

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	谷 口 美 玲
論文題目	Identification of Tympanic Border Cells as Slow-Cycling Cells in the Cochlea (内耳 slow-cycling cell として tympanic border cell を同定した)		
(論文内容の要旨)			
哺乳類の感覚上皮細胞は長らく障害後に再生することがないと考えられてきた。しかし 1995 年に Rubel らによって哺乳類前庭感覚上皮における有毛細胞の再生が報告され、2003 年にはマウス成体の卵形嚢に感覚上皮細胞や神経になりうる幹細胞が存在する(Li et al., 2003)という報告が、また、2006 年にはマウス成体の蝸牛コルチ器から、支持細胞のマーカーである p27kip1 を指標に取り出した細胞が <i>in vitro</i> では分裂可能であり有毛細胞のマーカーである myosin 6 陽性細胞になりうる (White et al., 2006)という報告がされた。これらの研究により内耳においても幹細胞の存在が明らかになったが、これまでの研究では内耳細胞を生体外に取り出し個々の細胞に遊離させてから幹細胞を選別するという手段を用いているため、幹細胞の生体内での解剖学的位置は解明されていない。現在、感覚上皮の障害による感音難聴には治療法がない状態であり、再生のための新しい治療法を開発するためには幹細胞の解剖学的位置の解明が必要である。 組織幹細胞は分裂サイクルが他の細胞に比べて極めて遅い slow-cycling cell である(Quesenberry et al.,1979)という性質を利用して、これまで皮膚(Taylor et al., 2000)、前立腺(Tsujimura et al.,2002) などにおいて、生体内での幹細胞の同定および局在の確認が行われた。 本研究の目的は内耳幹細胞の候補と考えられる slow-cycling cell を <i>in vivo</i>において同定することである。皮膚毛包幹細胞の報告(Taylor et al., 2000) と同様の実験手段を用い、胎児期から哺乳期、および成体のマウス蝸牛について検討した。核酸のホモログである BrdU 50μg/g を胎生 13.5 日齢、胎生 18.5 日齢、哺乳 4 日齢の ICR マウスに 1 時間おきに 2 回腹腔内投与し 5 日後に蝸牛を採取、もしくは哺乳 3 日齢から 5 日齢の 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与し約 3 週間後に蝸牛を採取した。これらの標本に対し、BrdU および内在性の増殖マーカーである Ki-67 に対する免疫組織化学的評価を行った。高頻度に分裂する細胞は BrdU が希釈され陰性化する。BrdU 投与後分化した細胞は BrdU は陽性、Ki-67 は陰性となる。内耳幹細胞は分裂回数が少ないため BrdU は希釈されずに検出される上に Ki-67 も陽性となると考えられる。蝸牛において BrdU 陽性かつ Ki-67 陽性となる細胞を検索した。 結果、基底板の鼓室階側の細胞層である tympanic border cell に BrdU 陽性かつ Ki-67 陽性の slow-cycling cell を認めた。これらの slow-cycling cell は血管周囲に比較的多く局在し、神経幹細胞などで発現が認められる Nestin が陽性であった。			

結果、基底板の鼓室階側の細胞層である tympanic border cell に BrdU 陽性かつ Ki-67 陽性の slow-cycling cell を認めた。これらの slow-cycling cell は血管周囲に比較的多く局在し、神経幹細胞などで発現が認められる Nestin が陽性であった。Tympanic border cell における slow-cycling cell の数は成長とともに減少する傾向にあり、成体のマウス蝸牛では検出できなかった。 Tympanic border cell は slow-cycling cell を含み、内耳において未熟な細胞群で幹細胞の候補と考えられる。今後 tympanic border cell の遺伝子発現について検討したい。			
(論文審査の結果の要旨)			
近年、哺乳類の内耳感覚上皮における幹細胞の存在が <i>in vitro</i> の研究によって報告されているが、その生体内での解剖学的位置は解明されていない。組織幹細胞の特徴のひとつとして分裂サイクルが他の細胞に比べて極めて遅い slow-cycling cell であるという性質があり、皮膚毛包幹細胞等はその性質を利用して局在が解明されている。今回、内耳幹細胞の候補と考えられる slow-cycling cell について、マウス蝸牛を対象に検討した。 マウスに核酸のホモログである BrdU を投与し一定時間経過した後に採取した標本に対し、BrdU および内在性の増殖マーカーである Ki-67 に対する免疫組織化学的で評価が行われた。高頻度に分裂する細胞は BrdU が希釈され陰性化する。Slow-cycling cell は分裂回数が少ないため BrdU は希釈されずに検出される上に Ki-67 も陽性となる可能性が高い。BrdU 陽性かつ Ki-67 陽性となる細胞を検索し、解析した結果が示された。 蝸牛における slow-cycling cell は基底板の鼓室階側の細胞層である tympanic border cell に局在していた。これらの slow-cycling cell は血管周囲に存在し、神経幹細胞などで発現が認められる Nestin が陽性であった。Tympanic border cell における slow-cycling cell の数は成長とともに減少する傾向にあり、成体のマウス蝸牛では検出できなかった。 以上から tympanic border cell は slow-cycling cell を含み、内耳において未熟な細胞群で幹細胞の候補と考えられることが示唆された。 以上の研究は tympanic border cell が slow-cycling cell であることを解明し、内耳再生の研究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。 なお、本学位授与申請者は、平成 2 5 年 1 月 3 0 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			