

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10749

研究課題名(和文) 支持細胞に着目した内耳蝸牛の病態の解明および再生の可能性

研究課題名(英文) Cochlear supporting cells as a target of cochlear pathology and regenerative medicine

研究代表者

山本 典生 (Yamamoto, Norio)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70378644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では1. 胎生13日目マウス内耳蝸牛単一細胞の網羅的遺伝子発現解析と2. 蝸牛支持細胞を介したIGF1の有毛細胞保護メカニズムの解明を行った。1. では、感覚上皮予定領域マーカーSox2陽性細胞由来47個中6個以上のサンプルで発現し、34個のSox2陰性細胞全てで発現していないプローブは28個であった。このうち、1つの遺伝子がSox2陽性領域の一部に発現していることを形態的に確認した。2. では、薬剤障害時に、IGF1により蝸牛支持細胞で発現上昇するNetrin1がその受容体Unc5Bを介して蝸牛有毛細胞を保護することが分かった。つまり、支持細胞が有毛細胞保護に重要な役割を果たすことを示した。

研究成果の概要(英文)：We performed two experiments. One is the comprehensive gene expression analysis from embryonic cochlear single cells. In this study, we picked up 47 Sox2-positive and 34 Sox2-negative cells and subjected these samples into microarray analysis. By filtering the acquired data to identify the probes that are expressed in the part of Sox2-positive cells and none of the Sox2-negative cells, we got 28 probes. The gene that is represented by one of them was morphologically expressed in the part of the Sox2-positive region in the E13 inner ear. The other is the elucidation of the supporting cells-mediated cochlear hair cell protection mechanisms by IGF1. In this study, we identified that Netrin1, which is induced by IGF1 in supporting cells when treated with an aminoglycoside, protected cochlear hair cells through its receptor, Unc5B. This result indicates that supporting cells have important roles to protect hair cells from pharmacological injury.

研究分野：耳科学・聴覚医学

キーワード：蝸牛支持細胞 成長因子 単一細胞 網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

感音難聴は65歳以上人口の約6割に認められ、75歳以上人口の実に4分の1が日常生活に支障をきたすレベルの難聴を有することが知られている。さらに、先天性難聴は1000人に1人に認められ、最も頻度の高い先天的機能障害である。したがって、感音難聴をどのように治療するかは社会的な課題であり、高齢化社会を迎える本邦においては切実な問題である。老人性難聴や薬剤性難聴、音響外傷、多くの先天性難聴を引き起こす感音難聴のほとんどは、蝸牛内で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。しかし、感音難聴の病態については一部の難聴を起こす薬剤や原因遺伝子については説明が進んでいるが、より頻度の高い老人性難聴や騒音難聴などについては十分な研究がなされていない。また、哺乳類の感覚上皮細胞は生後の傷害後に再生することがなく、感音難聴の根本的治療法は確立されていない。

これまでの内耳蝸牛の研究では感覚上皮の細胞のうち、有毛細胞が主な研究の対象であった。たとえば、内耳障害を起こす薬剤のうちアミノグリコシドは有毛細胞に取り込まれて有毛細胞を障害すると報告されている。また、幹細胞からの内耳感覚上皮の再生研究においても第一の目標は有毛細胞の誘導であった。しかし、内耳有毛細胞が再生する鳥類では、支持細胞が増殖しかつ有毛細胞に変化することにより有毛細胞が再生することが分かっている。さらに、申請者らは、哺乳類においても発生に重要なシグナル経路 Notch シグナルを阻害すると、生後蝸牛支持細胞が有毛細胞に変わることを示した (Yamamoto ら、2006)。また遺伝難聴の原因遺伝子でも、最も患者数が多いとされる Gjb2 遺伝子は支持細胞などに発現している。このように、未だ病態の説明されていない感音難聴の病態を説明し、生理的な状態では再生することがないといわれる哺乳類蝸牛の感覚上皮の再生、ひいては感音難聴の治療を実現するには有毛細胞だけでなく、その周囲に存在する支持細胞についての研究が必要であるが、現在のところ支持細胞に焦点を絞った類似の研究は見当たらない。

