の有無を確かめるために、球形嚢の切片を用いて GFP と有毛細胞マーカーである Myosin 7A の共染色を行った。前庭有毛細胞では、E15 から P0 では少数ながらも GFP 陽性細胞を認めた。聴覚獲得後の P15、P30 でも GFP 陽性有毛細胞を認め、驚くべきことに、GFP 陽性細胞の割合が

増加していた。支持細胞では、E15 から P30 までを通して、およそ半数が GFP 陽性であった。

ラセン神経節における Wnt シグナル活性について調べるために、内耳の midmodiolar section で GFP, Sox2, TuJ1 の共染色を行った。E15 において、Spiral ganglion は蝸牛回転に伴って形成されつつあり、TuJ1 陽性の spiral ganglion neuron (SGN) で核に Wnt シグナル活性がみられた。P0 では、ほぼ全ての TuJ1 陽性 SGN の核に GFP 蛍光を確認した。聴覚獲得後の P15 では SGN の核への GFP 局在が失われており、P30 でも同様であった。一方、Sox2 陽性のグリア細胞に着目すると、E15 では一部に GFP と Sox2 の共染色を認めた。E17 から P15 まで、Sox2 と GFP の両陽性細胞はみられなかった。しかしながら、P30 においては多くの Sox2-GFP 両陽性細胞が確認された。

また、ラセン神経節細胞とシュワン細胞の遺伝子発現様式の差を RNA-seq で示した。ラセン神経節細胞において Wnt シグナル関連遺伝子は軒並み抑制されていることが判明した (現在論文執筆中)。この研究に関連し、シュワン細胞を培養して神経に分化させる転写因子である Ascl1 と NeuroD1 を導入することにより、ラセン神経節様細胞を作成することに成功していたので、バイオインフォマティクスの研究者の助力を得てトランスクリプトーム解析を行い、聴神経再生の際に遺伝子発現がどのように変化するかの一端を解明するデータを得た (Noda et al., 2018)。

また、本研究は新型コロナウイルス感染症蔓延のため 2 度にわたり研究期間の延長を行った。最終年度に本研究を継承する基盤 C の研究費を頂くこととなり、引き続き Wnt シグナルと内耳発生・再生の研究に邁進していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noda T, Meas SJ, Nogami J, Amemiya Y, Uchi R, Ohkawa Y, Nishimura K, Dabdoub A	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct Reprogramming of Spiral Ganglion Non-neuronal Cells into Neurons: Toward Ameliorating Sensorineural Hearing Loss by Gene Therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2018.00016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田哲平、脇園貴裕、中川尚志
2. 発表標題 ラセン神経節細胞におけるWntシグナルの時空間的解析
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田哲平
2. 発表標題 ラセン神経節グリア細胞から分化誘導したニューロンの遺伝子解析
3. 学会等名 第28回日本耳科学会・学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 野田哲平、西村幸司、Steven Meas、内龍太郎、中川尚志、Alain Dabdoub
2. 発表標題 ラセン神経節グリア細胞から分化誘導したニューロンの遺伝子解析
3. 学会等名 平成29年 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	脇園 貴裕 (WAKIZONO TAKAHIRO)	九州大学・基盤幹細胞学・研究員 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
Canada	Sunnybrook Research Institute			