

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11178

研究課題名(和文) 内耳における組織マクロファージの役割とCsf1r伝達系による制御

研究課題名(英文) Csf1r signaling plays a key role on origin and differentiation of resident macrophages in the developing cochlea

研究代表者

岡野 高之 (OKANO, Takayuki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60642931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛の組織マクロファージの出現時期を明らかにするために胎生9.5日以降のマウス蝸牛でのマクロファージの組織内分布を検討した。Iba1陽性の組織マクロファージは、胎生10.5日に内耳の原基である耳胞周囲に初めて出現し、最終的にラセン神経節・ラセン靭帯・血管条を含めた蝸牛全域に分布していた。次にKi67やpHH3を発現するマクロファージが存在し、蝸牛組織マクロファージが局所増殖により組織内で維持される可能性が示唆された。さらにCsf1r欠損マウスの解析では、卵黄嚢を由来とするCsf1r依存性のマクロファージと、胎児肝を由来とするCsf1r非依存性のマクロファージが存在すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において明らかにされた蝸牛組織マクロファージの発生学的由来や組織内分布は、蝸牛組織マクロファージの機能解明する研究の起点となる。先天性サイトメガロウイルス感染をはじめとする感染性の先天性難聴は、その病態に免疫機構の関与が示唆されるものの詳細は不明であり、未だ治療も確立されていない。蝸牛の免疫機構の理解により、感染性の先天性難聴を含めた内耳疾患における組織マクロファージを標的とした治療の開発へと発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the spatial and temporal pattern of distribution of resident macrophage in the developing cochlea, we analyzed the mouse embryonic cochleae from E9.5 and onward. Resident macrophages expressing Iba1 emerge the mesenchyme surrounding the otocyst as early as E10.5 and then are distributed in the whole cochlea including the spiral ligament, spiral ganglion, and stria vasuclaris. Next we studied the proliferation capacity of cochlear resident macrophages using immunohistochemistry for Ki67 or pHH3, suggesting that self-maintenance of resident macrophages by in situ proliferation. Finally, using Csf1r-null mice, we demonstrated that resident macrophages in the mouse developing cochlea have two distinct origins and characteristics; ones dependent on Csf1r-signaling with yolk sac origin, and the others independent on Csf1r-signaling with fetal liver origin.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛 組織マクロファージ 免疫 発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

内耳は聴覚および平衡覚の受容器であり、多種多様な細胞が整然と配列され機能している。その機能は発現と維持には多くの生体内機構が関与すると考えられるが、未だ不明の点も多い。内耳は固有のリンパ組織を持たず、また外リンパ中の IgG 濃度も低いことから、従来は脳や眼とともに免疫学的に特異な組織とされてきた。しかし近年の研究で耳毒性薬物や強大音響による感覚上皮障害における病態には免疫機構が大きく関わり、さらに組織マクロファージが内耳にも常在することが明らかにされており、組織マクロファージが内耳の恒常性維持において重要な役割を果たす可能性が示唆されている。組織マクロファージは全身の各組織に常在し、恒常性維持と炎症反応において中心的な役割を果たすとともに組織特異的な機能も有するとされる。これに加えて卵黄嚢、胎児肝、骨髄などの由来組織については各組織に特異的な様式を示し、また同一組織内でも由来や局在、機能は多様であり複数のマクロファージ亜集団が存在することが報告されている。例えば脳のマイクログリアは卵黄嚢由来の細胞が脳に定住したのち骨髄造血に依存せず維持されるのに対して、皮膚や腸管の組織マクロファージは胎仔肝由来のマクロファージが移入したのち徐々に骨髄由来のマクロファージに置き換えられる。

しかし蝸牛の組織マクロファージについては、その発生や由来組織、機能など多くのことが不明である

### 2. 研究の目的

本研究においては、マウス蝸牛における組織マクロファージの胎生期からの発生と由来組織についての検討を行った。

### 3. 研究の方法

- 1) 蝸牛の組織マクロファージの出現時期を明らかにするために胎生 9.5 日から生後 21 日までのマウス蝸牛でのマクロファージの組織内分布を検討した。
- 2) Sox10-IRES-VENUS マウスにおいて、蝸牛組織マクロファージは Sox10 の発現を検討した。
- 3) 卵黄嚢由来のマクロファージの分化・増殖を促すとされている Csf1 受容体 (Csf1r) を欠損した遺伝子改変マウスの蝸牛を解析した。

