

機関番号 : 32620  
研究種目 : 基盤研究 C  
研究期間 : 2010~2010  
課題番号 : 20591983  
研究課題名 (和文) 内耳発生における幹細胞・前駆細胞の増殖・分化制御機構の解明と再生医療への応用  
研究課題名 (英文) The regulatory mechanism of proliferation and differentiation of the sensory precursor cells during inner ear development and its application for the regenerative medicine.  
研究代表者  
村田 潤子 (MURATA JUNKO)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 80332740

## 研究成果の概要 (和文) :

我々は今回の科学研究費補助金の給付を受けて、マウスを用いて哺乳類内耳発生における幹細胞・前駆細胞の増殖・分化制御機構の解明を試みた。

まず平成 20 年度には我々はHes1と活性化Notch1 (actN1) の胎生期マウス内耳における詳細な発現パターンを示し、加えてHes1KOマウスを解析することで、Notch伝達系がHes1をエフェクターとしてp27Kip1の発現を抑制することでSensory precursor cellの増殖維持に寄与していることを示した。この結果をは英文論文として発表した (Murata et al., J Neurosci Res, 2009)。

平成 20 年度から平成 21 年度にかけてリン酸化Akt (pAkt) とPI3K-Akt伝達系の拮抗因子であるPTENの発現パターンを検討し、胎生期ではPTENは感覚上皮予定領域にほぼ一致して発現が開始し、胎生後期では蝸牛上皮の中では有毛細胞に限局して陽性となるという特徴的な発現パターンが観察されることを明らかにし、国内外の学会で発表した。

この結果からPI3K-Aktシグナル伝達系はSensory precursor cellの増殖制御や未分化性の維持に関連した機能を持つ可能性が推察され、平成 21 年度からは実際にPI3K-Akt伝達系の内耳発生における機能を解析するための研究を開始した。具体的にはPTEN-floxマウスをカナダトロント大学のTak Mak教授のラボより導入し、一方でJackson LabよりCre-Foxg1マウスを購入して繁殖させた上で交配し、内耳特異的なPTEN コンディショナルノックアウト (cko) マウスの作製を開始した。このマウスではPI3K-Akt伝達系が持続的に活性化されることになるが、過去の他臓器での同様の実験の報告や、我々の検討したPTENの内耳発生での発現パターンの結果から、Sensory precursor cellの分裂がwild typeに比して長期にわたって継続することと未分化性の維持が継続することで有毛細胞の分化が遅れること等が観察されるのではないかと考えている。

平成 22 年度は年度半ばの 7 月に研究代表者が大阪大学より順天堂大学へ異動となったため、研究の主な対象であり、また作成過程であったPTEN コンディショナルノックアウト (cko) マウスを凍結受精卵として移動させた。凍結受精卵は順天堂大学動物実験施設で固体化することができ、現在繁殖、解析中である。

## 研究成果の概要 (英文) :

We tried to elucidate the regulatory mechanism of the proliferation and

differentiation of the sensory progenitor cells during the mammalian inner ear development.

At first, we demonstrated the detailed expression patterns of Hes1 and the activated Notch1. In addition, we analyzed the developing inner ear of Hes1 knockout mice, and showed that Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down regulation of p27Kip1 (Murata J et al., J Neurosci Res in 2009).

In 2008 and 2009 we investigated the developmental expression pattern of the phosphorylated Akt and PTEN, which is an antagonizing factor for the PI3K-Akt signaling pathway. We clarified that the immunoreactivity of PTEN is first observed within the prosensory region in the embryonic cochlear epithelium, and gradually restricted in the hair cell progenitors at the late embryonic stage.

The result implied that PI3K/Akt signaling pathway may function for the continuous proliferation and the pluripotency of the inner ear sensory precursor cells. We also started functional analysis of PTEN in 2009, trying to generate inner ear specific PTEN conditional knockout mice. We introduced PTEN-flox mice from the laboratory of professor Tak-Mak in Toronto University and Foxgl-cre mice from Jackson Laboratory.

