

## 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25年6月6日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2012

課題番号：24890251

研究課題名（和文） 卵形嚢有毛細胞の自発的再生メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of the spontaneous regeneration mechanisms in the utricle hair cells

## 研究代表者

宇田川 友克 (UDAGAWA TOMOKATSU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60328292

## 研究成果の概要（和文）：

神経堤細胞が自発的に卵形嚢有毛細胞として再生することを見出した。神経堤細胞をGFP標識したマウスの卵形嚢器官培養実験を行った。ゲンタマイシンを用いて、すべての卵形嚢有毛細胞の感覚毛を一旦完全に消失させた後、14日間器官培養した。器官培養終了後の卵形嚢感覚上皮において、GFP陽性細胞（神経堤細胞）が存在し、その一部は卵形嚢有毛細胞マーカーであるMyosin VIIaを発現していた。これらの結果は、神経堤細胞が自発的に感覚毛を再生する卵形嚢有毛細胞の一部であることを示唆している。

## 研究成果の概要（英文）：

We found that neural crest cells spontaneously regenerate the utricle hair cells. We performed the utricle organ culture using GFP mice labeling neural crest cells. After completely lost the hair bundles, the utricles were subsequently cultured for 14 days. GFP positive cells were existed in the sensory epithelia of the cultured utricles. A part of GFP positive cells expressed Myosin VIIa, a utricle hair cell marker, in the utricle sensory epithelia. These results revealed that neural crest cells compose the utricle hair cells regenerated spontaneously.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2012年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |

研究分野：先天性難聴

科研費の分科・細目：医歯薬学・耳鼻咽喉科

キーワード：内耳、卵形嚢、有毛細胞、再生

## 1. 研究開始当初の背景

内耳において、聴覚を司る蝸牛の有毛細胞は再生しないが、平衡覚を司る卵形囊の有毛細胞は一部再生することが知られている。が、しかし、この卵形囊有毛細胞の自発的な再生過程は未だ明らかとなっていない。現在まで、自発的に再生する卵形囊有毛細胞の発生母地としては卵形囊感覚上皮の細胞(有毛細胞自身の自己修復、若しくは、支持細胞の分化転換)が提案されている。ところで、卵形囊有毛細胞の発生源は内耳原基の耳胞のみであると考えられてきたが、最近、その一部は発生中の神経管から内耳に遊走・分化する神経堤細胞であることが報告された。神経堤細胞は幹細胞として、未分化な状態で間質に潜伏し、一旦臓器障害が発生すると、障害を受けた組織に遊走して様々な細胞に分化することが近年明らかとなってきている。このような組織再生の役割を演じている神経堤細胞は、特に神経堤幹細胞として、再生医療界でも注目され始めている。

- (1) 感覚毛を完全に消失した卵形囊感覚上皮の中に、神経堤細胞が存在するかは明らかとなっていない。
- (2) 感覚毛を自発的に再生した卵形囊感覚上皮内に、神経堤細胞が存在するかは明らかとなっていない。
- (3) 神経堤細胞が自発的に感覚毛を再生する有毛細胞の起源であるかは不明である。

## 2. 研究の目的

神経堤細胞が自発的に再生する有毛細胞の起源であるかを検証する。

- (1) 感覚毛を完全に消失した卵形囊感覚上皮の中に、神経堤細胞が存在するかを明らかにする。

- (2) 感覚毛を自発的に再生した卵形囊感覚上皮内に、神経堤細胞が存在するかを検証する。
- (3) 自発的に感覚毛が再生する卵形囊有毛細胞の中に、神経堤細胞が存在するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

卵形囊において、神経堤細胞と耳胞由来の細胞を鑑別するために、以下の遺伝子組み換えマウスを用いた。

### ① *Wnt1-Cre* トランスジェニックマウス

神経堤細胞にのみ特異的に発現する *Wnt1* 遺伝子の promoter 下流に、Cre recombinase が挿入されている。

### ② *CAG-CAT-EGFP* マウス

*CAT* 遺伝子の前後に loxP site が挿入されている。

①と②を交配して得られる *Wnt1-Cre; EGFP* マウスを実験に用いた。*Wnt1-Cre; EGFP* マウスの特色として、*Cre-loxP* システムにより一度 *Wnt1* 遺伝子を発現した神経堤細胞は以後永久に GFP で標識されるため、神経堤を離脱して耳胞由来の卵形囊感覚上皮細胞群に潜む神経堤細胞を視覚的に同定できる。この *Wnt1-Cre; EGFP* マウスを用いて、神経堤細胞を可視化して観察した報告が多数存在する。

- (1) 感覚毛を完全に消失した卵形囊感覚上皮を作製するために、以下の作業を行った。

- i) 出生3日目の *Wnt1-Cre; EGFP* マウス卵形囊感覚上皮を採取
- ii) 卵形囊有毛細胞感覚毛の除去  
卵形囊有毛細胞に対して毒性を有するゲンタマイシンを添加した培養液中で、卵形囊感覚上皮を48時間器官

培養し、すべての卵形嚢有毛細胞の感覚毛を一旦完全に消失させた。

iii) 卵形嚢感覚上皮のwhole preparation作製

iv) 免疫染色化学法による発現蛋白の検証

(2) 自発的に感覚毛が再生した卵形嚢感覚上皮内に、神経堤細胞が存在するかを明らかにするために、以下の作業を行った。

i) 卵形嚢有毛細胞の感覚毛の自発的再生 (1)-ii) の工程に続いて、ゲンタマイシンフリーの培養液中で、卵形嚢感覚上皮を14日間器官培養した。卵形嚢有毛細胞の自発的な再生は、感覚毛が消失して約2週間後に再生することが知られている。

ii) 卵形嚢感覚上皮のwhole preparation作製

iii) 免疫染色化学法による発現蛋白の検証

(3) 自発的に感覚毛が再生する卵形嚢有毛細胞の中に、神経堤細胞が存在するかを明らかにするために免疫二重染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 感覚毛が完全に消失した卵形嚢感覚上皮に GFP 陽性細胞 (神経堤細胞) が存在した。

(2) 自発的に感覚毛が再生した卵形嚢感覚上皮の中に GFP 陽性細胞 (神経堤細胞) が存在した。

(3) 自発的に感覚毛が再生した再生した卵形嚢感覚上皮の GFP 陽性細胞 (神経堤細胞) の一部は卵形嚢有毛細胞マーカーである Myosin 7a を発現していた。

これらの結果は、自発的に感覚毛が再生する卵形嚢有毛細胞の中に神経堤細胞が存在することを示唆している。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

1. 宇田川友克、力武正浩、谷口雄一郎、小島博己、森山寛. 耳胞由来上皮内に潜入する神経堤細胞の挙動追跡. 第22回日本耳科学会. 2012年10月5日. (名古屋国際会議場).

2. Tomokatsu Udagawa, Norifumi Tatsumi, Toshiaki Tachibana, Hiroki Saijo, Toshiki Kobayashi, Masahiro Rikitake, Yuichiro Yaguchi, Hiromi Kojima, Hiroshi Moriyama, Masataka Okabe. Neural crest cells invade the otic vesicle derived epithelium. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2012年12月11日 (Marine Messe Fukuoka).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田川 友克 (UDAGAWA TOMOKATSU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60328292

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

西條 広起 (SAIJO HIROKI)  
東京慈恵会医科大学・医学部  
・大学院博士課程4年生