

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20591989

研究課題名（和文）蝸牛支持細胞の細胞周期再活性化による有毛細胞の再生

研究課題名（英文）Cochlear hair cell regeneration by re-activation of cell cycle of the supporting cells

研究代表者

蓑田 涼生（MINODA RYOSEI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：30284772

研究成果の概要（和文）：

生後の正常動物では P27^{kip1} が蝸牛支持細胞の増殖のブレーキとして働いていると考えられている。このことから成熟動物においても P27^{kip1} をダウンレギュレートすることより支持細胞の G0-G1 移行（細胞周期への再進入）を引き起こすことができると考えられる。

本研究において P27^{kip1} は、正常マウスコルチ器においては支持細胞に局在しており、P27^{kip1} に対する siRNA 投与による支持細胞の細胞周期の活性化・細胞増殖が引き起こされたが、有毛細胞への分化は起こらなかった。

研究成果の概要（英文）：

P27^{kip1} has a function to suppress the proliferation of supporting cell in the adult mammal cochlea. Considering this, downregulation of P27^{kip1} in adult mammal cochlea may cause proliferation of the supporting cells.

P27^{kip1} existed in supporting cells in normal mouse organ of Corti. P27^{kip1} downregulation utilizing siRNA for P27^{kip1} resulted in re-entry into cell cycle of the supporting cells and proliferation of the supporting cells. Nevertheless, those supporting cells did not show phenotype of cochlear hair cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

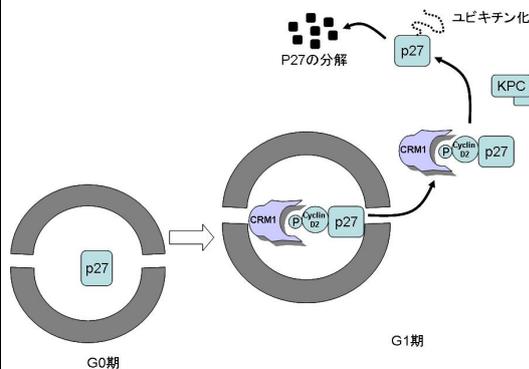
キーワード： 再生、内耳

1. 研究開始当初の背景

感音性難聴の原因の多くは有毛細胞 (HC) の消失によるものである。この HC は鳥類においては消失後、支持細胞が増殖・分化することにより再生するのに対して、哺乳類において支持細胞は生後 G0 期(静止期)にあるため増殖・分化することはなく、結果として HC は再生せず難聴は不可逆性である。近年、細胞周期に関する研究が急激に進歩し G0-G1 移行のメカニズムも少しずつ明らかになって来た。その鍵となる分子は P27kip1 であり Cyclin D2、CRM1、KPC を介した P27kip1 の分解により G0-G1 移行が起こることが線維芽細胞、リンパ球を用いた基礎研究によりわかってきた。一方 P27kip1 ノックアウトマウスでは蝸牛支持細胞の増殖が生後も持続することが報告されており、生後の正常動物では P27kip1 が支持細胞の増殖のブレーキとして働いていると考えられている。このことから成熟動物においても P27kip1 をダウンレギュレートすることより支持細胞の G0-G1 移行 (細胞周期への再進入) を引き起こすことができると考えられる。厚生労働省の遺伝子治療のガイドライン(平成 13 年)により禁止されている「生殖細胞の操作」を伴わない P27kip1 のダウンレギュレーションの方法としては、a) P27kip1 の分解促進因子である Cyclin D2、CRM1、KPC の過剰発現、b) small interfering RNA (siRNA) を用いた P27kip1 遺伝子 mRNA のノックアウトが考えられる。本研究においては a) b) の方法の in vitro、in vivo での効果について検討する。支持細胞の細胞周期への再進入は単に支持細胞の分裂・増殖のみではなく、鳥類と同様に支持細胞を HC へと分化を誘導できる可能性もあり非常に魅力的な研究テーマである。

細胞を HC へと分化を誘導できる可能性もあり非常に魅力的な研究テーマである。

- P27^{kip1}: Cyclin-dependent kinase inhibitor であり、蝸牛においては支持細胞に発現し生後その分裂・増殖を抑制している。(Lee YS, Development 2006)
- Cyclin D2: 線維芽細胞、リンパ球において、G0-G1 移行に際して P27^{kip1} はリン酸化された Cyclin D2 と結合する。(Susaki E, Mol. & Cell. Biol. 2007)
- CRM1: 線維芽細胞、リンパ球において G0-G1 移行に際して CRM1 (nuclear transportor) はリン酸化された Cyclin D2 を認識し P27^{kip1} を核内から細胞質へ移動させる。(Ishida N, J Biol Chem. 2002)
- KPC: 線維芽細胞、リンパ球において核内から細胞質に移動された P27^{kip1} を分解し G0-G1 移行を惹起する。(Kamura T, Nat Cell Biol. 2004)



