

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791595

研究課題名（和文） 内耳感覚上皮の網羅的遺伝子発現プロファイリングと再生への応用

研究課題名（英文） Comprehensive profiling of the gene expression in the inner ear sensory epithelium and its application to the regeneration

研究代表者

山本 典生（YAMAMOTO NORIO）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70378644

研究成果の概要（和文）：以下の事象を解明した。

1. Notch シグナルは内耳蝸牛感覚上皮前駆細胞を維持する。
 2. プロスタグランジン E は EP4 受容体を介して有毛細胞を保護する。
 3. Septin4, 5, 7 は、支持細胞に発現している。Septin4 ノックアウトマウスでは聴力が正常であるが、これは Septin4 の欠失を Septin5 が補っているためである。
- さらに、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子解析のための条件設定を行った。

研究成果の概要（英文）：We performed preliminary experiments to set up the condition of extracting RNA from single cochlear cells and amplifying the cDNA linearly. In addition, we found the function of several genes in the cochlea. These results will contribute to the realization of cochlear regenerative medicine. Complete inhibition of Notch signaling in the mouse cochlear caused small numbers of inner hair cells only in the apical turn. This result indicates that Notch signaling is involved not only in the determination of cell fate but also in the maintenance of the cochlear sensory epithelial progenitors. The analysis of EP4 knockout mice revealed that prostaglandin E physiologically protects cochlear hair cells. We also found the new markers of cochlear supporting cells, Septin4, Septin5, and Septin7.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：遺伝子発現解析、内耳、Notch シグナル、Septin、プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

難聴は、伝音系（鼓膜、耳小骨、中耳）に障害がある伝音難聴と感音系（内耳、聴神経、中枢神経）に障害がある感音難聴とに分類される。老人性難聴や薬剤性難聴、多くの先天性難聴を引き起こす感音難聴のほとんどは、

音の受容を司る有毛細胞やそれを支える支持細胞が存在する内耳感覚上皮が傷害されることによって引き起こされる。哺乳類の感覚上皮細胞は発生後半に、細胞分裂を停止してしまい(Ruben, Acta Otolaryngol 1967)、生後は傷害後に再生することがないとされ、

手術治療の可能な伝音難聴と異なり、いまだに感音難聴の根本的治療法は確立されていない。近年再生医療的手法を用いて、再生不可能といわれてきたさまざまな臓器を再生する試みがなされているが、内耳感覚上皮に関してはいまだに有効な手段の開発にいたっていない。

その理由のひとつは、内耳感覚上皮を構成する有毛細胞や支持細胞にどのような遺伝子やタンパク質が発現しているのかの情報に乏しく、それらの細胞の性質が形態学的特徴以外に分かっていないことにある。内耳内の有毛細胞や支持細胞は1種類ではなく、蝸牛では有毛細胞には内有毛細胞と外有毛細胞、支持細胞には内指節細胞、ダイテルス細胞、ヘンゼン細胞、柱細胞などが存在する。有毛細胞や支持細胞全体のマーカーは報告されているが(Hassonら, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, Chenら, *Development*, 1999)、内外有毛細胞や個々の支持細胞を明確に区別する手段は先に述べたように存在部位や形態の違いのみである。それぞれの細胞が機能的にどのような異なった役割を果たしているかもいまだに解明されておらず、内耳感覚上皮の再生を行う際に、どの細胞を標的としてどの遺伝子の操作を行えば機能的な再生を得られるのかの推測が困難な状態である。

2. 研究の目的

従来報告されているノックアウトマウスの内耳感覚上皮、あるいは野生型マウスの内耳感覚上皮を構成する各細胞の単一細胞からの発現遺伝子プロファイリングを行い、内耳感覚上皮を構成する細胞の性質に対する理解を深める。具体的には、各細胞特異的な遺伝子を発見し、タンパク質発現パターンの検討などを行う。

