

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26506010

研究課題名(和文) 宇宙環境での前庭有毛細胞の発生と維持機構の解明

研究課題名(英文) Development and maintenance of vestibular hair cell in microgravity environment

研究代表者

田浦 晶子 (Taura, Akiko)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・臨床研究企画運営部・研究員

研究者番号：70515345

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)：内耳前庭有毛細胞の発生について、マウスES細胞を用いて、内耳組織の分化誘導についても重力環境の影響について検討したところ、微小重力環境下では内耳有毛細胞系への分化誘導が抑制される傾向を認めた。
また、マウスの前庭耳石器組織を採取し、コラーゲン内で器官培養を行い、感覚毛を免疫組織学的に検討し、実験系のセットアップを確立し、通常重力環境下および微小重力環境下での培養で前庭組織有毛細胞の感覚毛について比較検討した。微小重力環境ではコントロール群と比較して、感覚毛がやや減少する傾向を認めたが、有意ではなかった。上記結果より、有毛細胞の発生には重力の影響があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of gravity to the development of vestibular hair cell. In the microgravity environment, the development of hair cell from mouse ES cells seemed to be suppressed. Also we established the organ culture method in the microgravity environment using 3D clinostat system. We observed the hair bundle maintenance of vestibular hair cells both in normal gravity and in microgravity environment. Compared with normal gravity, the number of hair bundle was decreased in the the microgravity environment, but there was no significant difference. So gravity might be important for the development of vestibular hair cell.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：平衡障害 微小重力環境

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な分野で宇宙開発に関する研究が進められ、一般人の宇宙旅行も現実的になり、宇宙はより身近なものになってきた。将来、宇宙ステーションや月面基地で人類が恒常的に生活し、繁殖する可能性がある。しかしながら、宇宙環境で人類は正常に発生し、恒常性を維持することが可能なのか否かは未だよくわかっていない。ですでに今までの宇宙実験において、魚類や両生類では正常に発生することが証明された。しかし、鳥類では初期胚の生存率が低く、正常に発生しないことが知られており、哺乳類においては繁殖実験が困難であり、未だ詳細は不明である。微小重力環境実験では受精は可能であるものの、胚発生や出産率は約半分に低下するため、宇宙における正常発生は困難であると予想されており、発達期における重力の必要性が示唆されている。

一方で発達後においても重力の重要性は指摘されている。内耳前庭は平衡感覚保持に非常に重要な臓器であり、その機能不全と宇宙酔いと関連も指摘されている。そのため、内耳が正常に発生し、維持されることは、人類が宇宙に置いて繁殖して行く為には不可欠である。前庭には耳石膜の下に有毛細胞層が存在する。有毛細胞は耳石のずれによる機械刺激を電気振動に変換する機能があり、この情報が電気信号となり中枢へ伝達される。この電気信号への変換システムとして感覚毛に存在する機械電気変換チャンネルが知られており、感覚毛の維持は有毛細胞機能維持として非常に重要である。しかし、哺乳類では一旦障害されると再生は極めて困難とされている。航空宇宙科学では前庭耳石器の耳石についてはすでに「飛行後の再適応期における耳石の研究」や「宇宙飛行中における耳石障害対策」などで研究されているが、有毛細胞については殆ど研究されていないのが現状である。

2. 研究の目的

内耳有毛細胞の感覚毛は一本の動毛と数十本の不動毛からなり、不動毛は階段状に束になって存在している。有毛細胞の感覚毛発生については様々な報告があるものの、重力の影響については未だ不明である。近年、iPSから有毛細胞を分化誘導することが可能になり、二次元培養では感覚毛は有毛細胞コーンの中心(Oshima, 2010)で上向きに、また三次元培養では有毛細胞は、球体を呈する細胞塊の下部に存在し、感覚毛は全てその球体内部に存在した(Koehler, 2013)。これらの報告からも有毛細胞の感覚毛形成には方向性があり重力の関与が示唆される。