2. 研究の目的

生後の蝸牛支持細胞において、その細

胞周期を停止させているのは P27^{kip1} であると考えられている。そこで本研究においては P27^{kip1} をダウンレギュレートさせることにより支持細胞の細胞周期の再活性化・細胞増殖が可能であるか、さらに支持細胞の細胞周期への再進入のみで支持細胞から有毛細胞への分化を誘導することが可能であるかどうかを in vitro、in vivo において検討する。

3. 研究の方法

マウスコルチ器の器官培養の系を用い P27^{kip1} に対する siRNA 投与による支持細胞の細胞周期の活性化・細胞増殖の可能性について検討した。siRNA による遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用いた

4. 研究成果

P27^{kip1} は、正常マウスコルチ器においては支持細胞に局在しており、P27^{kip1} に対する siRNA 投与による支持細胞の細胞周期の活性化・細胞増殖が引き起こされるが、有毛細胞への分化は起こらなかった。この様に in vitro の実験系において P27^{kip1} のダウンレギュレーションによる有毛細胞の分化が引き起こされなかったことから in vivo での検討も同様の結論となる可能性が高いため、これについては検討を中止した。

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 3 件)

- ① Minoda R, Haruno T, Miwa T, Kumai Y, Sanuki T, Yumoto E. External auditory canal stenting utilizing a useful

rolled, tapered silastic sheet (RTSS) post middle ear surgery, AURIS NASUS LARYNX, 37 (6):680-684;2010, 査読有

- ② Hayashida M, Minoda R, Shinmyo Y, Ohta K, Tanaka H, Yumoto E. PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in spiral ganglion neurons. Neuroreport 21:90-93 ; 2010, 査読有
- ③ Komori M, Yanagihara N, Hinohira Y, Minoda R. Aeration of tympanum for hearing rehabilitation in staged tympanoplasty with mastoid cavity, Surgery of the Ear, 278-279;2009, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Minoda R, Hayashida M, Miwa T, Yumoto E. Tsukushi Gene Expression in the Mouse Cochleae, 6th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010 年 11 月 14-17 日、京都 (京都国際会館)
- ② Miwa T, Minoda R, Yumoto E. Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) Test for Balance Disorder Patients, 6th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010 年 11 月 14-17 日、京都 (京都国際会館)
- ③ 蓑田涼生、増田聖子、三輪徹、湯本英二、高橋晴雄、反対側耳への人工内耳再埋め込み手術を余儀なくされた Bruton 型低 γ グロブリン血症の 1 症例、第 20 回日本耳科学会総会・学術講演会、2010 年 10

- 月 7-9 日、愛媛 (ひめぎんホール)
- ④ 林田桃子、蓑田涼生、湯本英二、マウス
蝸牛における Tsukushi の発現について、
第 20 回日本耳科学会総会・学術講演会、
2010 年 10 月 7-9 日、愛媛 (ひめぎんホ
ール)
- ⑤ 三輪徹、蓑田涼生、林田桃子、湯本英二、
ポリアルギニンによる胎生期内耳 (耳胞)
への蛋白質導入法、第 20 回日本耳科学会
総会・学術講演会、2010 年 10 月 7-9 日、
愛媛 (ひめぎんホール)
- ⑥ Minoda R、Yumoto E.
Mastoid Cavity Obliteration Using
 β -Tricalcium Phosphate after
Mastoidectomy、第 10 回台日耳鼻咽喉科
学会議、2009 年 12 月 4-5 日、台湾 (Hotel
Royal Chiao Hsi)
- ⑦ 蓑田涼生、春野尊、湯本英二、
シリコン板を用いた Mastoid Cortex
Plasty の試み、第 19 回日本耳科学会、
2009 年 10 月 8-10 日、東京 (京王プラザ
ホテル)
- ⑧ Hayashida M、Minoda R、Yumoto E.
PC3 is involved in the switch from
proliferation to differentiation in
the spiral ganglion cells of the
cochlea、16th International Society of
Developmental Biologists Congress、
2009 年 9 月 6-10 日、エジンバラ
(Edinburgh International
Conference Centre)
- ⑨ Minoda R、Mastoidectomy reconstruction

techniques、8th International
Conference on Cholesteatoma & Ear
Surgery、2008 年 6 月 18 日、トルコ
(Kervansaray Lala Hotel)

- ⑩ 蓑田涼生、遺伝子治療による蝸牛有毛
細胞再生の可能性、第 23 回九州連合地方
部会学術講演会、2008 年 5 月 31 日、沖
縄 (ロジワール沖縄)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓑田 涼生 (MINODA RYOSEI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：30284772

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし