

## 博士論文

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

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

耳鼻咽喉科

指導教員：山嵜 達也 教授

木 下 淳

## 1. 要旨

モルモット前庭傷害後の有毛細胞再生過程において、神経前駆細胞の分化・成熟と細胞分裂に関与する **Musashi1 (Msi1)** に注目し、その再生様式を検討した。傷害後 **Msi1** は細胞増殖期には支持細胞の細胞質にびまん性に発現し、分化・成熟期と考えられる時期には核優位となった **Msi1** と成熟有毛細胞のマーカーとされる **Myosin7a** との二重陽性細胞がみられた。この結果は、有毛細胞再生過程では支持細胞の細胞分裂と分化が関与すること、**Msi1** が細胞運命の制御に関わることを示唆する。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。

## 2. 序文

内耳には聴覚を感受する蝸牛と平衡覚を感受する前庭器とが存在し、哺乳類の場合、前庭器は末梢受容体である 2 つの耳石器と 3 つの半規管から構成されている（図 1A）[1, 2]。半規管は外側半規管、前半規管、後半規管からなり、互いに直交し、あらゆる方向の回転加速度を検出することができる。3 つの半規管の一端は膨大して膨大部を形成し、その内面には膨大部稜がある（図 1B）。ここでは支持細胞、有毛細胞が交互に並び、感覚上皮を形成している。有毛細胞には I 型と II 型があり、それぞれ細胞上部表面に感覚毛を有し感覚上皮上方 2/3 の感覚細胞層に位置している。I 型はフラスコ型を呈し、大きな求心性神経終末である神経杯に包まれている。II 型は円筒状で小さい神経がこれに接している。I、II 型とも脳幹に起始する遠心性神経終末が細胞に接して分布する。一方、支持細胞は基底膜からリンパ腔までのびる細胞で、その核は基底膜上の支持細胞層に整然と配列する（図 1C）。

前庭器の障害は、加齢・薬物（アミノ配糖体系抗生剤、抗腫瘍薬、利尿薬など）・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、前庭器のその他の構造、機能などは保たれている場合もあることが知られている[3]。言い換えれば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。

従来、鳥類・哺乳類では内耳有毛細胞が形成されるのは発生の過程に限られ、出生後は内耳有毛細胞が一度障害されると再生することはないとされてきた[4]。しかし鳥類において、1987年 Cotanche ら[5]、Rubel ら[6]によって、それぞれ強音、薬剤負荷による傷害後に蝸牛有毛細胞が再生することを報告された。以来、鳥類では前庭有毛細胞、蝸牛有毛細胞も、ある程度は自発的に再生することが明らかにされた[7-9]。

一方、再生能が低いとされてきた哺乳類では、1993年 Warchol ら[10]がアミノ配糖体傷害後のモルモット前庭において、van de Water ら[11]がラット蝸牛において有毛細胞の自発的再生を確認した。この2つの研究は、哺乳類においても有毛細胞の再生は有糸分裂を経た細胞増殖に伴うものであることを示したものである。また Forge ら[12]は、鳥類の場合と同様に哺乳類でも形態学的に形質転換による有毛細胞再生を報告した。形質転換による有毛細胞再生の根拠とされたのは、内耳感覚上皮の基底面から頂上面にいたるまで細胞体が存在する支持

細胞の特徴と、微絨毛を有するという未熟な有毛細胞の特徴を兼ね備えた細胞（transitional cell）が観察された点にある。これに対し Zheng ら[13]は、哺乳類の卵形嚢を器官培養し形質転換を誘導したところ、支持細胞が形質転換を説明できるほど減少していないこと、および、不動毛を失っているが有毛細胞のマーカであるカルシウム結合蛋白による免疫染色が陽性の細胞が観察できることから、有毛細胞の再生は完全に傷害されなかった有毛細胞が自己修復したと結論づけている。

以上より、鳥類・哺乳類におけ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（図 2）[14]。

発生学的には内耳幹細胞は 3 つの細胞ライン（第 8 脳神経節細胞、非感覚上皮前駆細胞、感覚上皮前駆細胞）に分かれる（図 3）[15-17]。内耳幹細胞に対して SOX2 と Neurog1 は第 8 脳神経節の形成を誘導し、Jagged1、Notch1、FGF、Sox2、IGF-1、BMP4 は有毛細胞と支持細胞の起源となる感覚上皮前駆細胞の形成を誘導する。Hes は Atoh1 の発現に拮抗し支持細胞の発生を促進する。Atoh1、Jagged2、Delta1 は有毛細胞への分化を誘導し、Espin、Brn3c、Myosin VI、VIIA、XV は有毛細胞の最終分化、維持、生存に重要な役割を果たす。Delta1 は有毛細

胞が初期に分化する際に発現される Notch リガンドであるが、最終的に分化の方向が決まるとむしろ低下することが知られ、ニワトリでは有毛細胞が再生する時にも Delta1 が発現することが確認されている[18]。また Notch は側方抑制として列の側方の過剰な有毛細胞の発生を抑制することが知られており、Notch シグナルが活性化されると支持細胞へ、抑制されると有毛細胞への分化運命が決定されることが考えられている。

このように Notch シグナルは内耳発生において重要な役割を果たしているが、その制御に関わる因子として Musashi (Msi) が知られている。Msi は 1994 年に Okano ら[19]によって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た[20]。Msi 蛋白質群は、種を超えて高度に保存された RNA 結合蛋白質であり、ショウジョウバエ・線虫・ホヤなどの無脊椎動物から、マウスなどの齧歯類、高等霊長類のヒトまで広く存在する。哺乳類では Msi1 および Msi2 がクローニングされており、Msi1 は胎生期発達中の中枢神経系前駆細胞に強く発現し、分化の進行に伴って消失する。そして、Msi1 は m-Numb mRNA の 3'UTR に結合し、その翻訳を阻害する[20]。m-Numb は細胞周期を停止させる機能を有し、さらに Notch に結合して拮抗的に働く。Notch シグナル伝達経路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（図 4）。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（図 5A）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[21, 22]である胎生 16 日では、*Msi1* 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（図 5B）、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（図 5C）[23]。これらのマウス内耳発生における *Msi1* および *Myo7a* の発現様式のまとめを図 5D に示す。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耳毒性物質として知られるゲンタマイシン（GM）の内耳投与後に起こる前庭感覚上皮の自発的再生を確認し、その過程で 1) 神経前駆細胞の分化・成熟と細胞分裂に関与する *Msi1* の前庭上皮細胞内での局在変化、2) 細胞増殖マーカーであるブロモデオキシウリジン (*BrdU*) の前庭上皮で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明らかにすることを目標とした。



### 3. 方法

#### 3.1. 実験動物

生後 4 週齢（200～250g）のハートレー系白色雄モルモット（東京実験動物供給所）を使用した。モルモットは温度管理環境、12 時間毎明暗サイクル環境下のコンベンショナル飼育施設において不断給餌の状態で飼育し、屠殺の時点で明らかな耳疾患症状（中耳炎など）および全身疾患を認めないものを使用した。動物実験の全過程は東京大学動物実験実施規則及び、NIH guide for the Care and Use of Laboratory Animals に則り施行され実験動物の苦痛を最小限にするよう努めた。

#### 3.2. GM 内耳局所投与による前庭傷害モデル動物の作製

前庭感覚上皮傷害のモデル動物として、モルモットにケタミン 40mg/kg およびキシラジン 10mg/kg の筋肉注射による深麻酔下に左耳後部切開を行い、手術用顕微鏡（M320 F12, Leica）下で蝸牛開窓部から GM（ゲンタシン注 60、MSD）を蝸牛内局所投与したものをを用いた。GM はアミノ配糖体の一つであり、耳毒性

物質として動物実験に汎用される薬物である[24]。内耳への薬物投与経路には大別して全身投与と局所投与があるが、全身投与で十分な内耳傷害を惹起する容量を投与した場合、腎機能傷害によってしばしば動物が死亡することや投与に数日の時間を要するため前庭有毛細胞再生の経時的な変化を検討する際の困難が予想される。したがって本研究では、(1) 傷害が用量依存性であり、再現性がある、(2) 短期間で前庭感覚上皮全体に均一な傷害を起こすことができる、(3) 投与法が容易であり、安定して行える、の3点の理由より、GM 局所投与による前庭上皮傷害を選択し、さらに投与時の前庭組織の外傷性変化も懸念して、蝸牛開窓部から薬物を還流させる方法を選択した。

GM 投与量の検討のために、生理食塩水のみ 0.2ml をモルモット蝸牛内に投与した群を対照として、各群 3 匹で GM を 20mg/dl、40mg/dl、80mg/dl、120mg/dl で 0.2ml 蝸牛内投与を行い、投与後 14 日目に内耳組織を採取してパラフィン切片を作製した。これらの切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、下記(3.8. 前庭感覚細胞の質的、量的解析)に示した方法で有毛細胞をカウントすると、図 6 のように 40mg/dl で有毛細胞密度は対照の 15.6%と本研究に十分な程度に減少し、それ以上の濃度では有意な差を認めなかった。したがって、40mg/dl の GM は市販の濃度であり濃度調製を要さず安定して実験に使用できることも考慮して、本実験で用いる前庭傷害モデル動物の GM 投与量は 40mg/dl の濃度で 0.2ml

を蝸牛内に注入することとした。

### 3.3. 実験プロトコール

#### 3.3.1. 前庭有毛細胞再生の経時的变化に関する検討

前庭傷害モデル動物に対して GM 投与前、投与後 7、14、21、28、56 日目に内耳組織を採取（各群 6 匹）し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色にて半規管膨大部稜における有毛細胞および支持細胞数の経時的变化を光学顕微鏡下で観察した。またパラフィン切片の一部を有毛細胞マーカーである Myo7a および I 型有毛細胞マーカーである Parvalbumin (Pvalb)、DAPI による核染色にて蛍光染色し、各細胞数の計測に用いた。

予備実験にてパラフィン切片や脱灰後 O.C.T.コンパウンド包埋凍結切片では良好な Msi1 染色標本が得られなかったため、GM 投与後の膨大部有毛細胞再生における Msi1 の細胞内局在変化の検討に対しては上記と同様の群で内耳を採取（各群 6 匹）した後に実体顕微鏡下で半規管膨大部を摘出し、未脱灰アガロース包埋凍結切片を用いて蛍光免疫染色による評価を行った。

### 3.3.2. 有毛細胞増殖時期に関する検討

GM 傷害後の前庭感覚上皮における増殖細胞標識のため、細胞増殖マーカーであるブロモデオキシウリジン (BrdU ; Sigma-Aldrich) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.4) に溶解して、浸透圧ポンプ (alzet、2ML2) に注入したものを用意した。これを前庭傷害モデル動物の背部皮下に埋め込み、それぞれ GM 投与後 1～5 日、6～10 日、11～15 日の期間に分けて 125 $\mu$ g/時間で 5 日間持続投与した。GM 投与後 28 日目に内耳組織を採取 (各群 6 匹) し、パラフィン切片を作製した。GM は投与されていないが、BrdU が持続投与されている健側右耳を対照群とした。得られた切片を免疫染色にて評価した。

### 3.4. パラフィン切片の作製

生体モルモットは、氷冷した 4% paraformaldehyde(PFA)/phosphate-buffered saline(PBS)(pH7.4)で経心灌流固定後断頭した。生体モルモットの断頭した頭部から内耳を取り出し、4%PFA/PBS 内で一晩常温にて固定後、10% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)で 4 週間脱灰した。その後、標本をエタノール系列で脱水し、パラフィンに包埋した。組織を含むパラフィンプロックを 4 $\mu$ m 切片にし、

作製した切片をキシレンで脱パラフィン化し、エタノール系列で親水化し、染色に用いた。

### 3.5. アガロース包埋凍結切片の作製

4% PFA/PBS にて生体モルモット内耳を常温にて 2 時間固定後 PBS で洗浄した。その後、実体顕微鏡 (SZX9, Olympus) 下で半規管膨大部を摘出し 30%スクロース/PBS の中で一晩振盪置換した。置換後、5%アガロース (Type IX-A, Sigma-Aldrich) /20%スクロース/PBS に包埋し、n-ヘキサンで急速凍結 (−60℃) 後、−80℃で保存した[25]。切片作製にはクライオスタット (Tissue-Tek Cryo3, SAKURA) を用いて 15μm に薄切し風乾した。

