

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659793

研究課題名(和文) 内耳欠損マウス胚への幹細胞注入による内耳組織の誘導

研究課題名(英文) Induction of inner ear tissue by stem cell injection into the inner ear deficient mouse embryos

研究代表者

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHIN-ICHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00532970

研究成果の概要(和文)：

胚盤胞補完による正常な内耳組織の誘導を検証した。まず、すでに胚盤胞補完によって腎臓が形成されることが報告されている Sall1 ノックアウトマウスは、発生過程における Sall1 の働きから、内耳の無形成が予想された。このノックアウトマウスの内耳形態を評価したが、予想に反して、正常なコルチ器の形成が確認され、内耳がほぼ正常に形成されていることがわかった。次に、すでに内耳の欠損が報告されている Pax2 ノックアウトマウス、Six1 ノックアウトマウスにおいて、胚盤胞補完を試みた。その結果、GFP 発現株の ES 細胞を注入した胚盤胞から、いくつか、内耳形成が見られる個体を得たが、GFP 陽性の内耳を確認することはできず、このノックアウトマウス群では、導入 ES 細胞由来の胚盤胞補完を確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：

We verified the formation of a normal inner ear by blastocyst complementation. First, kidney formation by blastocyst complementation already have been reported in Sall1 knockout mice. From the work of Sall1 during development, the lack of the inner ear was expected in this Sall1 knockout mice. But normal inner ear formation were observed in the knockout mice. Then, we investigated the formation of a normal inner ear by blastocyst complementation in Pax2 or Six1 knockout mice. The deficient in the inner ear formation have been reported previously in these knockout mice. We obtained some inner ear formed mice from the GFP-positive ES cells injected into these knockout blastocysts. But we couldn't find the GFP-positive inner ear cells in those mice. As a result, we could not confirm the blastocyst complementation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学・耳科学

キーワード：幹細胞、内耳、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) 内耳の感覚細胞である有毛細胞は、機械電気変換を行う極度に分化した細胞である。この有毛細胞を含めた内耳組織の障害で感音難聴が生じるが、「難聴者の内耳で、どの細胞がどういった障害を受けているか」には不明な点が多い。ヒト内耳は生検できないため組織学的知見は得られず、この解析は困難である。主にマウスモデルを用いての研究が進められているが、ヒト患者の症状がマウスでは再現できない例も多く、これは動物モデルの本質的な限界である。一方、胚性幹細胞 (ES細胞) と同様に全能性をもつ、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) から、ヒト内耳組織を分化誘導することは理論的には可能である。実際、試験管内でのマウス iPS細胞から有毛細胞様細胞への分化誘導が最近報告された (Oshima ら、Cell 2010)。しかし、生体内では三次元的に複雑なシグナルを受けて有毛細胞は成熟・分化するが、これを試験管内で正確に再現することは困難を極める。また、有毛細胞は一種ではなく、蝸牛においては I 型有毛細胞と II 型有毛細胞が存在し、これら 4 者はそれぞれ形態学的・生理学的に性質が異なるが、Oshima らが試験管内で誘導した有毛細胞様細胞は未成熟であり、これら 4 者のいずれにも相当しない。また Oshima らの分化誘導は自発的再生能を持つニワトリ前庭との共培養によるものであり、その分化誘導因子は依然未解明である。

(2) 近年、マウスの体内でラット多能性幹細胞から膝臓を作成する技術 (胚盤胞補完

法)が開発された (Kobayashi ら、Cell 2010)。膝臓ができないように遺伝子操作したマウスの受精卵に、正常なラット由来の多能性幹細胞を注入する事で、ラットの多能性幹細胞由来の膝臓に置き換わった新生児マウスが得られた。この技術は膝臓に限らず、あらゆる臓器に応用可能と考えられる。

2. 研究の目的

ヒト遺伝性難聴患者由来の iPS細胞から真に成熟した有毛細胞を誘導できれば、その遺伝子変異がどのような機能障害をきたしているのかを解明する画期的なツールとなる。現時点では有毛細胞への分化誘導法は完成されておらず、しかも、難聴の原因部位は有毛細胞に限らず、支持細胞、蝸牛血管条、ラセン靭帯など広範囲にわたるが、これらへの分化誘導法も全く開発されていない。それらを克服するため、内耳欠損マウス胚に幹細胞を注入することによって、内耳という臓器全体の分化誘導を可能にし、ヒト難聴の病態の解明を目指す。

