

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592161

研究課題名（和文） 内耳障害及び再生に関わる新規遺伝子の探索

研究課題名（英文） Research of novel genes which contribute to inner ear regeneration

研究代表者

大橋 充 (Ohashi Mitsuru)

九州大学・大学病院・医院

研究者番号：70529883

研究成果の概要（和文）：

永久的内耳障害には有効な治療手段がないが、これは哺乳類の内耳有毛細胞障害がほぼ不可逆的变化であることによる。哺乳類と比較し、鳥類では内耳有毛細胞の再生能力は高く、哺乳類における内耳再生への手掛かりとなると考えられる。特に鳥類卵形囊では定常状態でも有毛細胞の turn-over が生じており、緩やかではあるが絶えず支持細胞層から有毛細胞の再生が起こっていると報告されている。我々は鳥類卵形囊の支持細胞と有毛細胞を laser capture microdissection(LCM)法により採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。これにより、支持細胞に組織幹細胞マーカーである Musashi 及びその関連遺伝子が上昇していることを示した。更にアミノグリコシドによる内耳障害モデルを用いて解析を行った。支持細胞増殖が増した時期に一致して Musashi1 の発現上昇を認めた。これらの結果により Musashi1 が内耳支持細胞増殖を介して、内耳有毛細胞再生に関与していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Inner ear disturbances caused by ototoxic drugs, aging and several diseases mainly originate from loss of hair cells. In mammals, hair cell loss leads to a permanent deficit of hearing and balance. In contrast, birds and other vertebrates can spontaneously regenerate lost hair cells through differentiation of supporting cells and restore auditory and vestibular function. Hair cell progenitors are thus thought to reside in a population of supporting cells. In the present study, we sought to identify novel genes related to inner ear regeneration by gene expression profiling of supporting cells in chick utricle. Gene expression of supporting and hair cells prepared by Laser capture microdissection (LCM) was analyzed by using Affymetrix GeneChip Chicken Genome Array and Gene spring GX. The condition tree of each sample data after quality control demonstrated a validation for our method. The volcano plot (fold change 2,  $p=0.05$ , MTC: benjamin and hochberg) revealed 408 genes, and 175 genes were well annotated. Among these genes, we

focused particularly on Musashi1 (MSI1), a neural stem cell marker gene and its related genes. Immunohistochemistry analyses demonstrated that MSI1 mainly locates at the basal side of supporting cells of 12 day undamaged chick utricle. In aminoglycoside sulfate damaged models of chick utricle, gene expression of MSI1 and HES5 was up-regulated during the regenerating time. MSI1 may facilitate the proliferation of adult stem cells by repression of translation of Numb and p21<sup>CIP1</sup>. These findings suggest that MSI1 plays, at least in part, a critical role in hair cell regeneration in both static and damaged conditions of inner ear.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2400000	720000	3120000
2010年度	500000	150000	650000
2011年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

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：(1)内耳再生 (2)レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (3)Musashi1 (4)マイクロアレイ

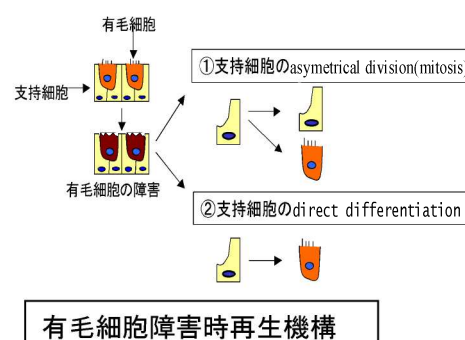
#### 1. 研究開始当初の背景

##### ○内耳有毛細胞再生(図 G)

臨床的に薬物、加齢、騒音など様々な原因による内耳障害には有効な治療手段がないが、これは哺乳類の内耳有毛細胞障害が不可逆的变化であることに起因している。それに比し、鳥類では内耳障害後の有毛細胞の再生は活発であり、内耳障害後の機能的な回復も確認されている。

