

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2006 ～ 2008

課題番号： 18390457

研究課題名(和文) プロテオミクスによる内耳有毛細胞再生への新戦略

研究課題名(英文) New Strategy for the Hair Cell Regeneration Research using Proteomics

研究代表者

喜多 知子 (KITA TOMOKO)

独立行政法人理化学研究所 感覚器官発生研究チーム・研究員

研究者番号： 20362519

研究成果の概要：

内耳再生するニワトリと内耳再生しないマウスとで比較解析を行い、効率的な内耳再生誘導因子の探索を試みた。まず両者で共通する内耳障害モデルを作成し、サンプル採取時期・採取法を設定した。次に、ニワトリ初期胚を用いて、Stage6-8(内耳 otic cup 形成開始期)と Stage10(内耳 otic vesicle 形成終了期)の otic 領域と otic 以外の ectoderm 領域とをマイクロアレイ比較解析して、内耳形成関連因子を抽出した。また、候補遺伝子をニワトリまたはマウス内耳の標的細胞に導入する為の手法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：(1) 内耳再生 (2) 蝸牛有毛細胞 (3) ゲノミクス (4) ニワトリ (5) 内耳発生 (6) 初期胚

1. 研究開始当初の背景

現代医学では、失聴者・難聴者に対する治療は困難である。人工内耳・補聴器の使用による聞こえの補助はできても、聴覚を司る内耳有毛細胞が一旦消失してしまうと、その再生は不可能である。老人性難聴などから起因する聴力の低下は、生活能力の低下へとつながり、昨今の高齢化社会において大きな問題とされている。これに対し、世界中で「内耳

再生プロジェクト」が遂行され、様々な検討が行われている。中でも、atoh1 などの転写因子が鍵をにぎるとされているが、いまだ治療に直結する内耳再生は実現していない。

本研究「プロテオミクスによる内耳有毛細胞への新戦略」は、内耳再生能力を有するニワトリと有しないマウスとで比較解析を行い、効率的な再生誘導分子の検索に役立てようという内容のものである。2004年12月に、

ニワトリゲノムの全塩基配列が解読された。ニワトリゲノムが開示されたことは、世界中で足踏み状態の「内耳再生研究」に新たな輝石を投じるものであり、この情報利用こそ、今後の研究推進を左右しうる有力手段になるといっても過言ではない。

2. 研究の目的

鳥類・魚類・両生類と異なり、哺乳類では、聴覚を司る蝸牛有毛細胞が一旦傷害されてしまうと再生しない。本研究は、内耳再生するニワトリと内耳再生しないマウスとで、傷害後の内耳組織のプロテオーム比較解析を行い、内耳再生誘導因子を同定する。プロテオミクスだけでなくゲノミクスも同時進行する。具体的には、ニワトリとマウスとで、内耳傷害後の再生時期における発現タンパク質を網羅的に比較探索する。

マウスやヒトゲノムに比べ、ニワトリゲノムは、未知遺伝子が多いのが特徴である。我々は、遺伝子の塩基配列情報を、ニワトリとヒトもしくはマウスとで迅速かつ相互に配列検索するシステムを立ち上げた。これにより、候補となる誘導因子が未知遺伝子であっても、その遺伝子名の推定はたやすい。傷害を受けたニワトリ内耳に特異的に発現しているタンパク質（遺伝子）が、有毛細胞再生に関わる因子であり、逆も然り（ニワトリで発現抑制されているものは、再生を阻害する因子）と推定される。鳥類の再生能力が、傷害を感知し再生を誘導する膜タンパク質の存在によると予想し、膜タンパク質の発現変化に着目して遂行する。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ・マウス内耳傷害条件：

ニワトリとマウスに共通する内耳傷害条件およびサンプル採取時期の設定を行なう。孵化後（生後）の内耳の *in vitro* 器官培養系において、アミノグリコシド系抗生物質（ゲンタマイシンまたはネオマイシン）を種々の投与量・投与回数で添加して有毛細胞に傷害を与える。そして経時的に標本を固定し、免疫染色（Myosin7a, phalloidin, TUNEL, DAPI）を行った。ニワトリ蝸牛器官培養系（抗生物質無添加）を評価する目的で、*in vivo* 実験系も検討した。

