

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462635

研究課題名(和文) 蝸牛発生の制御機構解明と聴覚再生医療への応用

研究課題名(英文) Regulation of sensory epithelium development in mammalian cochleae: a basis for auditory hair cell regeneration

研究代表者

楯谷 智子 (Tateya, Tomoko)

京都大学・白眉センター(ウイルス研究所)・特定助教

研究者番号：10512311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：聴覚を司る哺乳類蝸牛は、規則性に富む美しい器官で細胞分化や組織構築の異常が観察しやすい一方、その発生過程は非常に複雑で未だ決して十分には解明されていない。難聴の多くは蝸牛有毛細胞に再生力がないことに起因し、再生医療の応用が期待されているが、そのためにもまず蝸牛有毛細胞発生の知識が重要である。本研究は蝸牛有毛細胞を含む感覚上皮発生の分子メカニズムの解明を目的し、生体内および試験管内の培養蝸牛においてヘッジホッグシグナル伝達系、Fgfシグナル伝達系およびNotchシグナル伝達系を操作することで、それぞれのシグナル伝達系の蝸牛感覚上皮発生における役割と相互作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The cochlea in mammals is the well-ordered and beautiful organ for hearing. This research project is trying to elucidate the molecular regulation of sensory epithelium development in mammalian cochleae, and has both scientific and clinical importance. This is because the cochlear sensory epithelium sensitively exhibits the disorders caused by disturbance of cellular differentiation and tissue organization. Ultimately, better knowledge of how the mechanosensory hair cells in the cochlear sensory epithelium develop may form the basis for auditory hair cell regeneration. This research project revealed the roles and the crosstalk of Hedgehog, FGF and Notch signaling pathways in developing cochlear sensory epithelium by manipulation of these signaling pathways in vivo and ex vivo.

研究分野：内耳発生

キーワード：蝸牛有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

難聴は最もありふれた感覚器障害の一つであり、補聴器も使用できないほどの高度難聴者はわが国でも数十万人いると推測されている。難聴の多くは内耳性難聴で、蝸牛にある有毛細胞（聴こえの感覚細胞）に障害があると言われている。哺乳類では、成熟した蝸牛有毛細胞は一度障害を受けると再生しないとされ、このことが難聴治療の困難さの原因とされている。

難聴の根本的な治療には、失われた蝸牛有毛細胞を何らかの方法で再生させることが必要である。ある組織が再生するときには、その発生過程を模倣すると考えられる。そのため発生過程を解明していくことが再生医療の基礎となる。

蝸牛発生研究の現状と課題

蝸牛発生過程は非常に複雑であり、未だ決して十分には解明されていない。有毛細胞と、有毛細胞を取り囲む支持細胞を含む蝸牛感覚上皮の発生においては、前駆細胞の増殖・前駆細胞増殖の静止・細胞分化進行、の各時期がある。この各時期をその次へと進めるための、鍵となる因子が何なのかは、依然として不明である。

難聴に対する聴覚再生医療の現状と課題

治療法のない難聴の殆どが有毛細胞の障害を原因とすることから、聴覚再生に向けた研究の多くが有毛細胞の再生を目的としてきた。有毛細胞を再生させる方法として概念的には、(1) 新しい有毛細胞に分化しうる幹細胞/前駆細胞を移植する、(2) 支持細胞を有毛細胞に形質転換させる、(3) 支持細胞の分裂による新たな細胞を誘導して有毛細胞に形質転換する、の3つのアプローチが考えられてきた。しかしながら現在のところ、いずれも期待される効果が十分に得られているとはいえない。

上記の(2)(3)の修復機構は鳥類など哺乳類以外の脊椎動物では通常見られるものであり、有毛細胞が障害されたら、周囲の支持細胞が増殖し形質変換することで、有毛細胞が再生することが知られている。

なぜ他の脊椎動物では保たれている有毛細胞再生能力が、哺乳類ではなくなってしまったのだろうか？ その理由の一つは、哺乳類の蝸牛はより進化しており、有毛細胞・支持細胞が特殊なサブタイプに分化していることだと考えられている。哺乳類の蝸牛感覚上皮においては、適切な数の有毛細胞と支持細胞が高度に組織化されていることが必要ということになる。ということは、異所性の有毛細胞を増やすことのみによって聴覚機能回復を図るのは難しいと考えられる。