### 3.6. ヘマトキシリン・エオジン染色

作製したパラフィン切片をキシレンで脱パラフィン化し、エタノール系列で親水化した。その後、カラッチのヘマトキシリン (武藤化学) に 4 分間染色し、1%塩酸/70%エタノールで 4 分間処理した。さらに、エオジン溶液[1% Eosin Y (Merck KGaA) : 80% エタノール : 氷酢酸 100:375:1 (v/v/v) ]で染色し、脱水・

標本化した。

### 3.7. 免疫組織化学染色

GM 傷害後の有毛細胞数の変化や Msi1 の局在変化、細胞増殖マーカーの取込みを検討するために酵素抗体法、蛍光抗体法による免疫組織化学染色を行った。

3.7.1. 酵素抗体法：パラフィン切片をキシレン・エタノール系列で脱パラフィン・親水化したのち、10mM クエン酸緩衝液（DAKO）を用い、121℃・20 分のオートクレーブによる抗原賦活化を行った。また BrdU の抗原性を賦活化する目的で 2 規定の塩酸にて 30 分処理した。続いて 3%過酸化水素含メタノールで 15 分内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。ブロッキング液（PBS,pH7.4、2%ウシ血清アルブミン、0.1%Triton X-100、0.1%アジ化ナトリウム含有）にて室温で 30 分処理し非特異的抗体反応を減少させた後、切片をラット抗 BrdU 抗体（AbD Serotec; 1:500 希釈）にて 4℃・一晩反応させた。反応後 PBS（pH7.4）にて洗浄、HRP 付加抗ラット IgG 二次抗体（シンプルステイン MAX-PO（Rat）、ニチレイ）にて室温・1 時間反応させた。BrdU の免疫反応はジアミノベンジジン（DAB、ニチレイ）により発色した。マイヤーのヘマトキシリン（武

藤化学) による対比染色の後、脱水・透徹・封入した。標本は光学顕微鏡 (Eclipse E800, ニコン) で観察した。

3.7.2. 蛍光抗体法：一次抗体として、ラット抗 Msi1 抗体 (14H1, Medical & Biological laboratories; 1 : 100 希釈)、ウサギ抗 Myo7a 抗体 (Proteus BioSciences; 1:200 希釈)、マウス抗 Parvalbumin 抗体 (Pvalb, Sigma-Aldrich; 1:100 希釈)、ラット抗 BrdU 抗体 (AbD Serotec; 1:500 希釈) を用意した。パラフィン切片に対しては上記と同様の工程で脱パラフィン、抗原賦活化を行い、アガロース包埋凍結切片ではこれらの工程は行っていない。次に、ブロッキング溶液 (5% ヤギ血清アルブミン/0.1% Triton-X 100/PBS (pH7.4)) で常温 1 時間インキュベートし、非特異的結合部位をブロッキングした。ブロッキング溶液に希釈した一次抗体を用い、切片を 4℃一晩でインキュベートした。PBS で洗浄後、下記のように一次抗体由来動物に対応するヤギ由来蛍光二次抗体 (Alexa Fluor, Molecular Probes; それぞれ 1:100 希釈) を用い、遮光下室温で 1 時間インキュベートした。

Pvalb/Myo7a   —  抗マウス Alexa Fluor 488 抗体/抗ウサギ Alexa Fluor 568 抗体

Msi1/Myo7a   —  抗ラット Alexa Fluor 488 抗体/抗ウサギ Alexa Fluor 568 抗体

BrdU/Myo7a   —  抗ラット Alexa Fluor 568 抗体/抗ウサギ Alexa Fluor488 抗体

PBS で洗浄後、切片を VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector

Laboratories) で蛍光退色阻止処理および核染色を行った。標本は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 PASCAL, Carl Zeiss, Germany) で観察した。

### 3.8. 前庭感覚細胞の質的、量的解析

前庭感覚上皮における細胞種の鑑別は過去の報告に基づき、まずは細胞形態と解剖学的位置によって行った[2, 26]。ヘマトキシリン・エオジン染色標本で基底細胞層に核を有するものを支持細胞、感覚細胞層に核を有するものを有毛細胞とし、そのうちフラスコ型で神経杯に囲まれた細胞を I 型有毛細胞、神経杯を欠き円筒状の細胞を II 型有毛細胞とみなした。半規管膨大部連続切片の内、解析領域の差によるデータのばらつきおよび重複カウントを避けるために各動物において膨大部中央部を含み、各々40 $\mu$ m 離れた前後 2 枚 (合計 5 枚) の切片を抽出した。光学顕微鏡 100 倍視野にて観察した像をデジタル顕微鏡カメラ (AxioCam, Carl Zeiss, Germany) により取り込み、画像編集ソフト (Adobe Photoshop CS5) を用いて細胞数および基底部の長さを計測した (図 7)。「各種細胞数/基底部長」の比を「各種細胞の細胞密度」と定義し、平均値をその動物の代表値とした。計測者には計測している個体が特定できない形 (blind) で行った。GM 傷害前、傷害後 7、14、21、28、56 日 (各群 n=6) の動物において、



各群別に平均値±標準偏差で表した。データは one-way analysis of variance (ANOVA)にて解析し、群間の多重比較は Bonferroni の補正を行った t-test で検定した。 $p<0.05$  の際に統計学的有意差があると判定した。

またアガロース包埋凍結切片を用いて Myo7a、Pvalb、DAPI で蛍光免疫染色を行い、Myo7a 陽性/Pvalb 陽性/DAPI 陽性細胞を I 型有毛細胞、Myo7a 陽性/Pvalb 陰性/DAPI 陽性細胞を II 型有毛細胞、DAPI のみ陽性の細胞を支持細胞とみなして上記と同様の切片抽出方法、解析方法で「各種細胞の細胞密度」を計測することでパラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色にて形態学的になされた細胞カウントの妥当性およびパラフィン切片とアガロース包埋凍結切片との違いによる細胞カウントの相違を検討した[27]。

### 3.9. Msi1 陽性細胞の解析

アガロース包埋凍結切片のうち、上記と同様に各群から 5 枚の切片を抽出し、抗 Msi1 抗体、抗 Myo7a 抗体、DAPI にて蛍光染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 200 倍視野下で撮影した画像にて感覚上皮における DAPI 陽性細胞に対する Myo7a 陽性率および Myo7a/Msi1 陽性率を以下の数式にて算出した。

$$\text{Myo7a 陽性率 (\%)} = \text{Myo7a 陽性細胞数} / \text{DAPI 陽性細胞数} \times 100$$

$\text{Myo7a/Msi1 陽性率 (\%)} = \text{Myo7a および Msi1 二重陽性細胞数} / \text{DAPI 陽性細胞数} \times 100$

Myo7a 陽性細胞、Msi1 陽性細胞は各々の細胞で核を含む (DAPI 陽性) ものを 1 つの細胞として計測した。

得られた値の平均値をその動物の代表値とし、GM 傷害後 14、21、28、56 日 (各群 n=6) の動物において、各群別に平均値±標準偏差で表した。データは上記と同様に ANOVA にて解析した。

### 3.10. BrdU 陽性細胞の解析

BrdU を持続投与した動物から作製したパラフィン切片のうち、上記と同様に各動物から 5 枚の切片を抽出し、抗 BrdU 抗体、抗 Myo7a 抗体、DAPI にて蛍光染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 200 倍視野下で撮影した画像にて感覚上皮における DAPI 陽性細胞に対する BrdU 陽性率および BrdU/Myo7a 陽性率を以下の数式にて算出した。

$\text{BrdU 陽性率 (\%)} = \text{BrdU 陽性細胞数} / \text{DAPI 陽性細胞数} \times 100$

$\text{BrdU/Myo7a 陽性率 (\%)} = \text{BrdU および Myo7a 二重陽性細胞数} / \text{DAPI 陽性細胞数} \times 100$

BrdU 陽性細胞、Myo7a 陽性細胞は各々の細胞で核を含む (DAPI 陽性) ものを 1 つの細胞として計測した。

得られた値の平均値をその動物の代表値とし、GM 投与後 1～5 日、6～10 日、11～15 日に BrdU を投与した各群別に平均値±標準偏差で表した。データは上記と同様に ANOVA にて解析した。

## 4. 結果

### 4.1. GM 傷害後の前庭感覚上皮の組織学的変化

まず、パラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色標本にて GM 傷害後による半規管膨大部稜感覚上皮の組織学的変化を経時的に観察した (図 8)。GM 傷害前の正常標本では前述の通り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、有毛細胞は神経冠に囲まれフラスコ型の I 型有毛細胞と円筒状の II 型有毛細胞が密に存在していた。GM 投与により受傷した前庭上皮は感覚細胞層の細胞密度が著しく低くなっており、神経冠の遺残と考えられる空胞形成がみられた。特に傷害後 14 日目の標本では感覚上皮の菲薄化が著明で支持細胞が単層の配列を呈した基底細胞層のみとなっていた。傷害後 28 日、56 日目の標本では感覚上皮の厚みが戻り、感覚細胞層に II 型細胞に類似した細胞がみられた。

GM 傷害後における各細胞の平均密度の経時的変化を図 9 に示す。傷害前、傷害後 7、14、21、28、56 日目の順に見てみると、I 型有毛細胞は  $62.1 \pm 13.5$ 、 $9.0 \pm 4.9$ 、 $3.1 \pm 1.6$ 、 $5.0 \pm 2.5$ 、 $17.1 \pm 9.6$ 、 $14.9 \pm 2.8$  (/mm) であり、傷害前に比べて傷害後 7 日目から 56 日目の群までは 5.0~27.5% に有意差を持って減少してい

た ( $p<0.01$ )。同様にⅡ型有毛細胞では、 $80.8\pm 8.4$ 、 $46.0\pm 23.7$ 、 $23.3\pm 10.2$ 、 $31.6\pm 14.0$ 、 $64.4\pm 16.8$ 、 $75.2\pm 7.6$  (/mm) であった。傷害後 7、14 日目で傷害前より 56.9%、28.8%に有意差 (それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ) をもって減少し、その後 28、56 日目では 14 日目と比較して有意差 ( $p<0.01$ ) をもって増加し、傷害前の平均密度の 79.7%、93.1%と統計学的な差は認めなかった。一方、支持細胞では  $181.4\pm 26.8$ 、 $195.4\pm 16.7$ 、 $194.6\pm 28.9$ 、 $192.0\pm 16.6$ 、 $198.5\pm 26.1$ 、 $184.8\pm 20.1$  (/mm) であり、経過中に有意差はみられなかった。

またアガロース包埋凍結切片の Myo7a、Pvalb、DAPI の蛍光免疫染色による検討 (図 10、11) では、傷害前、傷害後 7、14、21、28、56 日目の順に見てみると、Ⅰ型有毛細胞と考えられる Myo7a 陽性/Pvalb 陽性/DAPI 陽性細胞は  $34.4\pm 9.5$ 、 $8.55\pm 4.6$ 、 $1.33\pm 0.8$ 、 $1.36\pm 1.1$ 、 $7.33\pm 3.6$ 、 $8.69\pm 3.3$  (/mm) であり、傷害前に比べて傷害後 7 日目から 56 日目の群までは 4~25%に有意差を持って減少していた ( $p<0.01$ )。同様にⅡ型有毛細胞と考えられる Myo7a 陽性/Pvalb 陰性/DAPI 陽性細胞は、 $102.2\pm 8.5$ 、 $52.4\pm 23.1$ 、 $20.3\pm 7.2$ 、 $31.5\pm 8.2$ 、 $73.5\pm 19.9$ 、 $83.9\pm 16.0$  (/mm) であった。傷害後 14 日目で傷害前より 20%に有意差 ( $p<0.01$ ) をもって減少し、その後 56 日目では傷害前の平均密度の 82%まで増加して統計学的な差は認めなかった。一方、支持細胞と考えられる DAPI のみ陽性の細胞は、 $187.9\pm 24.7$ 、 $199.8\pm 15.5$ 、 $191.3\pm 60.1$ 、 $184.9\pm 42.5$ 、 $194.5\pm 26.2$ 、

192.1±23.2 (/mm) であり、経過中に有意差はみられなかった。これらの結果は形態学的になされたパラフィン切片での計測値よりも I 型有毛細胞はやや少なく、II 型有毛細胞はやや多い傾向であったが、有毛細胞の総数は概ね同程度であった。

