

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11179

研究課題名(和文) 蝸牛感覚上皮予定領域におけるAtoh1発現の時空間的变化と有毛細胞分化制御

研究課題名(英文) Spatio-temporal change of Atoh1 expression in developing cochlear prosensory epithelium visualized by 3D real-time imaging.

研究代表者

楯谷 智子 (Tateya, Tomoko)

京都先端科学大学・健康医療学部・准教授

研究者番号：10512311

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)：哺乳類蝸牛において、聴覚細胞である有毛細胞とその周囲の支持細胞は共通の前駆細胞から分化するとされている。前駆細胞集団(蝸牛感覚上皮予定領域)の中でいかにして有毛細胞となるべき細胞が選ばれ、特有の規則的配列を形成していくかという過程を、Atoh1含む細胞マーカーを蛍光標識できるレポーターマウスを用い、3次元リアルタイムイメージングで取得した画像データを分析することによって初めて明らかにした。さらに、前駆細胞集団の周囲にあって時空間的に変化する各種のシグナル伝達系が、内有毛細胞列と外有毛細胞のパターン形成を制御していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療法のない難聴の殆どが蝸牛有毛細胞の障害を原因とすることから、聴覚再生に向けた研究の多くが有毛細胞の再生を目的としてきた。蝸牛の内有毛細胞と外有毛細胞は機能も異なり、内有毛細胞が聴覚情報を中枢に伝え、外有毛細胞は聴覚情報の増幅器として機能する。蝸牛の有毛細胞は、機能的に分化し高度の規則性をもって配列する細胞であるだけに、それをin vitroで作り出すことは現時点では困難であり、聴覚再生研究における次なるマイルストーンとも言える。本研究は、内有毛細胞と外有毛細胞の分化メカニズムを解明するものであり、この結果はさらなる聴覚再生研究に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During cochlear development, hair cells (HCs) and supporting cells differentiate in the prosensory domain to form the organ of Corti, but how one row of inner HCs (IHCs) and three rows of outer HCs (OHCs) are organized is not well understood. We investigated the process of HC induction by monitoring Atoh1 expression in cochlear explants of Atoh1-EGFP knock-in mouse embryos and showed that only the cells that express Atoh1 over a certain threshold are selected for HC fate determination. HC induction initially occurs at the medial edge of the prosensory domain to form IHCs and subsequently at the lateral edge to form OHCs, while Hedgehog signaling maintains a space between IHCs and OHCs, leading to formation of the tunnel of Corti. These results reveal dynamic Atoh1 expression in HC fate control and suggest that multi-directional signals regulate OHC induction, thereby organizing the prototype of the organ of Corti.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：有毛細胞 蝸牛感覚上皮 Atoh1

1. 研究開始当初の背景

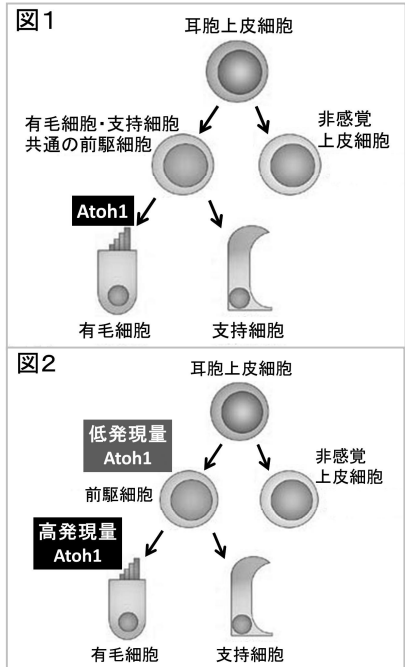
治療法のない難聴の殆どが有毛細胞の障害を原因とすることから、聴覚再生に向けた研究の多くが有毛細胞の再生を目的としてきた。有毛細胞を再生させる方法として概念的には、

- (a) 新しい有毛細胞に分化しうる幹細胞/前駆細胞を移植する
- (b) 支持細胞を有毛細胞に形質転換させる
- (c) 支持細胞の分裂による新たな細胞を誘導して有毛細胞に形質転換する

の3つのアプローチが考えられてきた(山根 2008)。現在のところ、いずれも期待される効果は得られているとはいえない。上記の(b)(c)の修復機構は鳥類など哺乳類以外の脊椎動物では通常見られるものであり、有毛細胞が障害されたら、周囲の支持細胞が増殖し形質変換することで、有毛細胞が再生することが知られている。

他の脊椎動物では保たれている有毛細胞再生能力が、哺乳類ではなくなってしまう理由の一つとして、哺乳類の蝸牛はより進化しており、有毛細胞・支持細胞が特殊なサブタイプに分化していることが考えられている(Groves 2010)。哺乳類の蝸牛感覚上皮が他の動物に比べてより特異度・鋭敏度が増しているとすれば、あらゆる有毛細胞再生の試みにおいて、適切な数の有毛細胞と支持細胞が必要であることを念頭におかなければならない(Groves 2010)。ということは、異所性の有毛細胞を増やすことのみによって聴覚機能回復を図るのは難しいと考えられる。応募者のこれまでの研究においても、過剰な有毛細胞は聴覚機能に寄与せず、むしろ脱落していく傾向にあることが示唆されている(研究業績欄の文献5)。今後は、有毛細胞を再生させるというだけでなく、支持細胞をも含めた感覚上皮全体の再生を目指した研究が必要がある。