### 4. 研究成果

蝸牛の組織マクロファージの出現時期を明らかにするために胎生 9.5 日以降のマウス蝸牛でのマクロファージの組織内分布を検討した。マウス蝸牛において Iba1 陽性の組織マクロファージは、胎生 10.5 日に内耳の原基である耳胞周囲に初めて出現し、以後発生段階の進行に伴って蝸牛内での分布領域や分布密度を変化させながら、最終的にラセン神経節・ラセン靭帯・血管条を含めた蝸牛全域に分布していた。蝸牛のマクロファージは成体と同様に CD68、Iba-1、F4/80 のタンパクを発現し、発生段階が進行するにつれて球型から紡錘型の細胞体と樹状の細胞突起を持つ形態への移行を示すことから、形態学的にマクロファージが成熟していく過程であると考えられた。次に局所増殖能については Ki67 や pHH3 を発現するマクロファージが P0 期をピークとしてごく少数だが一定の割合で存在し、蝸牛組織マクロファージが局所増殖により組織内で維持される可能性が示唆された。また Sox10-IRES-VENUS マウスにおいて、蝸牛組織マクロファージはいずれも Sox10 の発現を認めず、蝸牛組織マクロファージは神経堤由来の細胞集団とは独立であることが示された。さらに Csf1 受容体 (Csf1r) を欠損した遺伝子改変マウスの蝸牛では、CD11b 陽性マクロファージは野生型マウスと同等に認められたものの、Iba1 陽性マクロファージの数は著しく減少していたことから胎生期の蝸牛組織マクロファージには、卵黄嚢を由来とする Csf1r 依存性のマクロファージと、胎児肝を由来とする Csf1r 非依存性のマクロファージ

が存在すると考えられた。前者は主にラセン神経節やラセン靭帯に分布し、後者は蝸牛軸の間質や外リンパ腔内側壁に分布することが示された。

上記の研究において明らかにされた蝸牛組織マクロファージの発生学的由来や組織内分布は、蝸牛組織マクロファージの機能解明する研究の起点となる。先天性サイトメガロウイルス感染をはじめとする感染性の先天性難聴は、その病態に免疫機構の関与が示唆されるものの詳細は不明であり、未だ治療も確立されていない。蝸牛の免疫機構の理解により、感染性の先天性難聴を含めた内耳疾患における組織マクロファージを標的とした治療の開発へと発展する可能性がある。

- 1) 岡野高之: 内耳の免疫と組織マクロファージ 耳鼻咽喉科免疫アレルギー (JJIAO) 36: 233-238, 2018
- 2) Kishimoto I, Okano T, Nishimura K, Motohashi T, Omori K. Early Development of Resident Macrophages in the Mouse Cochlea Depends on Yolk Sac Hematopoiesis. Front Neurol. 2019 Oct 22;10:1115.
- 3) Okano T, Kishimoto I. Csf1 signaling regulates maintenance of resident macrophages and bone formation in the mouse cochlea. Front Neurol. 2019 Nov 21;10:1224

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kishimoto Ippei, Okano Takayuki, Nishimura Koji, Motohashi Tsutomu, Omori Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Early Development of Resident Macrophages in the Mouse Cochlea Depends on Yolk Sac Hematopoiesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.01115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okano Takayuki, Kishimoto Ippei	4. 巻 10
2. 論文標題 Csf1 Signaling Regulates Maintenance of Resident Macrophages and Bone Formation in the Mouse Cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.01244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okano Takayuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Immune system and resident macrophages in the inner ear	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society of Immunology & Allergology in Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.5648/jjiao.36.233">https://doi.org/10.5648/jjiao.36.233</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡野 高之
2. 発表標題 マウス蝸牛における組織マクロファージの起源
3. 学会等名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ippei Kishimoto, Takayuki Okano, Koichi Omori
2. 発表標題 Proliferation and Maturation of Resident Macrophage in the Mouse Cochlea
3. 学会等名 Association For Research In Otolaryngology 41th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ippei Kishimoto; Takayuki Okano; Koichi Omori
2. 発表標題 Development of Resident Macrophage in the Mouse Cochlea
3. 学会等名 40th Association for Research In Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 典生  (Yamamoto Norio)  (70378644)	京都大学・医学研究科・准教授   (14301)	
研究分担者	田浦 晶子  (Taura Akiko)  (70515345)	藍野大学・医療保健学部・教授   (34441)	