

論文内容の要旨

氏名	尾崎 大輔
Culture of organoids with vestibular cell-derived factors promotes differentiation of embryonic stem cells into inner ear vestibular hair cells (和訳) 内耳前庭細胞由来因子とオルガノイド培養を組み合わせたES細胞から内耳前庭有毛細胞への分化誘導	

論文内容の要旨

近年、オルガノイド培養系により未分化幹細胞(ES細胞やiPS細胞など)から種々の細胞や組織への分化制御法が報告されている。内耳前庭有毛細胞(V-HC)は、体平衡バランスにおいて重要な役割を果たしているが、それに特化した分化・再生メカニズムに関する報告は極めて少ない。そこで申請者は、内耳前庭細胞(VC)に由来する液性因子とオルガノイド培養を組み合わせた新規V-HC特異的培養法の開発を行った。

液性因子源には、生後4日目マウス前庭組織より単離したVCを培養することで得られた培養上清(V-CM)を使用した。オルガノイド培養は、有毛細胞特異的な転写因子(Math1)の発現に連動して蛍光タンパク質(GFP)を発現するES細胞株(Math1-GFP ES細胞)を用いて胚様体(EB)を形成後、非接着プレートにより培養することで実施した。ES細胞分化培地(LIFを含まないES培養液)あるいはV-CM添加培地により15日間培養し、有毛細胞関連マーカーの発現をreal time RT-PCRおよび免疫組織染色により精査し、更に、NGS解析によりV-CM特異的遺伝子候補の特定を試みた。

V-CMを用いたオルガノイド培養により、顕著なGFP陽性細胞の出現を認めた。遺伝子発現解析では、V-CMによりMath1、Myosin6、Brn3cの内耳有毛細胞マーカーに加え、V-HC特異的マーカーDnah5の有意な発現亢進を認めた。一方、蝸牛有毛細胞特異的マーカーであるLmod3の発現亢進は認めなかった。オルガノイド凍結切片の組織学的観察では、V-CMを用いた場合、H&E染色により多数のシスト形成が認められ、免疫染色によりGFP(Math1)とMyosin6、Brn3c、Dnah5との共発現が確認され、遺伝子解析との相関性を認めた。更に、蝸牛細胞(CC)を用いてVCに特異的な発現をRNA-seqにより解析したところ、コラーゲンファミリーを含む細胞外マトリックス群の優位な発現亢進を認めた。

本研究は、V-CMとオルガノイド培養系を組み合わせることにより、特異的にV-HCへの分化を制御する新規誘導法を開発したものであり、主に細胞外マトリックスが関与していることを明らかにした。この新しい知見は、内耳再生医学の基礎的視点から前庭有毛細胞の分化・再生メカニズムを解明する上で重要と考えられる。