研究代表者のこれまでの研究においても、過剰な有毛細胞は聴覚機能に寄与せず、むしろ脱落していく傾向にあることが示唆されている。今後は、有毛細胞を再生させるとい

うだけでなく、内有毛細胞と外有毛細胞それぞれの誘導、および支持細胞をも含めた感覚上皮全体の再生を目指した研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、蝸牛感覚上皮の発生の分子メカニズムの解明のため、まず生体内および試験管内の培養蝸牛においてシグナル伝達系を複数操作し、感覚上皮発生各時期における関与・相互作用をみることにより、蝸牛感覚上皮が発生する各過程がどのように制御されているか明らかにする。次に、各シグナル伝達系の下流因子より、鍵となる因子を同定する。

3. 研究の方法

本研究は哺乳類蝸牛を研究対象とし、実験はすべてマウスを用いておこなった。

生体内での操作：遺伝子改変マウス

蝸牛感覚上皮発生に関与していることが考えられるシグナル伝達系は、いずれも発生のさまざまな時期・臓器で重要な役割を果たしている。そこで本研究では、特定の遺伝子を時期・部位特異的に遺伝子を欠損させるコンディショナルノックアウトマウス、および特定の遺伝子を時期・部位特異的に発現させるコンディショナル持続発現マウスを用いた。

試験管内の培養蝸牛での操作

蝸牛感覚上皮発生に関与していることが考えられるシグナル伝達系につき、シグナル伝達を促進あるいは抑制させるために、シグナル伝達系の関連遺伝子を過剰発現させるプラスミドベクターを電気穿孔法にて培養蝸牛に導入した。また、培地に薬品またはタンパク質を添加した。

鍵となる因子の時間・空間的発現パターンの解明

研究の中で、プロニューラル遺伝子 Atoh1 の蝸牛における時間・空間的発現パターンが蝸牛有毛細胞の発生の鍵であることが示唆されたため、Atoh1-GFP マウス蝸牛培養を用いた3Dリアルタイムイメージングの系を確立し、Atoh1 の蝸牛における時間・空間的発現パターンを詳しく解析した。

4. 研究成果

ヘッジホッグシグナル伝達系を操作するマウスを用いた研究

生体内および試験管内の培養蝸牛において、ヘッジホッグシグナル伝達系、FGFシグナル伝達系およびNotchシグナル伝達系を操作する実験を行なった。

Smoothened (Smo、ヘッジホッグシグナル伝達に必須の膜タンパク) が蝸牛感覚上皮予定領域が形成された後に欠損する Smo コンディショナルノックアウト (Smo CKO) マウ

スでは、頂回転側の有毛細胞の分化が加速し早期に完了していた。蝸牛感覚上皮予定領域が形成された後に Smoothened の活性型が持続発現するマウス (R26-SmoM2) では、内有毛細胞のみではなく、外有毛細胞が形成されるべき領域に前駆細胞様の細胞が見られ、そこでは有毛細胞あるいは支持細胞への分化が抑制されていた。Hh シグナル伝達系は前駆細胞が有毛細胞あるいは支持細胞へ分化することを抑制しており、前駆細胞の未分化性を維持する働きがあることが明らかとなった。

Smo CKO マウスは生後も生き延びて、頂回転側優位の有毛細胞形態異常と有毛細胞数減少、聴性脳幹反応閾値上昇 (難聴) を示した。Hh シグナル伝達系による分化抑制によって有毛細胞分化が蝸牛頂回転側で遅延し、基底回転側から頂回転側へ波状に進行すること、それが正常な蝸牛感覚上皮の発生および生後の聴覚に必要であることが示唆された。

R26-SmoM2 蝸牛を培養し、SU5402 (FGF シグナル阻害剤) と抗 Fgf20 抗体のそれぞれを培地に添加する実験を行なうと、前駆細胞様の細胞が有毛細胞に分化した。このことより、ヘッジホッグシグナルは Fgf20 を介して前駆細胞の未分化性を維持していることが示唆された。一方、R26-SmoM2 蝸牛を培養し、DAPT (Notch シグナル阻害剤) を培地に添加する実験を行なうと、外有毛細胞が形成されるべき領域にある前駆細胞様の細胞には変化が見られなかった。このことより、前駆細胞の未分化性を維持するヘッジホッグシグナルの働きは、Notch シグナルと独立であることが示唆された。