#### 4.2. GM 傷害後の有毛細胞再生過程における Msi1 の細胞内局在変化

Msi1 の蛍光染色では GM 傷害前 (図 12a、b、c) では Myo7a で標識された有毛細胞では Msi1 染色は陰性であり、基底層に存在する支持細胞では核に局限して染色された。続いて、GM 傷害後 14 日目 (図 12d、e、f) では Myo7a で染色される細胞は消褪し、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。傷害後 21 日目 (図 g、h、i) では形態的にやや不揃いな Myo7a 陽性細胞が増加し、その多くは Msi1 が核に陽性であった。支持細胞における Msi1 は核、細胞質にびまん性に染色されていた。さらに傷害後 28 日目 (図 12j、k、l)、56 日目 (図 12m、n、o) では支持細胞における Msi1 の局在は次第に核優位の染色性を示した。この時期において Myo7a 陽性細胞の多くは Msi1 が陰性であったが、Myo7a と Msi1 が共陽性となる細胞も少数ではあるが確認された。傷害後 21 日目から認めた Myo7a/Msi1 二重陽性細胞は全て同一細胞内で

Myo7a と Msi1 が共染色されることはなく、Myo7a は細胞質に、Msi1 は核に限局していた。さらに Myo7a/Msi1 二重陽性細胞は傷害後 21 日目の標本では基底細胞側に多くみられ、28 日目、56 日目の標本では感覚細胞層に多くみられた。

次に GM 傷害後 14 日目から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（図 13）、Myo7a 陽性細胞は傷害後 14 日目では  $8.4 \pm 2.3\%$ 、21 日目では  $18.1 \pm 5.2\%$ 、28 日目では  $31.0 \pm 8.8\%$ 、56 日目では  $34.1 \pm 3.7\%$  となっており、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 も陽性である細胞について検討すると、傷害後 14 日では DAPI 陽性細胞に対して  $0.2 \pm 0.1\%$ 、21 日目では  $15.7 \pm 4.5\%$ 、28 日目では  $5.7 \pm 1.4\%$ 、56 日目では  $2.4 \pm 0.3\%$  となっており、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 日目にかけて有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。

これまでの有毛細胞、支持細胞密度の経時的変化および Myo7a、Msi1 の発現様式の変化のまとめを図 14 に示す。

#### 4.3. GM 傷害後の前庭感覚上皮における細胞増殖活性の変化

GM 傷害後の前庭感覚上皮における細胞増殖活性について検討する目的で、

GM 傷害後 1～5 日目、6～10 日目、11～15 日目にそれぞれ BrdU を少量持続投与し、28 日目に内耳を採取した標本を作製し組織学的な解析を行った。その結果、酵素抗体法による抗 BrdU 染色標本においては各群健常耳による対照では BrdU 陽性となる細胞はみられず、感覚上皮の正常構造は保たれていた (図 15j,k)。傷害後の標本では 1～5 日目に BrdU を投与した群では BrdU 陽性となる細胞は感覚上皮内にほとんどみられなかった (図 15a-c)。一方、6～10 日および 11～15 日の群では基底細胞層で支持細胞の核に BrdU が陽性となる細胞を多数認め、感覚細胞層においても BrdU を核に取り込んだ細胞がみられた (図 15d-i,l)。

蛍光免疫染色では、感覚上皮における DAPI 陽性細胞に対する BrdU 陽性細胞の割合は、1～5 日目に BrdU を投与した群では  $18.4 \pm 3.4\%$ 、6～10 日目の投与群は  $76.9 \pm 0.1$ 、11～15 日目の投与群は  $58.5 \pm 7.7\%$  であった。これらの結果は統計学的に各群間で有意差を認め ( $p < 0.01$ )、6～10 日目が最も多く BrdU を取り込んでいた (図 16)。

さらに BrdU 陽性細胞の中で Myo7a も陽性である細胞について検討すると、1～5 日目の群では  $2.1 \pm 0.9\%$ 、6～10 日の群では  $13.5 \pm 2.8$ 、11～15 日の群では  $9.4 \pm 3.0\%$  であり、やはり 6～10 日目に BrdU を投与した群で BrdU と Myo7a の二重陽性細胞が最も多かった ( $p < 0.01$ ) (図 16)。



## 5. 考察

### 5.1. 細胞増殖時期について

GM 傷害後の有毛細胞密度の経時的変化についてパラフィン切片ヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて観察すると、GM 傷害後 14 日目では I 型有毛細胞は傷害前の 5.0% とほぼ消失し、II 型有毛細胞は傷害前の 28.8% まで減少していた。一方、GM 傷害後 56 日目までは I 型有毛細胞の増加は認めず、II 型有毛細胞は 28 日目、56 日目で対照の 79.7%、93.1% まで増加していた。Lopez らのチンチラの内耳に GM 徐放剤で傷害を与えた報告[26]では、I 型有毛細胞は傷害後 7 日目ではほぼ消失し傷害後 56 日目までの観察期間において増加することではなく、II 型有毛細胞は傷害後 14 日目で 12% まで減少していたが、28 日目には 83% まで増加しており、本研究での結果と一致する。一方で、受傷後の感覚上皮では細胞配列や細胞形態そのものも変化していることがあるため、形態学的特徴から細胞種を鑑別し、有毛細胞の量的変化を論じるには困難である、との指摘がある[27]。そのためアガロース包埋凍結切片を用いて Myo7a を有毛細胞マーカー、Pvalb を I 型有毛細胞マーカーとして DAPI による核染色とも併せてそれぞれの染色性の相違から細胞種を鑑別すると、パラフィン切片にお

ける計測とほぼ同様の結果が得られ、形態学的になされた上記の結果が妥当であることが確認された。以上の結果から、本研究に用いた前庭上皮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 14 日目から 28 日目が有毛細胞の形成期間と推測された。

細胞増殖マーカーである BrdU の取込みを観察した実験では、GM 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。同様に GM 傷害後の前庭感覚上皮での BrdU 取込みをみた先行研究[28-30]では、統計学的な検討はなされていないがいずれも傷害後 7～14 日目に BrdU を取り込んだ支持細胞が示されており、我々の結果と一致する。したがって、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ることができる。

## 5.2. 有毛細胞の再生様式

有毛細胞の自発的再生様式には、有糸分裂を介したもの、有糸分裂を介さない形質転換、自己修復の 3 つの機構が考えられている。

有糸分裂による再生細胞は支持細胞が分裂、増殖する、有毛細胞自身が分裂する、あるいはまったく由来の異なる前駆細胞のようなものが増殖・分化するなどの可能性が考えられる[31]が、過去の報告では支持細胞が有糸分裂に関連し

ていることを示唆するものが多い[10, 26, 29, 32, 33]。支持細胞の有糸分裂に際しては対称性分裂と一方が有毛細胞、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機序であるが、本研究では有毛細胞再生過程において支持細胞の細胞密度が変化しないことや経過中に感覚上皮細胞内で非対称性分裂に関与する **Msi1** の局在変化がみられ、有毛細胞形成が盛んと考えられる時期に分化・成熟の初期段階と考えられる **Msi1** と **Myo7a** の二重陽性細胞がみられたことは支持細胞の非対称性分裂による有毛細胞再生を支持する結果であった。

また、**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細胞増殖に由来することに矛盾せず、過去の報告とも一致する[28-30, 34, 35]。

形質転換については、この機構では有毛細胞再生の由来となる支持細胞の数は有毛細胞の増加に伴って減少すると考えられことや、経過中にその根拠となる形質転換細胞[7, 8]を捉えられなかったため、今回得られた結果からは否定的である。ただし、**Lin** らのマウス由来の神経幹細胞を用いた *in vitro* の研究[36]では幹細胞の非対称性分裂による有毛細胞形成と共に、対称性分裂の後に形質転換により生じた有毛細胞も示されており、どちらも **BrdU** の取込みが確認されているため有糸分裂と形質転換が共存する可能性がある。一方、自己修復は受

傷細胞の一連の治癒過程を総称したものである[13, 37]。結果的に増加した細胞が修復したものか、そうでないものかを鑑別することは現時点では困難であるが、本研究では傷害後 14 日目の時点で、I 型有毛細胞は 97%、II 型有毛細胞は 77%まで核を含めて消褪している。それら多くの細胞が 2 週間以内に修復される可能性は極めて少ないと考えられる。以上より、有毛細胞の自発的再生過程には少なくとも支持細胞の非対称性細胞分裂が関与するものと考えられた。

### 5.3. GM 傷害後の有毛細胞再生過程における Msi1 の細胞内局在変化

本研究では、GM 傷害後の前庭感覚上皮自発的再生過程における Msi1 蛋白の経時的な細胞内局在変化を初めて報告した。Msi1 蛋白は神経細胞の神経幹細胞および神経前駆細胞に強く発現し、非対称性分裂において重要な役割を果たす[38]。さらに Msi1 は主に細胞分化における側方抑制に関与する Notch シグナル系を制御していると言われている[20, 39-41]。従って Msi1 は哺乳類において神経前駆細胞を未分化な状態に保つと考えられ、神経幹細胞のマーカーと認識されている[42, 43]。Sakakibara ら[43]は中枢神経系の未分化幹細胞の非対称性分裂過程において、Msi1 が自己再生する幹細胞において強く発現する一方、分化していく細胞系譜においては発現量が極めて低く、神経細胞あるいはグリア細胞

として細胞分化が進む過程において、その発現はほとんど消失することを示している。同様に感覚器として内耳組織と類似することが多いとされる網膜[44]において、Nickeson ら[45]は網膜前駆細胞の非対称性分裂過程で Msi1 が細胞質優位から核優位にシフトした娘細胞は網膜細胞へ、細胞質優位のままであった娘細胞はミューラー細胞になることを示している。このような Msi1 の細胞内局在変化について MacNicol ら[46]は哺乳類 Msi 蛋白質の標的 RNA 認識・結合を担う RRM 型ドメイン内に核局在シグナル(nuclear localization signal : NLS)を同定し、核内では RNA 結合活性や N 末端部位の領域が Msi 蛋白質の核外移行シグナル(Nuclear exporting signal : NES)であると報告しているが、それら核内—核外移行の制御機構については今後の検討を要するとしている。

GM 傷害前の標本において支持細胞の核に限局して 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する。定常状態で核に限局する Msi1 の役割には未だ不明な点が多いが、対応する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[47]。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ると考えられる。脳神経系の腫瘍、特に神経膠腫において Msi1 が強く発現し、Notch シグナルや PI3K-Akt シグナルの活性化を介して腫瘍細胞の増殖性および細胞生存能を促進すること

が報告されており[48]、上記の考察と矛盾しない。その後、GM 傷害後 21 日目において核に限局する 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、この時点でやや核優位であるが細胞質にも 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 日目、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、GM 傷害後支持細胞から非対称性分裂を経て新たに再生され、分化・成熟の後期にあたる有毛細胞が増加しているものと考えられる。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た[23]。

最後に、以上の結果から考えられた前庭有毛細胞の自発的再生過程における Msi1 の局在変化の概念図を図 17 にまとめた。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。

## 6. 謝辞

本研究を終えるに臨み、御校閲、御指導を賜りました指導教官である山唄達也・東京大学耳鼻咽喉科学教室教授に謹んで深謝いたします。また本研究において具体的に研究の計画、手順を御指導いただきました当教室の諸先生方に深謝いたします。また、当研究室の宮澤晃一さん、露崎敦子さん、三輪紀美子さんにも御助力いただき、心から感謝申し上げます。

## 7. 参考文献

- [1] N. Elaine, Marieb. and H. Katja. (2009). *Human Anatomy & Physiology*.
- [2] J. Wersall, "Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampulares in the guinea pig; a light and electron microscopic investigation," *Acta Otolaryngol Suppl*, vol. 126, pp. 1-85, 1956.
- [3] J. B. Nadol, Jr., "Hearing loss," *N Engl J Med*, vol. 329, pp. 1092-1102, Oct 7 1993.
- [4] R. J. Ruben, "Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses," *Acta Otolaryngol*, pp. Suppl 220:221-244, 1967.
- [5] D. A. Cotanche, "Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma," *Hear Res*, vol. 30, pp. 181-195, 1987.
- [6] R. M. Cruz, P. R. Lambert, and E. W. Rubel, "Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea," *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 113, pp. 1058-1062, Oct 1987.
- [7] H. J. Adler, M. Komeda, and Y. Raphael, "Further evidence for supporting cell conversion in the damaged avian basilar papilla," *Int J Dev Neurosci*, vol. 15, pp. 375-385, Jul 1997.
- [8] H. J. Adler and Y. Raphael, "New hair cells arise from supporting cell conversion in the acoustically damaged chick inner ear," *Neurosci Lett*, vol. 205, pp. 17-20, Feb 16 1996.
- [9] B. M. Ryals and E. W. Rubel, "Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail," *Science*, vol. 240, pp. 1774-1776, Jun 24 1988.
- [10] M. E. Warchol, P. R. Lambert, B. J. Goldstein, A. Forge, and J. T. Corwin, "Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans," *Science*, vol. 259, pp. 1619-1622, Mar 12 1993.
- [11] P. P. Lefebvre, B. Malgrange, H. Staecker, G. Moonen, and T. R. Van de Water, "Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells," *Science*, vol. 260, pp. 692-695, Apr 30 1993.
- [12] L. Li and A. Forge, "Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula," *Int J Dev Neurosci*, vol. 15, pp. 433-446, Jul 1997.
- [13] J. L. Zheng, G. Keller, and W. Q. Gao, "Immunocytochemical and morphological evidence for intracellular self-repair as an important contributor to mammalian hair cell recovery," *J Neurosci*, vol. 19, pp. 2161-2170, Mar 15 1999.



