

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007 ~ 2008 年度  
 課題番号： 19791207  
 研究課題名 (和文) BMP シグナル活性化による内耳有毛細胞の再生  
 研究課題名 (英文) Regeneration of Inner Ear Hair Cells Through Activation of BMP Signaling  
 研究代表者 坂本 達則 (SAKAMOTO TATSUNORI)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号： 60425626

## 研究成果の概要：

ほ乳類では内耳有毛細胞はいったん傷害されると再生することがない。BMP-4 は有毛細胞の発生に関わる重要な因子である。本研究では BMP シグナルの操作による有毛細胞再生の可能性について検討した。BMP-4、Noggin などは発生中の内耳での発現が確認され、耳胞培養系では培養条件を確立、有毛細胞の評価型として用いることが出来ることを確認した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：内耳再生、有毛細胞、BMP-4、感音難聴

## 1. 研究開始当初の背景

内耳有毛細胞は、ニワトリなどでは傷害を受けても再生し、聴覚機能が回復することが知られている。しかし、マウスや人では有毛細胞は全く再生せず、いったん低下した聴力は回復が非常に難しい。この違いは何である

うか。あるいは、有毛細胞が再生するときに何が起きているのであろうか。現在のところ、ニワトリの蝸牛の有毛細胞が傷害を受けたあと、有毛細胞と有毛細胞の間に存在する支持細胞が細胞分裂し、新たな有毛細胞と支持細胞を生むという現象は確認されている。

しかし、ニワトリで有毛細胞傷害がどのようにして細胞分裂を引き起こすのか、なぜ哺乳類では細胞分裂がおこらないのかは分かっていない。

耳胞（後脳両側の袋状の構造の構造）の壁の一部が感覚上皮と呼ばれる細胞集団になり、ここに存在する前駆細胞が有毛細胞と支持細胞に分化する。

最近2つのグループが相次いでニワトリ耳胞の培養に BMP4 とその抑制因子 Noggin を加えて有毛細胞の数が変化することを示したが (Pujades et al., Dev Biol, 2006 ; Li et al., BMC Developmental Biology, 2005)、生じた有毛細胞の数は反対の結果になった (左表)。BMP4 とその抑制因子が有毛細胞の増殖や運命決定に重要な役割を果たしていることは明らかであるが、その作用は単純ではないと予想される。このような実験は哺乳類 (マウス) では行われていない。その理由としては、マウスの初期の内耳の培養がニワトリに比べて困難であること、BMP4 のノックアウトマウスが胎生 9~10 日程度で、胎内で死亡するため、有毛細胞が出現する胎生 14 日以降の解析は不可能であることなどがあげられる。BMP シグナルの操作は哺乳類の有毛細胞を再生させるシグナルの有力な候補であるが、内耳有毛細胞の再生に用いるにはその作用メカニズムを解明することが不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、内耳有毛細胞の増殖・運命決定に重要な役割を果たす因子について、BMP-4 のシグナルを中心に検討し、これを操作することで内耳有毛細胞の再生、感音難聴の改善を目指すものである。

## 3. 研究の方法

本研究では BMP4 のノックアウトマウスを用いるが、動物実験施設に搬入し、清浄化するのに 2 ヶ月程度かかる。その間に、BMP4 およびその抑制因子である Noggin について正常マウスでの発現パターンを調べる。BMP シグナルは BMP タンパクとその抑制因子とのバランスで決定されており、抑制因子は多数報告されているが、本研究ではニワトリですでに関連が示されている Noggin を選んだ。ノックアウトマウスホモ接合体が得られたところで、耳胞培養による解析を行う。

ここから読み取った BMP4 の役割から BMP4/Noggin の投与スケジュールを決定し、*in vitro* 実験として培養内耳に対して有毛細胞傷害を与えたモデル培養系で、次には *in vivo* 実験として内耳傷害モデルマウスでその効果を確認する。

### 1) ノックアウトマウス

BMP4 遺伝子アレルの一つを LacZ で置換したノックアウトマウス (BMP-4lacZ/+) を入手し、BMP-4lacZ/lacZ を作成する。

### 2) 関連遺伝子の正常発現パターンの詳細な解析

正常胚および上記のノックアウトマウスを用いて whole mount、及び切片を用いた *in situ* hybridization 及び免疫染色によって BMP-4、Noggin などの因子や、Pax2、Math1、Sox2、p27Kip1 などの内耳関連の因子の発現について検討する。

### 3) 耳胞培養、タンパク添加の効果 (BMP-4、Noggin)

正常マウス、及びノックアウトマウスから耳胞を摘出して培養する。様々なマーカーの発現を検討して BMP-4 の役割を明らかにする。ここに BMP-4、Noggin をタンパクで添加する

ことで rescue の効果を見る。

#### 4) 耳胞培養と関連因子の添加による効果

正常マウス、BMP4 ノックアウトマウスの耳胞を培養し、感覚上皮 (Sox2, p27Kip1)、有毛細胞 (Atoh1, MyosinVIIa)、支持細胞 (p27Kip1, S100)、細胞分裂・細胞死 (BruU ラベル, Ki67, TUNEL) などを免疫染色と in situ ハイブリダイゼーション法を用いて調べること、BMP4 が有毛細胞発生のどの段階にどのような役割を持っているのかを知る。別に導入した Math1-GFP は発生早期の有毛細胞の検出に用いることが出来るので、これも応用する。