2. 研究の目的

すでに申請者らがあきらかにしている支持細胞に特異的に発現するタンパク質や支持細胞の特性をさらに深く検証することによって支持細胞の機能を詳らかにする。

ア) 支持細胞の発生メカニズム

機能や発現遺伝子の情報が蓄積されつつある有毛細胞と異なり、支持細胞は形態的に、あるいはその解剖学的位置から分類されているのみで、支持細胞とされているものがど

のように発生してくるか、また、どのような遺伝子を発現しているか、などについての情報はきわめて少ない。支持細胞の機能の解明のためには、これらの情報がきわめて重要と考え、本研究ではマウスを用いて発生途上の内耳蝸牛から単一細胞を採取し、RNA を抽出、増幅したうえで網羅的遺伝子発現解析の手法を用いてその遺伝子発現プロファイルを得る。そのプロファイルを細胞ごとに整理することによって、支持細胞発生に重要な遺伝子を同定し、その機能を検定して、支持細胞の発生メカニズムを明らかにし、さらに内耳の感覚上皮の発生過程の解明、再生方法の発見につなげる。

イ) IGF-1 の支持細胞を介した有毛細胞保護メカニズム

申請者らのこれまでの研究で、IGF-1 による有毛細胞保護メカニズムには支持細胞が大きな役割を果たすことが示唆される。IGF-1 が、有毛細胞を保護する際にどのような遺伝子の発現が上昇しているかはすでに検証している (Hayashi ら、2014)。それらの遺伝子産物が支持細胞において発現しているかの検証、また、それらの遺伝子産物が実際に有毛細胞保護に効果を及ぼしているのかを検討することにより、支持細胞が有毛細胞を保護するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

ア) 支持細胞発生メカニズムの解明

従来の内耳研究あるいは他臓器の研究では、臓器全体から RNA を調整していたが、内耳は隣り合う細胞さえも異なる性質の細胞からなる臓器で、網羅的遺伝子発現検索を行う際には、単一細胞レベルでの解析を行うことが望ましいと考えられる。

胎生 13 日齢マウスの内耳を摘出し、その中から蝸牛膜迷路を摘出し、天蓋部分を除いた。そののちにさらにサーモライシンを用いて上皮のみを剖出して、その後トリプシンを用いて単一細胞の状態にした。単一細胞をガラスピペットで拾い上げ、Kurimoto ら (2006) によって報告された方法を用いて、RNA を抽出後、cDNA を合成、各遺伝子の量的関係を損なわないように cDNA の増幅をおこなった。増幅が成功したかどうかはハウスキーピング遺伝子 2 種類 (Gapdh と Rplp0) に対して半定量的な PCR を施行することで判定した。これと並行して感覚上皮予定領域マーカーである Sox2 の発現の有無を PCR で検定した。その後マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子発現プロファイルを作成し解析を行った。

イ) IGF-1 の支持細胞を介した有毛細胞保護メカニズム

我々は、IGF-1 が障害された有毛細胞保護のメカニズムを発現する際に、どのような遺伝子の発現が上昇しているかを検定し、

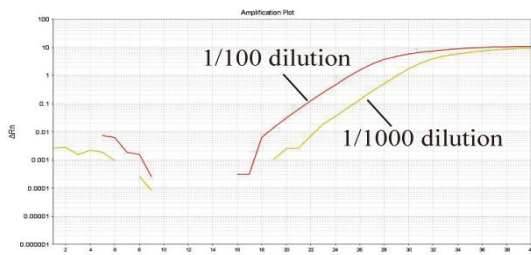
Netrin1 と Gap43 とが有意に上昇していることを報告した (Hayashi ら、2014)。Netrin1 は分泌タンパク質であるので、マウス蝸牛の器官培養を用いて Netrin1 に傷害された内耳有毛細胞の保護作用があるかを検討した。IGF-1 の際と同様に、蝸牛器官培養にアミノグリコシドを投与し、Netrin1 による有毛細胞保護作用があるかを検討した。また、Netrin1 の受容体の発現パターンを In situ hybridization 法を用いて検討した。さらに、ブロッピング抗体を用いて下流分子の同定を行った。

4. 研究成果

ア) 支持細胞発生メカニズムの解明

ハウスキーピング遺伝子 2 種類 (Gapdh と Rplp0) の PCR を施行する (図 1) ことで判定した、増幅の成功率は 72% で、81 個の細胞のサンプルを調整できた。

図 1



胎生期 13 日目の 81 個のマウス蝸牛単一細胞由来の RNA 抽出・増幅サンプルを用いて RT-PCR を行い、感覚上皮予定領域マーカーである Sox2 の発現の有無を検定した。Sox2 陽性サンプルは 47 個、陰性サンプルは 34 個であった。