また、北尻らにより報告された分子 TRIOBP は感覚毛の根に存在し感覚毛の stiffness の

維持に重要で、生後細胞内へと伸長する (Kitajiri, 2010)。TRIOBP-4/5 のノックアウトマウスでは、有毛細胞の感覚毛の根が形成されず、生後通常では細胞内へと伸長するものが、次第に変性して感覚毛が機能せず内耳障害を引き起こす。不動毛およびその根元はアクチン繊維の束で構成されるため、TRIOBP によるアクチン繊維の束化が不動毛の形態維持に必要であり、その機能欠損が内耳障害の原因と考えられる。この TRIOBP の細胞内への伸長は感覚毛維持に重要であるが、そこに重力が関与している可能性がある。

有毛細胞の発生および維持について重力による影響の詳細な研究は未だ見られない。そこで本研究では有毛細胞の機能的最大特徴である感覚毛について、その形態および機能に焦点を合わせて微小重力(宇宙環境)での発生および維持機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 微小重力環境での内耳有毛細胞の発生 (ES 細胞から内耳有毛細胞への分化誘導) 細胞としては有毛細胞系に分化すると GFP 陽性になるマウス math-1ES 細胞を使用した。BMP4, bFGF などの薬剤により ES 細胞を Otic preneurosensory vesicle まで分化誘導させた。それを、チャンバースライドに移し、微小重力及びコントロール群に分けて1週間培養した。内耳有毛細胞系へ分化誘導させるために、培養液には bFGF を添加した。微小重力環境を作成するために3Dクリノスタット(AES)を用いた。浮遊培養で作製した Otic preneurosensory vesicle を含んだチャンバースライドに培養液を満たし、パラフィルムにて密閉し、3Dクリノスタットに乗せて、テープにて固定した。コントロール群でも同様に培養液を満たしてパラフィルムにて密閉した。ES 細胞をクリノスタットにて合計 96 時間微小重力環境に起き、2週間後に組織を PFA にて固定した後、OCT コンパウンドにて凍結し、10 μm の厚さで切片を作成し、免疫組織染色を施行した。

2) 微小重力環境での前庭有毛細胞の維持 生後3-5日目のICRマウスから前庭卵形嚢を採取し、3Dクリノスタット微小重力環境下で器官培養を行った。微小重力の負荷時間についても12時間、24時間、72時間、120時間と様々な条件で施行し比較検討した。培養期間は2週間まで行い、その間の感覚毛の状態について検討した。またTRIOBP KOマウスにも同様に器官培養を行い、24時間微小重力環境で培養し、1週間後に組織を固定し、微小重力の影響を検討した。

4. 研究成果

2014年度

3Dクリノスタット微小重力環境装置を用いて内耳器官培養系を確立した。当初は、より

生理的な条件下で行うために、前庭耳石器ごと培養を行ったが、耳石の存在により感覚毛の正確な評価が困難であった。そのため、培養前に耳石を除去した。但し、微小重力環境作成のために2軸上で回転する装置を使用しているため、液体内での培養自体が感覚毛に影響を与える可能性があったため、前庭組織自体をコラーゲンの中に包埋し、浮遊空気層の影響を受けないように培養チャンバー内は培養液で充填させた。

2015-2017 年度

(1) 微小重力環境での有毛細胞の発生

コントロール群の通常重力環境での培養では1週間の培養後、内耳有毛細胞への分化で見られる GFP 陽性の細胞を約 28.3 個/2500 μm^2 確認できた。それと比較して、微小重力環境下では 8.5 個/2500 μm^2 と僅かしか確認できなかった。つまり通常重力環境下では Math1-GFP 陽性で有毛細胞系への分化が見られたが、微小重力環境では分化が抑制される傾向があると思われた。

(2) 微小重力環境での前庭有毛細胞の維持

感覚毛が微小重力による受ける影響を検討するために、12時間、24時間、72時間、120時間と様々な条件で、微小重力負荷をかけた後に培養し、感覚毛の数を計測した。12時間微小重力環境下におき、3日間培養時点で感覚毛数が減少する傾向が見られたが、その後7日間及び14日間培養した結果は感覚毛数に大きな差は見られなかった。また、12時間、24時間、72時間及び120時間微小重力環境下で培養した結果でも、通常重力下で培養したコントロール群(30.3 個/2500 μm^2)と比較して12時間(23.4 個/2500 μm^2)、24時間(23 個/2500 μm^2)、72時間(18.3 個/2500 μm^2)、120時間(23 個/2500 μm^2)とに減少傾向を認めたと、有意差は認めなかった。また、TRIBP KO マウスについても同様に検討したが、コントロール群では 17.6(個/2500 μm^2)、TRIBP KO マウスでは 13(個/2500 μm^2)と僅かに減少傾向を認めたと、有意差は認めなかった。

