

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861372

研究課題名(和文) Tympanic border cellにおける内耳幹細胞の性質の解明

研究課題名(英文) Characterization of tympanic border cells as progenitors for mouse cochlea cells

研究代表者

谷口 美玲 (Taniguchi, Mirei)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80706713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、tympanic border cellの遺伝子発現解析により、蝸牛基底膜下に局在する内耳前駆細胞(slow cycling細胞)の維持と制御機構を解明することである。これらは蝸牛有毛細胞の再生につながると期待される。本研究では新生仔マウス蝸牛を用いた2つの手法によって遂行された。まず内耳凍結切片からレーザーマイクロダイセクションによる選択的な細胞集団の採取法の検討、そして蝸牛コルチ器単離細胞から作製したOtosphereの遺伝子発現解析およびコルチ器・幹細胞(ES細胞)との比較解析である。後者により発見された複数の幹細胞マーカーの一部がこの目的部位に局在することが確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to characterize the tympanic border cells localized under the basal membrane of organ of Corti through the transcriptome analysis. We already found slow cycling cells, perhaps progenitor cells of the inner ear tissue, in this area. Making clear their maintenance and regulations will give us some hints for the regeneration of cochlear hair cells. In this research, we performed 2 things; establish the laser microdissection method and otosphere analysis using neonatal mouse cochlea. The former is good to obtain only the target area of tympanic border cells. In the latter, we found one of the candidate genes as the stemness category was existed in the area of tympanic border cells.

研究分野：耳科学

キーワード：Tympanic border cell 内耳蝸牛 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) かつてヒトを含む哺乳類の感覚上皮細胞は再生することがないと考えられてきた。ここ 20 年ほどの間に、マウスの前庭感覚上皮や新生仔期の蝸牛感覚上皮から単離し作製した細胞塊において有毛細胞マーカー陽性細胞が認められ、哺乳類内耳に幹細胞が存在することが示唆された。感音性難聴には治療法がないため、有毛細胞再生という新たな治療法の開発の可能性がでてきた。

(2) (1) により内耳に存在すると判明した幹細胞の局在を解明するため、我々は slow-cycling cell という組織幹細胞特有の性質を利用し、in vivo マウス内耳蝸牛における BrdU 陽性かつ Ki-67 陽性細胞の存在を調べた。その結果、基板の鼓室階側の細胞層である tympanic border cell の中に slow-cycling cell を認めた。これらは血管周囲に比較的多く存在し、Nestin 陽性であった。なお、この細胞は成長とともに減少し、成獣マウス蝸牛では検出できなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内耳幹細胞を含むと考えられる tympanic border cell の遺伝子発現解析を行い、性質と機能を解明することである。具体的には以下の 2 つについて検討を行った。

(1) tympanic border cell の採取法の確立：網羅的な遺伝子発現解析を行うには、まず対象となる tympanic border cell の採取法の確立が必須となることから、様々な方法による選択的な細胞回収法を検討した。

(2) tympanic border cell の幹細胞マーカー発現確認：新生仔期の蝸牛感覚上皮から単離し作製した細胞塊（有毛細胞の幹細胞を含む）の遺伝子発現を比較解析し、得られた内耳特有の幹細胞マーカーについて免疫染色

により、tympanic border cell での局在を確認した。

3. 研究の方法

(1) Laser Captured Microdissection (LCM) 法によって内耳の凍結切片から tympanic border cell、内耳感覚上皮などを採取し得られたサンプルから RNA を調製し cDNA マイクロアレイ可能なクオリティのサンプル取得技術の開発を行った。

胎生 18 日、哺乳 1 日、哺乳 4 日のマウスの内耳を採取して凍結切片を作成し、特定の細胞集団 (tympanic border cells, greater epithelial ridge, supporting cells) を LCM 技術で回収し、サンプル 固定条件、脱水条件、染色条件につき様々な条件検討を行った。固定条件は、4%PFA 固定、100%MeOH 固定、非固定の 3 条件で、脱水条件は、EtOH の濃度および Xylene の使用の有無を、染色条件は、クレイシルバイオレット染色または HistoGene 染色を比較検討した。

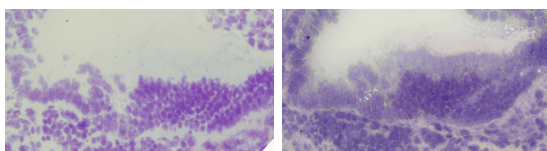
なお機器は、Cryostat (Leica)、PALM CombiSystem (Zeiss)、2100Bioanalyzer (Agilent)を用いた。

