

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592496

研究課題名(和文)再生医療への応用を指向したほ乳類内耳発生におけるリン酸化シグナルの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the PI3K/Akt signaling pathway during the mammalian inner ear development and its application for 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：PTENは癌抑制遺伝子産物でありPI3K/Aktシグナルに拮抗する。我々はマウスの内耳特異的にPTEN遺伝子を欠失させる(PTEN CKOマウス)ことで哺乳類蝸牛発生におけるPTENの役割の解明を試みた。PTEN CKOマウス蝸牛では、蝸牛管径は増大し感覚上皮予定領域外で細胞増殖が遷延化していた。有毛細胞に過剰列が観察されたが蝸牛管長はコントロールに比して短くなっていた。CKOマウスでは感覚上皮前駆細胞マーカーの発現パターンには変化がなかったが、有毛細胞分化は促進されていた。以上からPTENの感覚上皮予定領域決定以降での細胞の分化/増殖制御と、蝸牛管の収斂伸長への関与の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：PTEN, a product of a tumor suppressor gene, inhibits the PI3K/Akt pathway by dephosphorylating phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. We tried to elucidate the functions of PTEN during mammalian cochlear development by deleting PTEN conditionally in the mouse inner ear. In PTEN-conditional knockout (cko) mutant cochlea, the diameter of cochlear ducts was increased and the cell proliferation continued till the later stage outside of the prosensory region. Extra rows of OHCs and IHCs were observed, whereas the average length of the cochlear ducts was shorter than that of the control mice. The expression patterns of early prosensory markers were almost same between the PTEN-CKO and the control mice. However, the hair cell differentiation was accelerated in the PTEN-CKO cochlea. The results indicate that PTEN may regulate the cell differentiation and proliferation after the prosensory determination, and contribute to the convergent extension of the cochlear duct.

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：Pi3K/Aktシグナル伝達系 PTEN PTEN ckoマウス ほ乳類 内耳発生 感覚上皮予定領域 有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

この研究開始当初の時期にはほ乳類内耳発生において有毛細胞・支持細胞分化の段階とそれ以前の感覚上皮予定領域の決定段階の双方において Notch シグナル伝達系が重要な働きをしていることが、コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究 (Brooker R et al., Development 2006 など)、我々の活性化 Notch の時空間的発現パターンの解析結果 (Murata J et al., J Comp Neurol 2006) などから明らかにされてきた。

感覚上皮予定領域の決定 (prosensory determination) とはこれを構成する細胞 (有毛細胞、支持細胞) へと分化していく感覚上皮前駆細胞 (Sensory Precursor Cells; SPCs) の決定であり、少なくとも特定化 (specification)、増殖維持 (proliferation)、未分化性維持 (maintenance of undifferentiated state)、生存促進 (survival) などの要素が含まれる。

我々はこの領域において Notch シグナル伝達系の下流で Hes1 が p27Kip1 の発現を転写レベルで抑制する事で SPCs の増殖維持に機能している事を明らかにし論文として発表した (Murata J et al., J Neurosci Res 2009)。SPCs の決定に関わるこの分野は内耳障害時の再生医療においても critical point となる領域であり、今年に入っても主要な journal への報告が相次いでいる (Hartman BH et al., PNAS 2010; Pan et al., PNAS 2010)。

このような状況の中で Sensory Precursor Cells の決定には、当然 Notch 伝達系以外の他の因子、シグナル伝達系の関与が予想される。今回我々が注目したリン酸化シグナル (PI3/Akt シグナル) 経路は幹細胞の未分化性の維持、細胞増殖における機能に加えて、最近では組織幹細胞から前駆細胞を分化、増殖させていると今回の研究分担者である木村らも報告をしている (Murayama K, Kimura T et al., Oncogene 2007)。また PI3/Akt シグナル伝達系拮抗する PTEN については zebrafish の内耳発生における発現と機能が示唆 (Croushore JA et al., Dev Dyn 2005) されている。しかし、ほ乳類内耳発生については Dong Y. ら (Neuroscience 2010) が PTEN KO マウスのヘテロ (PTEN^{+/-}) において感覚上皮前駆細胞の最終分裂がわずかに遅くなり有毛細胞の数が若干増加している事を報告しているにすぎなかった。

一方例えば T 細胞型白血病では腫瘍細胞の増殖制御においては Notch シグナル伝達系と PI3/Akt シグナル伝達系が共同して細胞増殖を制御している事が治療の面からも近年のトピックとなっている (Palomero T et

al., Nat Med 2007) 等、内耳以外の他臓器での臓器発生、腫瘍化などでも Notch シグナル伝達系と PI3/Akt シグナル伝達系の相互作用が注目されるようになっていた。