哺乳類蝸牛の有毛細胞とその周囲にある支持細胞は、感覚上皮予定領域にある共通の前駆細胞から分化することがわかっている(図1)。Atoh1は神経分化を促進するプロニューラル遺伝子の一つであり、内耳においては有毛細胞分化を促進することが知られている(図1)。現在のところAtoh1遺伝子導入により有毛細胞を分化誘導することはできるが、支持細胞を分化誘導する方法は知られていない。一方、蝸牛感覚上皮予定領域の前駆細胞においてもAtoh1の発現がみられると報告されてきたが、その発現様式については文献上意見の一致をみておらずまたその役割も不明である。応募者は予備実験によって、前駆細胞ではAtoh1は低発現量でありかつ発現量が不均一であるのに対し、有毛細胞への分化が運命づけられた細胞ではAtoh1は高発現量であることを見出した(図2、図3)。このようにダイナミックなAtoh1発現様式の変化は、低発現量Atoh1が有毛細胞・支持細胞共通の前駆細胞を運命づけ、さらには高発現量Atoh1が有毛細胞へと運命づける役割を担っていることを示唆するものである(図2)。



2. 研究の目的

哺乳類では成熟した有毛細胞は一度障害を受けると再生せず、このことが難聴の多くが治療困難である原因と考えられている。応募者は有毛細胞を含む蝸牛感覚上皮の発生過程につき研究し、有毛細胞再生医療への応用を目指している。

本研究では、有毛細胞・支持細胞共通の前駆細胞が運命決定される過程で、有毛細胞分化促進因子であるAtoh1発現様式がダイナミックに変化することに着目し、2蛍光色3Dタイムラプス撮影により個々の前駆細胞におけるAtoh1発現様式の時空間的な変化および有毛細胞・支持細胞分化への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究はマウスを用いた動物実験から成る。蝸牛有毛細胞・支持細胞共通の前駆細胞におけるAtoh1の動的・時空間的な発現様式とその意義を明らかにするために、より高感度なAtoh1検知方法を用い、Atoh1陽性細胞のリアルタイム追跡(培養蝸牛の2蛍光色3Dタイムラプスイメージング)を行なう。また、前駆細胞集団の周囲にあって時空間的に変化する各種のシグナル伝達系につき、その促進剤あるいは阻害剤を用いることによるAtoh1の発現動態への影響を検出し、内毛細胞列と外毛細胞のパターン形成がどのように制御されているかを調べる。

4. 研究成果

蝸牛感覚上皮予定領域の中でいかにして有毛細胞となるべき細胞が選ばれ、特有の規則的配列を形成していくかという過程を、Atoh1含む前駆細胞、有毛細胞、支持細胞のそれぞれを蛍光標識できるレポーターマウスを用い、3次元リアルタイムイメージングによって前駆

細胞集団を観察し、有毛細胞と支持細胞への分化を示す蛍光の時空間的発現を観察した。次いで、得られた経時的3次元画像データを分析し、個別の細胞の軌跡と蛍光強度の変化を追跡することによって、前駆細胞から有毛細胞への運命決定と配列形成の過程を初めて明らかにした。さらに、前駆細胞集団の周囲において時空間的に変化するヘッジホッグシグナル伝達系と Bmp4 シグナル伝達系が、内有毛細胞列と外有毛細胞のパターン形成を制御していることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li Y, Jia S, Liu H, Tateya T, Guo W, Yang S, Beisel KW, He DZZ.	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of Hair Cell-Like Cells Converted From Supporting Cells After Notch Inhibition in Cultures of the Organ of Corti From Neonatal Gerbils.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2018.00073.	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 該当する

1. 著者名 Tateya Tomoko, Sakamoto Susumu, Ishidate Fumiyoshi, Hirashima Tsuyoshi, Imayoshi Itaru, Kageyama Ryoichiro	4. 巻 146
2. 論文標題 Three-dimensional live imaging of Atoh1 reveals the dynamics of hair cell induction and organization in the developing cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 177881 ~ 177881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1242/dev.177881	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Susumu Sakamoto; Tomoko Tateya; Koichi Omori; Ryoichiro Kageyama.
2. 発表標題 The role of Id genes in mammalian developing cochlea.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 41rd MidWinter Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Tateya; Susumu Sakamoto; Fumiyoshi Ishidate; Itaru Imayoshi; Ryoichiro Kageyama.
2. 発表標題 Three-dimensional real-time imaging reveals the dynamics of hair cell specification and organization in developing cochlea.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 41rd MidWinter Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楯谷智子, 坂本進, 石館文善, 今吉格, 影山龍一郎
2. 発表標題 蝸牛胎仔蝸牛の感覚上皮予定領域におけるAtoh1の動的発現パターン
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 楯谷智子, 坂本進, 影山龍一郎
2. 発表標題 蝸牛感覚上皮予定領域におけるAtoh1の動的発現パターン
3. 学会等名 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoko Tateya, Susumu Sakamoto, Fumiyoshi Ishidate, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama
2. 発表標題 Dynamic Atoh1 expression in prosensory domain visualized by 2-color fluorescence 3D real-time imaging.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 40rd MidWinter Meeting (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
研究協力者	影山 龍一郎 (Kageyama Ryoichiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今吉 格 (Imayoshi Itaru)		
研究協力者	坂本 進 (Sakamoto Susumu)		