- [14] G. Wan, G. Corfas, and J. S. Stone, "Inner ear supporting cells: rethinking the silent majority," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 24, pp. 448-459, May 2013.
- [15] Q. Liu, P. Chen, and J. Wang, "Molecular mechanisms and potentials for differentiating inner ear stem cells into sensory hair cells," *Dev Biol*, vol. 390, pp. 93-101, Jun 15 2014.
- [16] P. J. Lanford, Y. Lan, R. Jiang, *et al.*, "Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea," *Nat Genet*, vol. 21, pp. 289-292, Mar 1999.
- [17] M. W. Kelley, "Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear," *Nat Rev Neurosci*, vol. 7, pp. 837-849, Nov 2006.
- [18] J. S. Stone and E. W. Rubel, "Delta1 expression during avian hair cell regeneration," *Development*, vol. 126, pp. 961-973, Feb 1999.
- [19] M. Nakamura, H. Okano, J. A. Blendy, and C. Montell, "Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development," *Neuron*, vol. 13, pp. 67-81, Jul 1994.
- [20] H. Okano, T. Imai, and M. Okabe, "Musashi: a translational regulator of cell fate," *J Cell Sci*, vol. 115, pp. 1355-1359, Apr 1 2002.
- [21] P. Chen, J. E. Johnson, H. Y. Zoghbi, and N. Segil, "The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination," *Development*, vol. 129, pp. 2495-2505, May 2002.
- [22] D. A. Cotanche and C. L. Kaiser, "Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration," *Hear Res*, vol. 266, pp. 18-25, Jul 2010.
- [23] H. Sakaguchi, T. Yaoi, T. Suzuki, H. Okano, Y. Hisa, and S. Fushiki, "Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development," *Neuroreport*, vol. 15, pp. 997-1001, Apr 29 2004.
- [24] E. Selimoglu, "Aminoglycoside-induced ototoxicity," *Curr Pharm Des*, vol. 13, pp. 119-126, 2007.
- [25] S. Kanda, Y. Akazome, T. Matsunaga, *et al.*, "Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*oryzias latipes*)," *Endocrinology*, vol. 149, pp. 2467-2476, May 2008.
- [26] I. Lopez, V. Honrubia, S. C. Lee, G. Li, and K. Beykirch, "Hair cell recovery in the chinchilla crista ampullaris after gentamicin treatment: a quantitative approach," *Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 119, pp. 255-262, Sep 1998.
- [27] D. D. Simmons, B. Tong, A. D. Schrader, and A. J. Hornak, "Oncomodulin identifies different hair cell types in the mammalian inner ear," *J Comp Neurol*, vol. 518, pp. 3785-3802, Sep 15 2010.
- [28] H. Lang, C. Liu, and E. Fan, "[Bromodeoxyuridine immunohistochemical

- observation of sensory epithelium repair after ototoxic destruction in the crista ampullaris of guinea pigs],” *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, vol. 31, pp. 341-343, 1996.
- [29] H. Tanyeri, I. Lopez, and V. Honrubia, "Histological evidence for hair cell regeneration after ototoxic cell destruction with local application of gentamicin in the chinchilla crista ampullaris," *Hear Res*, vol. 89, pp. 194-202, Sep 1995.
  - [30] H. Yamane, T. Nakagawa, H. Iguchi, *et al.*, "In vivo regeneration of vestibular hair cells of guinea pig," *Acta Otolaryngol Suppl*, vol. 520 Pt 1, pp. 174-177, 1995.
  - [31] R. A. Baird, P. S. Steyger, and N. R. Schuff, "Mitotic and nonmitotic hair cell regeneration in the bullfrog vestibular otolith organs," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 781, pp. 59-70, Jun 19 1996.
  - [32] T. T. Tsue, E. C. Oesterle, and E. W. Rubel, "Hair cell regeneration in the inner ear," *Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 111, pp. 281-301, Sep 1994.
  - [33] A. Forge, L. Li, J. T. Corwin, and G. Nevill, "Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear," *Science*, vol. 259, pp. 1616-1619, Mar 12 1993.
  - [34] J. Chen and A. Streit, "Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors," *Hear Res*, vol. 297, pp. 3-12, Mar 2013.
  - [35] E. W. Rubel, L. A. Dew, and D. W. Roberson, "Mammalian vestibular hair cell regeneration," *Science*, vol. 267, pp. 701-707, Feb 3 1995.
  - [36] J. Lin, L. Feng, Y. Hamajima, *et al.*, "Directed differentiation of mouse cochlear neural progenitors in vitro," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 296, pp. C441-452, Mar 2009.
  - [37] H. M. Sobkowicz, B. K. August, and S. M. Slapnick, "Epithelial repair following mechanical injury of the developing organ of Corti in culture: an electron microscopic and autoradiographic study," *Exp Neurol*, vol. 115, pp. 44-49, Jan 1992.
  - [38] H. Ogita, T. Nakagawa, T. Sakamoto, T. Inaoka, and J. Ito, "Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea," *Laryngoscope*, vol. 120, pp. 576-581, Mar 2010.
  - [39] T. Imai, A. Tokunaga, T. Yoshida, *et al.*, "The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA," *Mol Cell Biol*, vol. 21, pp. 3888-3900, Jun 2001.
  - [40] S. Artavanis-Tsakonas, M. D. Rand, and R. J. Lake, "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development," *Science*, vol. 284, pp. 770-776, Apr 30 1999.
  - [41] J. Kohyama, A. Tokunaga, Y. Fujita, *et al.*, "Visualization of spatiotemporal

- activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development," *Dev Biol*, vol. 286, pp. 311-325, Oct 1 2005.
- [42] H. Okano, H. Kawahara, M. Toriya, K. Nakao, S. Shibata, and T. Imai, "Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells," *Exp Cell Res*, vol. 306, pp. 349-356, Jun 10 2005.
  - [43] S. Sakakibara, T. Imai, K. Hamaguchi, *et al.*, "Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell," *Dev Biol*, vol. 176, pp. 230-242, Jun 15 1996.
  - [44] O. Bermingham-McDonogh and T. A. Reh, "Regulated reprogramming in the regeneration of sensory receptor cells," *Neuron*, vol. 71, pp. 389-405, Aug 11 2011.
  - [45] P. E. Nickerson, T. Myers, D. B. Clarke, and R. L. Chow, "Changes in Musashi-1 subcellular localization correlate with cell cycle exit during postnatal retinal development," *Exp Eye Res*, vol. 92, pp. 344-352, May 2011.
  - [46] A. M. MacNicol, A. Wilczynska, and M. C. MacNicol, "Function and regulation of the mammalian Musashi mRNA translational regulator," *Biochem Soc Trans*, vol. 36, pp. 528-530, Jun 2008.
  - [47] S. Sakakibara, Y. Nakamura, T. Yoshida, *et al.*, "RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, pp. 15194-15199, Nov 12 2002.
  - [48] J. Muto, T. Imai, D. Ogawa, *et al.*, "RNA-binding protein Musashi1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI3 kinase/Akt signaling pathways," *PLoS One*, vol. 7, p. e33431, 2012.



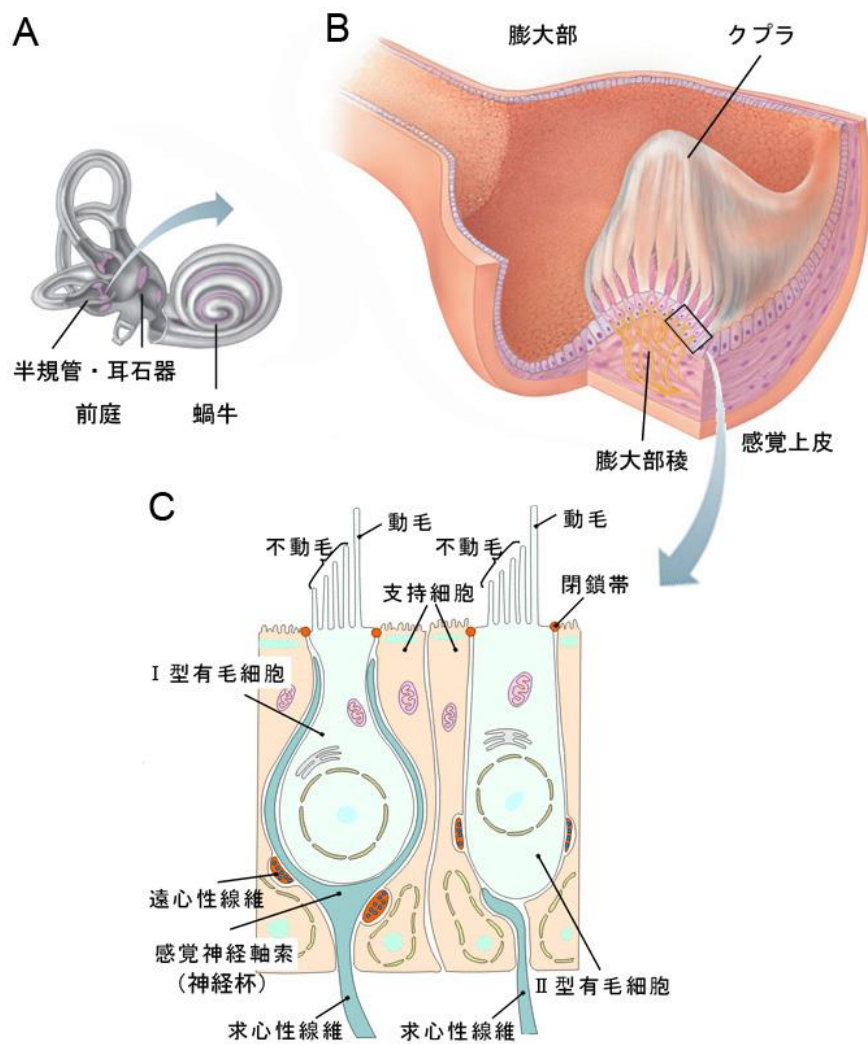


図 1

内耳の解剖および前庭感覚上皮の構造（文献 1、2 より改編）。A）内耳は前庭と蝸牛から成り、前庭は 3 つの半規管と 2 つの耳石器から構成される。B）半規管の一端は膨大部を形成し、この内部に膨大部稜という感覚上皮部がある。C）感覚上皮は支持細胞と有毛細胞から成り、有毛細胞にはフラスコ型で神経杯に包まれた I 型と円筒状の II 型がある。それぞれ細胞上部表面に感覚毛を有し感覚上皮上方 2/3 の感覚細胞層に位置している。支持細胞は基底膜からリンパ腔までのびる細胞で、その核は基底膜上の支持細胞層に整然と配列する。

