

京都大学	博士 (医学)	氏名	松永 麻美
論文題目	Initiation of supporting cell activation for hair cell regeneration in the avian auditory epithelium: an explant culture model (鳥類蝸牛器官培養モデルでの有毛細胞再生における支持細胞活性化因子の初期過程)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>蝸牛感覚上皮は哺乳類、鳥類ともに音刺激を神経信号に変換する有毛細胞と周囲の支持細胞から構成される。哺乳類蝸牛有毛細胞の再生能は極めて限定的であるが、鳥類蝸牛では、支持細胞を起源として生涯を通じて有毛細胞が再生し、機能的にも完全に回復する。鳥類蝸牛有毛細胞の再生経路は、支持細胞から有毛細胞へ直接分化転換する経路と支持細胞が分裂後に有毛細胞へ分化する経路の2つが知られているが、詳細な分子機構や哺乳類と鳥類の再生能の差異は解明されていない。本研究では、鳥類蝸牛有毛細胞の旺盛な再生能の哺乳類への応用を企図し、鳥類蝸牛有毛細胞再生の初期過程で活性化する新規遺伝子および情報伝達系の探索を目的とした。</p> <p>孵化後1日目のヒヨコ蝸牛感覚上皮の器官培養を行い、アミノ配糖体であるストレプトマイシン (SM) により有毛細胞傷害を惹起し、有毛細胞消失過程と再生過程を組織学的に調べた。有毛細胞はSM曝露24時間でほぼ消失し、再生有毛細胞はSM48時間曝露完了18時間後から出現することが解った。有毛細胞再生に支持細胞の分裂増殖がどの程度関与するのかを調べるために、EdU添加培地での培養を行った。結果、再生有毛細胞の核にEdUの取り込みは観察されず、支持細胞の直接的な分化転換が主たる再生経路であることが示唆された。有毛細胞再生の初期過程における支持細胞活性化に関与する新規遺伝子および情報伝達系を探索することを目的とし、トランスクリプトーム解析を行った。SM曝露前、SM曝露24時間後、48時間後、48時間のSM曝露完了6時間後の4群からサンプルを採取した。得られた全発現遺伝子19,238個のうち、1,219個の発現変動遺伝子を同定してクラスター解析を行った結果、11個のクラスターに分類された。第一に、有毛細胞再生過程に関与することが知られている情報伝達系の変動を調べたところ、過去の報告と矛盾しない変動パターンが観察された。支持細胞から有毛細胞への分化転換における重要な遺伝子である <i>Atoh1</i> の有毛細胞傷害後早期の活性化を quantitative polymerase chain reaction (qPCR) で確認し、In situ hybridization (ISH) にて過去の報告と同様に、有毛細胞傷害後直ちに感覚上皮広範囲に発現上昇が認められることが確認された。支持細胞活性化に関与する新規誘導因子を探索する目的で、再生初期過程で一過性に上昇する遺伝子を探索し、type I interferon (IFN) /JAK/STAT の下流遺伝子である <i>Ifi6</i> が抽出され、発現変動をISHで確認することができた。JAK/STAT 情報伝達系の再生初期過程での機能解析を目的とし、JAK 阻害剤を器官培養系に添加し、<i>Ifi6</i> および <i>Atoh1</i> 発現に対する効果を調べた。qPCR で評価した結果、阻害剤非投与群と比較して投与群では <i>Ifi6</i> の発現は有意に抑制され、<i>Atoh1</i> の発現は抑制される傾向を認めた。</p> <p>本研究結果より、鳥類蝸牛有毛細胞再生初期過程に、type I IFN/JAK/STAT 情報伝達系が関与していることが示唆された。今後、この鳥類蝸牛器官培養モデルを用い、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行い、より詳細な有毛細胞再生初期過程での支持細胞活性化のメカニズム、支持細胞のサブタイプ等を調べ、哺乳類への応用を試みたい。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

鳥類蝸牛有毛細胞再生の初期過程で活性化する新規遺伝子および情報伝達系の探索を目的とした研究である。孵化後1日目のヒヨコ蝸牛感覚上皮の器官培養を行い、ストレプトマイシン (SM) にて有毛細胞傷害を惹起し、有毛細胞消失および再生過程を組織学的に解析した。有毛細胞消失および再生有毛細胞出現の詳細な時期を明確にし、トランスクリプトーム解析を行った。また、EdU 添加培養実験を行い、再生有毛細胞は直接分化転換により誘導されること、特定の領域の支持細胞が分裂増殖していることが示唆された。上記実験結果に立脚した実験群 (4 群) によるトランスクリプトーム解析から、有毛細胞再生にむけた支持細胞活性化に関与する可能性のある遺伝子を抽出し、候補シグナルとして type I IFN/JAK/STAT 情報伝達系に注目し、機能解析を実施した。本研究により、鳥類蝸牛有毛細胞再生初期過程にかかわる可能性がある新規シグナルの1つとして type I IFN/JAK/STAT 情報伝達系を検出した。

以上の研究は、蝸牛有毛細胞再生のメカニズムの一端を明らかにし、今後ヒト難聴克服のための新規治療薬開発に貢献する可能性がある。

よって、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。おお、本学位授与申請者は、令和3年2月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた者である。

要旨公開可能日： 年 月 日以降