(2) (1) に時間を要することがわかったため、限られた研究期間で本研究の目的を果たすべく、並行して新たな切り口での取り組みも始めた。すなわち、当科・伊木らが得たマイクロアレイデータ (Iki T, et al., Microarray analyses of otospheres derived from the cochlea in the inner ear identify putative transcription factors that regulate the characteristics of otospheres. PLoS One. 2017;12(6):e0179901. doi: 10.1371/journal.pone.0179901.) から内耳幹細胞の候補となる遺伝子をいくつか抽出し、そのキャラクターゼーションを行った。このデータは細胞種ごとの個別解析でなく、生後

0日齢の蝸牛感覚上皮・otosphere・ES細胞、の発現比較解析により得られたものである。よって、蝸牛感覚上皮に比べ、otosphereやES細胞で発現が有意に上昇していた遺伝子が蝸牛感覚上皮に特異的な幹細胞のマーカーであるという仮定のもと、組織学的評価法により、その検証を行うものである。

4. 研究成果

(1) LCM技術で回収し、サンプルの固定および染色に対する様々な条件検討を行った結果、内耳の凍結切片に対してはメタノール固定およびクレシルバイオレット染色が形態保持および染色性の面で適していることが分かった。



左)クレシルバイオレット染色、右)HistoGene染色

LCMを用いる切片の厚さやレーザーの強さについても条件検討を行った。LCMを用いて採取したサンプルからのRNAの調製には、微量RNA回収用のキット(PicoPure RNA extraction Kit, Arcturus)を用いた。RT-PCRにて、RNAが採取できていることを確認した後、RNAの質についての解析を

行った。

様々な条件検討を重ねた結果、RNAサンプル抽出が質・量ともに改善されたものの、cDNAマイクロアレイ解析に使える値(増幅ありで最低10ngのRNAかつRIN値が7以上)には到達できなかった。cDNAマイクロアレイに必要なRNAの質についての解析中であるが、実験結果が安定せず、解析が不十分である。さらにどのくらいの切片を用いれば、cDNAマイクロアレイを行うことのできる量のRNAを採取できるかの検討をする必要がある。

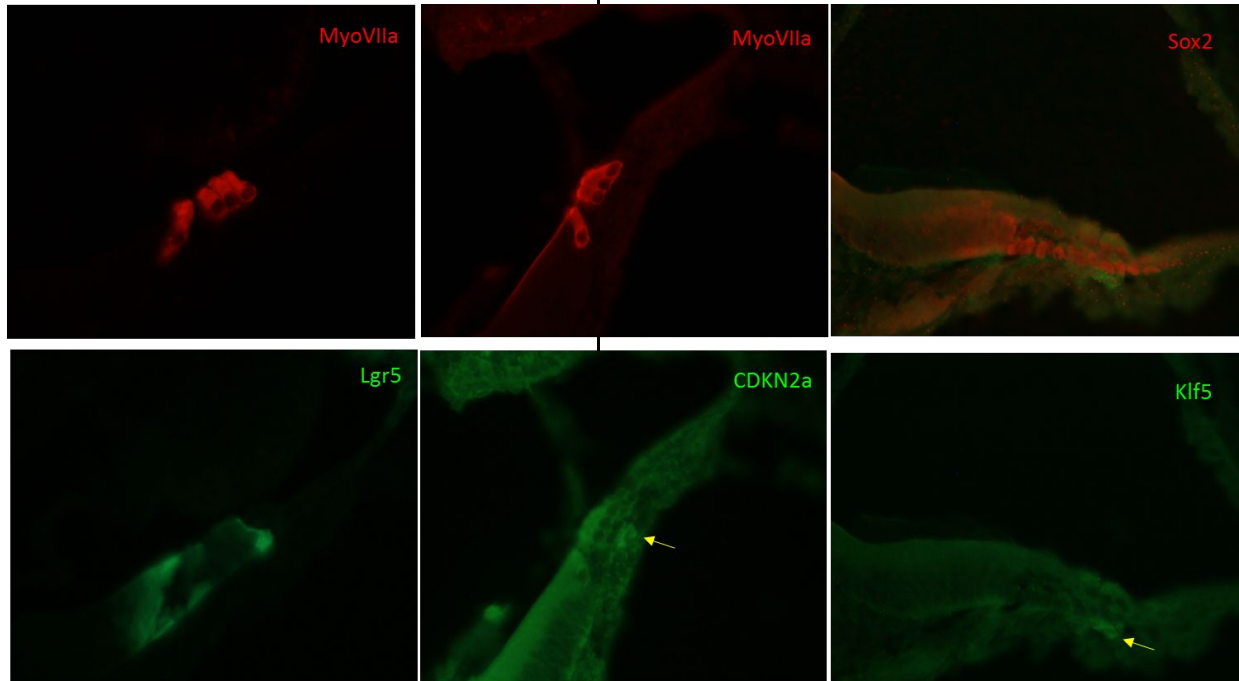
マウス内耳の凍結切片からLCMの技術を用いて採取したRNAについて、cDNAマイクロアレイの解析に適した質および量を採取できているか、引き続き、検証する。さらに、細胞種の特定のための染色法の改良も必要と考えられた。