2. 研究の目的

以上のような背景の下で、今回我々はほ乳類内耳発生においてこれまで注目される事が比較的少なかったリン酸化シグナル (PI3K/Akt シグナル) 経路の機能を解明する事を目的とした。特にその拮抗因子であり、かつ癌抑制遺伝子産物である PTEN の発現・働きにも焦点をあてて詳細に検討し、最終的に現在内耳発生に関与している主要なシグナル伝達経路と考えられている Notch シグナル伝達系との相互作用についても明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

PI3K/Akt シグナル伝達経路の内耳発生における機能を検討するために、我々は拮抗因子である PTEN の発現をマウス内耳で欠失させた時に発生各段階の内耳で生じる変化について解析することとした。

しかし PTEN KO マウスは胎生 9.5 日齢 (E9.5) で致死のため、我々は PTEN^{-lox} マウス (Suzuki A, Mak TW et al., 2003) と Foxg1-Cre マウス (Hébert JM, McConnell SK, 2000) (Foxg1 は内耳、前脳、眼、前腸に発現) を利用して PTEN conditional knock-out (cko) マウスの系を作製し継代した。胎仔の中で Foxg1^{Cre/+}; PTEN^{lox/lox} の遺伝子型をもつ PTEN CKO マウスの内耳では PTEN 発現は欠損していると考えられたが、E18.5 まで生存した。実際に PTEN に対するマウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ陽性反応は消失し (図 1) 活性化 Akt の発現が上昇していた。

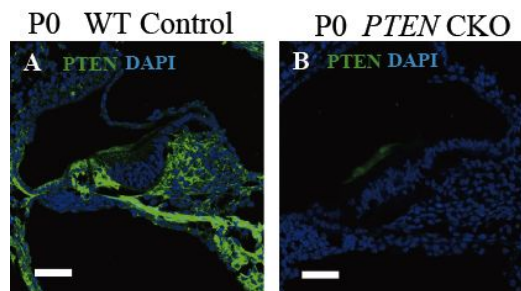


図 1 PTEN CKO マウス内耳における抗 PTEN 抗体による免疫染色の陽性反応の消失

4. 研究成果

(1) PTEN CKO マウスの内耳は全体的にコントロールマウス内耳と比較してやや巨大化した (図 2) 特に蝸牛管径が著明に増大していた (図 3)。

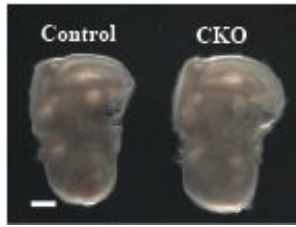


図2
PTEN CKO マウス
内耳の巨大化

(2) BrdU 陽性の増殖細胞については感覚上皮
予定領域決定時期(E13.5 頃)以降に予定領域
外の部位において増加し(図3)、同部位で
の細胞増殖の遷延化が観察された。

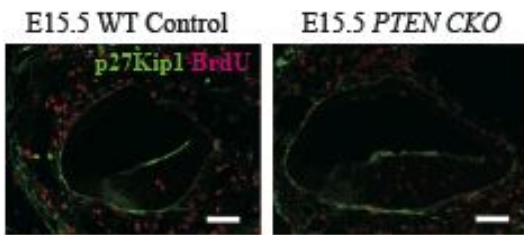


図3
*PTEN*CKO マウス内耳においては p27Kip1 陽性
の感覚上皮予定領域の外での BrdU 陽性細胞
の数が増加

(3)細胞配列に注目すると、*PTEN* CKO マウス
内耳では正常配列と交代にパッチ状に外有
毛細胞が余剰列を有し、4列構造となってい
た。

内毛細胞においても頻度は少ないが
所々に余剰細胞が観察された(図4)

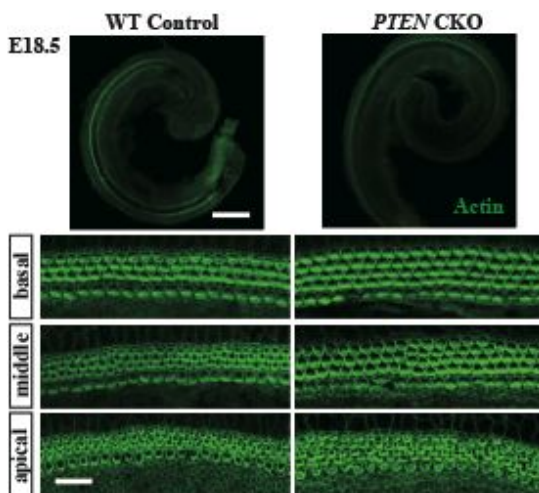


図4
PTEN CKO マウスで観察された外有毛細胞4列
構造

(4)細胞分化について検討すると、コント
ロールマウスでは Myosin VI 陽性の外有毛細胞
が蝸牛回転の上部(apical-middle turn)では
観察されなかったが、*PTEN* CKO マウスではみ

