

令和 7 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K09656

研究課題名（和文）Wntシグナル賦活化による聴神経幹細胞の増殖制御を介した聴覚再生

研究課題名（英文）Wnt signaling activation in the inner ear development and 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ラセン神経節が障害された際に出現する幹細胞様細胞の潜在的な活性化因子として着目している古典的Wntシグナル伝達経路の役割を調査した。Wntシグナル伝達は、耳の発生と内耳の形態形成において重要な役割を果たしている。レポーターマウスWntVISを使用し、胎生期から成体期までの細胞段階における内耳のWnt古典的経路の活性を分析した。Wntシグナルは、幼若なラセン神経節ニューロンおよび成体のグリア細胞で活性を示すことが明らかとなった。また、前庭有毛細胞、前庭支持細胞、蝸牛支持細胞においても活性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の耳では、音を感じる蝸牛の有毛細胞は再生できませんが、バランスをつかさどる前庭の有毛細胞は一部再生します。ただし、蝸牛内の支持細胞には再生の可能性があり、再生医療の研究対象となっています。また、音を脳に伝える神経（らせん神経節ニューロン）も、生後すぐに増殖能力を失います。本研究では、細胞の再生や発達に関わる「Wntシグナル」という仕組みの働きをマウスで調べました。その結果、Wntシグナルは発達期から成体まで、蝸牛や前庭の支持細胞、前庭の有毛細胞、さらに出生直後の神経細胞でも活発に働いており、耳の細胞の再生や成長に重要な役割を果たしていることが示されました。

研究成果の概要（英文）：The auditory system lacks regenerative ability, whereas the vestibular system exhibit limited regenerative potential. The spiral ganglion neurons actively proliferate until birth but lose this ability within a week postnatally. This study investigated the role of the canonical Wnt signaling pathway as a potential regulator of these cells. Wnt signaling plays a crucial role in otic development and inner ear morphogenesis. Using reporter mice, we analyzed the activity of the Wnt pathway during inner ear development. Our findings demonstrate that Wnt signaling remains active in the vestibular hair cells and in the supporting cells of both the cochlea and vestibule throughout development and into adulthood. In addition, Wnt activity was observed in spiral ganglion neurons up to 7 days after birth, coinciding with their period of proliferative potential. These findings suggest that Wnt signaling is integral to cell proliferation in the inner ear both before and after birth.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳発生 内耳再生 Wntシグナル ラセン神経節ニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

ラセン神経節細胞 (SGN; Spiral Ganglion Neuron)は、蝸牛有毛細胞からの刺激を受け取り中枢聴覚野へと伝達する双極性の聴覚一次ニューロンであり、周囲をグリア細胞であるシュワン細胞に囲まれている。そのSGNが一次性的もしくは有毛細胞障害後二次的にダメージを受けることで後迷路性難聴が引き起こされる。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。SGNが一定数を下回ると言語聴取能が著しく低下するため、SGNの再生を目指す研究において、細胞増殖の制御は喫緊の課題である。しかしながら、蝸牛有毛細胞の再生研究に対し、SGN再生の研究はその重要性に比して進んでいない。

我々は成体マウスのラセン神経節で薬剤性内耳障害時に増殖性細胞が出現することを示し、ラセン神経節内在性神経幹細胞 (SG-NPC)の存在を同定した。エピジェネティックな制御によりSG-NPCの増殖とニューロンへの分化誘導が得られることも示し、ある程度の聴力改善が得られることを報告した (Wakizono et al, JCI insight, 2021)。

しかしながら、SGNを薬剤により障害しないとこのSG-NPCは賦活化されず、現状では再生医療の手段としては未完成であり、このSG-NPCが活性化され細胞増殖が開始される制御機構は未だ解明されていない。

再生医療の実現のためには発生を理解し模倣することが重要である。我々はラセン神経節における細胞増殖能は出生後2週間以内に消失することを示した。神経幹細胞から神経細胞への増殖・分化が活発な胎生期のマウスにおいて、細胞増殖を制御する機構として代表的なものに古典的 Wnt シグナル経路がある。

