

論文の内容の要旨

論文題目 ゲンタマイシン局所投与後モルモット前庭
 における *Musashi1* の細胞内局在変化

氏名 木下 淳

【諸言】

平衡覚を司る前庭器の障害は、加齢・薬物・炎症・遺伝子異常など様々な原因で生じるが、その主な症状はめまい・平衡障害である。めまい・平衡障害として社会的に最も問題になるのが、高齢者における転倒・転落事故であり、加速度的に高齢化が進む日本では高齢者のめまいに対する適切な対応が今後ますます重要な課題になると考えられる。このように平衡障害の原因は異なるが、前庭器の障害は病的には有毛細胞の障害によるものが多く、前庭有毛細胞の機能回復、再生が可能であれば将来のめまい治療へ結びつくと考えられ、その再生機序を解明することが重要となる。

内耳有毛細胞の再生のしくみについては、1. 支持細胞の有糸分裂による有毛細胞増殖、2. 支持細胞の有糸分裂を経ない有毛細胞への形質転換、3. 部分的に傷害を受けた有毛細胞の自己修復の大きく3つの仮説が提唱されているが、現在のところ一定した見解がない。

発生学的には有毛細胞と支持細胞は共通の前駆細胞から生まれてきていることが確認されており、Notch シグナルが側方抑制を通して有毛細胞と支持細胞の分化を制御していると考えられている。さらに、その Notch シグナルの制御に関わる因子としては *Musashi* (*Msi*) が知られている。*Msi* はショウジョウバエの外感覚器の発生における非対称性分裂に必須な遺伝子として同定され、哺乳類では *Msi1* および *Msi2* がクローニングされている。*Msi1* は胎生期発達中の中枢神経前駆細胞に強く発現し、細胞周期を停止する機能や Notch に結合して拮抗的に働く *m-Numb* mRNA の翻訳を阻害する。Notch シグナルの活性化は幹細胞からニューロンへの分化を抑制することから、*Msi1* は Notch シグナルを間接的に増強することで幹細胞を未分化状態に保つと考えられている。一方、マウスの内耳発生時における *Msi1* の発現は、胎生 14 日において膨大部稜の全ての感覚上皮細胞内で広範囲にみられるが、有毛細胞が形成され、そのマーカーである *Myosin7a* (*Myo7a*) が細胞質に陽性となる時期である胎生 16 日では有毛細胞での発現を欠き、支持細胞の細胞質内で強くびまん性にみられ、生後 14 日では支持細胞においても *Msi1* の発現は核優位にみられるのみとなる。このような *Msi1* の組織内および細胞内での局在変化は、内耳感覚細胞の発生制御に *Msi1* が関連していることを示唆する。

これらの背景に鑑み、本研究ではモルモットを用いて前庭感覚上皮傷害物質であるゲンタマイ

シン投与後に起こる有毛細胞の自発的再生過程で神経前駆細胞の分化・成熟と細胞分裂に關与する Msi1 の前庭上皮感覚細胞内での局在變化および細胞増殖マーカーであるブロモデオキシウリジン (BrdU) の取込み量の変化について分子生物学的に解析し、有毛細胞の再生様式を検討した。

【前庭感覚上皮増殖時期の推定】

まずゲンタマイシンの内耳局所投与による前庭感覚上皮傷害モデルモルモットを作製した。傷害後 7、14、21、28、56 日目に内耳を摘出し、作製した組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色にて観察した。傷害前の半規管膨大部稜では I 型および II 型有毛細胞から成る感覚細胞層と支持細胞から成る基底細胞層の 2 層構造を認め、それらの細胞が密に存在していた。各細胞における平均密度の経時的變化を調べたところ、I 型有毛細胞は経過中に傷害前と比べて 5~28%まで減少し ($p<0.01$)、ほとんど再生しなかった。II 型有毛細胞は傷害後 7、14 日目で傷害前より 57%、29%に減少し ($p<0.05$ 、 $p<0.01$)、その後 28、56 日目では傷害前の 80%、93%にまで増加していた ($p<0.01$)。支持細胞は経過中に細胞密度の増減はみられなかった。

次に傷害後 1~5 日、6~10 日、11~15 日と分けて BrdU を少量持続投与し、傷害後 28 日目に各群の BrdU 取込みを観察した実験では、傷害後 6~10 日と 11~15 日目に BrdU を取込んだ支持細胞を多くみとめた ($p<0.01$)。以上の結果から、前庭傷害モデル動物における有毛細胞の自発的再生過程では傷害後 6~15 日目が支持細胞による細胞増殖が盛んな時期と考えられ、傷害後 14 日目から 28 日目が有毛細胞の形成時期と考えられた。