その知見に基づき、該当遺伝子の欠失動物の聴覚や形態の検討を行い、遺伝子の機能を確認したうえで、従来不可能であるとされてきた内耳感覚上皮再生への応用をはかる。

3. 研究の方法

内耳感覚上皮細胞の単離は、有毛細胞に対してパッチクランプを行うなどの電気生理学的実験の際に以前より行われている確立された手法である(Zajicら, *Hear Res*, 1987)。具体的には、胎生17日齢、生後3日齢あるいは30日齢のマウス内耳を頭蓋内より摘出し、内耳のうち蝸牛と前庭を分離した後、浸透圧を一定に保った培養液中で、まず蝸牛と前庭それぞれの骨部を除去する。その後、蝸牛では膜迷路の側壁を除去したものを、前庭では耳石などを除去したものをそれぞれCollagenase処理すると感覚上皮細胞の単離が可能となる。個々の細胞の区別は、形態的特徴によって行う。蝸牛の有毛細胞は不動毛

が存在するため、その他の細胞との区別は容易である。内有毛細胞と外有毛細胞とは、前者が核の位置が細胞の中心部に近く、後者は細胞底部に近いこと、また形も前者がフラスコ型、後者が直方体の形をしていることから区別は容易である(Heら, *Hear Res*, 2000)。また、外有毛細胞の支持細胞であるダイテルス細胞は、指節様の突起を持つことから容易に同定可能である(Bobbin, *Neuroreport*, 2001)。

また、Rbpj cKO マウスは、Foxg1Cre マウスを Rbpj floxed マウスと掛け合わせて作成したのち、胎生17.5日目で形態の観察を行った。

EP4およびSeptinファミリー遺伝子のノックアウトマウスは通常のConventional knockout マウスである。それぞれについて、聴性脳幹反応などの機能評価、免疫染色などの形態の評価を行った。

4. 研究成果

(1)

上皮レベルでの網羅的遺伝子発現解析のために用いるNotchシグナルの内耳特異的遮断マウス(Rbpj cKO マウス)は、従来のNotchシグナル遮断マウスに比べてより完全なシグナル遮断を可能にする。その内耳では、有毛細胞が蝸牛回転のうち頂回転にしか存在せず、また、内外2種類の有毛細胞のうち、内有毛細胞しか形成されず、支持細胞も一部を除き形成されなかった。以上の成果は *Developmental Biology* 誌に掲載された。

(2)

さまざまな臓器発生に重要な生理活性物質プロスタグランジンEの受容体の一つである、EP4のノックアウトマウスを解析したところ、同腹のWild type マウスに比べて、聴覚が劣ることがわかった。EP4ノックアウトマウスの聴覚低下の原因は、外有毛細胞の消失であった。このことからプロスタグランジンEはEP4受容体を介して、生理的に内耳有毛細胞の保護を担っていることが明らかになった。以上の成果は *Neuropharmacology* 誌に掲載された。

(3)

これまで、蝸牛の構成細胞のうち、有毛細胞にはいくつかのマーカーが報告されているが、支持細胞については報告されているマーカーはごく少数で、支持細胞の機能についても不明な点が多かった。本研究において、構造タンパクの一種であるSeptinファミリーのうち、Septin4, Septin5, Septin7が、支持細胞のうち、内外柱細胞、ダイテルス細胞に特異的に発現していることを見出し、Septin4およびSeptin5のノックアウトマウスの検討も行った。両マウスとも聴力は正常であったが、Septin4ノックアウトマウスにおいては、Septin4の欠失をSeptin5が補っ

ている所見を得ることができ、このため Septin4 が欠失しても聴力が正常であることが示唆された。この成果は、Hearing Research誌に掲載された。

(4)

さらに、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子解析のため、蝸牛の有毛細胞や支持細胞の単離を行い、RNA を抽出し、cDNA を Linear に増幅させる条件の設定を行う実験を、胎生のマウス蝸牛において行った。