鳥類の内耳障害後の有毛細胞再生は、①支持細胞の非対称的有糸分裂(asymmetrical division)②支持細胞のdirect transdifferentiation(DT)の両方により生じている。そのほかにも支持細胞の一部から有毛細胞が生じるとする研究は数

多い。支持細胞層に特殊な組織幹細胞が含まれているか、支持細胞自体が細胞周期にre-entryすることで有毛細胞再生が生じる可能性がある。しかし、内耳障害時の支持細胞層に再生能が励起されていることは明らかであり、内耳障害時の支持細胞層は有毛細胞再生の鍵を握っている。

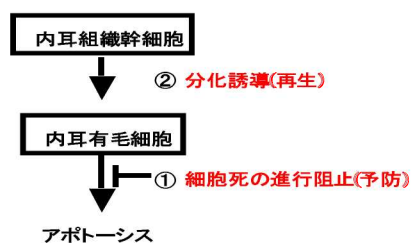


## 2. 研究の目的

内耳有毛細胞の障害は薬物、加齢、騒音など様々な原因で生じる。これらの変化の多くは不可逆性であり、有効な治療手段がない。アミノ配糖体による内耳障害の病態として内耳有毛細胞のアポトーシスが重要であるが、その詳細は不明である。

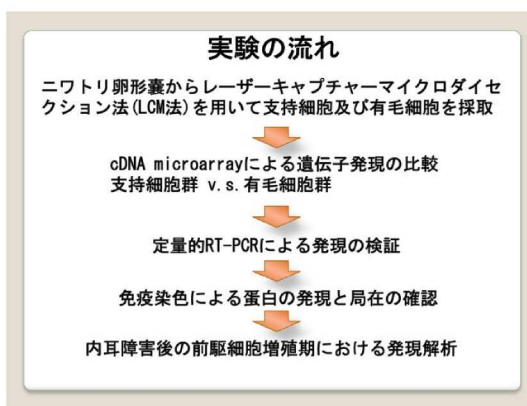
molecular level でその障害機序を明らかにすることで、障害前や障害早期の内耳予防的・保護的治療を目的とした新たな治療戦略が可能である(①)。また、不可逆的な内耳障害に対しては内耳有毛細胞の再生による治療を確立する必要がある。すなわち、有毛細胞前駆細胞(内耳組織幹細胞)を同定できれば、分化誘導による有毛細胞再生治療へ応用できる(②)。現在までの研究で有毛細胞に分化しうる細胞が支持細胞の中に含まれていることが分かっており、組織幹細胞も支持細胞の中に含まれている可能性がある。

本研究では前庭における不可逆的内耳障害の予防的・保護的治療法を想定して molecular level で障害メカニズムを明らかにする。更に有毛細胞前駆細胞(内耳組織幹細胞)より内耳有毛細胞分化へのメカニズムを明らかにする。



想定する内耳障害に対する治療

## 3. 研究の方法



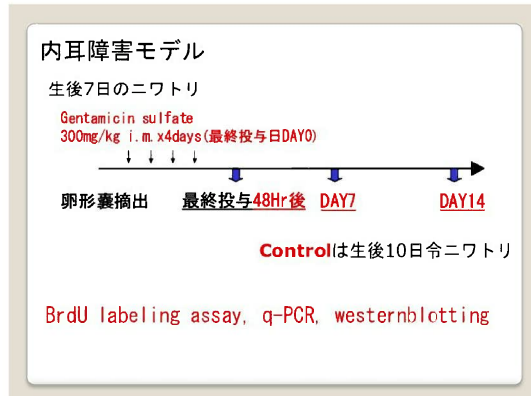
### (1) 高度純化有毛細胞、支持細胞を使用した静止状態における遺伝子発現解析