(2) 内耳サンプル処理：

フローサイトメトリー FACSArea, FACSCalibur (BD 社) を用いて、細胞周期別あるいは細胞種別（有毛細胞・支持細胞）の解析および細胞回収を行う。内耳組織からの細胞単離法、PI や Hoechst33342 染色による細胞周期解析や Myo7a による有毛細胞の

回収を調べた。

(3) ニワトリ内耳ゲノミクス解析：

(1)(2)で得られたマウスおよびニワトリの内耳サンプルを解析する前段階として、ニワトリの初期胚を用いて内耳形成に関わる因子をマイクロアレイ解析 (Affymetrix 社) した。再生能力をもつニワトリで検討することにより、発生過程と再生過程とで共通する因子が見つかる可能性が高い。サンプルは、初期胚 Stage6-8 (内耳 otic cup 形成開始期) と Stage10 (内耳 otic vesicle 形成終了期) の otic 領域と otic 以外の ectoderm 領域とした。

(4) ニワトリ・マウス内耳への遺伝子導入：

候補遺伝子の内耳への導入条件について、以下の内容で検討した。

①電気穿孔法

②ウイルスベクター法 (図 1)

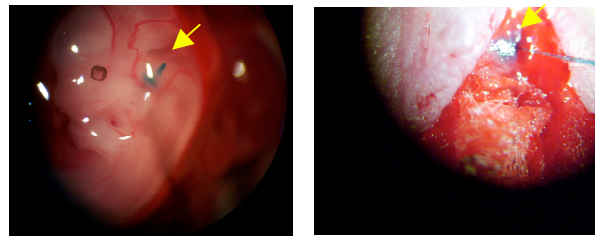


図 1 マウス内耳投与(左:E12.5、右:P4)

4. 研究成果

(1) 内耳傷害モデル作成：

ニワトリは、ゲンタマイシンにより *in vitro* 感覚上皮層培養系および *in vivo* 系で傷害および再生モデルを作成した。有毛細胞の脱落の後に再生細胞 (Myo7a+/BrdU+/DAPI+) を確認した (図 2)。

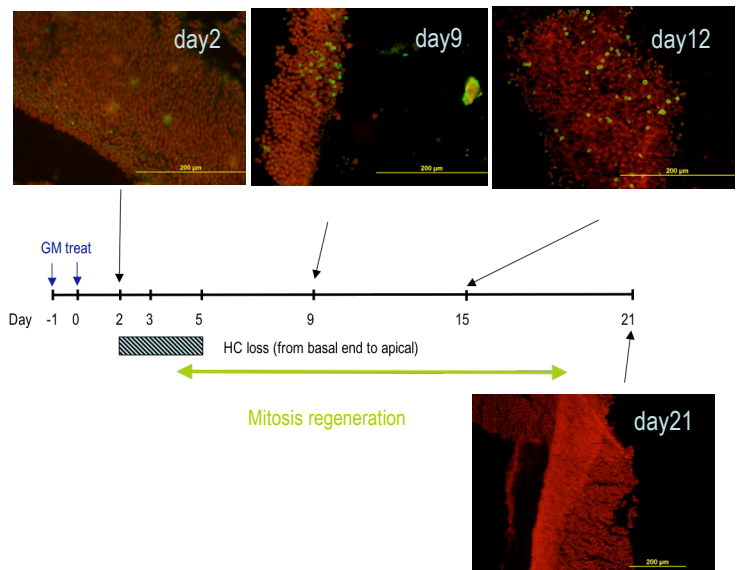


図 2 ニワトリ *in vivo* 系障害・再生モデル(写真は蝸牛感覚上皮、赤 MyoVIIa、緑 BrdU)

マウスは、ネオマイシンにより *in vitro* 系器官培養系で確立した。従来の報告通り、ニワトリとマウスでは薬剤感受性に違いがあること、投与濃度を調節することにより、ほぼ同様のタイムコースで傷害を起こすことが可能であることが、明らかとなった。

(2) 内耳サンプルの FACS 解析 :

