

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24031

研究課題名（和文）Id遺伝子群の蝸牛支持細胞での役割と有毛細胞再生医療への応用

研究課題名（英文）The role of Id genes in cochlear supporting cells and the application to hair cell regeneration

研究代表者

坂本 進（Sakamoto, Susumu）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00845406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）： Id遺伝子は蝸牛支持細胞を強く誘導する因子である。蝸牛支持細胞のId遺伝子を欠損させることで支持細胞から有毛細胞への分化転換が生じるか検討した。支持細胞でCreを発現させるマウスを用い、Id1-Id3を支持細胞で欠損させたところ、少数の外有毛細胞の増加が確認された。支持細胞にはId4も発現しているため、分化転換効率を上げるには、支持細胞でId1-Id4すべてのId遺伝子を欠損させることが必要であると考えた。Id4をCre存在下で欠損させるため、現在、Id4floxマウスの開発を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は高齢化社会となり、難聴者は増加している。蝸牛は音の振動を電子信号に変換し脳に伝える組織である。難聴の原因の多くは蝸牛の有毛細胞の脱落であるが、現在の医学では有毛細胞を再生させる方法はない。そのため、有毛細胞を再生させる治療方法の確立は学術的意義だけでなく社会的意義も大きい。今回、我々はId遺伝子が有毛細胞再生の重要な因子である可能性を示した。この研究が進展することで難聴の治療方法の確立に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）： Id genes are factors which induce supporting cells in developing cochlea and we hypothesized that deletion of Id genes in supporting cells lead to conversion from supporting cells to hair cells. We performed in vivo experiment using Id1 knockout, Id2 knockout, Id3 flox and pHes5 creERT2 mice which express cre driver in supporting cells in developing cochlea. We observed a few extra outer hair cells in this mutant mice. We think that Id4 expression is need to be knocked down to observe the effect of Id genes on supporting cells. We are now going to produce Id4 flox mice to elucidate whether deletion of Id1-Id4 in supporting cells led to conversion from supporting cells to hair cells.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内耳 蝸牛 有毛細胞 再生医療 Id遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の蝸牛の感覚上皮(コルチ器)は、1列の内毛細胞と3列の外毛細胞とそれを取り囲む支持細胞が整然と配列した器官(図1)であり、音を電気信号に変換し、中枢神経へ情報を伝達する。

難聴の殆どの原因は有毛細胞の脱落であるとされる。有毛細胞が脱落すると、間隙を支持細胞が埋めるが、有毛細胞は再生しない。

有毛細胞再生に向けて、再生医療の応用による新しい治療法が待望されており、多くの研究がなされてきた。多能性幹細胞を *in vitro* で分化させた有毛細胞様細胞の移植や、比較的未分化な細胞を移植し目的の場所で有毛細胞に分化させるなどのアイデアがある。ただし、未分化細胞はもとより分化させた有毛細胞が神経とシナプスを介し機能するかは不明である。また、iPS細胞から有毛細胞へ分化させる方法は報告されているが、生じるほとんどは蝸牛ではなく前庭有毛細胞であり、蝸牛有毛細胞を効率的に作成する方法は報告されていない。このように、細胞移植による有毛細胞再生医療は未だハードルが高く、局所にあらかじめ存在する細胞を有毛細胞へと分化転換させる方策をも模索すべきと考える。

局所で毛細胞を再生させる供給源となるべき細胞としては、有毛細胞と起源を一にする支持細胞が最も有力と考えられる。実際、鳥類では有毛細胞脱落后に支持細胞が有毛細胞に分化転換することが知られる。