生後12-14日のニワトリを深麻酔下に安楽死行い、側頭骨より前庭(卵形嚢)を摘出した。凍結切片を作成、LCMを使用し有毛細胞群(HC)と支持細胞群(SC)を別々に採取した。RNA抽出し、RT-PCRを行った結果、有毛細胞サンプルでのみ有毛細胞特異的遺伝子Fimbrinを検出し、それぞれの細胞群を高い純度で得たことを確認した。鳥類卵形嚢では静止状態においても、内耳障害後ほど活発ではないが弱い有毛細胞の再生が生じている。そこでまず、卵形嚢(静止状態)での有毛細胞と支持細胞の遺伝子発現を比較し、内耳再生に関わる遺伝子検出を試みた。有毛細胞及び支持細胞から抽出したRNAを増幅、ビオチン化してAffymetrix gene chip(chick)を使用し、n=5で対比を行った。注目した遺伝子に関してq-RT PCRにて遺伝子の発現を確認した。支持細胞に強く発現している遺伝子群は組織幹細胞を維持するために必須のものが含まれているとかがえ、その遺伝子に関して障害モデルでの検証を行った。

### (2) 前庭障害モデルにおける遺伝子発現解析

生後10-14日のニワトリにgentamicin sulfate 100mg/kg x4日間投与行い、4回目投与終了24時間後、7日後、2週間後にsacrifice、卵形嚢摘出・凍結切片作成した。同量の薬物投

与にて有毛細胞特異的発現遺伝子量が減少、投与中止4日後にはcontrol量まで回復する。病理組織学的に内耳障害、再生を確認した上で、卵形嚢(有毛細胞+支持細胞)をthermolysin処理を行い、支持細胞層のRNA抽出を行った。上記にて注目した遺伝子に関してq-RT PCRにて注目する遺伝子発現を定量的に測定した。



投薬スケジュールおよびその後の実験



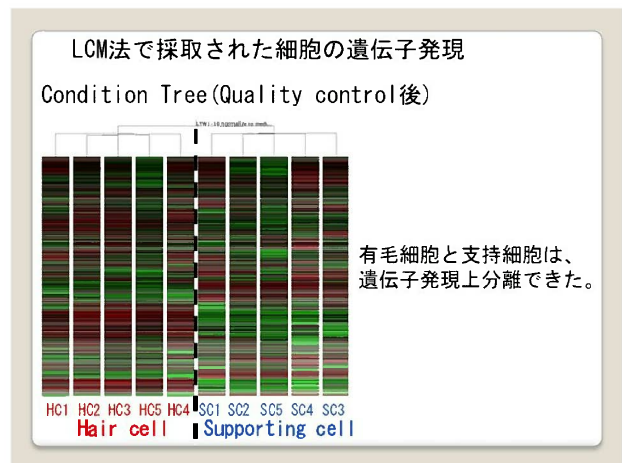
Thrmolysin 処理

4. 研究成果

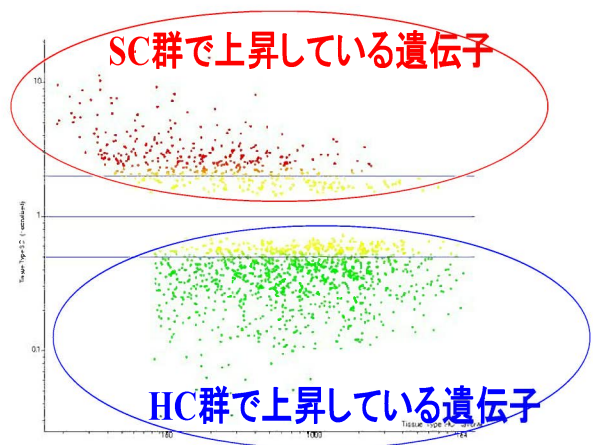
(1) 障害を与えない状態(内耳再生を励起しない状態)での実験

有毛細胞及び支持細胞から抽出したRNAを増幅、ビオチン化して Affymetrix gene chip(chick)を使用し、n=5 で対比を行った。

ばらつきは妥当で Condition tree でも、有毛細胞及び支持細胞にツリーが分かれ、それぞれの細胞群に再現性のあるデータが得られた。有毛細胞群では特異的遺伝子 ESPN, Myo6, CHRNA9 などの相対的上昇を認め、Myo6 など有毛細胞マーカーはq-PCRにてその発現量を確認した。支持細胞群でも、成熟支持細胞に存在すると考えられている機知の遺伝子の相対的上昇を認め、ここでもそれぞれの細胞群の純度が高いことを再確認できた。



