

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19791228

研究課題名（和文）内耳の発生における TROY の役割

研究課題名（英文）The role of TROY in inner ear development

研究代表者 久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

## 研究成果の概要：

発達過程、及び生後のマウス蝸牛における TROY の発現を免疫染色法で検討した結果、TROY は胎生中期から生後 7 日にかけて、蝸牛の greater epithelial ridge (GER) に強く認められた。GER には内毛細胞とその支持細胞の前駆細胞が存在すると考えられており、TROY がそれらの前駆細胞に発現し、その増殖や分化に関与している可能性が考えられる。今後、GER における TROY の役割を明らかにすることにより、聴覚機能を担う内毛細胞の発生メカニズムの解明と再生への応用に寄与できる可能性が期待できる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳、蝸牛、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は、成体マウスの脳よりクローニングされた、TNF レセプタースーパーファミリーのメンバーである TROY に着目し、これまで、マウスの中枢神経系における TROY の発現を Northern blot 法、*in situ* hybridization 法、免疫染色法、免疫電子顕微鏡法等で検討してきた。その結果、TROY は発達過程の中枢神経系において、前脳の神経上皮細胞や放射状グリア、アストロサイトに発現していたのに加え、嗅球の嗅神経被覆グ

リアにも発現していた。これらの結果は、TROY が中枢神経系や嗅覚系の発生過程において、時期、部位特異的に発現し、TROY のシグナルがそれらの発生に役割を果たしている可能性を示唆している。

(2) 申請者は、*in situ* hybridization 法、及び免疫組織染色法により、TROY の mRNA 及び蛋白が、内耳の感覚細胞の分化の盛んな胎生後期において、蝸牛の感覚上皮の特定の領域に強く発現していることを見出しており、TROY が蝸牛の特定の感覚細胞や支持細胞の

発生に役割を担っている可能性が考えられる。

(3) 最近、*in vitro* で TROY が軸索伸展阻害因子である Nogo のレセプターと複合体を形成し、成体マウスの後根神経節細胞において神経突起の伸展を阻害することが報告され、注目されている (Park et al., *Neuron* 45: 345-351, 2005; Shao et al., *Neuron* 45: 353-359, 2005)。しかし聴覚系の発生における TROY の発現や役割についての報告はなく、これらを解明することは、TROY の新しい機能の解明という点でも話題性、重要性が高い。

## 2. 研究の目的

- (1) 発生過程の内耳において TROY を発現している細胞種の同定
- (2) 生後から成獣の内耳における TROY の発現と発現細胞の検討
- (3) TROY 発現細胞における TROY の役割とシグナル伝達経路の解明 (*in vitro*)
- (4) 内耳の発生における TROY の役割の解明 (*in vivo*)

## 3. 研究の方法

- (1) 胎生期、及び生後から成獣の内耳における TROY の発現パターンの解析

胎生期、生後の発達過程、及び成獣の内耳における TROY の発現パターンを免疫染色法で検討する。

- (2) 蝸牛において TROY を発現している細胞種の同定

蝸牛に存在する各細胞のマーカー (表 1) と TROY に対する抗体とを用いて二重免疫組織染色を行い、TROY 発現細胞を同定する。

GER		LER			
支持細胞		有毛細胞		支持細胞	
PC	IPC	IHC	OHC	OPC	DC
GFAP	GFAP	calbindin		GFAP	GFAP
	p75			p75	p75
	S100			S100	S100

表 1 蝸牛における各細胞のマーカー

## 4. 研究成果

- (1) 発生過程の蝸牛における TROY 蛋白の発現パターン

胎生 (embryonic day; E) 11.5 日齢、E13.5、E15.5 及び E17.5 の蝸牛上皮の特定の領域において、TROY 蛋白の発現が認められた (図 1)。

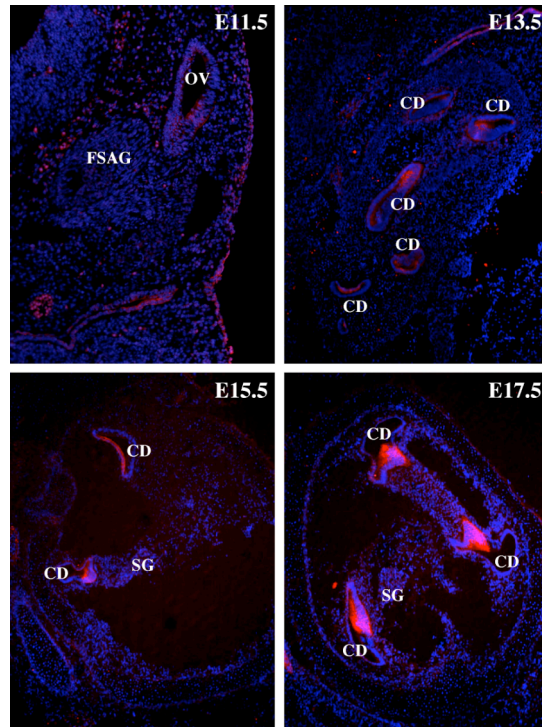


図 1 発生過程の蝸牛における TROY の発現

- (2) 生後から成獣の蝸牛における TROY 蛋白の発現パターン

生後 (postnatal day; P) 0 日齢、P5、及び P7 においても、蝸牛の GER における TROY の発現が持続していた。一方、P10 以降になると GER は退縮して一層の inner sulcus cell (ISC) に置き換わると考えられており、TROY の発現が P10 から成獣まで ISC に認められた (図 2)。

