

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 近藤 健 二

本研究は内耳有毛細胞の発生・分化のメカニズムの解析のための基礎的ツールとなる①有毛細胞をその分化の初期から光学顕微鏡下で容易に同定するための細胞マーカー、及び②in vivoでの発生過程を再現でき、なおかつ細胞環境の操作を容易にする発生期内耳組織の培養系の開発を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ニワトリ幼鳥から摘出した内耳膜迷路組織を抗原としてマウスを免疫し、免疫組織化学的スクリーニングにより有毛細胞を特異的に標識する単クローン抗体 (2A7 抗体) を作成した。2A7 抗体は孵化後のニワトリ内耳のすべての感覚上皮の有毛細胞の apical region を標識し、さらに免疫電顕法による観察により、この標識は有毛細胞の stereocilia, kinocilium 及び non-ciliary apical surface に分布することが示された。内耳膜迷路のその他の細胞種は標識されず、また他の臓器では腎に弱い標識がある他は反応を認めなかったことから同抗体は有毛細胞に特異的な抗原を認識しているものと考えられた。

2. 2A7抗体と蛍光phalloidinとの2重染色によって、有毛細胞の2A7抗体による染色パターンは hair bundle の基部付近に反応が限局している型 (basal-type 2A7-IR) と hair bundle のほぼ全長に渡って反応が存在している型 (extended-type 2A7-IR) の2種類があることが示された。前庭有毛細胞には神経終末の形に基づいて分類されたI型、II型の2種類の有毛細胞が存在するが、I型有毛細胞が基本的にbasal-type 2A7-IRを示したのに対し、II型有毛細胞ではbasal-type 2A7-IRを示す細胞とextended-type 2A7-IRを示す細胞が場所特異的に分布していた。この結果から、従来神経終末の形により単純に2種類に分類されていた前庭有毛細胞のうち、特に II 型有毛細胞については subtype の存在が示唆された。

3. 発生期における検討では、2A7 抗体の標識は前庭では孵卵開始後 4.5 日目

胚に、蝸牛管では同7日目胚に初めて出現した。これらは電顕的に有毛細胞の形態的分化が初めて認められる時期とほぼ一致することから、2A7抗体は分化開始後早期の有毛細胞をも標識可能な抗体であると考えられた。

4. 孵化後のニワトリ内耳における2A7抗体標識の分布、及び発生期のニワトリ内耳における2A7抗体標識の出現時期は抗hair cell antigen (HCA)抗体のそれと若干の差異を認めるものの類似しており、両抗体が関連した抗原部位を認識している可能性が示唆された。

5. 組織片を培養液に浮遊させたポリカーボネート膜上で静置して培養する方法（ポリカーボネート膜静置法）を内耳原基である耳胞の器官培養法として新たに導入した。先に作成した2A7抗体を有毛細胞のマーカーとして用い、同培養系における有毛細胞の発生過程をin vivoのそれと比較検討したところ、①有毛細胞の分化の開始のタイミングは本培養系でほぼ保たれていることが分かった。また②basal-type 2A7-IRとextended-type 2A7-IRを示す有毛細胞が培養系内にそれぞれ確認され、有毛細胞のsubtypeの分化も培養系内で起こっていることが示唆された。さらに③細胞増殖マーカーであるブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた検討により、培養系で分化した有毛細胞の多くはin vitroで分裂増殖中の前駆細胞から分化したことが示された。以上の結果より、今回用いたニワトリ耳胞の器官培養系ではin vivoにおける有毛細胞の発生過程がかなりの程度で再現されていると考えられた。

以上、本研究では聴覚研究の代表的な実験動物であるニワトリを用い、内耳有毛細胞の発生と分化に関する研究に不可欠な研究ツールの開発を行った。本研究の成果である2A7抗体とニワトリ胚の耳胞の器官培養系の組み合わせは今後有毛細胞の発生・分化のメカニズムの解析に大きな貢献をなすと考えられ、さらに2A7抗体による2種類の染色型（basal-type 2A7-IRとextended-type 2A7-IR）の解析は前庭感覚上皮における機能的局在の解明に大きな示唆を与えると期待される。よって本研究は学位の授与に値するものと考えられる。