られた。蝸牛管の成熟が基底回転から頂回転
へ向かって進むので、*PTEN* CKO マウスでは有
毛細胞の分化がコントロールに比して促進
されていると考えられた(図5)。

一方で感覚上皮予定領域の早期マー
カーである p27Kip1、Sox2 の E13.5(感覚上皮予定
領域決定期に相当する)での発現パターンを
検討すると *PTEN* CKO マウスとコントロール
マウスの間で明らかな差はみられず、*PTEN*
の欠失は感覚上皮予定領域決定には影響し
ていないという可能性が考えられた(図6)。

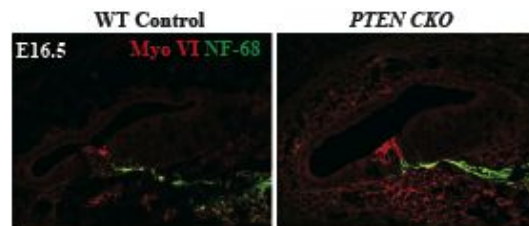


図5
PTEN CKO マウス内耳での有毛細胞分化促進
(CKO マウスでは3列の Myosin VI 陽性外有
毛細胞が確認される。)

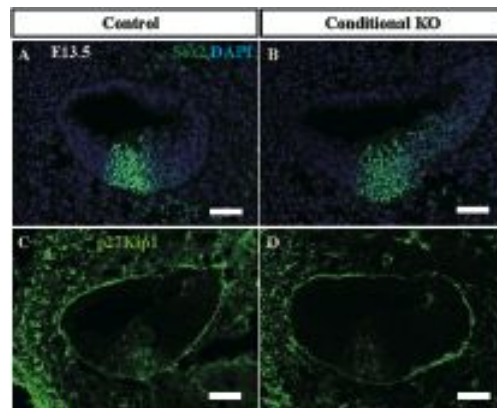


図6
Sox2、p27Kip1 の感覚上皮予定領域決定期に
おける発現パターン(コントロールと *PTEN*
CKO マウスの間で変化が見られなかった。

以上(1)-(4)の結果から、*PTEN* はマウス内
耳発生において主に感覚上皮予定領域決定
期以降における細胞増殖、細胞配列、細胞分
化において極めて重要な機能を有している
可能性が示唆された。我々は得られた知見を
基礎として現在英文論文を執筆中である。

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4件)

1. Spatio-temporal expression of TRPM4 in
the mouse cochlea
Sakuraba M, Murata J (Corresponding

author), Teruyama R, Kamiya K, Yamaguchi J, Okano H, Uchiyama Y, Ikeda K
J Neurosci Res. 2014 May 20. doi:
10.1002/jnr.23410. [Epub ahead of print]
(査読有り)

2. Subclassification of chronic rhinosinusitis with nasal polyps based on eosinophil and neutrophil.

Ikeda K, Shiozawa A, Ono N, Kusunoki T, Hirotsu M, Honnma H, Saitoh T, Murata J
Laryngoscope 123(11) E1-9, 2013
(査読有り)

3. 宇野 敦彦、村田 潤子、西池 季隆、
西村 洋、今井 貴夫、太田 有美、池田 勝
久、猪原 秀典
周囲構造への浸潤がみられた副鼻腔真菌症
の2例 耳鼻臨床 105 : 1 ; 21-26, 2012
(査読有り)

4. 津田 武、西池 季隆、川島 貴之、村
田 潤子、喜井 正士、田村 学、猪原 秀
典
鼻副鼻腔内反性乳頭腫 32 例の検討 耳鼻臨
床 104 : 6 ; 427-433, 2011
(査読有り)

[学会発表](計 12 件)

1. Expression of TRPM4 in the mouse cochlea and its putative roles in the potassium ion transport and the inner hair cell repolarization Murata J, Sakuraba M, Teruyama R, Kamiya K, Yamaguchi J, Okano H, Uchiyama Y, Ikeda K
(The 37th Annual Midwinter Meeting of ARO, February, 22-26, 2014, Manchester Grand Hyatt, San Diego, CA, USA)