#### 5) 有毛細胞傷害時の BMP4, Noggin の効果

マウスの内耳培養に対して、あるいは全身投与でアミノ配糖体を用いて有毛細胞傷害を与えることができることが分かっているが、ここに BMP4/Noggin を添加して、有毛細胞の再生を確認する。

### 4. 研究成果

#### 1) ノックアウトマウス

BMP4 遺伝子アレルの一つを LacZ で置換したノックアウトマウス (BMP-4lacZ/+) を入手し、動物実験施設搬入のためのクリーニング、およびホモ接合体作成のための繁殖を行った。

また、有毛細胞発生をより早い段階で、確実に検出できるようにするために、Atoh1 遺伝子のプロモータ下に EGFP を配したトランスジェニックマウス (Math1-GFP) も同時に導入し、クリーニング、繁殖を行った。

#### 2) 関連遺伝子の発現パターンの解析

正常胚および生後マウス、上記ノックアウトマウスを用いて、様々な分子の発現を免疫

染色および in situ hybridization で調べた。

耳胞、および感覚上皮における BMP-4、Pax2、Math1、p27Kip1 などの発現を確認した。

#### 3) 耳胞培養

様々な発生段階のマウスから耳胞を摘出し、in vitro での培養条件を検討した。一般的には血清の添加が行われているが、この場合は血清は必ずしも耳胞の生存率を改善せず、代用血清を用いる方が好ましいことが分かった。しかし、代用血清も省略して glucose のみの添加では十分な発育を得ることが出来なかった。

発生初期の様々な段階のマウス胚から耳胞を摘出し、in vitro での培養条件を検討した。代用血清を用いた培地で発生初期の内耳のマーカーである Pax2 の発現を指標にして免疫染色で評価したところ、BMP4 は Pax2 発現に何らかの影響があることが分かった。また、ソニックヘッジホッグも Pax2 発現に対して影響があることが分かった。詳細は現在解析中である。

### 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5件)

1. Sakamoto T, Ito J, Ladher RK Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear. Neuroreport. 18(9)841-4, 2007, 査読有
2. Hori R, Nakagawa T, Sakamoto T, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. Neuroreport, 18(18), 1911-14, 2007, 査読有
3. 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. 86 2075-85, 2008. 査読有

4. Ogita H, Nakagawa T, Lee KY, Inaoka T, Okano T, Kikkawa YS, Sakamoto T, Ito J. Surgical Invasiveness of Cell ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. Transplantation into the Guinea Pig Cochlear Modiolus.71 31-39, 2008, 査読有
5. Horie R, Nakagawa T, Sugimoto Y, Sakamoto T, Yamamoto N, Hamaguchi, K, Ito J. Prostaglandin E Receptor Subtype EP4 Agonist Protects Cochleae Against Noise-Induced Trauma, Neuroscience, 2009, 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 坂本達則, ラージ・ラダ, 伊藤壽一. 耳胞のパターニングに対する後脳の役割. 第108回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2007年5月17日, 金沢
2. Sakamoto T, Nakagawa T, Horie R, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J. Pharmacological inhibition of Notch signaling in damaged cochleae of guinea pigs. Age Related Hearing Impairment, International Congress 2007. 2007年6月17日、アントワープ
3. Tatsunori Sakamoto, Juichi Ito, Raj Ladher. Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear, 44th Inner Ear Biology Workshop, 2007. 9. 17-19, LONDON
4. 坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一. 耳胞のパターニングに対する後脳の役割. 第17回日本耳科学会総会・学術講演会. 平成19年10月18日-20日. 福岡
5. Sakamoto T, Nakagawa T, Horie R, Ito J, Tabata Y, Ishiara T, Higaki M. Inner Ear Therapies Against Hearing Impairment and Tinnitus Using Inner Ear Drug Delivery Systems. Conference on Cell Replacement in the Inner Ear. 2008. 6. 13-15, Bethesda
6. Sakamoto T, Nishimura K, Inaoka T,

Nakagawa T, Ito J. Inner Ear Regeneration by Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. 45th Inner Ear Biology Workshop (IEB2008). 2008. 9. 21, Ferrara

7. Sakamoto T, Horie R, Nakagawa T, Tabata Y, Ito J. Treatment of Tinnitus by Lidocaine Using Inner Ear Drug Delivery, ARO 2009 MidWinter Meeting, 2009. 2. 14, Baltimore
8. Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, Ito J. Efficacy of Stealth Nano-Particles Encapsulating Betamethasone for Attenuation of Noise Induced Hearing Loss in Mice. ARO 2009 MidWinter Meeting, 2009. 2. 14, Baltimore

〔図書〕(計1件)

1. 坂本達則. 再生医療へ進む最先端の幹細胞研究 第2章8 内耳障害に対する細胞移植治療. 羊土社. 2008

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)  
該当無し
- 取得状況(計0件)  
該当無し

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 達則 (SAKAMOTO TATSUNORI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：19791207

(2) 研究分担者

該当無し