

京都大学	博士 (医学)	氏名	山本亮介
論文題目	<b>In silico analysis of inner ear development using public whole embryonic body single-cell RNA-sequencing data</b> (マウスの全身の単一細胞 RNA シークエンシング公開データを利用した内耳発生の in silico 解析)		
(論文内容の要旨) 内耳上皮は蝸牛・前庭・三半規管・内リンパ管の四つの構造で構成される。これらの構造はマウスでは胎齢 13.5 日には明瞭に分かれる一方で、内耳が耳胞と呼ばれる胎齢 10.5 日にはまだ明確に分かれていない。本研究では、Mouse Organogenesis Cell Atlas と呼ばれる胎生期マウスの全身の細胞の単一細胞トランスクリプトームの公開アトラスの一部を利用し、内耳発生早期の各種細胞に特異的に発現するマーカー遺伝子を同定することを目的とした。胎齢 9.5-13.5 日の全身の細胞の 200 万個の単一細胞トランスクリプトームデータから内耳上皮細胞と考えられる 5,000 個の細胞のデータを抽出した。まず全身の細胞を遺伝子発現情報から分類し <i>Epcam</i> や <i>Trp63</i> を発現する上皮細胞の集団が特定された。その後、上皮細胞の細胞集団を同様に分類したところ、他の細胞群と明瞭に分かれる細胞集団が存在し、その細胞集団が、内耳に特異的に発現する <i>Oto11</i> , <i>Oc90</i> などを発現していたことから内耳上皮細胞と考えられた。5,000 個の細胞の高次元情報を二次元に落とし込み可視化したところ、胎齢 9.5 日の細胞から胎齢 13.5 日へと分化が進むにつれて、辺縁に分布し、大きく四つのクラスターを形成していくことがわかった。それらのクラスターを胎生期内耳での発現分布が既知の遺伝子の発現を参考にしながら、データのアノテーションを行ったところ、それぞれが蝸牛・前庭・三半規管・内リンパ管に相当することがわかった。また、各クラスターの中に、感覚上皮などのサブクラスターを検出できることがわかった。in silico 解析の妥当性を確認するために、各クラスターに特異的に発現していると検出された遺伝子の中から内耳での発現がわかっていない遺伝子を選び、蝸牛・前庭・三半規管・内リンパ管での発現を、in situ hybridization で確認したところ、in silico 解析結果と同様の発現分布を認めた。胎齢 10.5 日では、蝸牛と前庭を組織学的に区別することが難しく、両者を区別するようなマーカー遺伝子も見つかっていなかったが、in silico 解析の結果、胎齢 10.5 日でも蝸牛と前庭のクラスターは明瞭にわかれていると考えられた。胎齢 10.5 日から 13.5 日にかけて蝸牛のクラスターに特異的に発現すると考えられた遺伝子 <i>Rorb</i> の in situ hybridization を行ったところ、胎齢 11.5 日から 13.5 日にかけて、 <i>Rorb</i> が蝸牛に特異的に発現することを確認し、また胎齢 10.5 日においては蝸牛と前庭の区別をする指標がないものの、蝸牛が出現してくると考えられる耳胞腹側端に特異的に <i>Rorb</i> が発現することがわかった。これらの結果から、胎齢 10.5 日において既に蝸牛の分化が始まっていることが示唆され、また <i>Rorb</i> は蝸牛前駆細胞と前庭前駆細胞を区別するマーカー遺伝子である可能性が示された。 以上のように、公開された単一細胞トランスクリプトームデータを再解析することで、内耳発生早期の細胞を分類するとともに、各細胞群を特徴づけるマーカー遺伝子候補を検出した。また、胎齢 10.5 日の時点で、蝸牛や前庭を遺伝子発現情報から分類できることがわかった。胎齢 10.5 日の蝸牛と前庭を比較して見つかった発現変動遺伝子の中に、蝸牛や前庭の発生機構に関わる遺伝子が含まれている可能性があり、今後各遺伝子の機能を明らかにする研究が望まれる。また、本研究で見つかった各クラスターのマーカー遺伝子の知識が、内耳発生早期の研究を更に促進することが期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

内耳発生機構の解明につながる内耳発生時の各細胞種に特徴的なマーカー遺伝子の探索を目的とした研究である。公開されている胎生期マウスの全身の細胞の単一細胞トランスクリプトームのデータから、5,000 個の内耳上皮細胞のデータを抽出して独自に解析を行った。その結果、胎齢 9.5 日を中心とした未熟な内耳上皮細胞と、内耳を構成する蝸牛・前庭・三半規管・内リンパ管の細胞集団を同定することができた。また、各細胞集団に特徴的なマーカー遺伝子の候補を各クラスターにつき数十個検出することができた。それらの遺伝子から、各細胞種に特に特異的に発現する遺伝子を選定し in situ hybridization を行った結果、実際の組織での発現分布は in silico 解析の発現分布に合致するものであった。また、その中の 1 つの *Rorb* という遺伝子は、in silico 解析で胎齢 10.5 日以降蝸牛の上皮細胞に特異的に発現すると考えられ、胎齢 10.5 日ではまだ明確な蝸牛は形成されていないものの、蝸牛が出現してくると考えられている耳胞の腹側端に特異的に発現していた。過去の *Rorb* を用いた系統追跡実験の報告も踏まえると in silico 解析で胎齢 10.5 日において *Rorb* を発現している細胞集団は蝸牛上皮前駆細胞の存在を示唆するものである。以上のことから、組織学的に蝸牛と前庭を区別できない胎齢 10.5 日においても既に未熟な蝸牛や前庭の細胞は遺伝子発現レベルでは分けられ、また *Rorb* が胎齢 10.5 日の蝸牛前駆細胞を見分けるためのマーカーとなりうると考えられた。

以上の研究は胎生期内耳の各細胞種のマーカー遺伝子を多く発見することに寄与し、今後は蝸牛の発生機構の解明に貢献すると考えられる。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、本学位授与申請者は、令和 3 年 8 月 10 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降