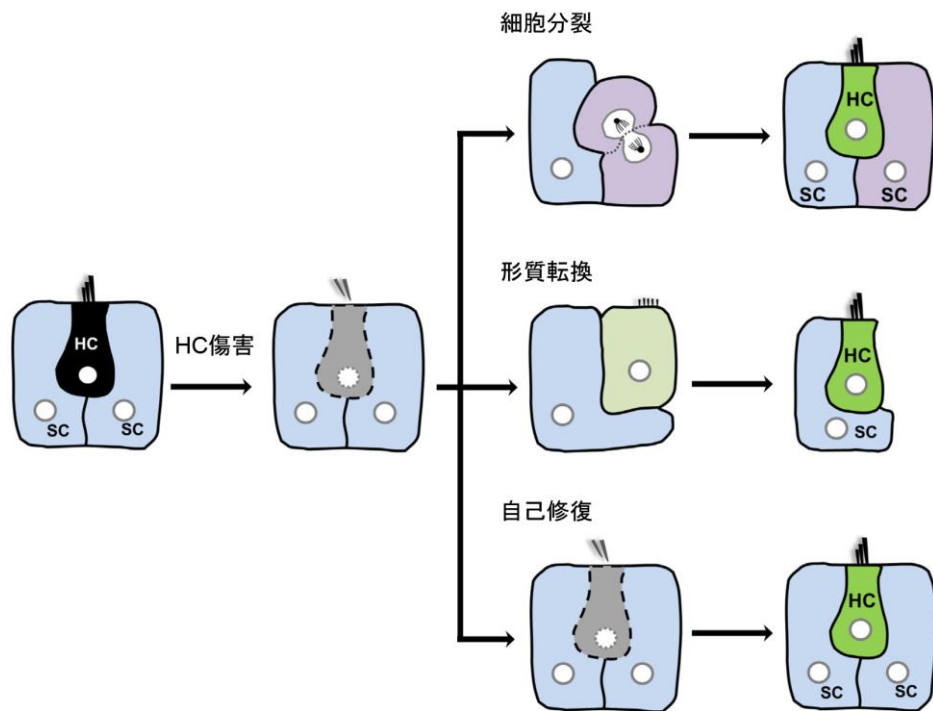


図 2

内耳有毛細胞再生の機構（文献 14 より改編）。内耳有毛細胞の再生機構については、①支持細胞の非対称的な細胞分裂による有毛細胞形成、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部分的に障害を受けた有毛細胞による自己修復が主に考えられている。

HC: 有毛細胞、SC: 支持細胞

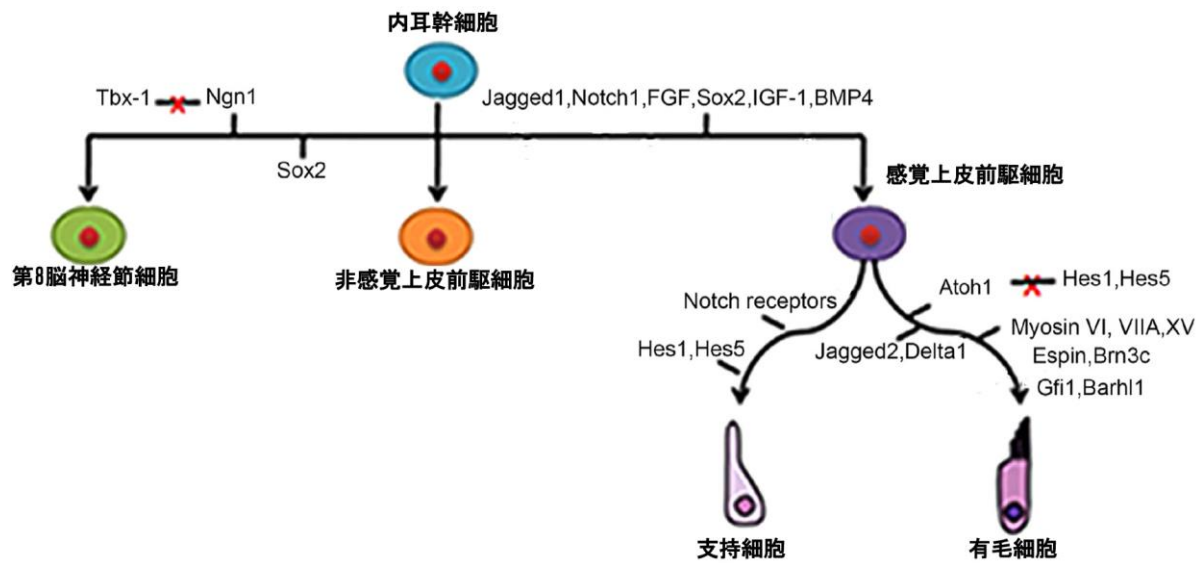


図 3

内耳の形態発生（文献 15 より改編）。内耳幹細胞は 3 つの細胞ライン（第 8 脳神経節細胞、非感覚上皮前駆細胞、感覚上皮前駆細胞）に分かれる。図では細胞の運命決定に要する因子やシグナル経路を示している。SOX2 と Neurog1

(Ngn1) は第 8 脳神経節の形成を誘導する。Jagged1、Notch1、FGF、Sox2、IGF-1、BMP4 は有毛細胞と支持細胞の起源となる感覚上皮前駆細胞の形成を誘導する。Atoh1、Jagged2、Delta1 は有毛細胞への分化を誘導する。Espin、Brn3c、Myosin VI、VIIA、XV は有毛細胞の最終分化、維持、生存に重要な役割を果たす。Hes は Atoh1 の発現に拮抗し支持細胞の発生を促進する。

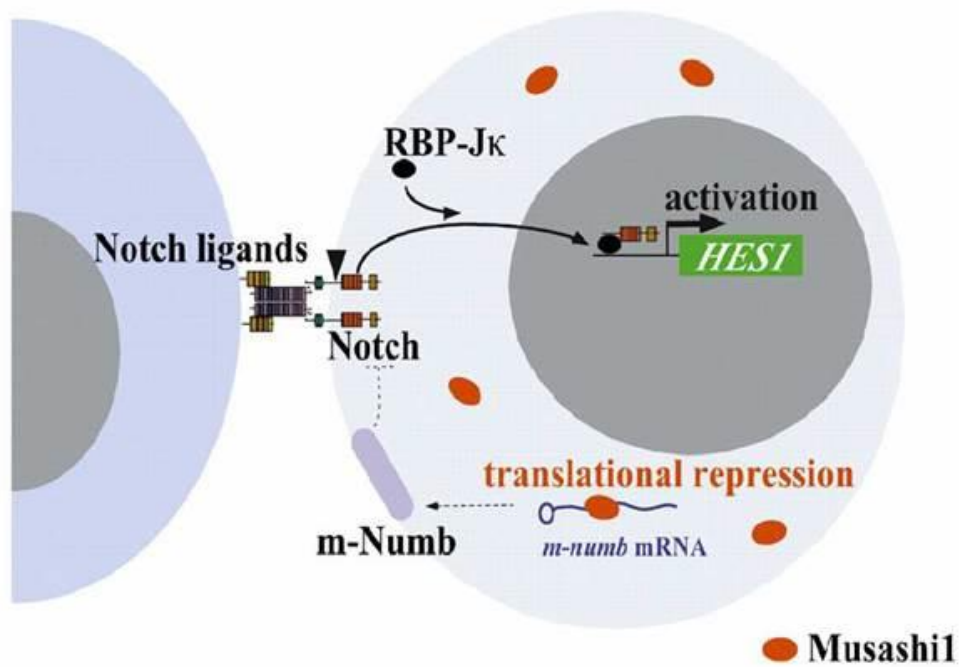
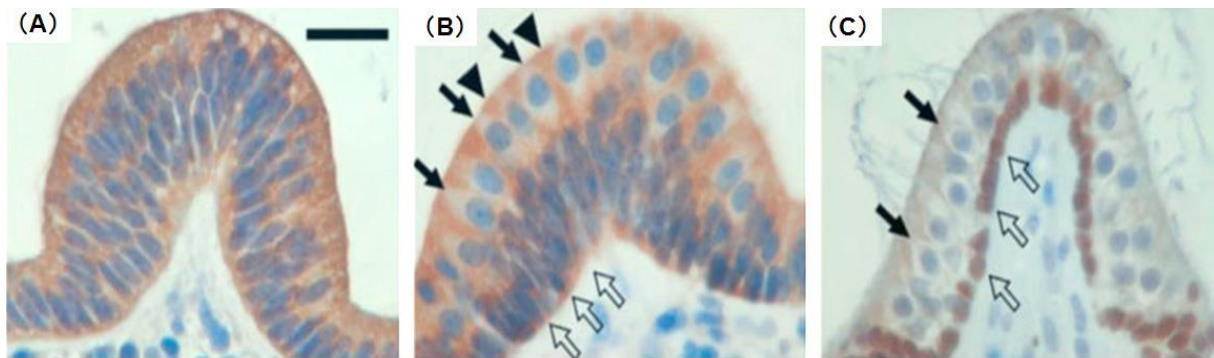


図 4

Notch シグナル伝達経路に対する Msi1 の機能（文献 20 より改編）。Msi1 蛋白質は m-Numb mRNA の 3'UTR に結合し、その翻訳を阻害する。m-Numb は細胞周期を停止させる機能を有し、さらに Notch に結合して拮抗的に働く。Notch シグナル伝達経路の活性化は幹細胞からニューロンへの分化を制御することから、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。





(D)

	胎生14日	胎生16日	生後14日
<b>Msi1</b>	感覚上皮 <b>N+C</b>	支持細胞 <b>N&gt;C</b>	支持細胞 <b>N</b>
<b>Myo7a</b>	感覚上皮 —	有毛細胞 <b>C</b>	有毛細胞 <b>C</b>

図 5

マウス半規管膨大部稜発生における Msi1 発現の局在変化（文献 23 より改編）。(A)胎生 14 日では感覚上皮の全ての細胞の細胞質で Msi1 陽性（茶）である。(B)胎生 16 日では有毛細胞（黒矢印）は Msi1 陰性となっているが、支持細胞では細胞質に強く発現している（白矢印；支持細胞基底部、矢頭；支持細胞の頂部突起）。(C) 生後 14 日では支持細胞に Msi1 発現が残っているが、核優位となる。

(D) マウス内耳発生における Msi1、Myo7a の発現様式のまとめ。Msi1 の発現は A-C のように発生に伴い細胞内局在が経時的に変化する。一方、Myo7a は胎生 15.5 日より有毛細胞の細胞質で陽性となる。

C：細胞質。N：核。Scale bar=50  $\mu$ m。

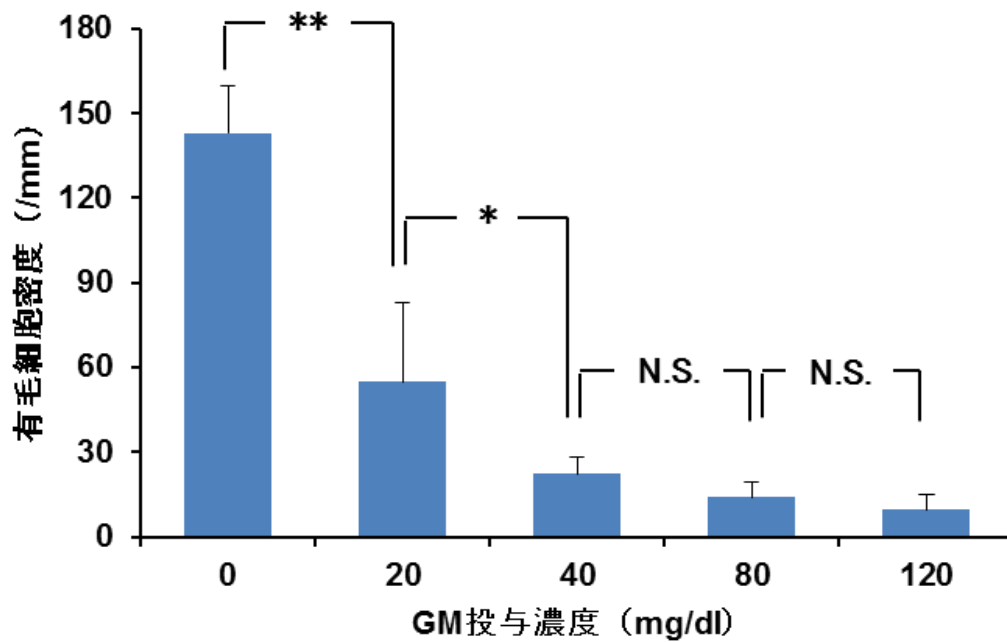


図 6

前庭傷害モデル動物作製時のゲンタマイシン局所投与濃度の検討（平均値±標準偏差）。内耳への局所投与量は内耳容量を考慮し 0.2ml として薬剤投与後 14 日目の組織において有毛細胞密度を評価した。0、20、40mg/dl では濃度依存的に有毛細胞は傷害され、40mg/dl 以上の濃度では有毛細胞はほぼ消褪し有意な差はみられなかった。これに基づき、本実験ではゲンタマイシンを 40mg/dl、0.2ml で内耳に局所投与することとした。