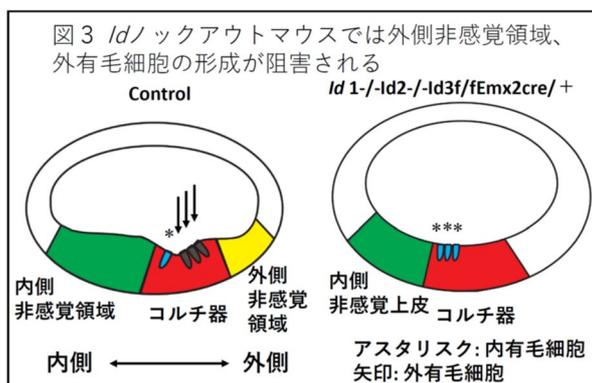
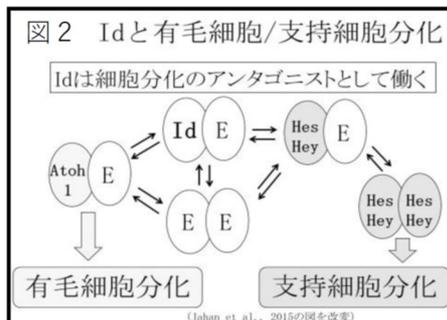
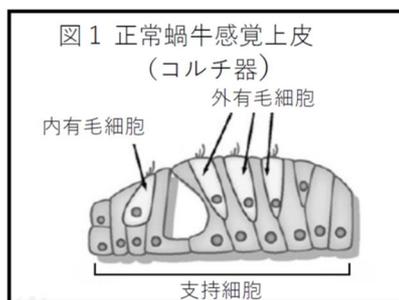
蝸牛感覚上皮の発生過程では、有毛細胞と支持細胞は Notch シグナル伝達系の側方抑制によって運命決定がなされることがよく知られている。そのため、有毛細胞分化誘導には何らかの形で Notch シグナルを抑制することが多く試みられてきた(Shibata et al., 2010)。しかし、Notch シグナル抑制によって有毛細胞が増加するときには、支持細胞の殆どが有毛細胞に分化してしまう(Atkinson et al., 2015)。このように、最良の有毛細胞・支持細胞のバランスを維持するためには、Notch シグナルを抑制する方法ではなくそれ以外の制御因子を操作する必要があると考えられる。

有毛細胞と支持細胞の分化を操作しうる Notch シグナル以外の制御因子として、研究代表者は Inhibitors of differentiation and DNA binding (Id) 遺伝子群に着目した。Id 遺伝子は哺乳類では Id1 から Id4 まで4種類存在することが知られており、bHLH 型転写因子と結合しアンタゴニストとして働く。有毛細胞分化促進因子 Atoh1、支持細胞分化促進因子 Hes/Hey は、いずれも bHLH 型転写因子であり、Id による調節を受ける可能性がある(Jahan et al., 2015) (図2)。

内耳における Id についての先行研究としては、2006年 Jones らの報告があり、蝸牛感覚上皮予定領域で Id3 を強制発現させると支持細胞に分化するという(Jones et al., 2006)。

また、研究代表者はノックアウトマウスを解析することで、Id 遺伝子群が蝸牛発生早期においては外側非感覚領域の形成と、外毛細胞の形成に必要であることを明らかにした(Sakamoto et al., 2020)(図3)。

さらに、有毛細胞、支持細胞分化後には、Id 遺伝子群は支持細胞に発現は限局し、Id3 は支持細胞の分化促進因子であることより(Jones et al., 2006)、Id 遺伝子群は支持細胞を強く誘導する因子であり、支持細胞において Id 遺伝子群を抑制することで支持細胞から有毛細胞への分化転換を引き起こす可能性があると考えた。



2. 研究の目的

本研究では、Id 遺伝子群の支持細胞における役割を、マウスを用いた Id 遺伝子群の loss of function、および gain of function の実験によって、支持細胞から有毛細胞への分化転換能に関して明らかにし、内耳有毛細胞再生への応用を目指す。

3. 研究の方法

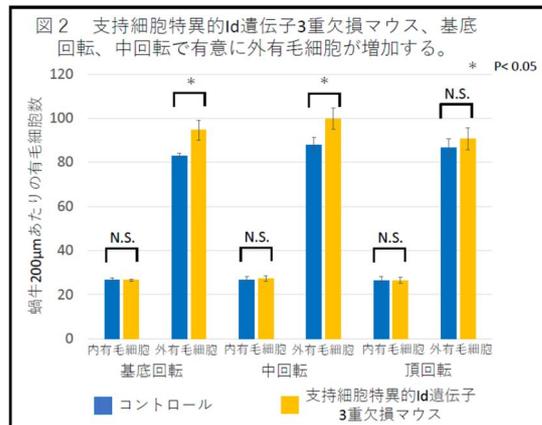
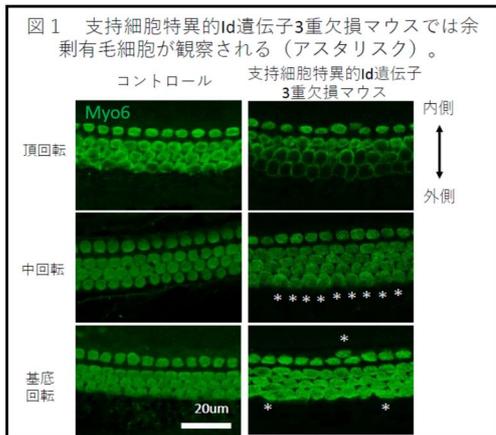
loss of function: 支持細胞特異的な Id 遺伝子群多重ノックアウトマウスの解析をおこなった。我々の研究グループでは、薬剤誘発性・支持細胞特異的 CreER を発現する pHes5-creERT2