これらの結果は、〔雑誌論文〕として発表された。

ヘッジホッグシグナル伝達系を操作するマウスを用いた研究

蝸牛感覚上皮予定領域が形成された後に Notch の細胞内ドメイン (NICD) が持続発現することにより Notch シグナル伝達系を促進させるマウス (R26-NICD) を作成した。Notch シグナル伝達系を促進させると、有毛細胞数が減少するが、その分支持細胞が増加するのではなく支持細胞も減少し、多くは前駆細胞の状態で留まっていることがわかった。

これらの結果は、〔雑誌論文〕として発表された。

プロニューラル遺伝子 Atoh1 の時間空間的発現パターン

プロニューラル遺伝子 Atoh1 は、内耳においては有毛細胞分化促進因子と考えられていたが、この実験を進める中で、有毛細胞と支持細胞の共通の前駆細胞への分化を進める鍵であると示唆された。そのため、Atoh1-GFP マウス蝸牛培養を用いた 3D リアルタイムイメージングの系を確立し、発生期蝸牛における時間・空間的発現パターンを詳細に分析した。この研究は現在進行中である。

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4件)

Tateya T, Sakamoto S, Imayoshi I, Kageyama R. In vivo overactivation of the Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. *Hear Res.* 327: 209-17, 2015.

Tateya I, Tateya T, Sohn JH, Bless DM. Histological effect of basic fibroblast growth factor on chronic vocal fold scarring in a rat model. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 29: 133-9, 2015.

Tateya I, Tateya T, Watanuki M, Bless DM. Homeostasis of Hyaluronic Acid in Normal and Scarred Vocal Folds. *J Voice.* 2014 Dec 9. pii: S0892-1997(14)00155-6.

Tateya T, Imayoshi I, Tateya I, Hamaguchi K, Torii H, Ito J, Kageyama R. Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development.* 2013 Sep; 140(18):3848-57.

〔学会発表〕(計8件)

榎谷智子, 坂本進, 影山龍一郎 蝸牛感覚上皮予定領域における Atoh1 の動的発現パターン 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会 平成 27 年 5 月 22 日

坂本進, 榎谷智子, 影山龍一郎, 伊藤壽一 蝸牛感覚上皮発生における Inhibitors of differentiation and DNA binding (Id) の機能の解析 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会 平成 27 年 5 月 22 日

Susumu Sakamoto, Tomoko Tateya, Yukiko Harima, Juichi Ito, Ryoichiro Kageyama. Expression of Id Genes in Developing Cochlear Epithelium. The Association for Research in Otolaryngology 38rd MidWinter Meeting, Baltimore, Maryland, February 21-25, 2015.

Susumu Sakamoto, Tomoko Tateya, Yukiko Harima, Itaru Imayoshi, Juichi Ito, Ryoichiro Kageyama. Expression of bHLH Genes in Developing Cochlear Epithelium. Inner Ear Biology Workshop in Kyoto, Kyoto Japan, November 3, 2014.

Tomoko Tateya, Susumu Sakamoto, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama. In Vivo Overactivation of Notch Signaling Pathway in Cochlear Prosensory Epithelium. Inner Ear Biology Workshop in Kyoto, Kyoto Japan, November 3, 2014.

Tomoko Tateya, Itaru Imayoshi, Takahiko Matsuda, Ichiro Tateya, Ryoichiro Kageyama. In Vivo Overactivation of Notch Signaling Pathway in Developing Cochlear Epithelium. The Association for Research in Otolaryngology 37rd MidWinter Meeting, Anaheim, San Diego CA, February 21-25, 2014.

楯谷智子 影山龍一郎 蝸牛感覚上皮発生におけるヘッジホッグシグナル伝達系の役割 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会、口頭発表 2013年5月11日 ロイトン札幌（札幌市）

楯谷智子：蝸牛感覚上皮発生におけるNotchシグナル活性化の影響．第23回京都耳鼻咽喉科研究会、2013年12月14日、ウエスティン都ホテル（京都市）

〔図書〕（計2件）

Tateya T, Tateya I. Vocal fold development (Chapter 11). In Regenerative Medicine in Otolaryngology (Ito J. Ed), Springer, 2015: 161-169.

Tateya T. Cochlear development (Chapter 11). In Regenerative Medicine for the Inner Ear (Ito J. Ed), Springer, 2014: 101-113.〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
ウイルス研究所 HP HOME > 研究所紹介 最新の研究成果
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2013/kageyama20130915.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯谷 智子 (Tateya, Tomoko)

京都大学白眉センター/ウイルス研究所/特定助教

研究者番号：10512311

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし