

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670720

研究課題名(和文) In vitro内耳発生システムの開発とWntシグナルによる内耳発生機序の解明

研究課題名(英文) In vitro system recapturing inner ear development using otic vesicle cells, Wnts and effector cells

研究代表者

吉川 正英 (Yoshikawa, Masahide)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50230701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内耳発生・細胞分化を試験管内で再現・模倣し、それらの細胞が形態形成を行うプロセスを解明すべく、耳胞細胞OVCを用いたin vitro内耳発生モデルの構築を目的とした。マウス胎児由来のOVCの単離・培養に成功し、有毛細胞分化マーカー遺伝子(Math1)活性によりモニター可能なM-OVC1を樹立した。この細胞を用いてin vitro分化誘導を行った結果、ある種のWntシグナルは分化促進的に働き、さらに、エフェクター細胞(EFC)との共培養では、分化誘導促進が観察された。

研究成果の概要(英文)：To establish the in vitro system recapturing inner ear development is needed for the evaluation of cellular dynamics related to inner ear. In this study, we developed long-term cultivation method of the otic vesicle cells (OVCs) isolated from mouse embryos. OVCs were successfully maintained in the undifferentiated state judging from the confirmed expression of nestin and Oct-3/4. OVCs were transfected with the GFP-expressing plasmid under the control of Math1 promoter region, and the M-OVC cells, which become to express GFP with Math1, were obtained. One Wnt protein among various Wnts was found to promote the differentiation of M-OVCs into hair cell-like cells. Furthermore, it was observed that the co-culture with a certain cell line as effector cells could affect the differentiation of M-OVCs. These results strongly suggest the important roles of the specific Wnt and effector cells on the regulation in the differentiation of OVC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：内耳 再生医学 有毛細胞 発生 Wnt 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

内耳の発生学的なプロセスは非常に複雑である。さらに、内耳には種々の細胞が存在することから、内耳発生を解析するための細胞材料・解析法の開発が求められる。我々は、最近、胚性幹細胞 (ES 細胞) から内耳有毛細胞への分化誘導を試み、高効率かつ簡便な方法を見出した (Ouji *et al.*, *Cell Death Dis.*, 2012)。しかし、内耳には有毛細胞を含む種々の細胞が相互に機能して聴覚・平衡感覚を司っており、それらの細胞分化・内耳発生 (形成) メカニズムの解明こそが、内耳治療において最も重要と考えた。そこで、発生機構が酷似する目の発生 (Moscona *et al.*, *Exp Cell Res.*, 1961; Fujisawa *et al.*, *Dev Growth Differ.*, 1971) を参考に、内耳形成初期に発生する耳胞由来の細胞 (耳胞細胞: OVC) を用いて、試験管内で内耳発生を模倣するシステム (*in vitro* 内耳発生システム) の開発を計画した。

また、近年の細胞生物学的、分子生物学的アプローチにより、内耳発生には様々なシグナル (Wnt、Shh、Notch、FGF 等) の関与が明らかとなっており (Kelly *et al.*, *Nature Rev. Neurosci.*, 2006 など)、我々も以前から発生学的な観点から Wnt シグナルの解析を進めてきた (Ouji *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006 など)。そこで、内耳発生における Wnt シグナルに焦点を絞った本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

内耳発生・細胞分化を試験管内で再現・模倣することのできる、*in vitro* 内耳発生モデルの構築を目的とした。

内耳幹細胞ともいふべき耳胞細胞 OVC の使用および内耳発生に寄与する Wnts シグナルに着目し、①胎生マウスより耳胞細胞 (OVC) を単離・培養、②OVC の分化をモニター可能な細胞 (M-OVC) を樹立、③OVC における分化誘導の影響を Wnt あるいはエフェクター細胞 (EFC) を用いて精査する。以上の 3 点を具体的目標とし、*in vitro* 内耳発生システム開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 耳胞細胞 (OVC) の単離・培養

妊娠マウスより胎児 (10.5 日) を取り出し、マイクロダイセクションにより耳胞を採取した。耳胞を酵素処理することで単細胞化させ、耳胞細胞 (OVC) を単離した。培養条件を検討後、長期間培養可能な株化細胞 (OVC1) を樹立した。

(2) OVC のキャラクターゼーション

培養維持した OVC1 より total RNA の抽出

し、RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。また、固定した細胞の免疫染色を行い、タンパク質レベルでの発現解析を行った。

(3) *Math1*-plasmid の調製

内耳有毛細胞のマーカーである *Math1* 遺伝子のプロモーター活性により蛍光タンパク質 (GFP) を発現可能な plasmid construct を作成した。この遺伝子を OVC1 細胞へ transfection し、薬剤耐性細胞 (M-OVC1) を樹立した。

(4) *In vitro* 分化誘導

M-OVC1 細胞を用いて *in vitro* での分化誘導を行った。培養系は、付着培養および浮遊培養を検討し、各種 Wnt を添加する、あるいはエフェクター細胞 (EFC) と共培養し、*Math1* に由来する GFP の蛍光強度を測定することで、その分化誘導効率を算出した。

4. 研究成果

(1) OVC の単離・培養とキャラクターゼーション

マウス胎児からマイクロダイセクションにより耳胞細胞 (OVC) を単離し、培養条件を検討後、増殖活性の高い clone を選択し、長期間培養可能な株化細胞 (OVC1) を樹立した (形態: 図 1)。OVC1 は、神経幹細胞のマーカー (Nestin) を発現し、内耳成熟細胞 (有毛細胞) のマーカー (*Brn3.1* など) の発現は認められず、一方で、ES 細胞などの未分化な細胞で発現している転写因子 Oct-3/4 の弱い発現が認められる未熟な細胞であることが明らかとなった (図 2)。