マウスを保有している。このマウスを用い、Id1^{-/-}、Id2^{-/-}、Id3^{flox/flox} マウスを掛け合わせることで、支持細胞特異的 Id 遺伝子 3 重欠損マウス (pHes5-creERT2;Id1^{-/-};Id2^{-/-};Id3^{flox/flox}) を掛け合わせた。胎生期 16.5 日目、胎生期 17.5 日目にタモキシフェンを投与し、胎生 18.5 日目で蝸牛を固定し、有毛細胞のマーカである Myo6 で免疫染色し、単位長さ当たりの有毛細胞の数を評価した。コントロールは pHes5-creERT2;Id1^{+/-};Id2^{+/-};Id3^{+ /flox} とした。

gain of function: 蝸牛培養系を用い、Id 遺伝子群の強制発現と細胞の運命決定の解析をおこなった。CAG プロモーター下で Id1 と mCherry を同時に発現させるプラスミドを作成した。Id2、Id3 を発現させるプラスミドも同様に作成した。コントロールとして mCherry のみを発現させるプラスミドを使用した。エレクトロポレーション法を用い、それらのプラスミドを胎生 13.5 日目の蝸牛に導入した。蝸牛は 5 日間器官培養し、固定後、有用細胞のマーカである Myo6 で免疫染色を行った。遺伝子導入された細胞は mCherry 陽性であり、mCherry 陽性細胞に対する mCherry、Myo6 共陽性細胞の割合を計測した。

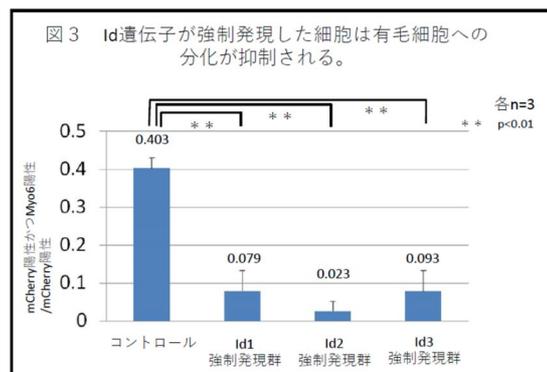
4. 研究成果

loss of function: コントロールと比較し、支持細胞特異的 Id 遺伝子 3 重欠損マウスでは、余剰有毛細胞が観察され(図 1)、基底回転、中回転で有意に外有毛細胞が増加していた(図 2)。



gain of function: Id 遺伝子が導入された細胞は有意に Myo6 陽性細胞が減少していた (図 3)。この結果から、Id 遺伝子は有毛細胞への分化を強く阻害し支持細胞への分化を誘導する因子であると考えられた。

の結果は支持細胞において Id 遺伝子群を欠損させると有毛細胞が増加したが、増加数はわずかであった。支持細胞には Id1 から Id4 まで発現しており、支持細胞特異的 Id 遺伝子 3 重欠損マウスでは Id4 の発現は維持されている。有毛細胞の増加がわずかであったのは Id4 が残存することが原因であると考え、Id4^{flox} マウスの作成を行ない同様の実験を行う予定である。また、また、支持細胞へと分化した細胞を蛍光タンパクでマーキングし、一度支持細胞に分化した細胞が有毛細胞に分化転換するかを観察する方針である。その後、蝸牛障害モデルにて有毛細胞が再生するかを検討する予定である。



< 引用文献 >

(参考文献)

- Shibata et al., J Commun Disord. 2010; 43(4): 295–310.
 Atkinson et al., Development. 2015 May 1;142(9):1561-71.
 Jahan et al., Front. Cell. Neurosci., 05 February 2015.
 Jones et al., J Neurosci. 2006 Jan 11;26(2):550-8.
 Sakamoto et al., Dev Biol., 2020; Apr 15;460(2):164-175.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 坂本進
2. 発表標題 Inhibitor of differentiation and DNA binding (Id) 因子の蝸牛有毛細胞再生への応用
3. 学会等名 第120日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
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
---------------------------	-----------------------	----

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