Wnt シグナルは発生段階の内耳原基である耳胞において、将来の半規管に相当する背側のみで活性を有し、有毛細胞が形成される前の胎生 12-14 日目頃までにその活性が抑制される (Noda et al, Dev Biol 2012)。耳胞腹側、すなわち将来の蝸牛やラセン神経節細胞での活性はないと思われていたが、高感度に Wnt シグナル活性を評価できる新規 GFP レポーターマウスである R26-WntVis マウス (WntVis) (Takemoto et al, Genes to Cells 2016)を用いて発現解析を行ったところ、生後 0 日 (P0)、P7 では神経細胞核に Wnt シグナル活性を認め一方で、P15 ではそれが消失していることが初めて確認された。また P30 では Sox2/GFP 共陽性細胞が少数ながら確認でき、Sox 陽性シュワン細胞の一部では成体でも Wnt シグナル活性が保持されていることが示唆され、シュワン細胞の一部が神経幹細胞として保存されているとする既報 (Lang et al, Sci Rep 2015)や我々の SG-NPC 説を支持する結果であった。

これらの予備データを踏まえ、Wnt シグナルが減弱していくことがラセン神経節細胞発生過程での自己増殖能・可塑性の喪失に関与しているのではないかと、そして Wnt シグナルによって神経節細胞や内在性幹細胞の増殖能を制御できるのではないかとという仮説のもと、本研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、必要十分な数のラセン神経節細胞を再生させるための方法の確立である。本研究で用いる WntVIS マウスは GFP レポーターマウスであり、既存のレポーターマウスと同様の発現様式を示し、より高感度かつ single cell レベルで Wnt シグナル活性を確認でき、蛍光レポーターであることから培養系でリアルタイムな解析にも用いることができる。申請書執筆時点で、このマウスを用いて内耳での Wnt シグナル活性を観察した報告は皆無であり、新規性・独自性を保った有用な実験系であると考えられた。

## 3. 研究の方法

### 1) Wnt シグナルの詳細な時空間的解析

WntVis マウスを用いて胎生期から成体に至るまでの期間において、ラセン神経節内の種々の細胞で Wnt シグナル活性がどのように変遷するのかをより詳細に解析する。細胞増殖マーカーである BrdU や Ki67 との共染色、シュワン細胞マーカーである Sox2/Sox10、ミクログリアマーカーである Iba1 との共染色によって、SGN の他にいつどの細胞が Wnt シグナル活性を持つのかを検証する。

### 2) Wnt シグナル調節による増殖能制御の検証

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase であるウアバインによる SGN 障害モデルマウスを WntVIS マウスで作成し、ウアバイン投与後に出現する増殖細胞における Wnt シグナル活性の有無を *in vivo* で検証する。出現した SG-NPC に Wnt シグナルの活性が確認できれば、Wnt シグナルを亢進させる薬剤を正円窓経路で投与することにより、細胞増殖が得られるかどうかを検証する。

現時点での薬剤の候補は iPS 細胞などにも用いられている Gsk3 阻害薬の CHIR99021 である。低分子・疎水性の化合物であるため、正円窓膜経路の投与方法としてゼラチンハイドロゲルを用いれば速やかに放出され、ポリグリコール乳酸のナノパーティクルを用いれば徐放性に長時間にわたり作用させることが可能である。i) で得られたデータをもとに条件を検討し、薬剤を内耳へ

in vivo に投与することで、SG-NPC および誘導される新生 SGN の増殖能向上を図る。

#### 4. 研究成果

##### 1) Wnt シグナルの詳細な時空間的解析

さらに詳細に、E11 (ラセン神経節細胞が内耳原基である耳胞から剥離して神経節を形成し始める)から P60 (生後2か月、成体)までの、ラセン神経節における Wnt シグナルの発現解析を行った。内耳切片を GFP、Sox2、および TuJ1 で染色し検討したところ、E15 では、TuJ1 陽性のらせん神経節ニューロン(SGN)は、らせん神経節の発達および蝸牛の回転と一致して、核に Wnt シグナル活性を表す GFP 蛍光を示した。一部の Sox2 陽性細胞は、顕著な蛍光を示し、グリア細胞の一部が強い増殖能を持っていることがわかった。P0 および P7 において、ほぼすべての TuJ1 陽性 SGN は、均一な核内 GFP 蛍光を示したが、SGNs における Wnt シグナル活性は P15 までに消失し、P30 および P60 においても検出不能であった。一方、Sox2 陽性細胞 (シュワン細胞) は E15 で GFP と Sox2 の共染色を示した。E17 から P15 までの期間には Sox2 と GFP 陽性細胞は観察されなかったにもかかわらず、Sox2-GFP 二重陽性細胞が P30 で再出現し、P60 でも維持されていた。我々の知る限り、本研究はラセン神経節における Wnt シグナル活性を確認した初めてのものであり、Hearing Research 誌に掲載された (Noda et al., Hear Res, 2025)。