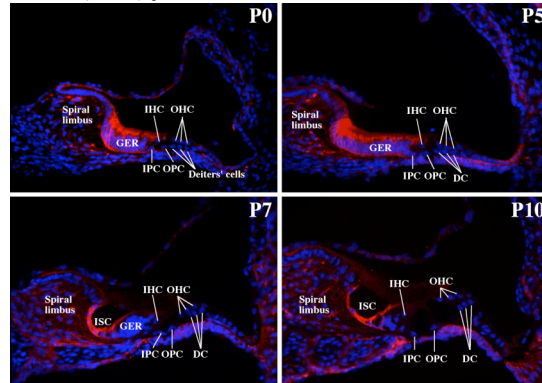


図 2 生後の蝸牛における TROY の発現

- (3) E17.5 から P7 の蝸牛における TROY 蛋白発現細胞の同定

蝸牛上皮細胞は、E17.5 には 1 列の内有毛細胞、3 列の外有毛細胞、及び支持細胞に分化し、それらの細胞が組織学的に判別可能となる。TROY の発現は、分化した内毛細胞、外毛細胞及びそれらの支持細胞には認められず、GER にのみ認められた。実際、P0、P5、P7 の蝸牛において以下の蛍光二重免疫染

色を行い確認した。

①内有毛細胞、外有毛細胞のマーカである calbindin と TROY に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った結果、共存は認められなかった。

②内有毛細胞、外有毛細胞の支持細胞のマーカである GFAP、p75、S100 と TROY に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った結果、共存は認められなかった (図 3A-3C)。

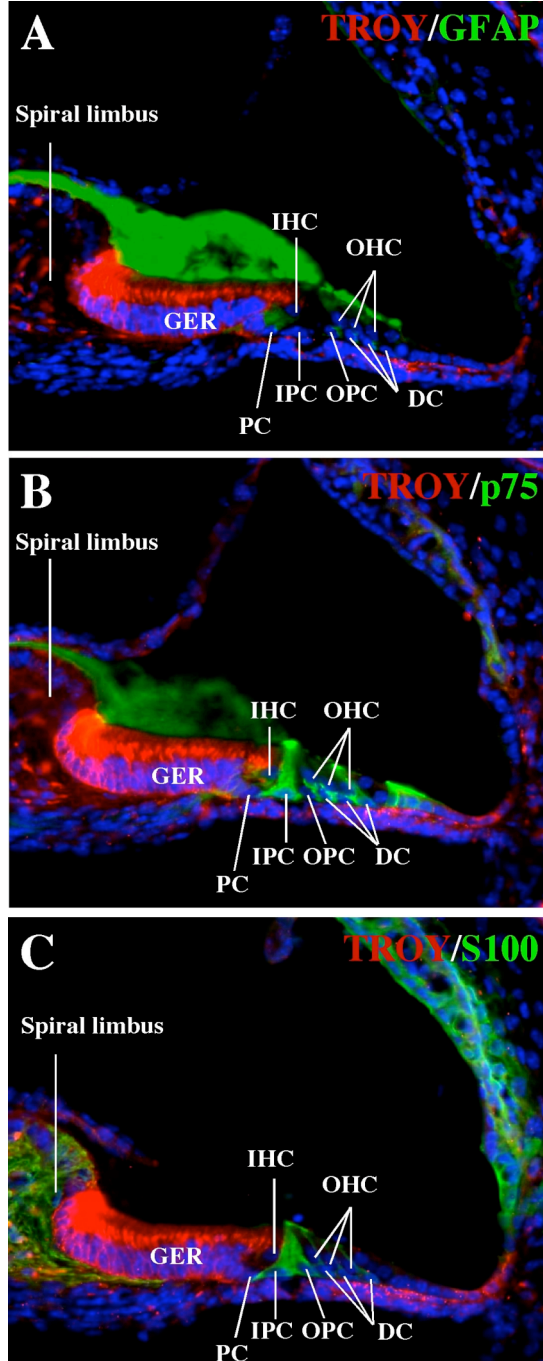


図3 生後5日齢の蝸牛における TROY と支持細胞のマーカとの蛍光二重免疫染色

(4) P10 から成獣の蝸牛における TROY 蛋白発

現細胞の同定

P10以降になると GER は退縮して一層の ISC に置き換わると考えられており、実際 P10以降、GER 様の組織像は認められなかった。TROY の発現は、分化した内有毛細胞、外有毛細胞及びそれらの支持細胞には認められず、ISC にのみ認められた。実際、P10 及び、成獣の蝸牛において以下の蛍光二重免疫染色を行い確認した。