今回我々は、マウス内耳蝸牛のLCM法を用いたサンプル取得法の確立は達成できなかった。しかしながら、近年、国内でRNAseq解析に使用可能なマウス内耳蝸牛のLCMでのサンプル取得法が信州大学耳鼻咽喉科のグループから発表された(Nishio SY et al., Hear Res, 348:87-97 2017)。こちらを参照頂きたい。

Sample	Nucleic Acid Conc. (ng/ul)	A260	A280	260/280	260/230	RIN
Control 1	1.6	0.039	0.022	1.75	-4.84	Not Analyzed
Control 2	13	0.325	0.163	1.99	1.89	7.5
cresyl violet acetate 1	18.3	0.207	0.1	2.08	3.38	6.2
cresyl violet acetate 2	8.5	0.211	0.107	1.97	3.24	Not Analyzed
Staining Kit 1	7.7	0.191	0.1	1.91	0.04	4.7
Staining Kit 2	20.1	0.503	0.24	2.1	2.64	3.4

(2) 週齢の異なる(胎生期~成獣期)マウス内耳について染色による発現確認を行った結果、胎生期~新生仔期にかけて、tympanic border cell 近傍でシグナルの確認された遺伝子がいくつかあった。

その一例を下図(マウス P0 蝸牛の染色像)に示す。現在、さらに詳細な解析を行っている。



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: Taniguchi M, Matsuo H, Shimizu S, Nakayama A, Suzuki K, Hamajima N, Shinomiya N, Nishio S, Kosugi S, Usami S, Ito J, Kitajiri S. Carrier frequency of the GJB2 mutations that cause hereditary hearing loss in the Japanese population. J Hum Genet. 2015;60(10):613-7. doi: 10.1038/jhg.2015.82.

2: Okano T, Iwai N, Taniguchi M, Ito J. [A clinical study on 106 infant cases who received detailed hearing tests after newborn hearing screening]. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2014 Oct;117(10):1249-57. Japanese.

3: Kikkawa YS, Nakagawa T, Taniguchi M, Ito J. Hydrogen protects auditory hair cells from cisplatin-induced free radicals. Neurosci Lett. 2014;579:125-9. doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.025.

4: Tona Y, Sakamoto T, Nakagawa T, Adachi T, Taniguchi M, Torii H, Hamaguchi K, Kitajiri S, Ito J. In vivo imaging of mouse

cochlea by optical coherence tomography.
Otol Neurotol. 2014;35(2):e84-9.
doi:10.1097/MAO.0000000000000252.

〔学会発表〕(計 4 件)

0-071 一側が先天性重度難聴を示す幼児
例の病態：岡野高之，谷口美玲，岩井詔
子，大森孝一；日本耳鼻咽喉科学会会報
120(4)：538-538，2017.

P2-013 口蓋形成術時に鼓膜換気チューブ
留置術を同時施行した症例の検討：岡野
高之、谷口美玲、大森孝一；日本耳科学
会誌 26 (4)：622，2016.

新生児聴覚スクリーニング後に精密聴力
検査を実施した乳児例の検討：岡野高之，
岩井詔子，谷口美玲，伊藤壽一；日本耳
鼻咽喉科学会会報 117(10)：1249 -1257
2014.

難聴の遺伝学的検査を受検した患者の臨
床的検討：中國正祥，岡野高之，谷口美
玲，柴田有花，土屋実央，北尻真一郎，
小杉眞司；第 38 回日本遺伝カウンセリ
ング学会学術集会 2014 年 6 月 29 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷口 美玲 (TANIGUCHI, Mirei)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80706713

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

伊木 健浩 (IKI, Takehiro)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：20755649