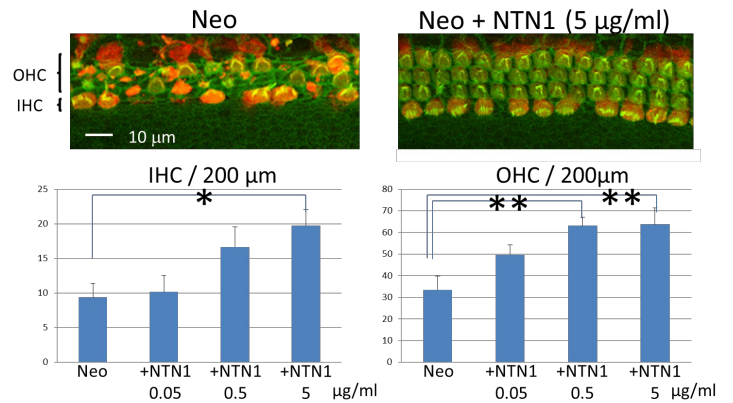
これらをマイクロアレイにかけて網羅的遺伝子発現情報を得た。この情報をもとに、Sox2 陽性細胞特有の未知マーカーの同定を試みた。

Sox2 陰性細胞からの 34 サンプルすべてで発現していない遺伝子プローブは 14424 個であった。これらのプローブの遺伝子は Sox2 陽性細胞にのみ発現しているものと仮定することができる。このうち Sox2 陽性細胞の一部にのみ発現する遺伝子を同定するためまず、Sox2 陽性細胞由来 47 サンプルのうち 1 サンプル以上で発現量 (発現シグナル値の対数) が 4 以上のプローブを 2520 個同定した。そのうち 6 個以上のサンプルで発現量が 6 以上のプローブは 28 個であった。28 のプローブが示す遺伝子の Sox2 陽性領域での発現の有無を In situ hybridization を用いて確認中で、少なくとも 1 つの遺伝子で、Sox2 陽性領域の一部に発現を確認できた。この遺伝子が、支持細胞のマーカーとなるか、などにつき今後検討を行っていく。

イ) IGF-1 の支持細胞を介した有毛細胞保護メカニズム

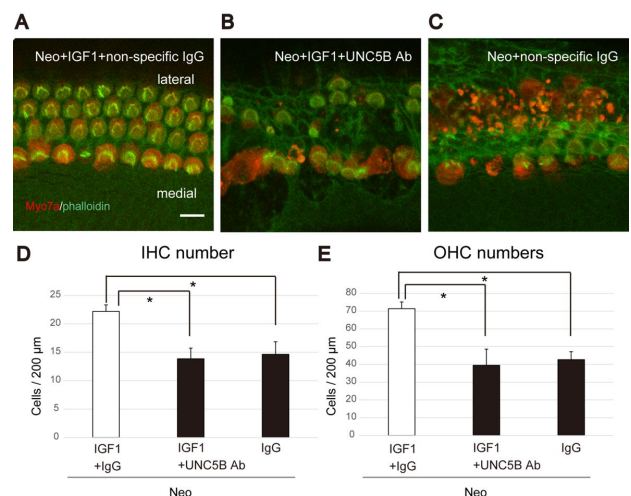
先行研究で IGF1 がアミノグリコシドによる有毛細胞障害からの有毛細胞保護の際に Netrin1 遺伝子の発現上昇が確認されていた。まず、Netrin1 が IGF1 と同様に有毛脂肪保護効果を有するかを検討し、アミノグリコシドによる有毛細胞障害が Netrin1 の投与により軽減されることを確認した。(図 2)

図 2



次に IGF1 による蝸牛有毛細胞保護の際に、Netrin1 がどの細胞から発現しているかを検討した。その結果、アミノグリコシドによって障害を加えて IGF1 を投与した際にのみ、Netrin1 が支持細胞から発現していることが明らかになった。次に、Netrin1 の 6 種類の受容体すべての新生仔マウス蝸牛における発現部位を検討した。その結果、Unc5B が蝸牛全長にわたって有毛細胞に発現していることが分かった。さらに、IGF1 や Netrin1 による蝸牛器官培養の有毛細胞保護効果が、Unc5B のブロッピング抗体によって阻害されることを示し (図 3) IGF1 - Netrin1 - Unc5B という経路で有毛細胞が保護されることが明らかになった。IGF1 は有毛細胞に直接働くわけではなく、支持細胞から Netrin1 を発現させ、その Netrin1 が有毛細胞に働き有毛細胞の保護を行っていると考えられた。

図 3



また、IGF1 投与によるシグナル経路 MEK/ERK

と PI3K/ACT の両方の活性化を、RT-PCR で証明することができた。

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13件)

Miyoshi T., Yamaguchi T., Ogita K., Tanaka Y., Ishibashi K. I., Ito H., Kobayashi T., Nakagawa T., Ito J., Omori K., and Yamamoto N.: Quantitative Analysis of Aquaporin Expression Levels during the Development and Maturation of the Inner Ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 18: 247-261, 2017. 査読有 doi: 10.1007/s10162-016-0607-3.