GM：ゲンタマイシン。 \*\*： $p < 0.01$ 、\*： $p < 0.05$

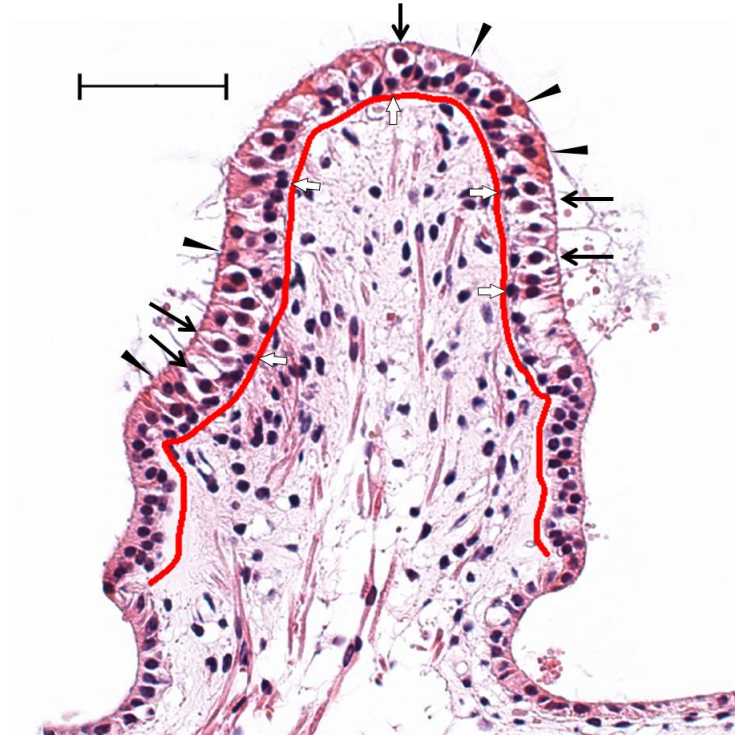


図 7

半規管膨大部稜感覚上皮細胞のカウント方法。ヘマトキシリン・エオジン染色標本で基底細胞層に核を有するものを支持細胞（白矢印）、感覚細胞層に核を有するものを有毛細胞とし、そのうちフラスコ型で神経杯に囲まれた細胞をⅠ型有毛細胞（黒矢印）、神経杯を欠き円筒状の細胞をⅡ型有毛細胞（矢頭）とみなした。光学顕微鏡下で得た画像の基底部分を赤線でなぞり、そのピクセル数と **scale bar** の長さから基底部長を計算し、「各種細胞数／基底部長」の比を「各種細胞の細胞密度」として解析した。

Scale bar=50  $\mu\text{m}$ 。

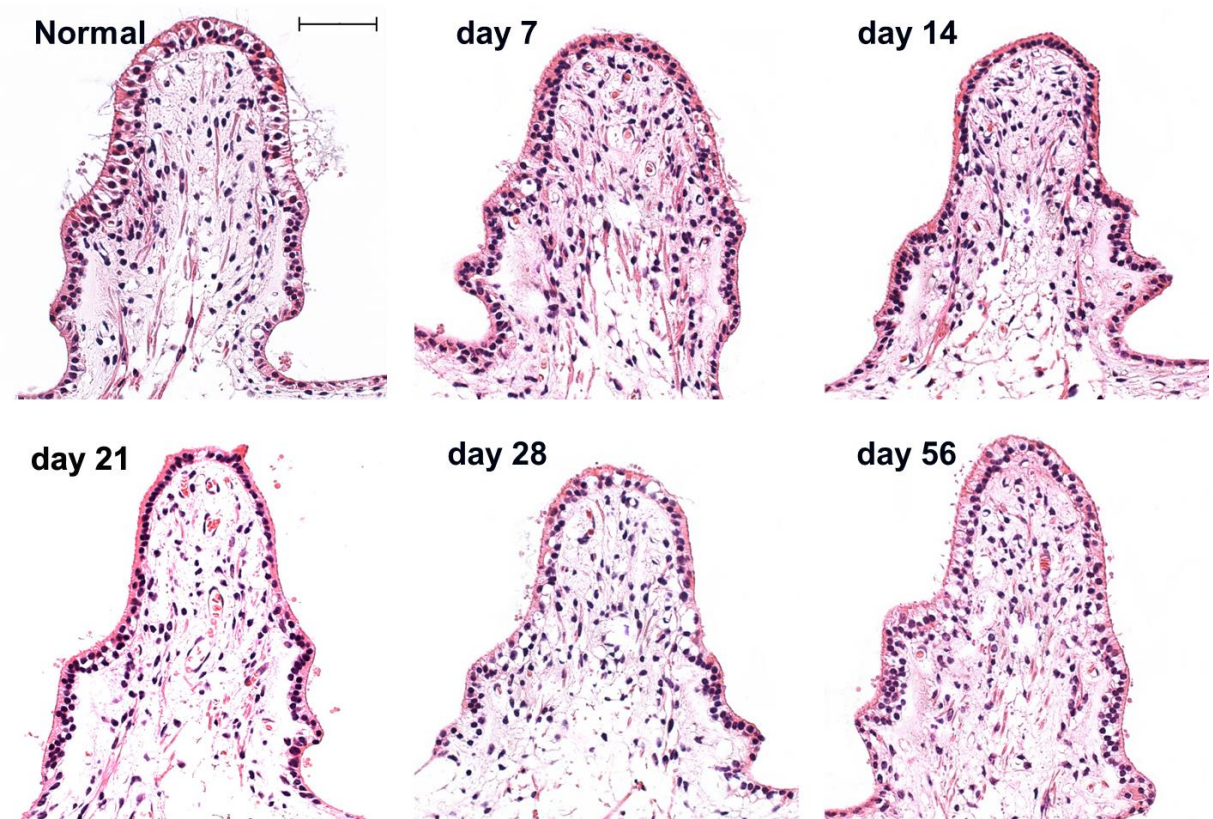


図 8

ゲンタマイシン傷害後のヘマトキシリン・エオジン染色による前庭感覚上皮の経時的変化。正常標本では有毛細胞と支持細胞から成る 2 層構造を認め、それぞれ密に存在している。傷害後 7、14 日目では感覚細胞層の細胞密度が著しく低くなり、支持細胞が密に配列した基底細胞層のみとなる。傷害後 21 日目から 56 日目では支持細胞に加えて感覚細胞層に主としてⅡ型細胞に類似した細胞がみられる。

Scale bar=50  $\mu$ m。

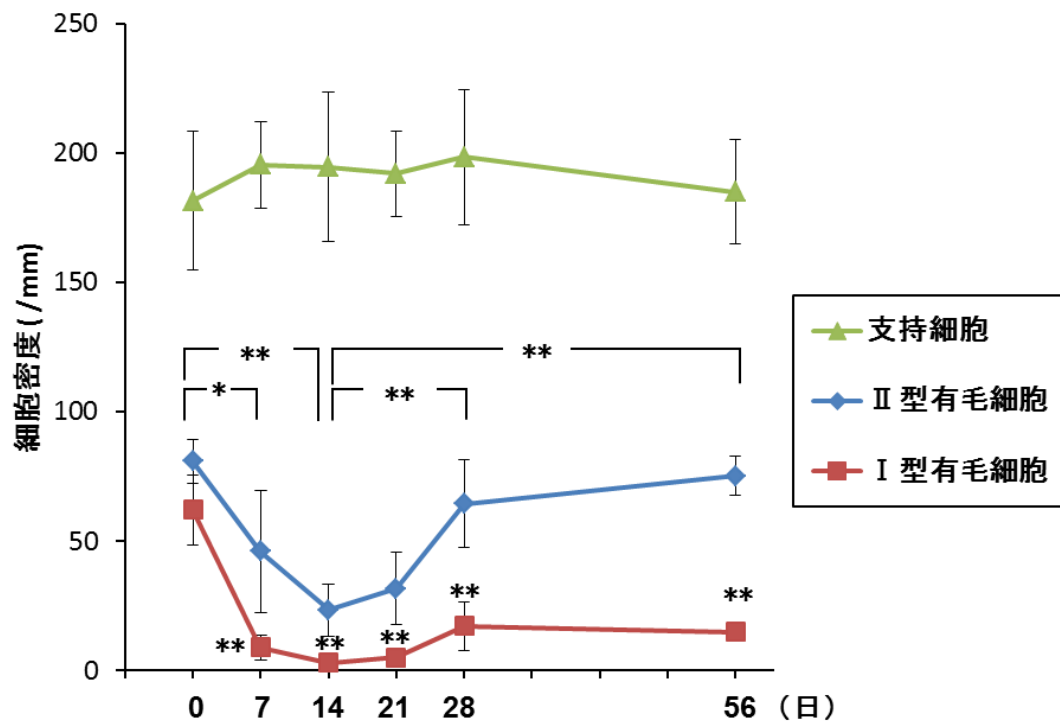


図 9

ゲンタマイシン傷害後の前庭上皮細胞の経時的変化（平均値±標準偏差）。Ⅰ型有毛細胞は傷害後 7 日目ではほぼ消失し、その後はほとんど増加しない。Ⅱ型有毛細胞は傷害後 14 日目で傷害前の 30%まで減少するが、56 日目では 93%まで増加する。支持細胞の細胞密度は経過中に大きな増減はみられない。

\*\* :  $p < 0.01$ 、\* :  $p < 0.05$



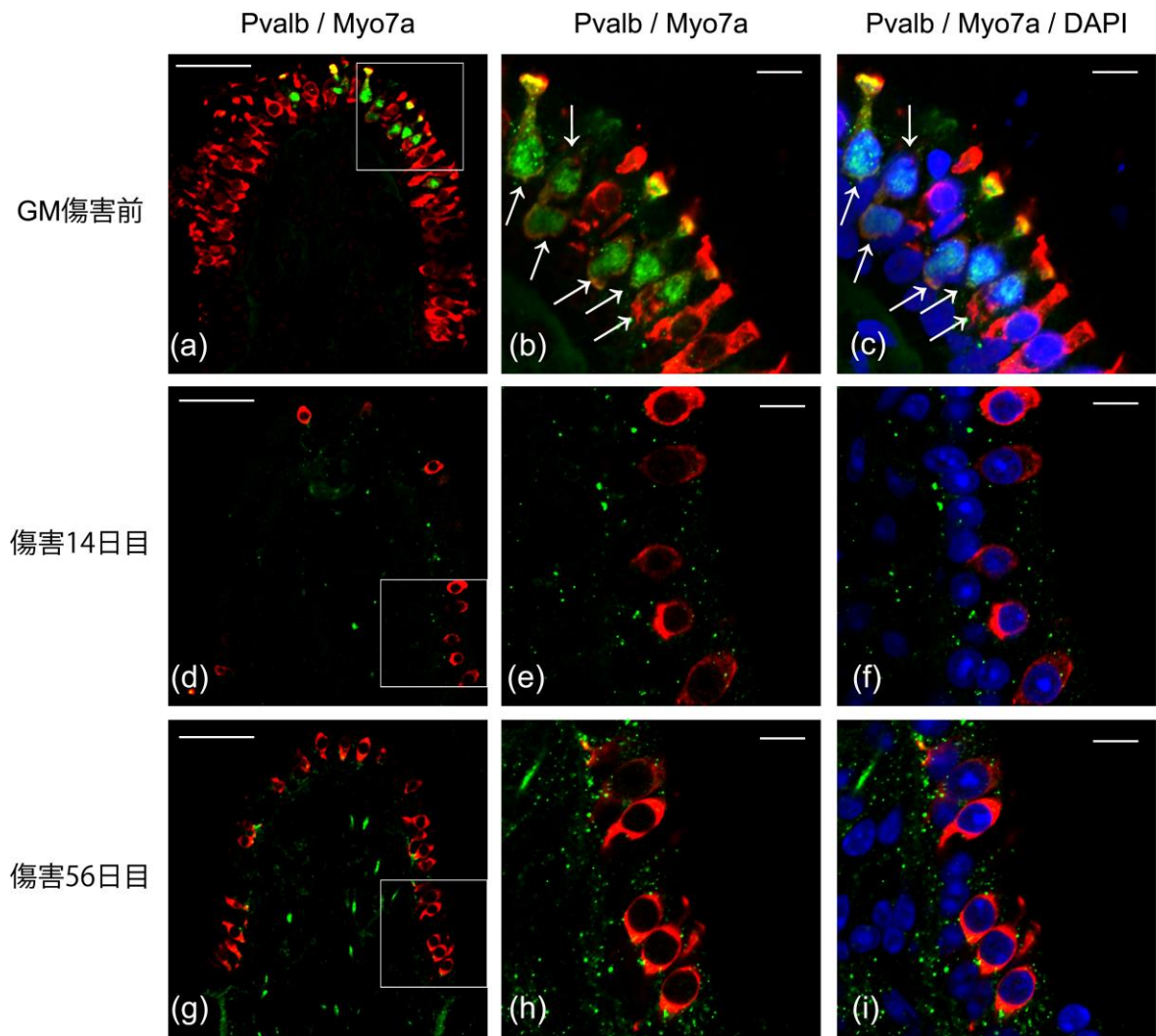


図 10

Pvalb、Myo7a、DAPI による膨大部感覚細胞の鑑別。(a)-(i) : Pvalb (緑)、Myo7a (赤)。(c)、(f)、(i) : DAPI (青)。(b、c)、(e、f)、(h、i) は各々 (a)、(d)、(g) において□で示した領域の強拡大像を示す。Pvalb、Myo7a、DAPI 陽性細胞 (矢印) は I 型有毛細胞、Myo7a、DAPI の二重陽性細胞は II 型有毛細胞、DAPI のみ陽性の細胞は支持細胞と考えられる。(a-c) : GM 傷害前の標本では I 型と II 型有毛細胞が密に混在している。(d-f) : 傷害 14 日目では有毛細胞は著明に減少し主として II 型である。(g-i) : 傷害 56 日目では主として II 型有毛細胞が増加している。(c、f、i) : 各々の支持細胞数は変わらない。

