

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09887

研究課題名(和文) 蝸牛の内側-外側軸形成と内毛細胞-外毛細胞分化のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of medial-lateral axis formation and inner hair cell-outer hair cell differentiation in the cochlea

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・教授

研究者番号：10512311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBmp4シグナルの蝸牛感覚上皮発生における役割を解明するため、Bmp4下流因子であるとされるId1-3に着目し、Id遺伝子群は蝸牛の形態形成に必要な因子であり、また外毛細胞など蝸牛外側の細胞配列に重要な役割を担っていることが明らかにした。また、自験例RNA-Seqおよび他施設RNA-Seqの結果より、内毛細胞-外毛細胞の分化と成熟に關与する6つの候補遺伝子を選び、loss of function実験に着手した。現在作製中・解析中であるが、1つの候補遺伝子ノックアウトマウスは有毛細胞発生異常を認め、より直接的な制御因子であることが示唆された。

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しており、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。蝸牛の内毛細胞と外毛細胞は機能も異なり、内毛細胞が聴覚情報を中枢に伝え、外毛細胞は聴覚情報の増幅器として機能する。また、外毛細胞はとりわけ、障害を受けやすいことが知られている。内毛細胞と外毛細胞の分化メカニズムを解明することは、聴覚再生研究の基礎として重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of Bmp4 signaling in developing cochlear sensory epithelium, we focused on Id1-3, downstream factors of Bmp4, and found that the Id genes are required for cochlear morphogenesis and play an important role in organization of the cochlear peripheral compartment, including outer hair cells. Based on our results of RNA-Seq and RNA-Seq at other institutions, we have selected 6 candidate genes involved in the differentiation and maturation of inner and outer hair cells, and have started loss of function experiments. One of the candidate gene knockout mice showed abnormal hair cell development, suggesting that it is a more direct regulator.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：有毛細胞 蝸牛 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

治療のない難聴の殆どが蝸牛有毛細胞の障害を原因としており、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。蝸牛の内毛細胞と外毛細胞は機能も異なり、内毛細胞が聴覚情報を中枢に伝え、外毛細胞は聴覚情報の増幅器として機能する。また、外毛細胞はとりわけ、障害を受けやすいことが知られている。内毛細胞と外毛細胞の分化メカニズムを解明することは、聴覚再生研究の基礎として重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、蝸牛の内側-外側軸に異常をきたすトランスジェニックマウスの解析を足がかりに、未だ詳細不明である蝸牛の内側-外側軸形成と内・外有毛細胞分化の制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

Bmp4 下流因子であるとされる Id1/2/3 遺伝子群の多重欠損マウス Id1^{-/-}; Id2^{-/-}; Id3^{flxed/flxed} ; Emx2^{+/-}/Cre (蝸牛における Id1/2/3 の3重コンディショナルノックアウトマウス)を作成し、これらのマウス蝸牛につき高解像度3次元イメージングを行ない、内側-外側軸と内・外有毛細胞分化の異常パターンを解析する。また、各トランスジェニックマウスとコントロールマウス蝸牛上皮サンプルを用い RNA-Seq で網羅的解析を行ない、コントロールに比して増加あるいは減少の顕著な遺伝子を抽出し、また、他施設で蝸牛組織や細胞を用いて施行された RNA-Seq 結果を入手し、内毛細胞-外毛細胞の分化と成熟に関与する遺伝子を選んで、そのノックアウトマウスあるいはコンディショナルマウスを作製する。

4 . 研究成果

Inhibitor of differentiation and DNA-binding (Id) タンパク質である Id1 ~ Id4 は、細胞の増殖や分化を制御する機能を有していることが知られている。Id タンパク質は、bHLH タンパク質や細胞の増殖や分化の制御に関与する他のタンパク質と相互作用することが示されており、広範な制御機能があることが示唆されている。Id1-3 は、発生中の蝸牛の感覚上皮予定領域で発現していることが知られている。しかし、蝸牛の発生における Id 遺伝子の役割は完全には解明されていなかった。Id1-3 遺伝子のいずれかを欠損させても蝸牛の発達にはほとんど影響がないため、これらの遺伝子の機能的冗長性が表現型の欠如を説明すると推定されてきた。我々は、Id1/2/3 遺伝子のコンディショナルノックアウト (Id TKO) により、哺乳類の蝸牛の発生において形態形成と細胞パターン形成に大きな欠陥が生じることを明らかにした。Id TKO の蝸牛はコントロールに比べて 82% 短く、増殖の低下と細胞死の増加の両方がこの低形成を引き起こしたと考えられた。Id TKO 蝸牛では Sox2 陽性感覚上皮予定領域が形成されたが、内側-外側 (蝸牛軸側-血管条側) 軸の形成が妨げられ、感覚上皮予定領域の内側-外側区画の境界が一部重複し、単位長あたりの内有毛細胞数が増え、外有毛細胞数は減少した。さらに、Bmp4 と Lmo3 を発現する外側非感覚上皮領域が欠落していた。このように、蝸牛外側上皮のパターン形成は内側上皮よりも大きな影響を受けていた。これらの結果から、Id 遺伝子は発生中の蝸牛において、蝸牛管の形態形成と外側上皮のパターン形成に重要であることが示唆された。さらに、Bmp シグナル阻害剤を作用させた蝸牛を用いた定量的 RT-PCR と免疫染色による解析の結果、Bmp-Id シグナル経路は外側非感覚上皮領域に由来し、外有毛細胞の分化を促進することが判明した。

また、自験例 RNA-Seq および他施設 RNA-Seq の結果より、内有毛細胞-外有毛細胞の分化と成熟に関与する 6 つの候補遺伝子を選び、loss of function 実験に着手した。現在作製中・解析中であるが、1 つの候補遺伝子ノックアウトマウスは有毛細胞発生異常を認め、より直接的な制御因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Susumu, Tateya Tomoko, Omori Koichi, Kageyama Ryoichiro	4. 巻 460
2. 論文標題 Id genes are required for morphogenesis and cellular patterning in the developing mammalian cochlea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2019.12.006	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Susumu Sakamoto; Tomoko Tateya; Koichi Omori; Ryoichiro Kageyama.
2. 発表標題 Bmp4-Id signaling regulates medial-lateral axis formation in developing cochlear epithelium.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 42nd MidWinter Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019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	坂本 進 (Sakamoto Susumu)		
研究協力者	影山 龍一郎 (Kageyama Ryoichiro)		
研究協力者	今吉 格 (Imayoshi Itaru)		

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
---------	---------