2. PTEN Plays Multiple Roles by Regulating Both PI3K/Akt and MEK/Erk Signaling Pathway During the Mammalian Inner Ear Development

Murata J, Sakuraba M, Kimura T, Suzuki A, Mak T, Okano H, Nakano T, Ikeda K
(The 36th Annual Midwinter Meeting of ARO, February, 16-20, 2013, Baltimore Marriott Waterfront Hotel, Baltimore, Maryland)

3. The Expression of Fbxo 45 in the Developing Inner Ear
Sakuraba M, Murata J, Tada H, Shibata S, Kamiya K, Okano H, Ikeda K
(35th ARO MidWinter Meeting February 25-29, 2012. The Manchester Grand Hyatt Hotel San Diego, California, USA)

4. 内耳発生における TRPM4 の発現変化と EP 形成との関連について
村田 潤子、城所 淑信、松岡理奈、池田 勝

久

順天堂大学 医学部 耳鼻咽喉科
第 1 3 回日本耳科学会総会・学術講演会(宮
崎シーガイアコンベンションセンター、宮崎、
2013.11.24-2013.11.26)

5. 癌抑制遺伝子 *PTEN* の哺乳類内耳発生にお
ける役割の検討

村田 潤子、池田 勝久
順天堂大学 医学部 耳鼻咽喉科
第 1 1 4 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講
演会(ロイトン札幌・ホテル札幌芸文館、札
幌、2013.5.15.-2013.5.18)

6. 再生医療への応用を指向した内耳発生
研究:内耳感覚上皮前駆細胞の増殖と分化に
関与するシグナル伝達経路の解明

村田 潤子、神谷 和作、岡野 栄之、池田
勝久
第 2 1 回日本耳科学会総会・学術講演会 2
0 1 1 年 1 1 月 2 4 日(木) ~
2 6 日(土)沖縄コンベンションセンター(沖
縄県宜野湾市)

7. ESS 後にアスピリン減感作療法を併用した
AIA の臨床経過と末梢リンパ球上のサイトカ
イン発現について

村田 潤子、本間 博友、齋藤 達矢、西村
将彦、小野 倫嗣、沖崎 貴子、岡田 弘子、
池田 勝久
順天堂大学 医学部 耳鼻咽喉科
第 5 2 回日本鼻科学会総会・学術講演会(福
井フェニックスプラザ、福井、
2013.9.26~2013.9.28)

8. ESS 後にアスピリン減感作療法を施行した
AIA の予後について

村田 潤子、齋藤 達矢、西村 将彦、本間
博友、沖崎 貴子、池田 勝久、熱田 了、
高橋 和久
(第 5 1 回日本鼻科学会総会・学術講演会
2 0 1 2 年 9 月 2 7 日~2 9 日、幕張メッセ、
千葉)

9. 内視鏡手術後に再燃した ASA 合併難治性
慢性副鼻腔炎に対するアスピリン減感作療
法の経験

村田 潤子、飯塚 崇、齋藤 達矢、笠井 美
里、岡田 弘子、熱田 了、高橋 和久、池
田 勝久
アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2011
2 0 1 1 年 1 1 月 1 2 日(土)
AP 品川(東京都品川区)

10. Sternberg ' s canal からの髄膜瘤に伴う
特発性髄液漏の 2 症例とその治療経験

村田 潤子、畠 将晃、飯塚 崇、笠井 美
里、岡田 弘子、本間 博友、小野倫嗣、広
津 幹夫、楠 威志、池田 勝久
第 7 3 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演

会 2011年6月23日～24日(金)
松本文化会館(長野県松本市)

11. 内視鏡下に経上顎洞的に開放し得た側頭下窩粘液嚢胞の一例

村田 潤子、飯塚 崇、加瀬 香、笠井 美里、小野 倫嗣、楠 威志、池田 勝久
第112回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2011年5月19日(木)～21日(土)国立京都国際会館(京都市)

12. 内視鏡手術後に再燃したASA合併難治性慢性副鼻腔炎に対するアスピリン減感作療法の経験

村田 潤子
第60甲斐御茶の水耳鼻咽喉・頭頸科治療研究会、2011年4月14日(木) 東京

[図書](計1件)

1. Murata J, Ikeda K, and Okano H
Notch Signaling and the Developing Inner ear in 'Notch Signaling in Embryology and Cancer' (Chapter 12) edited by Jörg Reichrath and Sandra Reichrath. Landes Bioscience and Springer. 2012.

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

(2)研究分担者

木村 透 (KIMURA, Thoru)
北里大学・理学部・教授
研究者番号: 50280962