(a、d、g) : Scale bar=50  $\mu$ m。(b、c、e、f、h、i) : Scale bar=10  $\mu$ m。

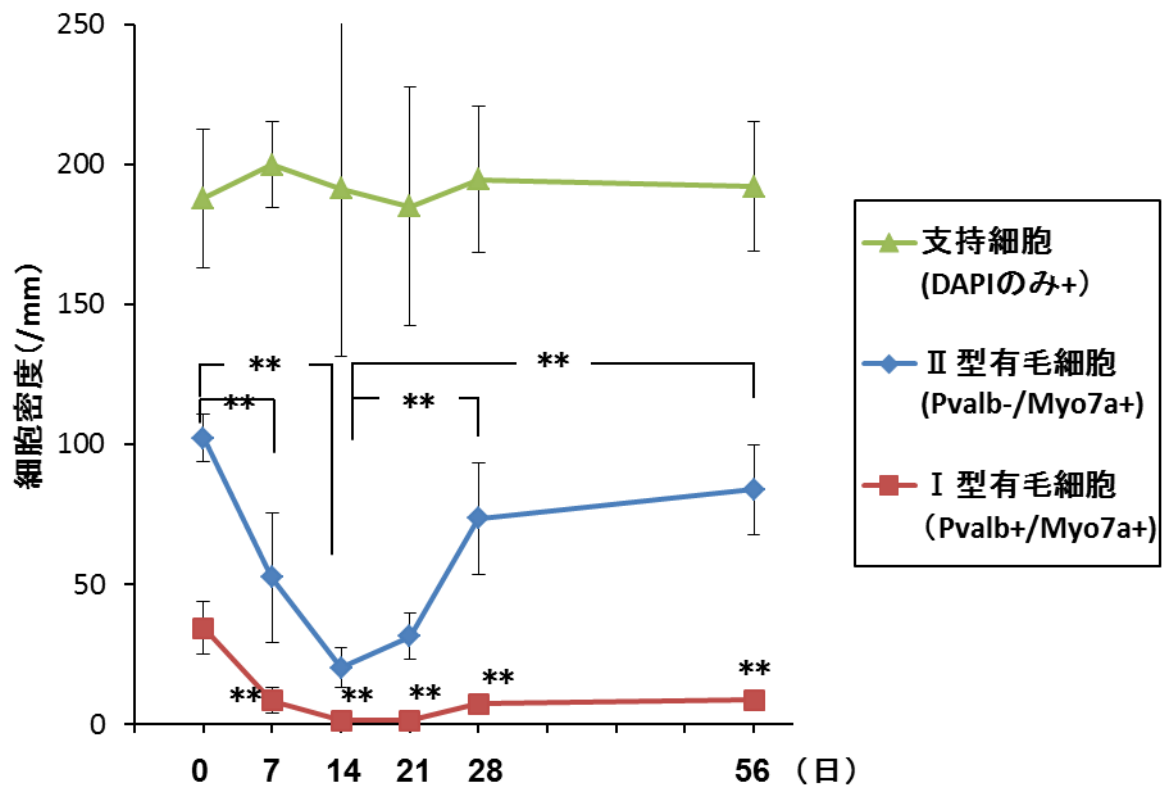


図 11

ゲンタマイシン傷害後の前庭上皮細胞の経時的変化（平均値±標準偏差）。Pvalb 陽性/Myo7a 陽性/DAPI 陽性細胞を I 型有毛細胞、Pvalb 陰性/Myo7a 陽性/DAPI 陽性細胞を II 型有毛細胞、DAPI のみ陽性の細胞を支持細胞として計測した。I 型有毛細胞は傷害前に比べて傷害後 7 日目から 56 日目の群までは 4~25%に減少している。II 型有毛細胞は傷害後 14 日目で傷害前より 20%に減少し、その後 56 日目では傷害前の 82%まで増加している。支持細胞の細胞密度は経過中に大きな増減はみられない。

\*\* :  $p < 0.01$

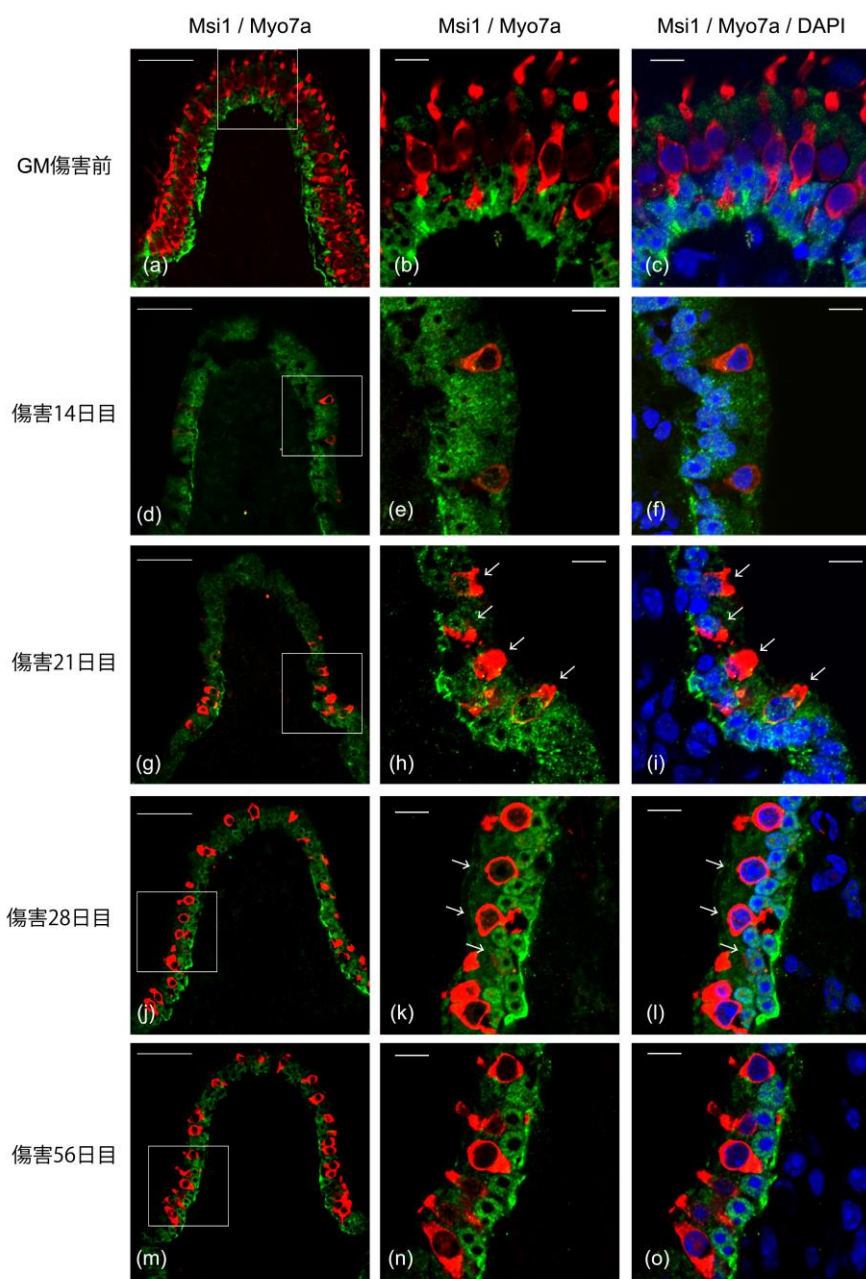


図 12

半規管有毛細胞の自発的再生過程における Msi1 の経時的局在変化。Myo7a (赤)、Msi1 (緑)、DAPI (青) に染色。(b、c)、(e、f)、(h、i)、(k、l)、(n、o) は各々 (a)、(d)、(g)、(j)、(m) において□で示した領域の強拡大像を示す。(a-c) : GM 傷害前。有毛細胞、支持細胞が各々感覚細胞層、基底細胞層に密に並び、Msi1 は支持細胞の核に局限する。(d-f) : 傷害 14 日目。有毛細胞は消褪し、Msi1 は支持細胞の細胞質、核にびまん性に発現。(g-i) : 傷害 21 日目。有毛細胞がやや増加し、その多くは Myo7a/Msi1 の二重陽性細胞 (矢印) である。(j-l) : 傷害 28 日目。有毛細胞が増加し、Msi1 は支持細胞内で核優位のパターンに変化。



Myo7a 陽性細胞における Msi1 の染色性は低下（矢印）。(m-o)：傷害 56 日目。Msi1 は支持細胞内で核に限局。Myo7a 陽性/Msi1 陰性の細胞が主となる。Scale bar=50  $\mu$ m (a, c, e, h)、Scale bar=10  $\mu$ m (b, d, f, g, i, j)

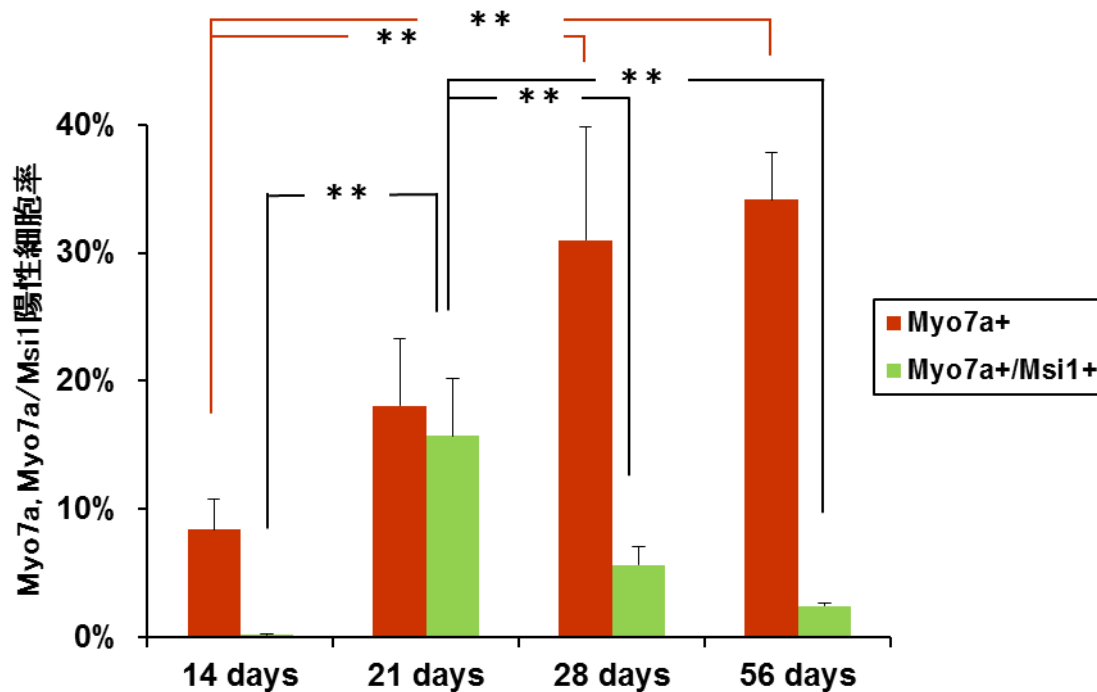


図 13

Myo7a 陽性細胞の内訳（平均値±標準偏差）。Myo7a 陽性細胞は傷害後 28 日目、56 日目では 14 日目に比べて有意に増加している。そのうち Myo7a/Msi1 二重陽性細胞は傷害後 21 日目で最も多くみられ、28 日目、56 日目では有意に減少している。

