

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16876

研究課題名(和文)内リンパ囊の細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of cell differentiation in the endolymphatic sac

研究代表者

本田 圭司(Keiji, Honda)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90621079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：内リンパ囊は内耳の正常な発生や機能の維持に不可欠な組織であり、その異常は前庭水管拡大症などの内耳疾患を引き起こす。今回我々は内リンパ囊を構成する二つの細胞である mitochondria-rich cell と ribosome-rich cell の細胞分化機構を解明するために、マウス内リンパ囊の組織培養を行い、転写制御候補遺伝子のノックダウンにより細胞分化に与える影響を観察することを試みた。種々の方法を試みたが、内リンパ囊を培養し維持する際に上皮の収縮などがおこり、顕微鏡検査が可能な安定した形態を保つことに問題が生じた。内リンパ囊 MRC によるイオン輸送および水吸収作用が影響していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内リンパ囊細胞の分化機構の解明は前庭水管拡大症の治療法の確立に極めて重要な意義を持つ。たとえば、イオン輸送関連遺伝子の変異によりタンパクレベルでイオン輸送機能低下を有している場合においても、前駆細胞から MRC への分化を誘導させその細胞数を増加させることによって、機能低下を補完できる可能性がある。また別の可能性として、ES/iPS 細胞から MRC に分化誘導する手法を構築し、治療へつなげることも考えられる。

研究成果の概要(英文)：The endolymphatic sac is essential for the normal development and function of the inner ear, and its abnormality causes inner ear diseases such as enlarged vestibular aqueduct. To elucidate the cell differentiation mechanism of mitochondria-rich cells and ribosome-rich cells, which are the two cell types constituting the endolymphatic sac, we attempted to observe the effects of knockdown of candidate genes for transcriptional regulation on cell differentiation in mouse endolymphatic sac tissue culture. Although we tried various protocols, contraction of epithelial tissues occurred during culture of the endolymphatic sac, leading to problems in maintaining a stable morphology that could be examined under a microscope. It is thought that ion transport and water absorption by MRC may have affected the morphology of the cells.

研究分野：耳科学

キーワード：内リンパ囊 イオノサイト 細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内耳は、聴覚を感知する蝸牛、平衡覚を司る前庭、および内リンパ嚢で構成され、各々は小さな管で連結しておりその内部は内リンパで満たされひとつの膜迷路を形成している。

そのうち内リンパ嚢は、①骨迷路外から突出し頭蓋内に交通している、②内耳発生のごく初期に形成される、最も原始的な内耳を有する円口類から哺乳類に至るまで共通してみられる構造である、といった特徴を持っており、内耳の形成や機能の維持に極めて重要な組織であることが推定される。しかしながら、蝸牛や前庭に比して十分な研究が行われているとはいえ、その詳細は未解明な点が多い。

形態学的には内リンパ嚢上皮には少なくとも2種類の細胞があることが報告されてきた。上皮細胞の30%は Mitochondria-rich cell (MRC) と呼ばれ、豊富なミトコンドリアと微絨毛を有し典型的には内腔に突出した形状を呈するが、残りの70%を占める Ribosome-rich cell (RRC) は、微絨毛が少なく、その表面は平坦である。