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15件)

- 1) 扇田秀章、田浦晶子：四肢平衡機能検査。耳鼻咽喉科検査マニュアル、医学書院『耳鼻咽喉科・頭頸部外科』122-125.2017
- 2) 田浦晶子：研修ノート 頭位性めまい診断のポイント。耳鼻咽喉科臨床.110(11).786-787.2017
- 3) 田浦晶子：iPS細胞を用いた前庭再生医療。Equilibrium Research.Vol.76 (6).704-711.2017

- 4) Taura A, Taura K, Koyama Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J, Ryan AF. Hair cell stereociliary bundle regeneration by espin gene transduction after aminoglycoside damage and hair cell induction by Notch inhibition. Gene Therapy 23:415-23. 2016.
- 5) Taura A, Nakashima N, Ohnishi H, Nakagawa T, Funabiki K, Ito J, Omori K. Regenerative therapy for vestibular disorders using human induced pluripotent stem cells (iPSCs): neural differentiation of human iPSC-derived neural stem cells after in vitro transplantation into mouse vestibular epithelia. Acta Otolaryngol. 136:999-1005.2016
- 6) 田浦晶子：めまい-新しい流れとその周辺-新しい治療・将来展望 再生医療。JOHNS (Journal of head and neck surgery). 東京医学社 Vol.32 No.1.107-111. 2016
- 7) 田浦晶子：めまいの問診の要点。ENTONI. 全日本病院出版会、東京、(北原紘編) No.189:7-13.2016
- 8) 田浦晶子、大西弘恵。前庭障害に対する iPS 細胞移植の可能性、Clinical Neuroscience.Vol.34 (10).1142-1144. 2016
- 9) 大西弘恵、田浦晶子：第4節 ヒト iPS 細胞からの前庭神経節細胞作製の開発：iPS 細胞 (書籍 No. 1867) 技術情報協会(東京).361-364. 2016
- 10) 田浦晶子：高齢めまい患者の薬物療法。ENTONI. 全日本病院出版会、東京、(石川和夫編) 22-27.2015
- 11) 田浦晶子：トピックス 内耳再生医療。Equilibrium Research.Vol.73.538-542. 2014
- 12) Taura A, Ohnishi H, Ochi S, Ebisu F, Nakagawa T, Ito J. Effects of mouse utricle stromal tissues on hair cell induction from induced pluripotent stem cells. BMC Neurosci. 2014;15(1):121
- 13) Taura A, Funabiki K, Ohgita H, Ogino E, Torii H, Matsunaga M, Ito J. One-third of vertiginous episodes during the follow-up period are caused by benign paroxysmal positional vertigo in patients with Meniere's disease. Acta Otolaryngol. Aug 28:1-6. 2014
- 14) 松永麻美、田浦晶子、鳥居紘子、服部佳世子、竹内啓喜、船曳和雄、伊藤壽一：末梢性めまいとの鑑別に苦慮した急性散在性脳脊髄炎(ADEM)の一症例。Equilibrium Research.Vol.73 (4). 206-213. 2014

15) 田浦晶子、中川隆之:めまい。「ガイドライン外来診療 2014」日経メディカル開発、東京、(泉孝英 編) 553-558.2014

[学会発表](計 12 件)