【有毛細胞の再生様式】

有毛細胞の再生様式には、支持細胞の有糸分裂を介したもの、有糸分裂を介さない支持細胞の形質転換、傷害有毛細胞の自己修復の 3 つの機構が考えられている。

支持細胞を基にした形質転換や対称性有糸分裂では再生過程で支持細胞数の増減があると考えられるが、本研究では上述のように支持細胞数の増減はみられなかった。支持細胞数を一定に保ちながら有毛細胞が再生する機序としては、支持細胞の一方が有毛細胞、他方が支持細胞になるような非対称性細胞分裂の様式が考えられる。そこで、前庭傷害モデル動物から得られた組織切片を非対称性分裂に關与する Msi1、Myo7a 抗体を用いて蛍光免疫染色で観察をおこなった。その結果、傷害後 7、14 日目では支持細胞の細胞質に Msi1 がびまん性に発現し、傷害後 21 日目には核優位に染色される Msi1 と細胞質に染色される Myo7a との二重陽性細胞がみられた。これらの結果は有毛細胞再生過程に Msi1 が關与する可能性を示唆し、支持細胞の非対称性分裂を介した有毛細胞再生様式を支持するものと考えられた。

また、上記の BrdU 持続投与実験において、BrdU を取り込み DNA 複製が行われたことを示す細胞が支持細胞のある基底細胞層に多くみられ、一部に BrdU と Myo7a が二重陽性となる細胞を感覚細胞層側にみとめたことも再生した有毛細胞が支持細胞の有糸分裂に由来することに矛盾しないと考えられた。

【前庭有毛細胞再生過程における Msi1 の細胞内局在變化】

前庭傷害モデル動物から得られた前庭組織切片を Msi1 抗体および Myo7a 抗体で蛍光免疫染色を行い観察した。傷害前では Myo7a で標識された有毛細胞は Msi1 陰性であり、基底層に存在する支持細胞では Msi1 は核に局限して染色された。続いて、傷害後 7、14 日目では Myo7a 陽性細胞は消褪し、Msi1 は支持細胞の核および細胞質にびまん性に染色されていた。さらに傷害後 21、28、56 日目では支持細胞における Msi1 の局在は時間経過と共にびまん性から核優位の発現に変化した。この期間において Myo7a 陽性細胞の多くは Msi1 染色が陰性であったが、一部に Msi1 が核に染まる細胞が確認された。さらにこの二重陽性細胞は傷害後 21 日目では基底細胞側に多くみられ、28、56 日目では感覚細胞層に多くみられた。

傷害後 14、21、28、56 日目の感覚上皮における DAPI 陽性細胞に対する Myo7a 陽性細胞の推移を検討してみると、Myo7a 陽性細胞は 14 日目から 28 日目の間に有意差を持って ($p<0.01$) 増加していた。さらに Myo7a 陽性細胞の中で Msi1 と二重陽性になる細胞について検討すると、傷害後 14 日目から 21 日目にかけて有意に増加し ($p<0.01$)、21 日目から 28 日、56 日目の間では有意に減少していた ($p<0.01$)。

傷害前の標本において支持細胞の核に局限して Msi1 の発現があったことは、支持細胞が神経幹細胞機能を有することを示唆し、細胞の未分化維持に寄与しているものと考えられている。傷害後 7~14 日に支持細胞の核、細胞質にびまん性に Msi1 が発現していた時点は BrdU の取込みが多い時期でもあり、この時期は支持細胞の増殖活性が上昇した時期にあたりと考えられる。その後、傷害後 21 日目において核に局限する Msi1 と細胞質に発現する Myo7a の二重陽性細胞を基底細胞層側に多く認めた。これは非対称性分裂中に Msi1 の局在が核優位に変化した娘細胞が有毛細胞へ分化・成熟する初期段階を捉えているものと考えられる。一方、この時点で細胞質にも Msi1 が発現している細胞は再び支持細胞になるものと考えられる。傷害後 28、56 日目では Msi1 と Myo7a の二重陽性細胞の割合は減少し、その多くは感覚細胞層にみられた。それに対して Myo7a のみ陽性の細胞が増加しており、この細胞は新たに再生され成熟した有毛細胞にあたりと考えられる。このような有毛細胞の自発的再生過程における Msi1 の前庭感覚上皮内での時間的空間的な局在変化は、その発生過程における Msi1 の挙動と同様の変化と考えられ、Msi1 が有毛細胞再生過程で細胞の運命決定、細胞系譜形成の制御に関わることが示唆された。

【結論】

本研究では、ゲンタマイシン傷害後のモルモット前庭感覚上皮自発的再生過程における Msi1 蛋白発現の経時的な細胞内局在変化を初めて報告した。哺乳類前庭有毛細胞の再生過程では少なくとも支持細胞の細胞分裂と分化が関与し、Msi1 がその過程で細胞の運命決定、細胞系譜形成の制御に関わることが示唆された。この研究結果より、内因性神経幹細胞の分化誘導機構の制御が平衡機能障害の治療戦略の 1 つと成り得るものと考えられた。