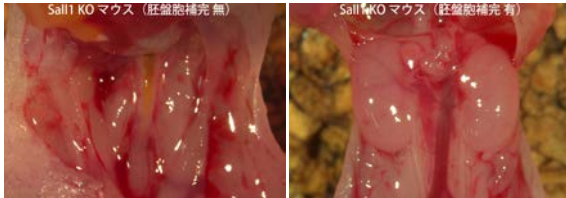
3. 研究の方法

まず、胚盤胞補完法を用いての内耳組織誘導が同種移植でなされるかの検証を行う。蛍光ラベルされた内耳機能正常なマウス由来の ES細胞を蝸牛欠損モデルマウスの胚盤胞に注入し、仔マウスで蛍光をもち正常に機能する内耳組織が形成されるかを検討する。マウスの ES細胞による内耳再生を確認できれば、異種移植での内耳再生を実証する。ヒトの iPS細胞を蝸牛欠損モデルマウスの胚盤胞に移植し、ヒト iPS細胞由来内耳を誘導し

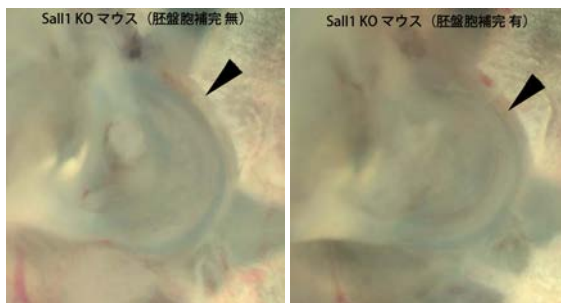
て、これを機能的、組織学的に解析する。

4. 研究成果

Sall1 ノックアウトマウスは腎臓が無形成だが、胚盤胞補完により正常な腎臓が形成されることが報告されている。(下図)



内耳の発生に重要な役割を果たす Pax2 や Six1 が、Sall1 に影響を受けることから、Sall1 ノックアウトマウスで内耳の無形成が予想された。そこで、この Sall1 ノックアウトマウスにおいて、内耳の胚盤胞補完を試みた。Sall1 ノックアウトマウスの内耳形態を評価したところ、予想に反し、Sall1 ノックアウトマウスの内耳は、ほぼ正常に形成されていることがわかった。(下図)



Sall1KO マウスにおける内耳

次に、すでに内耳の欠損が報告されている Pax2 ノックアウトマウス、Six1 ノックアウトマウスにおいて、胚盤胞補完を試みた。注入には GFP 発現株の ES 細胞を用い、細胞の系譜が確認できるようにした。現在までに、ES 細胞を注入した胚盤胞から、いくつか、内耳形成が見られる個体を得たが、GFP 陽性の内耳を確認することはできず、このノックアウトマウス群では、導入 ES 細胞由来の胚盤胞補完を確認できなかった。この結果の原因としては、注入された ES 細胞から、何らか

の液性因子が分泌され Pax2、Six1 の表現系をレスキューしている可能性が考えられる。現在、Septin-7 ノックアウトマウスが内耳欠損の表現系を示すことを我々は見出し、このマウスでの解析を進めている。

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 2 件)

(1) Yoshida A, Kitajiri S, Nakagawa T, Hashido K, Inaoka T, Ito J. Adipose tissue-derived stromal cells protect hair cells from aminoglycoside. *Laryngoscope* 121:1281-1286, 2011.

(2) Nishimura K, Nakagawa T, Sakamoto T, Ito J. Fates of murine pluripotent stem cell-derived neural progenitors following transplantation into mouse cochleae. *Cell Transplant* 21; 763-771, 2012.

[学会発表] (計 1 件)

中川隆之 内耳再生医療開発と未来の難聴治療 第 68 回山形県耳鼻咽喉科疾患研究会 山形 2013 年 3 月 24 日

[図書] (計 1 件)

北尻真一郎、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK22、2012、6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHIN-ICHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00532970

(2) 研究分担者

中川 隆之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50335270

田浦 晶子 (TAURA AKIKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70515345

山本 典生 (YAMAMOTO NORIO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70378644

坂本 達則 (SAKAMOTO TATSUNORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60425626

(3) 研究協力者

西村 幸司 (NISHIMURA KOJI)

京都大学・医学研究科・大学院生