I was transferred from Osaka University to Juntendo University in July 2010. The frozen fertilize ova of the PTEN cko mice were also transferred to Juntendo University. We fused and individuated them and started to analyze the developing inner ear of PTEN cko mice.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2009年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2010年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

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：内耳発生、蝸牛、有毛細胞、PI3K-Akt シグナル伝達系、PTEN、Sensory Precursor Cell

#### 1. 研究開始当初の背景

聴覚は重要なコミュニケーションの手段であるが、その感覚受容細胞である有毛細胞は生後障害を受けてもほ乳類では再生しないことが知られている。従って内耳再生医療は外部から移植した幹細胞または内在性の幹細胞の有毛細胞への分化誘導が必要となり、このための手段を得るには、内耳発生を特に感覚器を形成する有毛細胞、支持細胞への分化のメカニズムを含めて解明することが必要であると考えられる。

我々は科研費の補助を受けてこのような

再生医療を指向した内耳発生研究に取り組んできた。中でも Notch シグナル伝達系に注目し、活性化された Notch1 のみを特異的に認識する抗体を用いて、Notch 伝達系の活性化を時空間的に明らかにした。その結果 Notch 伝達系は過去に報告されてきたような側方抑制による有毛細胞・支持細胞への分化誘導のみならず、それ以前の段階である感覚上皮予定領域の決定においても、特徴的な比較的弱い Notch1 の活性化を通して主要な役割を果たしていると考えられることを示し、英文論文として既に発表していた (Murata et al. J Comp Neurol, 2006)。

## 2. 研究の目的

感覚上皮予定領域の決定にはこれを構成する細胞へと分化していく Sensory precursor cell の特定化、増殖維持、未分化性維持、生存促進等が必要である。我々は種々の遺伝子改変マウスの解析やこれを利用した器官培養などの利用によって間隔上皮予定領域決定に関わる一つ一つの要素についてどのようなタンパクやシグナル伝達経路が関与しているかを具体的に明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

我々は特異的な抗体を用いた免疫染色と in situ hybridization によって Hes1 と活性化 Notch1 (actN1) の胎生期マウス内耳における詳細な発現パターンを示し、また Hes1KO マウスを解析することで、Notch シグナル伝達系が Hes1 をエフェクターとして Sensory precursor cell の増殖維持に機能していることを明らかにしたいと考えた。

加えて我々はリン酸化 Akt (pAkt) と PI3K-Akt 伝達系の内耳発生における役割を明らかにするために、まず活性化 Akt (pAkt) と PI3K-Akt 伝達系の拮抗因子である PTEN の発現パターンを胎生期と生後のマウス内耳で明らかにしたいと考え、免疫染色と in situ hybridization を予定した。

その結果胎生期では PTEN は感覚上皮予定領域にはほぼ一致して発現が開始し、胎生後期では蝸牛上皮の中では有毛細胞に限局して陽性となるという特徴的な発現パターンが観察されることを示し、この結果から PI3K-Akt 伝達系は Sensory precursor cell の増殖制御や未分化性の維持に関連した機能を持つ可能性が推察されたため、実際に PI3K-Akt 伝達系の内耳発生における機能を解析するための研究実施を予定した。

一つは胎生期蝸牛の器官培養系を確立し、40HT の添加によって pAkt を強制発現可能な Akt-Mer を発現するトランスジェニックマウスを用いて実験をすすめる。この系では、PI3K-Akt 伝達系の阻害因子、または 40HT を器官培養に添加することで同伝達系を off にした場合と on にした場合の両方の蝸牛発生における影響を検討することが可能である。

もう一つの方法としては PTEN-flox マウスと Cre-Foxg1 マウスを交配し内耳特異的な PTEN コンディショナルノックアウトマウスの作製し、これを解析することを予定している。このマウスでは PI3K-Akt 伝達系が持続

的に活性化されることになるが、過去の他臓器での同様の実験の報告や、我々の PTEN の内耳発生での発現パターンを調べた結果から、Sensory precursor cell の分裂が wild type に比して長期にわたって継続することや未分化性の維持が継続することで有毛細胞の分化が遅れること等が観察されるのではないかと予想している。