Hayashi Y., Yamamoto N., Nakagawa T., Omori K., and Ito J.: Activation of IGF1 Signaling in the Cochlea Induces the Transcription of Its Mediators During the Protection of Cochlear Hair Cells Against Aminoglycoside. *Otol Neurotol* 38: 278-282, 2017. 査読有 doi: 10.1097/mao.0000000000001276.

Yamahara K., Nakagawa T., Ito J., Kinoshita K., Omori K., and Yamamoto N.: Netrin 1 mediates protective effects exerted by insulin-like growth factor 1 on cochlear hair cells. *Neuropharmacology* 119: 26-39, 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.032.

大西 弘恵, Skerleva Desislava, 北尻真一郎, 坂本 達則, 山本 典生, 伊藤 壽一, and 中川 隆之: 段階的分化誘導法を用いたヒト iPS 細胞からの内耳有毛細胞様細胞の誘導. *耳鼻咽喉科ニューロサイエンス* 30: 40-43, 2016. 査読なし doi: なし

山原 康平, 山本 典生, 中川 隆之, and 伊藤 壽一: Netrin1 受容体の蝸牛内における発現. *耳鼻咽喉科ニューロサイエンス* 30: 15-17, 2016. 査読なし doi: なし

Taura A., Taura K., Koyama Y., Yamamoto N., Nakagawa T., Ito J., and Ryan A. F.: Hair cell stereociliary bundle regeneration by espin gene transduction after aminoglycoside damage and hair cell induction by Notch inhibition. *Gene Ther* 23: 415-423, 2016. 査読有 doi: 10.1038/gt.2016.12.

Torii H., Yoshida A., Katsuno T., Nakagawa T., Ito J., Omori K., Kinoshita M., and Yamamoto N.: Septin7 regulates inner ear formation at an early developmental stage. *Dev Biol*

419: 217-228, 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.012.

Nakagawa T., Yamamoto M., Kumakawa K., Usami S., Hato N., Tabuchi K., Takahashi M., Fujiwara K., Sasaki A., Komune S., Yamamoto N., Hiraumi H., Sakamoto T., Shimizu A., and Ito J.: Prognostic impact of salvage treatment on hearing recovery in patients with sudden sensorineural hearing loss refractory to systemic corticosteroids: A retrospective observational study. *Auris Nasus Larynx* 43: 489-494, 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.anl.2015.12.004.

山本 典生, and 伊藤 壽一: 再生医療から見た音声言語医学の未来 再生医学から見た音声言語医学の未来 人工内耳と再生医療. *音声言語医学* 56: 213-218, 2015. 査読無 doi: 10.5112/jjlp.56.213.

山本 典生: 科学技術の進歩と聴覚医学 再生医療技術の聴覚医学への応用. *Audiology Japan* 58: 219-226, 2015. 査読無 doi: 10.4295/audiology.58.219.

Yamahara K., Yamamoto N., Nakagawa T., and Ito J.: Insulin-like growth factor 1: A novel treatment for the protection or regeneration of cochlear hair cells. *Hear Res* 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.heares.2015.04.009.

Ishikawa M., Ohnishi H., Skerleva D., Sakamoto T., Yamamoto N., Hotta A., Ito J., and Nakagawa T.: Transplantation of neurons derived from human iPS cells cultured on collagen matrix into guinea-pig cochleae. *J Tissue Eng Regen Med* 2015. 査読有 doi: 10.1002/term.2072.

Ohnishi H., Skerleva D., Kitajiri S., Sakamoto T., Yamamoto N., Ito J., and Nakagawa T.: Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci Lett* 599: 49-54, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.032.

[学会発表](計18件)

Yamamoto Norio, Yamahara Kohei, Nakagawa Takayuk, Kinoshita Kazuo, Omori Koichi, and Ito Juichi. Netrin1 Mediates the Protection of Cochlear Hair Cells by IGF1 through its Canonical Receptor, UNC5B. In: 41st Annual ARO MidWinter Meeting. San Diego, USA: 2018.

山本 典生, 山原 康平, 中川 隆之, 伊藤 壽一, and 大森 孝一. IGF1 の下流分

子としての Netrin1 の蝸牛有毛細胞保護作用. In: 第 62 回日本聴覚医学会総会・学術講演会. 福岡市: 2017, p. 268. 山本 典生, 山原 康平, 西村 幸司, 扇田 秀章, 中川 隆之, 伊藤 壽一, and 大森 孝一. IGF1 による人工内耳挿入時蝸牛障害の保護効果. In: 第 27 回日本耳科学会総会・学術講演会. 横浜市: 2017, p. 295.