研究代表者は、米国国立衛生研究所留学中に先天性難聴の小児に最も多い内耳奇形である前庭水管拡大症の研究に携わった。そこで前庭水管拡大症の形成には胎生期での内リンパ嚢の内リンパ吸収機能不全が関わることに着目し、まず正常なマウス内リンパ嚢の分子生物学的機構を明らかにすべく研究を行った。用手的な解剖と酵素処理の併用により内リンパ嚢上皮のみを単離採取することに成功し、さらに単一細胞に解離して次世代シーケンサーを用いたシングルセル遺伝子解析 (Single-cell RNA-seq) を行った (Honda et al. eLife, 2017)。その結果、内リンパ嚢上皮はこれまでの形態学的な報告と一致して遺伝子発現的にも2種類の細胞に分類されることが判明し、またそれぞれの細胞特異的マーカー遺伝子を多数同定することができた。MRC においては、これまで報告されている前庭水管拡大症の原因遺伝子である *Slc26a4*, *Atp6v0a4*, *Atp6v1b1*, *Foxi1* に加え、多数のチャネルやトランスポーターをコードした遺伝子が発現しており、イオン輸送に重要な役割を担っていると考えられた。一方 RRC は、細胞外マトリックス形成に関連した遺伝子を発現しており、内リンパ嚢の発生や形態維持に必要と思われた。また30日齢の RRC では免疫応答に関する遺伝子の発現が強くなっていたことから、生体防御における内リンパ嚢の関わりも示唆された。さらに胎生期の内リンパ嚢を含めた単一細胞の遺伝子プロファイルを解析した結果からは、発生初期の内リンパ嚢前駆細胞は細胞分裂を行いながら成熟した RRC へと分化し、その一部が MRC へと特殊化することが推定された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内リンパ嚢の細胞分化に関わる分子生物学的機構を *ex vivo* 実験系で明らかにすることである。特に、イオン輸送に関わる MRC を誘導し増加させる因子が明らかになれば、前庭水管拡大症の治療法を確立できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 蝸牛や前庭における器官培養はすでに確立された技術であるが、マウス内リンパ嚢を採取しその組織構造を保ったまま長期間維持する試みは未だなされていない。この実験が困難とされてきた背景には、内リンパ嚢は袋状の単層上皮に結合組織や骨組織が取り囲む構造をしているため、手技的に組織を採取することが困難であった点が挙げられる。

研究代表者は既報告においてその解剖手技を確立し、安定した細胞を採取し RNA シーケンシ

ングや whole mount 免疫染色を行うことに成功している。本研究ではまずその技術を組織培養系に発展させることを行った。日齢 0-5 の C57BL/6J 野生型マウスを用いて内リンパ嚢を採取し、嚢状の構造を保った 3 次元培養とする、または 嚢を 2 枚におろして上皮シートとして平面培養とする、二つの手法を試みて必要な培地やスキヤフォールドの最適化を試みた。

4 . 研究成果

種々の方法を試みたが、内リンパ嚢を培養し維持する際に上皮の収縮などがおこり、顕微鏡検査が可能な安定した形態を保つことに問題が生じた。内リンパ嚢 MRC によるイオン輸送および水吸収作用が影響していると考えられた。引き続き培養条件の最適化を試みるとともに、シングルセル解析による分化誘導因子の同定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honda K, Lee HJ, Griffith AJ, Roux I	4. 巻 169
2. 論文標題 Dissection of the Endolymphatic Sac from Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of visualized experiments : JoVE	6. 最初と最後の頁 e62375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/62375	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 Honda Keiji, Griffith Andrew J.	4. 巻 141
2. 論文標題 Genetic architecture and phenotypic landscape of SLC26A4-related hearing loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HUMAN GENETICS	6. 最初と最後の頁 455-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-021-02311-1	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 該当する
1. 著者名 Ito Taku, Fujikawa Taro, Honda Keiji, Makabe Ayane, Watanabe Hiroki, Bai Jing, Kawashima Yoshiyuki, Miwa Toru, Griffith Andrew J., Tsutsumi Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Cochlear Pathomorphogenesis of Incomplete Partition Type II in Slc26a4-Null Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JARO-JOURNAL OF THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY	6. 最初と最後の頁 681-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10162-021-00812-4	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 -
1. 著者名 本田 圭司, 堤 剛	4. 巻 77
2. 論文標題 内リンパ囊のイオン輸送機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 574-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田 圭司, 堤 剛
2. 発表標題 マウス内リンパ嚢上皮におけるアクアポリンmRNAの発現
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------