

氏名	さか もと たつ のり 坂 本 達 則
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3165 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 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	Hair Cell Differentiation Becomes Tissue Specific By E9.5 In Mouse Inner Ear (有毛細胞の分化は胎生 9.5 日までに組織特異的になる)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 森 治 紀 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 開 祐 司

### 論 文 内 容 の 要 旨

我が国には難聴患者が 600 万人おり、その多くが感音難聴と考えられている。感音難聴において傷害されている細胞は、内耳有毛細胞、らせん神経節細胞が代表的である。しかし感音難聴に対する治療方法は、ステロイド、浸透圧利尿薬、ビタミン類など非常に限られており、大部分の患者はそれらにも反応しない。この状況に対して、再生医学的アプローチとして、細胞移植による感音難聴治療を目標とした研究を開始した。

内耳は後脳外側の皮膚外胚葉に形成される耳プラコードに由来し、これが陥凹して耳胞となり、複雑な形態形成と細胞分化を経て、構造的には蝸牛・前庭・半規管など、細胞としては有毛細胞・支持細胞やらせん神経節細胞などとして、内耳を構成する。感音難聴において傷害されている細胞を細胞移植によって治療するためには、その材料となる細胞が必要であるが、これらの成熟した細胞を多量に集めることは現実的ではなく、また内耳幹細胞に相当するような細胞も同定されていないため、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて、胚発生に準じて段階的に内耳細胞を誘導することを計画した。しかし、マウス ES 細胞を耳胞近傍に移植して同様の分化キューの与えられる環境に置くだけでは、生着はしても分化はしなかった。

水関らによって、マウスおよび霊長類の ES 細胞は神経管の腹側から背側、神経堤細胞由来の組織、および皮膚外胚葉へと分化誘導できることが示された。本研究はこれに続き、未熟な内耳 (耳胞) を培養して有毛細胞まで分化させることを主眼として開始した。

組織培養を行うときに通常用いられる培地は血清を用いたものであるが、血清に含まれる増殖因子などの不確定因子によって細胞の分化に影響を及ぼすため、無血清培地を用いて耳胞を培養した。この条件のもとでマウスの耳胞は胚における有毛細胞のマーカーの発現と矛盾しないタイミングでこれを発現し、またこれらの細胞が有毛細胞特有の構造 (有毛細胞・支持細胞の配列や頂側のアクチンの集積など) を持つことが分かった。すなわち、この培養系において、耳胞における有毛細胞の分化を再現できていると考えられる。

続いて、胎生 9.0~10.5 日の耳胞を、耳胞単独、あるいは耳胞と周囲組織 (隣接する後脳と耳胞周囲間葉組織) を合わせて培養して有毛細胞の出現を調べたところ、胎生 9.5 日の耳胞では既に耳胞外からのシグナルがなくても有毛細胞が発生する、すなわち有毛細胞の分化が組織特異的であることが分かった。また、周囲組織から胎生 9.0 日と 9.5 日の間に耳胞にもたらされるシグナルが有毛細胞分化に必要であることや、胎生 10 日頃では同様のシグナルが有毛細胞分化に阻害的に働いていることなどが示唆された。

本研究の基礎的な側面としては、有毛細胞の分化機構を明らかにする上で重要な「いつどこからシグナルが入るのか」という情報を与えており、また臨床的な側面としては、細胞移植による感音難聴治療という非常に挑戦的で現在も模索の段階にある治療法に向けて、細胞を供給するための足がかりとなると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

内耳有毛細胞の障害は感音難聴の主要な原因であるが、哺乳類ではこの細胞がいったん傷害されると再生しない。これに対する再生医学的アプローチとして細胞移植を考えると、有毛細胞を *in vitro* で増殖・分化させることのできる培養条件が必要となる。

内耳発生は後脳外側の皮膚外胚葉の肥厚である耳プラコードとそれに続く耳胞から始まる。本研究では、まずマウス耳胞を無血清培地で培養すると有毛細胞まで分化することを示し、本培養系での有毛細胞の発生が実際の発生を模倣していることを示した。

続いて、胎生 9.0～10.5 日の耳胞を単独で、あるいは耳胞周囲間葉組織と後脳とともに無血清培地で培養することで、胎生 9.5 日以降の耳胞は外部からのシグナル無しに有毛細胞を生じることができることを示した。また、周囲組織から胎生 9.0 日と 9.5 日の間に耳胞にもたらされるシグナルが有毛細胞分化に必要であることや、胎生 10 日頃では同様のシグナルが有毛細胞分化に阻害的に働いていることなども示唆された。

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。なお、本学位論文は平成 19 年 11 月 30 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。