①蝸牛組織から細胞を単離するには、コラゲナーゼ/ディスペラーゼ処理が最も有効であった。

②有毛細胞の傷害・再生時には種々の因子がダイナミックに変化することからサンプル採取時期は経時的に細かく区切る必要があると考えられた。

③Hoechst33342 染色により生細胞の回収は可能だが解析するには相当量の内耳サンプルを準備する必要があること、が判明した(図 3)。

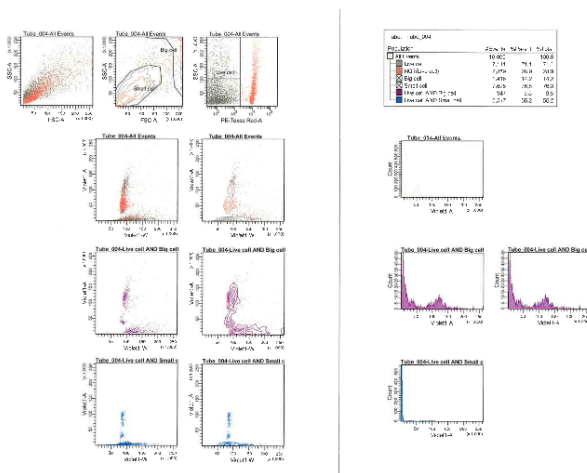


図 3 ニワトリ前庭感覚上皮の FACS 解析結果
増殖期細胞は分離採取できるが、その割合は非常に少ない。

以上より、解析用サンプルは、A)傷害を受け再生中のニワトリ内耳、B)正常なニワトリ内耳、C)傷害を受けたマウス内耳、D)正常なマウス内耳、の 4 種類必要であるとされた。傷害後の内耳については、多段階かつ時系列での変化を見るため、経時的に準備する。

(3) ニワトリ内耳ゲノミクス解析 :

マイクロアレイ解析の結果、以下のことが明らかとなった。

①一つの解析あたり 80-100 の初期胚を必要とした。

②Stage10 の時期で otic 領域に特異的に発現している遺伝子 (P value<0.05) は 1386 個あり、そのうち遺伝子名・働きの明らかなものは約 8 割を占めた。

③既知の遺伝子の中で、顕著に up-regulate しているものとして、繊維芽細胞

増殖因子 (fgf) 18 や LIM/ホメオボックス転写因子 (islet1) が、顕著に down-regulate しているものとして、fgf レセプター様因子 (fgfr1) 1、GATA 配列認識型転写調節因子 (gata) 5、ホメオボックス転写調節因子 (hoxB) 3 などが挙げられた。

現在、これら内耳形成関連候補因子 (未知遺伝子を含む) について、網羅的に *in situ* hybridization を行い、発現部位・発現時期の詳細を検討している。

(4) ニワトリ・マウス内耳への遺伝子導入 :

候補となる遺伝子の解析には、障害内耳の有毛細胞または支持細胞に遺伝子を発現させることが必要である。今回、様々な時期の内耳への標的指向性遺伝子導入法を検討した。

①電気穿孔法による *in vitro* 系での一過性発現

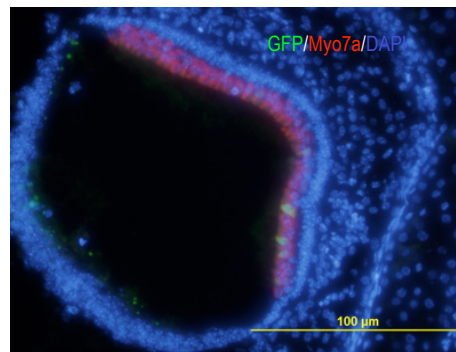
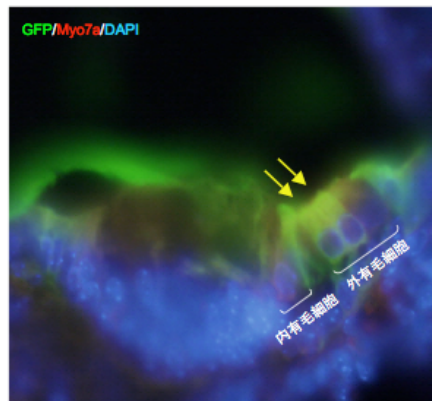
(1) ニワトリ : embryo (stage 6, *in ovo*) から young adult の器官培養では可能