Condition tree



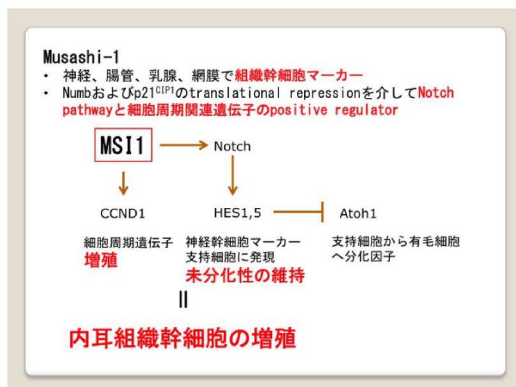
Scatter plot

支持細胞の中に組織幹細胞が多く含まれていることが今までの報告により示されているため、支持細胞に発現の強い遺伝子に関して注目した。マクロアレイのデータを統計解析したデータの中で幹細胞マーカーなどを抽出すると、支持細胞で強く発現上昇していたのは Notch pathway で MSI-1, -2, HES1, -5, RBP-J などがあげられた。さらに蛋白レベルでの発現確認するために Musashi-1 に関して支持細胞層での蛋白レベルでの発現上昇を免疫化学染色法にて確認した。

(2) アミノグリコシドによる薬剤投与障害後の卵形囊上皮の増殖能を見る指標として thermolysin 後の BrdU の取り込みを観察した。投与後 48 時間にて最大の取り込みを生じ、内耳障害後の内耳再生を証明した。その時期の内耳上皮組織を用いて障害後、内耳増殖期に MSI1, HES5, CNND1 mRNA の発現上昇を認めた。さらに Musashi1 蛋白レベルでの確認をウエスタンブロットにて行った。戦術の内耳増殖期に MSI1 発現上昇を認めた。

Musashi1 は内耳組織幹細胞を含んでいる内耳支持細胞に強く発現しており、内耳障害後の内耳再生時期にはその発現はさらに強くなることを示した。

Musashi1 は神経、腸管、乳腺、網膜で組織幹細胞マーカーとして知られる。Musashi1 が内耳における組織幹細胞の維持・増殖における働きに関しては下記機序が考えられる。



われわれのデータにより、内耳組織幹細胞が含まれると考えられる内耳有毛細胞において支持細胞をメンテナンス（維持、増殖）するキー遺伝子としての Musashi-1 の可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）投稿準備中

〔学会発表〕（計2件）

1. トリ卵形囊における支持細胞及び有毛細胞の網羅的遺伝子発現解析、第19回日本耳科学会、平成21年10月6日-9日、東京
2. Gene expression analysis of supporting cell in chick inner ear, ARO2010、平成22年2月5日-9日、ロサンゼルス
3. 内耳再生における新規遺伝子の探索、第6回難聴研究会総会、平成22年7月3日、福岡
4. 内耳再生における Musashi 関連遺伝子の発現変化解析、日本耳鼻咽喉科学会九州地方部会、平成22年7月10日、11日、福岡

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋 充 (OHASHI MITSURU)

九州大学病院・医員

研究者番号：70529883

(2)研究分担者

君付 隆 (KIMITUKI TAKASHI)

九州大学医学研究院・准教授

研究者番号：50240908

松本 希 (MATSUMOTO NOZOMU)

九州大学病院・助教

研究者番号：60419596

新納 宏昭 (NIRO HIROAKI)

九州大学病院・助教

研究者番号：20380636