- 1) 田浦晶子、辻純、中川隆之、船曳和雄、扇田秀章、西村幸司、大森孝一、伊藤壽一: iPS 細胞による前庭再生医療への試み. 第 76 回日本めまい平衡医学会総会 長野 2017 年 12 月 1 日
- 2) 田浦晶子、伊藤通子、辻村隆司、嘉田真平、宮崎眞和、安里亮、辻純、小亀敏明、瀬崎伸一: 手術用顕微鏡光源による耳珠部熱傷の一例. 第 31 回近畿耳鼻咽喉科手術手技研究会 大阪 2017 年 1 月 28 日
- 3) 田浦晶子: シンポジウム 3: めまい疾患のモデル動物 - 遺伝子医療、再生医療への扉 - iPS 細胞を用いた前庭再生医療. 第 75 回日本めまい平衡医学会総会 大阪 2016 年 10 月 28 日
- 4) 田浦晶子、中川隆之、船曳和雄、辻純、伊藤壽一、大森孝一: 微小重力環境における前庭有毛細胞についての検討. 第 75 回日本めまい平衡医学会総会 大阪 2016 年 10 月 27 日(第 75 回日本めまい平衡医学会ポスター受賞)
- 5) 田浦晶子、片岡通子、辻村隆司、嘉田真平、神田智子、宮崎眞和、安里亮、辻純: 当院におけるメニエール病症例のめまい発作についての検討: 第 115 回 日本耳鼻咽喉科学会京滋合同地方部会 京都 2016 年 6 月 25 日
- 6) 田浦晶子、大西弘恵、中川隆之、伊藤壽一: ヒト iPS 細胞を用いた前庭障害治療への試み: 第 15 回 日本再生医療学会 大阪 2016 年 3 月 18 日
- 7) 田浦晶子、船曳和雄、伊藤壽一: 頸性めまい症例の特徴的検査所見の検討: 第 74 回日本めまい平衡医学会総会 横浜 2015 年 11 月 6 日
- 8) 田浦晶子、中川隆之、伊藤壽一: iPS 細胞への遺伝子導入: 第 116 回 日本耳鼻咽喉科学会 東京 2015 年 5 月 22 日
- 9) 田浦晶子、越智 翔平、大西弘恵、中川隆之、伊藤壽一: マウス iPS 細胞から蝸牛有毛細胞誘導への試み: 第 14 回 日本再生医療学会 横浜 2015 年 3 月 21 日
- 10) 田浦晶子、中川隆之、伊藤壽一: ヒト iPS 細胞を用いた前庭障害治療. 第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会. 2014.11.6(第 73 回日本めまい平衡医学会ポスター受賞)
- 11) Taura Akiko, Nakashima Noriyuki, Onishi Hiroe, Nakagawa Takayuki, Ito Juichi. The Regenerative Therapy for Vestibular Disorders with human induced pluripotent stem (iPS) cells. Inner ear Biology Workshop. 2014.11.1-4. Kyoto. JPN

12) 田浦晶子、坂本達則、中川隆之、伊藤壽一: iPS 細胞を用いた内耳障害治療への試み. 第 115 回 日本耳鼻咽喉科学会 2014 年 5 月 16 日

[図書](計 7 件)

- 1) 田浦晶子: メニエール病. 耳鼻咽喉科頭頸部外科レジデントマニュアル、医学書院、東京、(伊藤壽一、大森孝一監修) 114-118.2016
- 2) 田浦晶子: 良性発作性頭位めまい症. 耳鼻咽喉科頭頸部外科レジデントマニュアル、医学書院、東京、(伊藤壽一、大森孝一監修) 119-121.2016
- 3) 田浦晶子: 前庭神経炎. 耳鼻咽喉科頭頸部外科レジデントマニュアル、医学書院、東京、(伊藤壽一、大森孝一監修) 122-123.2016
- 4) Taura A: Gene Therapy. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer Japan KK;215-221,2014
- 5) Taura A: Self-Repair. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer Japan KK;189-197,2014
- 6) Tona Y and Taura A. Otolith. In: Regenerative Medicine for the Inner Ear Springer Japan,67-74,2014
- 7) Hiroko Torii and Taura A. Vestibular Development. In: Regenerative Medicine for the Inner Ear Springer Japan,115-125,2014

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田浦 晶子 (TAURA AKIKO)

藍野大学・医療保健学科・教授

研究者番号: 70515345

(2) 研究分担者

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHINICHI)

信州大学・大学院医学研究科・特認講師

研究者番号: 00532970

山崎 博司 (YAMAZAKI HIROSHI)

京都大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号: 80536243

中島 則行 (NAKASHIMA NORIYUKI)

久留米大学医学部・助教

研究者番号: 80625468

伊藤 壽一 (ITO JYUICHI)

京都大学・大学院医学研究科・名誉教授

研究者番号: 90176339