\*\* :  $p < 0.01$

		傷害前	傷害14日	傷害21日	傷害28日	傷害56日
有毛細胞	細胞密度(%)	100	18	26	57	63
	Myo7a	C	C	C	C	C
	Msi1	—	—	N++	N+	—
支持細胞	細胞密度(%)	100	107	105	109	102
	Myo7a	—	—	—	—	—
	Msi1	N	N、C	N、C	N>C	N

図 14

ゲンタマイシン障害後の有毛細胞、支持細胞密度および Myo7a、Msi1 の発現様式の経時的変化のまとめ。有毛細胞が増加傾向となる傷害 21 日目で Msi1 は核に強陽性となる。一方、支持細胞では障害後 14 日、21 日目では細胞内にびまん性に発現しているが、障害後 56 日目では核優位の発現となる。

C : 細胞質。N : 核。

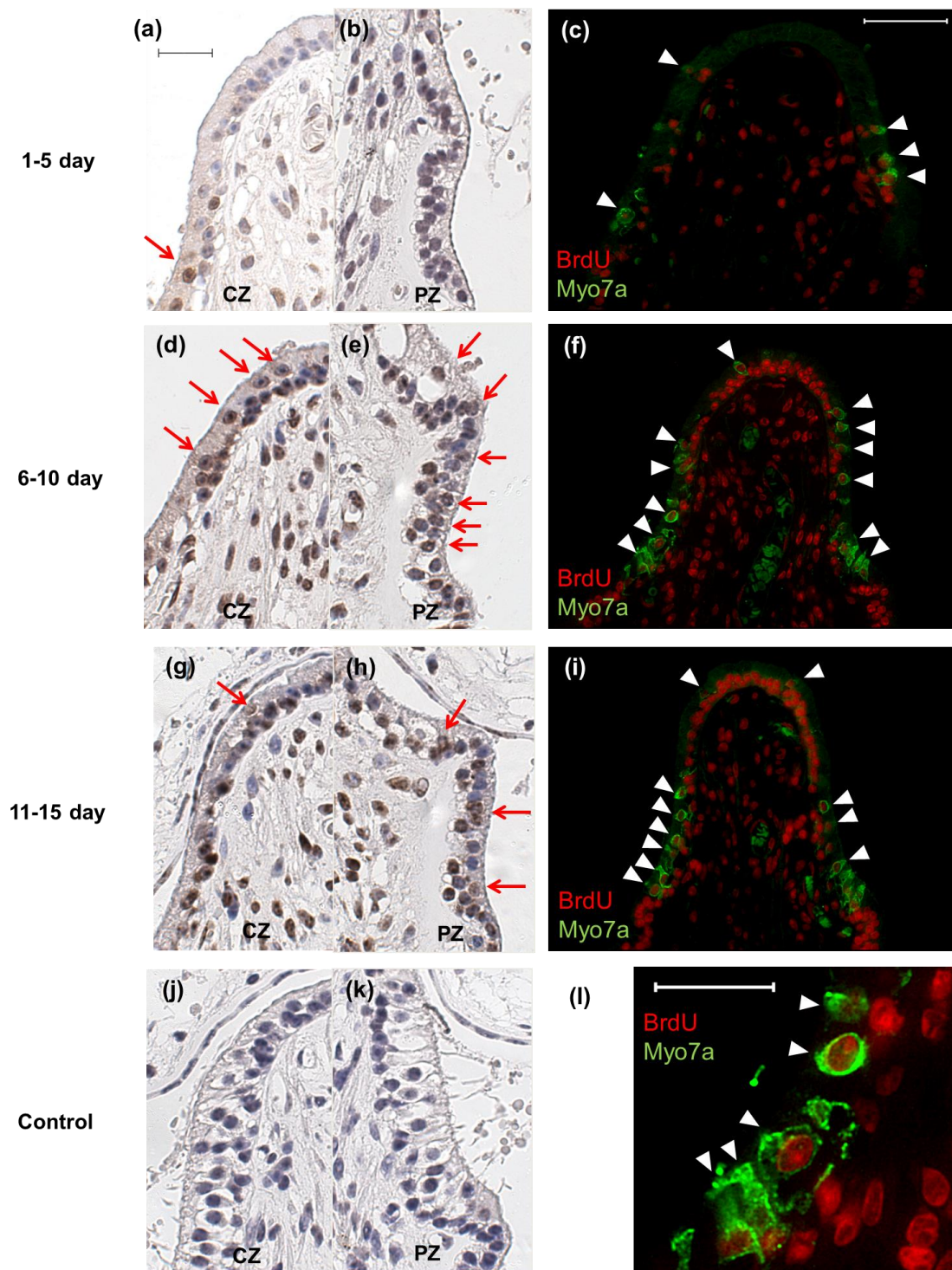


図 15

BrdU による前庭感覚上皮細胞の増殖活性の評価。酵素抗体法（抗 BrdU 抗体；a, b, d, e, g, h, j, k）と蛍光抗体法（抗 BrdU 抗体（赤）、抗 Myo7a 抗体（緑）；c, f, i, l）の染色写真。BrdU の取込みは傷害後 6～10 日、11～15 日の標本で支持細胞に多くみられる。一部感覚細胞層に BrdU 陽性細胞（赤矢印）、BrdU/Myo7a 二重

陽性細胞（矢頭）を認め、辺縁部に多くみられた。

CZ: 頂部。PZ: 辺縁部。Scale bar=50  $\mu\text{m}$  (c, f, i)、Scale bar=20  $\mu\text{m}$  (a, b, d, e, g, h, j, k, l)

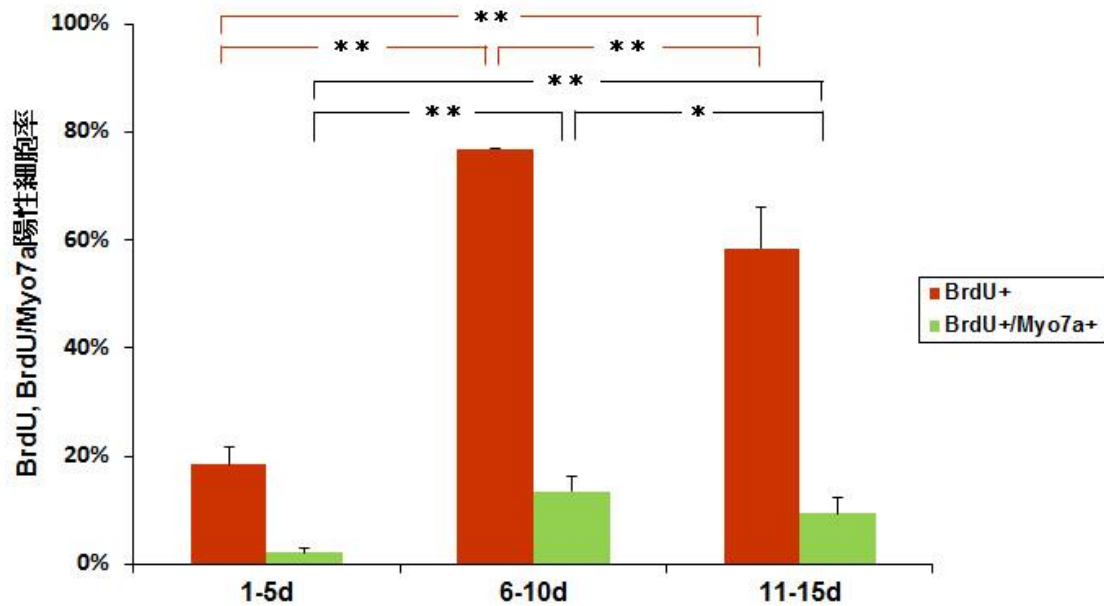


図 16

BrdU 陽性細胞率および BrdU/Myo7a 二重陽性細胞率（平均値±標準偏差）。BrdU 陽性細胞率および BrdU/Myo7a 二重陽性細胞率は共に傷害後 6～10 日目に BrdU を投与した群が最も高い。

\*\* :  $p < 0.01$ 、\* :  $p < 0.05$

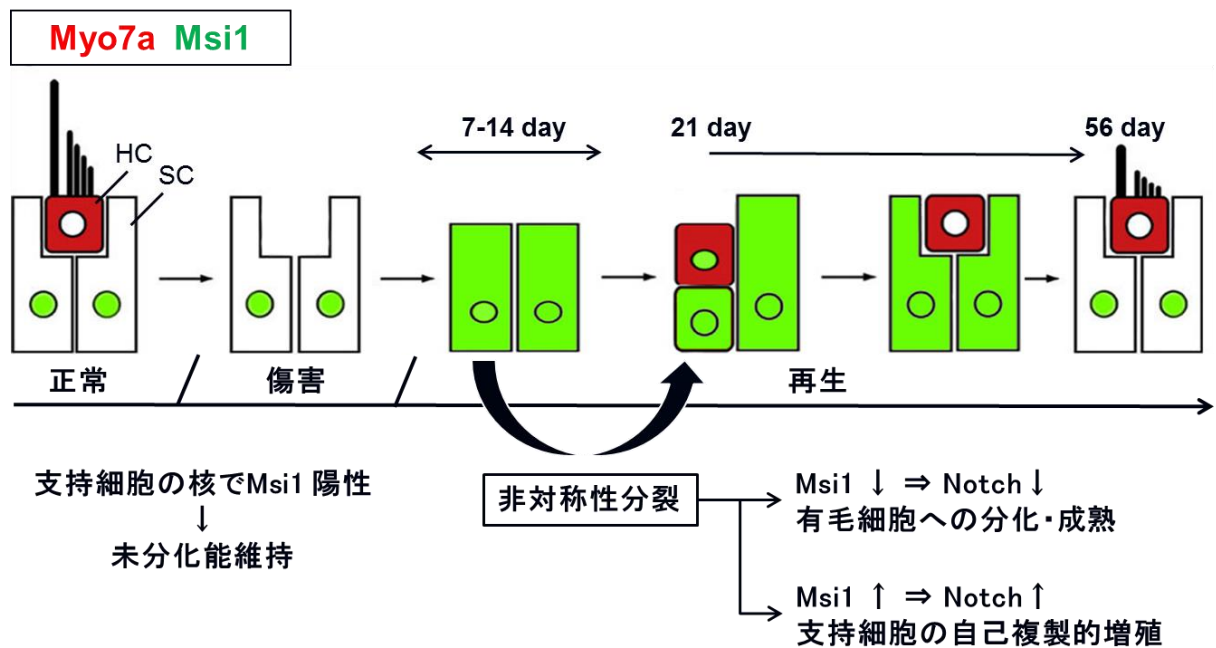


図 17

本研究で明らかとなった前庭感覚上皮再生過程における Msi1 の局在変化と再生様式の概念図。GM 傷害前の定常状態では Msi1 は支持細胞の核に局限し、支持細胞が内耳幹細胞機能を有することを示唆する。傷害後 7 から 14 日では Msi1 は支持細胞の核、細胞質にびまん性に発現し、支持細胞の増殖活性が上昇した時期にあたると思われる。傷害後 21 日目以降は有毛細胞への分化・成熟の初期段階と考えられる Msi1 と Myo7a の二重陽性細胞が出現するが、成熟と共に Msi1 は陰性化する。一方、支持細胞における Msi1 はびまん性の細胞内発現から次第に核優位の発現に変化する。このような Msi1 の時間的空間的な細胞内局在変化は、Msi1 が非対称性分裂および Notch シグナルを介した有毛細胞再生に関与することを示唆する。

HC:有毛細胞、SC：支持細胞