(2) マウス : neonatal の器官培養では可能、young adult では器官培養自体が難しく不可能

②ウイルスベクターによる *in vivo* 系での一過性または恒常的発現

(1) ニワトリ : Arcus virus による恒常的発現は可能

(2) マウス : AAV による一過性発現は可能、Lenti virus による恒常的発現は限定された投与期間 (マウス胚 E12.5 前後の *in utero*) でのみ可能(図 4)



ウイルスベクターの投与法は、半規管への持続インフュージョンが低侵襲で良い。但し Lenti virus は、neonatal 以降中央階（内リンパ腔）に分布せず、外リンパ腔の lining cell に発現する。

以上の結果より、内耳形成関連候補因子の障害内耳への標的指向型遺伝子導入法が確立された。

本研究では、当初の目的であるプロテオミクス解析は完遂されなかったが、サンプルの条件設定と新規候補因子の標的指向型遺伝子導入法を確立でき、さらにマイクロアレイによる内耳形成関連候補因子の情報を入手した。現在、得られた有毛細胞再生候補因子について、in situ hybridization 等で発現を調べるとともに、遺伝子導入実験を進めている。

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 15 件)

- ① Okano T, Nakagawa T, Kita T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J. Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *J Neurosci Res.* 2008; 86(8):1758-67. 査読有
- ② Freter S, Muta Y, Mak SS, Rinkwitz S, Ladher RK. Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development.* 2008; 135(20):3415-24. 査読有
- ③ Sai X, Ladher RK. FGF signaling regulates cytoskeletal remodeling during epithelial morphogenesis. *Curr Biol.* 2008; 18(13):976-81. 査読有
- ④ Higashi T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Sakamoto T, Ito J. Effects of bone morphogenetic protein 4 on differentiation of embryonic stem cells into myosin VIIa-positive cells. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2007; (557):36-40. 査読有
- ⑤ Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J. Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009; 266(3): 367-71. 査読有
- ⑥ Matsumoto M, Nakagawa T, Kojima K, Sakamoto T, Fujiyama F, Ito J. Potential

of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res.* 2008; 86(14): 3075-85. 査読有

- ⑦ Hori R, Nakagawa T, Sakamoto T, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J. Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. *Neuroreport.* 2007; 18(18): 1911-4. 査読有
 - ⑧ Lee KY, Nakagawa T, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, Lee SH, Ito J. Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol.* 2007; 28(7): 976-81. 査読有
 - ⑨ Nakagawa T, Ito J. Endoscopic modified Lothrop procedure for postoperative frontal mucocele. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2007; (557): 51-4. 査読有
 - ⑩ Nakagawa T, Asato R, Ito J. Cholesterol granuloma of the posterior ethmoid sinus mimicking meningocele. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2007; (557): 47-50. 査読有
 - ⑪ Nakagawa T, Ito J. Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2007; (557): 30-5. 査読有
 - ⑫ Sharif S, Nakagawa T, Ohno T, Matsumoto M, Kita T, Riazuddin S, Ito J. The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy. *Neuroreport.* 2007;18(4):351-4. 査読有
 - ⑬ Sakamoto T, Ito J, Ladher RK. Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear. *Neuroreport.* 2007; 18(9): 841-4. 査読有
 - ⑭ Okano T, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Ito J. Cell-gene delivery of brain-derived neurotrophic factor to the mouse inner ear. *Mol Ther.* 2006; 14(6): 866-71. 査読有
 - ⑮ Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J. Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope.* 2006; 116(4): 529-33. 査読有
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Nakagawa T. Hydrogen Rescues Auditory Hair Cells From Reactive Oxygen Species. Association for Research in Otolaryngology, 32nd MidWinter Meeting, Feb 14-19,2009,

Baltimore, USA

- ② Nakagawa T. The potential of cell therapy for hearing loss caused by degeneration of the spiral ligament. Inner Ear Biology, Sept 20-24, 2008, Ferrara, Italy.
- ③ Nakagawa T. Cell Therapy for Functional Regeneration of Spiral Ganglion Neurons. Association for Research in Otolaryngology, 31st MidWinter Meeting, Feb 16-21,2008, Phoenix, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 知子 (KITA TOMOKO)

独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究チーム・研究員

研究者番号：20362519

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

ラージ ラダ (RAJ LADHER)

独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究チーム・チームリーダー

研究者番号：70392173

中川 隆之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50335270

安里 亮 (ASATO RYO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70283603

坂本 達則 (SAKAMOTO TATSUNORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60425626