① 内有毛細胞、外有毛細胞のマーカである calbindin と TROY に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った結果、共存は認められなかった (図 4A)。

② 内有毛細胞、外有毛細胞の支持細胞のマーカである GFAP、p75 (図 4B)、S100 と TROY に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った結果、共存は認められなかった。

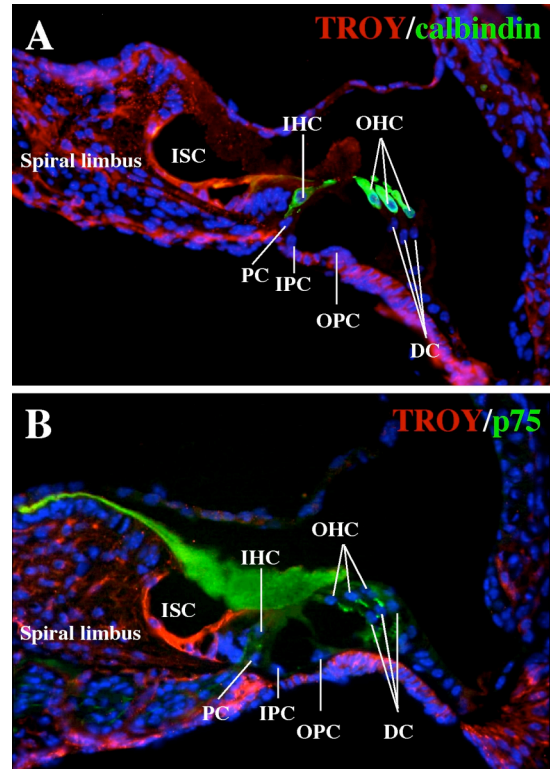


図4 生後10日齢の蝸牛における TROY と有毛細胞、及び支持細胞のマーカとの蛍光二重免疫染色

③ AQP4 は成獣の ISC の細胞膜に発現していると報告されていることから、成獣の蝸牛において AQP4 と TROY に対する抗体との蛍光二重免疫染色を行った結果、共存が認められた (図 5)。

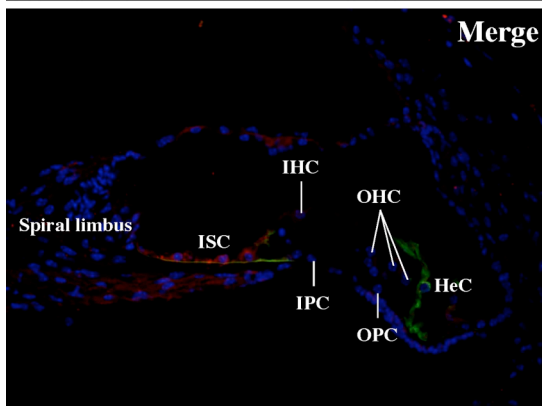
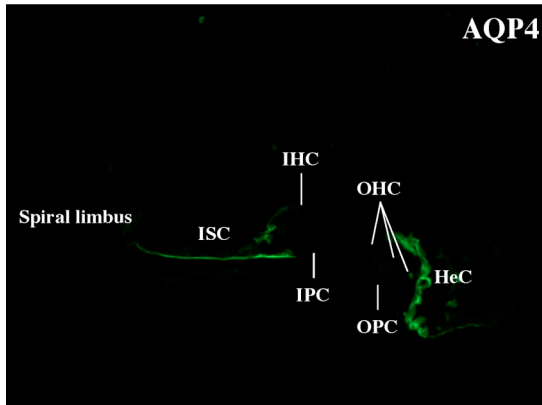
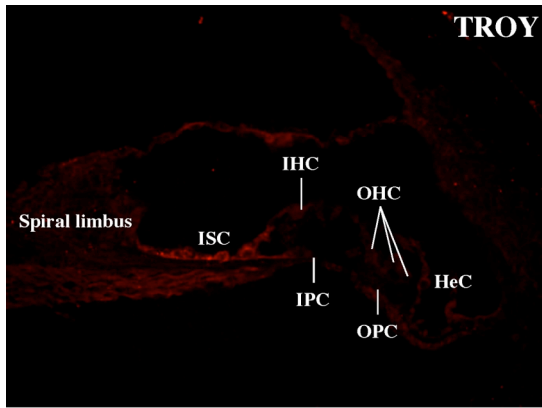


図5 成獣の蝸牛における TROY と AQP4 との蛍光二重免疫染色

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00398463

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：