

氏名	たけ ばやし しん じ 竹 林 慎 治
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3152 号
学位授与の日付	平 成 19 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Multiple roles of Notch signaling in cochlear development (蝸牛有毛細胞発生における Notch シグナルのさまざまな役割)

論文調査委員 (主査) 教授 篠原隆司 教授 大森治紀 教授 渡邊 大

### 論 文 内 容 の 要 旨

80歳では、約50%が老人性難聴である。老人性難聴の重要な原因の一つに蝸牛有毛細胞障害および蝸牛有毛細胞数の減少がある。哺乳類では、蝸牛有毛細胞は、一度障害をうけると、自然再生しないため、老人では、蝸牛有毛細胞数の減少を認める。そこで、蝸牛有毛細胞を再生させて、老人性難聴を治療することが将来の目標である。そのためには、蝸牛有毛細胞の発生のメカニズムをよく理解する必要がある。現在、Notch シグナルが有毛細胞分化の抑制に働いていることが、Notch シグナルに関連したさまざまな遺伝子欠損動物実験から明らかにされてきた。しかし、まだ解明されていないことも多く残っている。そこで、将来の再生医療への応用をめざして、有毛細胞発生における Notch シグナルの働きをさらに詳細に明らかにした。

Notch シグナルは、横の細胞から出るリガンドと受けての細胞の Notch 受容体が結合することにより開始されるシグナルである。Notch シグナルの情報伝達には、TNF- $\alpha$  転換酵素と  $\gamma$ -セクレターゼの 2 種類の酵素による Notch 受容体の切断が不可欠である。Notch シグナルは、それら 2 種類の酵素により切断された Notch 受容体の細胞内部分が核に移行し、DNA 結合蛋白と結合し、標的遺伝子の転写を活性化することで生じる情報伝達系である。

今回、新しいマウス胎子の器官培養法を開発した。そして、TNF- $\alpha$  転換酵素と  $\gamma$ -セクレターゼの阻害薬を、Notch シグナルを阻害する薬として使用することで蝸牛有毛細胞発生におけるさまざまな Notch シグナルの役割を明らかにした。

まず、今回開発した器官培養法で、Notch シグナル阻害薬が、これまでに報告された遺伝子欠損動物実験と同様に有毛細胞数を増加させることを免疫染色と蛍光色素通過実験により確認した。また、Notch シグナル阻害薬で、Notch シグナルが実際に阻害されていることを免疫染色と q-PCR 法を用いて確認し、今回用いた実験モデルがきちんと動いていることを明らかにした。

次に、Notch シグナルの抑制で、有毛細胞数が増加するメカニズムを BrdU 投与実験と有毛細胞・支持細胞数のカウントにより明らかにした。Notch シグナルの抑制により、前駆細胞は、有毛細胞へと運命づけられ、Notch シグナルが入ると支持細胞に運命づけられ、前駆細胞から有毛細胞あるいは支持細胞への運命決定に関与していることが明らかになった。また、支持細胞に分化しても、初期の段階の支持細胞であれば、Notch シグナルが抑制されると有毛細胞に分化できることを明らかにした。

さらに、Notch シグナルは、有毛細胞前駆細胞の細胞増殖を抑制する働きがあることも明らかにした。Notch シグナル阻害薬投与により、蝸牛上皮の細胞分裂している細胞数が増加し、それらの一部が有毛細胞にも支持細胞にも分化できることを明らかにした。

新しい器官培養実験モデルを用いて、今までに明らかにされていた Notch シグナルの有毛細胞への分化の抑制作用だけでなく、Notch シグナルは、支持細胞へ分化誘導および維持に必要であることを明らかにし、また、前駆細胞の細胞増殖を抑制する働きがあることも明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

内耳有毛細胞の障害は難聴の主要な原因の一つであり、障害を受けた内耳有毛細胞の再生が可能となれば難聴の治療の有効な手段となりうる。本研究では内耳有毛細胞の再生を目指し、まず内耳有毛細胞の発生につき検討した。

これまでの *in vitro* の実験系で Notch シグナルが内耳有毛細胞の増加抑制に関与していることが報告されてきたが詳細は不明な点が多い。本研究ではマウス胎仔蝸牛の 3 次元無血清器官培養系において、蝸牛の初期発生時期に Notch シグナル阻害薬を投与し、内耳有毛細胞の増加、抑制などの効果を検討した。その結果、Notch シグナルは内耳有毛細胞前駆細胞の増殖を抑制し、内耳有毛細胞から周辺的支持細胞への分化を誘導し、更に支持細胞から内耳有毛細胞への分化転換を抑制する働きがあることが判明した。本結果は Notch シグナルを操作することにより内耳有毛細胞の増殖、再生を促すことが可能であることを証明するものである。以上の結果は内耳有毛細胞の発生のメカニズムの一部を解明し、更には将来の内耳有毛細胞再生医療の実現の可能性に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。尚、本学位授与申請者は平成 19 年 7 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。