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 16 件)

- ① Yoshida A, Yamamoto N, Kinoshita M, Hiroi N, Hiramoto T, Kang G, Trimble WS, Tanigaki K, Nakagawa T, Ito J. Hear Res.、査読あり、2012 Apr 30. [Epub ahead of print] 10.1016/j.heares.2012.04.015 [doi]、Localization of septin proteins in the mouse cochlea.
- ② Hamaguchi K, Yamamoto N, Nakagawa T, Furuyashiki T, Narumiya S, Ito J. Neuropharmacology、査読あり、2012 Mar;62(4):1841-1847, 10.1016/j.neuropharm.2011.12.007 [doi]、Role of PGE-type receptor 4 in auditory function and noise-induced hearing loss in mice.
- ③ Yamamoto N, Chang W, Kelley MW. Dev Biol.、査読あり、2011 May 15; 353(2): 367-379. 10.1016/j.ydbio.2011.03.016 [doi]、Rbpj regulates development of prosensory cells in the mammalian inner ear.
- ④ Yamamoto N, Fujimura S, Ogino E, Hiraumi H, Sakamoto T, Ito J. Acta Otolaryngol Suppl.、査読あり、2010 Nov;(563):16-9. 10.3109/00016489.2010.489232 [doi]、Management of labyrinthine fistulae in Kyoto University Hospital.
- ⑤ Yamamoto N, Ogino E, Hiraumi H, Sakamoto T, Ito J. Acta Otolaryngol Suppl. 査読あり、2010 Nov;(563):11-5. 10.3109/00016489.2010.489231 [doi]、Outcome of ossiculoplasty in Kyoto University Hospital.
- ⑥ Nakagawa T, Sakamoto T, Hiraumi H, Kikkawa YS, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ono K, Yamamoto M, Tabata Y, Teramukai S, Tanaka S, Tada H, Onodera R, Yonezawa A, Inui K, Ito J.、査読あり、BMC Med. 2010 Nov 25;8:76. 10.1186/1741-7015-8-76 [doi]、Topical

insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Yamamoto N, Yoshida A, Nakagawa T, Ito J.、Thirty-Fifth Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology、2012/2/28、米国サンディエゴ、Septin Protein Expression in the Embryonic and Neonatal Mouse Cochlea
- ② Yamamoto N, Hayashi Y, Nakagawa T, Ito J.、The 8th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences、2011/10/26、韓国 Daegu、Mechanisms of mammalian cochlear hair cell protection by IGF-1
- ③ Yamamoto N, Hamaguchi K, Nakagawa T, Ito J.、48th Inner Ear Biology Workshop、2011/9/20、ポルトガル・リスボン、Parkin Deficiency Causes Progressive Hearing Loss in Mice through Outer Hair Cell Loss
- ④ 山本典生 ;伊藤壽一、第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2011/5/19、京都、Notch シグナルは内耳感覚上皮前駆細胞を維持する
- ⑤ Yamamoto N, Hamaguchi K, Nakagawa K, Ito J.、Thirty-Fourth Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology、2011/2/20、米国ボルチモア、Parkin Deficiency Causes Progressive Hearing Loss in Mice Through Outer Hair Cell Loss
- ⑥ Yamamoto N, Chang W, Kelley M, Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders、2010/11/17、京都、Rbpj is Required for Development of Prosensory Cells in the Mammalian Inner Ear
- ⑦ Yamamoto N, Yoshida A, Nakagawa T, Ito J.、47th Inner Ear Biology Workshop、2010/8/31 チェコ共和国・プラハ、Expression Pattern of Olig Gene Family in the Developing Inner Ears
- ⑧ 山本典生, 吉田充裕, 中川隆之, 伊藤壽一、第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2010/5/20、仙台、マウス蝸牛における Sept4 タンパク質発現および機能の解析

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本典生 (YAMAMOTO NORIO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：

7 0 3 7 8 6 4 4