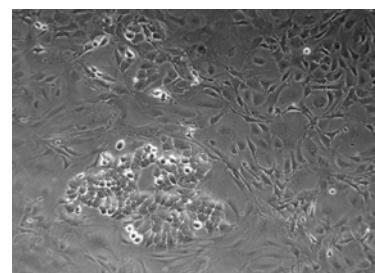


図 1

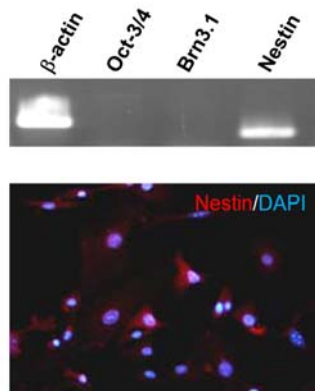


図 2

(2) M-OVC の樹立

耳細胞の中でも特に難聴に関わる内耳有毛細胞に着目し、特異的マーカー遺伝子 *Math1* のプロモーター活性により GFP を発現可能な plasmid construct を作成した。この遺伝子を OCV1 細胞へ transfection し、薬剤耐性細胞 (M-OVC1) を樹立した。この細胞株を用いることで、*in vitro* での分化誘導がモニター可能となった。

(3) *In vitro* 分化誘導

M-OVC1 細胞を *in vitro* 培養系で各種 Wnt を添加培養した結果、ある種の Wnt が増殖活性を抑制し、分化を誘導することが明らかとなった。さらに、分化誘導のエフェクター細胞 (EFC) として、種々の細胞株との共培養により、M-OVC1 の分化誘導を試みた。その結果、ある種の細胞株との混合培養により、M-OVC1 由来細胞から誘導された有毛細胞様細胞の出現効率が飛躍的に亢進した。また、各種 Wnt の添加培養により、その効率が異なることが明らかとなり、Wnt シグナルが有毛細胞の分化誘導を制御していることが示唆された。

(4) 結論と今後の展望

マウス胎児由来の耳胞細胞 (OVC1) の単離・培養に成功し、有毛細胞分化マーカー遺伝子 (*Math1*) の活性によりモニター可能な M-OVC1 を樹立した。この細胞を用いて *in vitro* 分化誘導を行った結果、ある種の Wnt シグナルは分化促進的に働くことが明らかとなった。さらに、エフェクター細胞 (EFC) との共培養では、その分化が促進されることから、細胞外環境や液性因子が有毛細胞の分化誘導を制御していることが示唆された。

今後は、OVC を Wnt や EFC を用いたさらに厳密な分化誘導により内耳形成初期を模倣した分化システムの開発をさらに進めてゆきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ①
Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Okuzaki D, Yoshikawa M.
 Partial maintenance and long-term expansion of murine skin epithelial stem cells by wnt-3a *in vitro*.
J Invest Dermatol
 査読有
 2015、**135**: 1598-1608
 10.1038/jid.2014.510
 - ②
Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Wanaka A, Yoshikawa M.
 Induction of inner ear hair cell-like cells from *Math1*-transfected mouse ES cells.
Cell Death Dis
 査読有
 2013、**4**: e700-710
 10.1038/cddis.2013.230.
 - ③
 Nakazawa T, Nakamura M, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nishimura F, Nakagawa I, Yamada S, Matsuda R, Tamura K, Sugimoto T, Takeshima Y, Marutani A, Tsujimura T, Ouji N, Ouji Y, Yoshikawa M, Nakase H.
 Cytotoxic human peripheral blood-derived γ δ T cells kill glioblastoma cell lines: implications for cell-based immunotherapy for patients with glioblastoma.
J Neurooncol
 査読有
 2014、**116**: 31-39
 10.1007/s11060-013-1258-4.
 - ④
Ouji Y, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M.
 Canonical Wnts, specifically Wnt-10b, show ability to maintain dermal papilla cells.
Biochem Biophys Res Commun
 査読有
 2013、**438**: 493-499
 10.1016/j.bbrc.2013.07.108.
- 〔学会発表〕 (計 4 件)
- ①
Yukiteru Ouji, Nakamura-Uchiyama Fkumi, Masahide Yoshikawa
 Canonical Wnt-10b signaling play important roles in the maintenance of dermal papilla cells
 第 37 回日本分子生物学会
 2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

②

Masahide Yoshikawa, Yukiteru O uji, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Akio Wanaka
Induction of inner ear hair cell-like cells from transcription factor math1-transfected mouse embryonic stem cells
第 13 回 国際幹細胞学会 (ISSCR)
2014 年 6 月 19 日、バンクーバー (カナダ)

③

吉川正英、王寺幸輝、中村 (内山) ふくみ、名和行文
わが国の糞線虫症の現況 2000-2013 年文献報告例の検討
第 25 回 日本臨床寄生虫学会学術大会
2014 年 6 月 14 日、東京医科歯科大学

④

Yukiteru O uji, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Akio Wanaka, Masahide Yoshikawa
Differentiation of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse embryonic stem cells
第 36 回 日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3 日、神戸国際展示場 (神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 正英 (YOSHIKAWA, Masahide)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 50230701

(2) 研究分担者

王寺 幸輝 (OUJI, Yukiteru)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 50343421