Yamamoto Norio, Torii Hiroko, Yoshida Atsuhiko, Katsuno Tatsuya, Nakagawa Takayuki, Ito Juichi, Kinoshita Makoto, and Omori Koichi. Septin7 regulates apoptosis to achieve gross morphogenesis during the development of inner ears. In: The 40th Annual ARO Midwinter Meeting. Baltimore, MD, USA: 2017.

Yamamoto Norio, Yamahara Kohei, Nakagawa Takayuki, Ito Juichi, and Omori Koichi. Netrin1 mediates the protection of cochlear hair cells by IGF1 through its canonical receptor, UNC5B. In: 54th Workshop on Inner Ear Biology and Symposium. Hannover, Germany: 2017.

山本典生. IGF1 とその下流シグナルによる内耳有毛細胞の保護・再生. In: 第 89 回日本薬理学会年会. 横浜市: 2016. 三好 拓志, 山本 典生, 中川 隆之, 伊藤 壽一, and 大森 孝一. 内耳発生過程におけるアクアポリン 11 の発現と局在. In: 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 名古屋市: 2016, p. 612. 山原 康平, 中川 隆之, 伊藤 壽一, 大森 孝一, and 山本 典生. Netrin1 受容体の蝸牛内における発現. In: 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 名古屋市: 2016, p. 613.

山原 康平, 山本 典生, 中川 隆之, and 伊藤 壽一. Netrin1 受容体の蝸牛内における発現. In: 第 34 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会. 大阪市: 2016, p. 15-17.

山本 典生, 十名 洋介, 中川 隆之, 伊藤 壽一, and 大森 孝一. 蝸牛の単一細胞トランスクリプトーム解析プロトコルの開発. In: 第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会. 長野市: 2016, p. 241. Yamamoto Norio, Tona Yosuke, Nakagawa Takayuki, Ito Juichi, and Omori Koichi. Single-cell Transcriptome Protocol of the Cochlear Development. In: The 39th ARO Midwinter Meeting. San Diego, USA: 2016.

Yamamoto Norio, Hayashi Yushi, Nakagawa Takayuki, Omori Koichi, and Ito Juichi. Activation of IGF-1 Signaling in the Cochlea Induces the Transcription of its Mediators during

the Protection of Cochlear Hair Cells against Aminoglycoside. In: American Neurotology Society 51st Annual Spring Meeting. Chicago, USA: 2016. Yamamoto Norio. Effects of IGF1 to preserve hearing after CI electrode insertion. In: New Trends in Hearing Implant Sciences 2016 - Hakuba meeting in OKUSHIGA -. Shimotakai, Nagano: 2016.

Yamamoto Norio, Tona Yosuke, Kita Tomoko, Ohnishi Hiroe, Nakagawa Takayuki, and Omori Koichi. Single-cell Transcriptome Protocol of the Cochlear Development. In: 53rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France: 2016.

山本 典生, 山原 康平, 中川 隆之, and 伊藤 壽一. IGF1 の下流分子、Netrin1 による内耳有毛細胞保護効果. In: 第 25 回日本耳科学会総会・学術講演会. 長崎市: 2015, p. 622.

Yamamoto Norio. Application of Insulin-Like Growth Factor-1 in the Treatment of Inner Ear Disorders. In: 2015 International Congress of Korean Society of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery. Seoul: 2015.

Nakagawa Takayuki, and Yamamoto Norio. Strategies for Induction of Regeneration in Mammalian Inner Ear. In: 52nd Inner Ear Biology Workshop. Rome: 2015.

Yamamoto Norio, Yamahara Kohei, Nakagawa Takayuki, and Ito Juichi. The expression of Netrin1 receptors in sensory epithelium and spiral ganglion cells of the neonatal cochlea. In: 52nd Inner Ear Biology Workshop. Rome: 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本典生 (Yamamoto, Norio)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 7 0 3 7 8 6 4 4

(2) 研究分担者

中川隆之 (Takayuki, Nakagawa)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 5 0 3 3 5 2 7 0

(3) 研究分担者

坂本達則 (Sakamoto, Tasunori)
公益財団法人田附興風会・医学研究所・研究員
研究者番号： 6 0 4 2 5 6 2 6

(4) 研究分担者

岡野高之 (Okano, Takayuki)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号： 6 0 6 4 2 9 3 1