## 4. 研究成果

我々は Hes1 と活性化 Notch1 (actN1) の胎生期マウス内耳における詳細な発現パターンを示した Hes1KO マウスを解析することで Notch 伝達系が Hes1 をエフェクターとして Sensory precursor cell の増殖維持に寄与していることを示し、英文論文として発表した (Murata et al., J Neurosci Res, 2009)。ただ Notch 伝達系のみで Sensory precursor cell の制御がすべてなされているとは考えにくく、他の因子やシグナル伝達系との関連について検討することを次の目的とし、PI3K-Akt 伝達系の内耳発生における役割について検討することとした。平成 21 年度にはリン酸化 Akt (pAkt) と PI3K-Akt 伝達系の拮抗因子である PTEN の発現パターンを胎生期と生後のマウス内耳で明らかにした。PTEN は胎生期内耳において感覚上皮予定領域にほぼ一致して発現が開始し、胎生後期では蝸牛上皮の中では有毛細胞に限局して陽性となるという特徴的な発現パターンが観察されることを示し、この結果を国内外の学会において発表した。また発現パターン解析のみならず、内耳特異的な PTEN コンディショナルノックアウトマウスを作成中であり、このマウスの内耳を発生段階を追って解析することで PI3/Akt 伝達系の役割を具体的に解析中である。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. 村田 潤子 「発生・分類・遺伝子 内耳の発生とそれに関与する遺伝子」JOHNS 第 25 巻第 1 号: 21-26, 2009. (総説)

2. Murata J, Ohtsuka T, Tokunaga A, Nishiike S, Inohara H, Okano H, Kageyama R.

Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down regulation of p27Kipl. J Neurosci Res. 2009 Dec; 87(16): 3521-34.

(査読有り)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 村田潤子、西池季隆、堀井新、土井勝美  
胎生期マウス内耳発生における Akt の活性化  
と PTEN の発現について  
第18回日本耳科学会総会・学術講演会 平  
成20年10月16日-18日  
神戸

2. Junko Murata, Tohru Kimura, Suetaka  
Nishiike, Arata Horii, Toru Nakano,  
Hideyuki Okano.  
The Expression Pattern of Phosphorylated  
Akt and PTEN in the Developing Cochlea.  
The 32<sup>nd</sup> Annual Midwinter research Meeting  
of the ARO  
Feb. 14-19 2009  
Baltimore Maryland, and U.S.A.

3. 村田潤子、堀井新、森鼻哲生、土井勝美、  
西池季隆、猪原秀典、木村透、仲野徹、岡野  
栄之  
マウス内耳発生異おける PI3K/Akt シグナル  
経路の細胞増殖・生存促進機能について  
平成21年5月16日～19日  
ザ・プリンスパークタワー東京

4. 村田潤子、堀井新、森鼻哲生、土井勝美、  
西池季隆、猪原秀典、木村透、仲野徹、岡野  
栄之  
マウス内耳発生異おける PI3K/Akt シグナル  
経路の細胞増殖・生存促進機能について  
平成21年10月8日～10日  
京王ホテル(東京)

5. Murata J, Kimura T, Tomiyama Y, Nishiike  
S, Doi K, Inohara H, Okano H, Nakano T  
Transient Expression of PTEN in the Hair  
Cell and Neuronal Lineage During Mammalian  
Inner Ear Development  
ARO 33rd MidWinter Meeting February  
6-10, 2010  
Disneyland Hotel (Anaheim, CA, USA)

6. Junko Murata, Toshiyuki Ohtsuka,  
Akinori Tokunaga, Kazusaku Kamiya,  
Hideyuki Okano, Katsuhisa Ikeda,  
Ryoichiro Kageyama  
Notch-Hes1 pathway may contribute to the  
cochlear prosensory formation through the  
transcriptional down-regulation of p27<sup>Kip1</sup>  
The 47<sup>th</sup> Inner Ear Biology Workshop, August  
29<sup>th</sup> to September 1<sup>st</sup> in 2010, Prague in  
Czech Republic

7. 村田潤子、木村透、西池季隆、太田

有美、長谷川太郎、川島 貴之、池田 勝久、  
猪原秀典、岡野栄之、仲野徹  
神経節細胞での発現パターンを通じて考察  
した PI3K/Akt シグナル経路と PTEN の内耳発  
生における役割について  
第20回日本耳科学会学術講演会 201  
0年10月7日(木)～9日(土)松山市

〔図書〕(計 1件)

1. Junko Murata, Katsuhisa Ikeda, and  
Hideyuki Okano  
‘Notch Signaling and the Developing Inner  
Ear’ in ‘Notch Signaling in Embryology  
and Cancer’ edited by Jorg Reichrath and  
Sandra Reichrath  
Landes Bioscience and Springer Science and  
Business Media 2011 in NCBI Bookshelf

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 潤子 (MURATA JUNKO)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：80332740