

論文内容の要旨

報告番号		氏名	阪上 雅治
Differentiation of embryonic stem cells into inner ear vestibular hair cells using vestibular cell derived-conditioned medium (内耳前庭細胞由来の培養上清を用いた 胚性幹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、分子生物学的アプローチにより聴覚系における内耳有毛細胞の再生研究は盛んに行われるようになったが、前庭障害に対する基礎研究は極めて報告が少なく、前庭有毛細胞 (V-HC) の分化に着目した研究はほとんど行われていない。そこで、申請者は、本研究において、高増殖性で多分化能を有する胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた V-HC 特異的分化誘導法の開発を試みた。

前庭有毛細胞への分化誘導 (液性) 因子を発現すると考えられる前庭由来の細胞を、生後 4 日目のマウス内耳卵形嚢より単離、培養し、それらの培養上清 (V-CM) を回収した。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 (GFP) を発現する ES 細胞株 (Math1-GFP ES 細胞) を用いて、V-CM の V-HC 分化誘導を解析した。Math1-GFP ES 細胞から胚様体 (EB) を形成後、ES 細胞分化培地 (LIF を含まない ES 培養液: ES-DM) あるいは V-CM を用いて、2 週間接着培養を行った。その後、有毛細胞関連マーカーの発現を real time RT-PCR および細胞免疫染色により精査した。ES-DM および V-CM の両培地での培養において細胞形態には明らかな差は認められなかったが、GFP 陽性細胞の出現は V-CM 培養にて有意な増加を認めた。遺伝子発現解析では、V-CM 培養において *Math1*、*Myosin6*、*Brn3c* の内耳有毛細胞マーカーに加え、V-HC 特異的と考えられる *Dnah5* の有意な発現亢進を認めた。一方、*Lmod3* (蝸牛有毛細胞特異的マーカー) の発現に差は認められなかった。さらに、細胞免疫染色による解析では、V-CM を用いて培養を行った細胞中に GFP (Math1) と Myosin6、Brn3c、Dnah5 との共発現が認められたことから、V-CM が V-HC 分化誘導の促進因子を有する可能性が示唆された。

本研究により、前庭細胞由来液性因子を用いることで、前庭有毛細胞への特異的分化誘導制御が実現可能となった。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。