

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

平成25年 4月22日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学研究科

職名・学年 博士課程4年(平成24年2月時点)

氏名 西村幸司

助成の種類	平成23年度 ・ 若手研究者在外研究支援 ・ 在外研究長期助成		
研究課題名	ラセン神経節発生因子の解明による機能的聴神経再生		
受入機関	トロント大学サニーブルックリサーチインスティテュート		
渡航期間	平成24年 4月13日 ～ 平成26年 4月12日 助成対象渡航期間 平成24年4月13日から1年間		
成果の概要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 ■ 無 □ 有()		
会計報告	交付を受けた助成金額	2,500,000円	
	使用した助成金額	0円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	渡航費・1年分の滞在費に充当	

成果の概要

医学研究科 西村 幸司

哺乳類のラセン神経節は聴覚感覚細胞である蝸牛有毛細胞と脳幹の蝸牛神経核をシナプスする聴覚一次ニューロンである。現在高度難聴者に対しての唯一の治療法である人工内耳はラセン神経節を直接電気刺激して音感を得させるために、ラセン神経節が残存しない程の高度難聴者は人工内耳の効果も見込めない。さらに生後のラセン神経節は自発的には再生しない。従来、蝸牛有毛細胞変性後の二次的変性がラセン神経節変性の主要因とされてきたが、音響暴露や加齢によりラセン神経節が一次性に変性しうるということが近年報告されてきている(Furman AC, 2013; Engle JR, 2013; Kujawa AG, 2009)。従って、聴覚再生医療の開発にむけてラセン神経節の機能的再生は第一に考慮されるべきであり、これにより、現存の人工内耳の装用効果が改善するのみならず、根本的な感音難聴の治療法が開発できる可能性がある。

聴覚感覚細胞である蝸牛有毛細胞、それらを取り囲む支持細胞、ラセン神経節は共通の起源である耳プラコードから発生する(Rubel and Fritzscht, 2002)。報告者の留学先の以前の研究で、転写因子 Neurog1, NeuroD1, Sox2 のいずれの強制発現によっても蝸牛非感覚細胞が神経細胞へ運命を変更することが示されている(Puligilla, 2010)。しかしながら、神経への分化転換は胎生時期にのみ認め、神経誘導効率も低く、かつ生後非感覚上皮からの神経分化誘導は認めなかった。従って、生後マウスの神経分化効率の向上が成人のラセン神経節再生に向けて克服する課題といえる。一方で最近では、神経発生特異的な転写因子群の強制発現により線維芽細胞から神経細胞への直接分化転換が報告されている(Vierbuchen, 2010; Pang, 2011)。bHLH 転写因子である Ascl1 がこれらの報告に共通の神経誘導因子であることに加えて、Ascl1 は神経前駆細胞の増殖、前駆細胞から成熟神経への分化に役割を果たす (Castro, 2011)ことから、蝸牛非感覚上皮においても Ascl1 が神経細胞を高効率に誘導するとの仮説のもとに実験を行った。

まず、胎生 13.5 日マウスから剖出した蝸牛上皮に pCIG.nucEGFP.Ascl1 ベクターを電気穿孔法にて強制発現させ、6 日間器官培養した後に組織を固定し、汎神経マーカーの β III-tubulin の陽性率を免疫組織化学で評価した。pCIG.nucEGFP ベクターを陰性コントロールとした。Ascl1 が遺伝子導入された蝸牛非感覚上皮

のうち 91%が β III-tubulin であった。pCIG.nucEGFP ベクター導入細胞の β III-tubulin 陽性率は0%であった。Neurog1(26%), Sox2(39%), NeuroD1(73%) (Pulligila, 2010)と比較して Ascl1 はより高い神経分化能を有した。さらに生後 5 日齢の蝸牛非感覚上皮において、Neurog1, Sox2, NeuroD1, コントロールベクターいずれも遺伝子導入細胞の β III-tubulin 陽性率は 0%である一方で Ascl1 導入細胞においては 73%が β III-tubulin 陽性であった。生後 10 日齢では 86%, 生後 20 日齢では 42%の β III-tubulin 陽性率であった。さらに、Ascl1 を遺伝子導入した蝸牛非感覚上皮から活動電位が記録され (Rutgers 大学との共同研究)、分化誘導された神経は機能的であることが示された。分化誘導された神経は成熟神経マーカーMap2 陽性であり、シナプス関連タンパク Synapsin1, SNAP25 も陽性であった。本成果は近日中に論文投稿予定である。

本研究は生後蝸牛非神経細胞からラセン神経節を誘導し再生させる **proof of principle** 型研究である。今後は本成果を敷衍して、ラセン神経節の支持細胞である蝸牛シュワン細胞からラセン神経節への分化転換を行い、聴神経の機能的再生をめざす。蝸牛シュワン細胞は蝸牛非感覚上皮と異なり、神経に誘導された場合末梢、中枢共にシナプス結合しやすい解剖学的位置に存在するからである。予備的実験結果として、Ascl1 導入後の生後蝸牛シュワン細胞から神経への分化誘導は *in vitro* で確認している。蝸牛シュワン細胞由来神経と蝸牛有毛細胞あるいは蝸牛神経核とのシナプス結合が聴神経の機能的再生には必須であり、今後は分化誘導された神経のシナプス結合能を器官培養系の実験で示す予定である。さらに *in vivo* 実験による蝸牛シュワン細胞からの神経分化と聴性脳幹反応による再生した聴神経の機能評価も施行する。

近年、転写因子導入による分化転換研究は各国で盛んに研究されているがラセン神経節を標的にした研究は極めて少ない。帰国以降、京都大学の研究室に成果を還元することが十分可能であり、貴財団の意図に叶ったものであると確信する。