ラセン神経節の観察の際に蝸牛および前庭の有毛細胞・支持細胞についても詳細に検討した。蝸牛の発達は、原始蝸牛管における GER (大上皮稜)の形成から始まり、内有毛細胞 (IHC) の誘導、次いで外有毛細胞 (OHC) の誘導が続く。神経節同様に、内耳の感覚上皮領域を示す Sox2 と神経を示す TuJ1 を用いて、E15 と E17 の蝸牛を染色した。未熟な感覚上皮細胞領域では GFP 蛍光を示し Wnt シグナルの活性が認められたが、蝸牛の発達中に GER が形成されると、GFP 蛍光が GER から消失した。発生が進み E17 では、GFP 蛍光は内側指状細胞 (IPhCs) と外側支柱細胞 (OPCs) と思われる限られた数の支持細胞で観察された。P30 時点では、支持細胞のより多くの細胞で GFP 蛍光が観察され、特に IPhCs、内側支柱細胞 (IPCs)、OPCs、および Deiters 細胞で顕著であり、少なくとも P60 まで持続した。一方で蝸牛有毛細胞は1列の内有毛細胞 (IHC; 音刺激の知覚)と3列の外有毛細胞 (OHCs; 音の増幅と周波数特性)に分けられるが、Wnt シグナル活性は IHCs では完全に欠如していたのに対し、OHCs では P10 まで弱い Wnt シグナル活性が観察されたが、内耳が P30 で成体へと成熟するにつれ、Wnt シグナル活性は IHCs だけでなく OHCs でも消失した。

前庭は平衡覚を知覚する器官で、蝸牛よりも進化論的な由来が古く、哺乳類で再生能のない蝸牛と異なり再生能を有することが知られている。球形嚢の切片を観察すると、E15 から P60 の成体に至るまで、一定数の GFP 陽性前庭有毛細胞および支持細胞が観察された。卵形嚢および半規管膨大部の有毛細胞・支持細胞についても同様の観察結果が得られた。

この、器官形成後から成体に至るまでの蝸牛・前庭における Wnt シグナルの検討についても新規の知見であるため、上記論文内で報告した。

##### 2) Wnt シグナル調節による増殖能制御の検証

まず Wnt レポーターマウスにおいて Type 1 ニューロンをウアバインにより選択的に阻害し、ラセン神経節の切片を作成して細胞数をカウントした。ラセン神経節細胞の大半が死滅していたが、残存する少数のニューロンは GFP 強陽性を示した。また、グリア細胞の多くが GFP 陽性であり、薬剤で処理していないコントロール側と比較して有意に Wnt シグナル陽性細胞数が増加していた。この結果から以下の2つの仮説を立て、検証中である。

仮説 Wnt シグナルは薬剤傷害時のラセン神経節ニューロンの生存に寄与する

仮説 薬剤によるラセン神経節ニューロンの障害が、細胞 X による Wnt タンパク放出を経て周囲のグリア細胞の Wnt シグナル活性を上昇させ、細胞増殖と幹細胞様細胞の振る舞いをもたらす。

この仮説のもと、細胞障害性薬剤を用いないラセン神経節ニューロンの再生能の惹起について研究を進めている。

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 Teppei, Wakizono Takahiro, Manabe Takahiro, Aoyagi Kei, Kubota Marie, Yasui Tetsuro, Nakagawa Takashi, Nakashima Kinichi, Meno Chikara	4. 巻 462
2. 論文標題 Sustained Wnt signaling in the mouse inner ear after morphogenesis: In hair cells, supporting cells, and spiral ganglion neurons	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 109282 ~ 109282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heares.2025.109282	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田哲平
2. 発表標題 薬剤によるラセン神経節細胞障害時のWntシグナルの挙動
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田哲平
2. 発表標題 ラセン神経節ニューロンの再生にむけた治療戦略
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	目野 主税 (MENO Chikara) (20311764)	九州大学・医学研究院・教授  (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	安井 徹郎  (YASUI Tetsuro)  (60803468)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (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