

甲 第 号

阪上 雅治 学位請求論文

審 査 要 旨

奈 良 県 立 医 科 大 学

## 論文審査の要旨及び担当者

	委員長	教授	和中 明生
論文審査担当者	委員	教授	齋藤 康彦
	委員(指導教員)	教授	北原 糺

### 主論文

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

Masaharu Sakagami, Yukiteru Ouji, Norikazu Kawai, Masayasu Misu,

Masahide Yoshikawa, Tadashi Kitahara

Biochemistry and Biophysics Reports 2019 May 15; 19:100649

doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100649

## 論文審査の要旨

本研究では多分化能を有する胚性幹細胞（ES 細胞）から前庭有毛細胞への効率の良い分化誘導法の開発を目的とした。申請者は前庭組織に特異的な分化誘導（液性）因子が存在するという仮説の下、生後 4 日目のマウス内耳卵形嚢より細胞を単離、培養し、それらの培養上清（V-CM）を回収した。有毛細胞への分化のモニタリングには有毛細胞特異的な転写因子（Math1）に連動して GFP を発現する ES 細胞株（Math1-GFP ES 細胞）を用い、この細胞に V-CM を作用させた。対照として ES 細胞分化培地（ES-DM）を用いて V-CM と ES-DM の分化誘導効率を比較した。有毛細胞関連マーカーの発現は real time RT-PCR および細胞免疫染色により検討した。遺伝子発現解析では、V-CM 培養において Myosin6、Brn3c（内耳有毛細胞共通マーカー）に加え、前庭有毛細胞特異的と考えられる 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 の発現に差は認められなかった。免疫染色においても、Myosin6、Brn3c、Dnah5 との共発現が認められたことから、V-CM に前庭有毛細胞への分化誘導促進因子が存在する可能性が示唆された。さらに申請者は前庭には前庭の、蝸牛には蝸牛の有毛細胞をそれぞれ分化誘導する因子が存在するはずであると考え、それぞれの組織からの培養上清を用いて、前庭或いは蝸牛有毛細胞への分化誘導が可能であり、且つそれぞれの組織に特異的な遺伝子群が発現していることを予備検討で見出している。本研究は蝸牛に比較して研究があまり進んでいなかった前庭有毛細胞への特異的な分化誘導制御を実現可能とする第一歩として高く評価されるものであり、前庭障害患者への再生医療に繋がるものとして副論文と合わせて医学博士に値する研究と評価する。公聴会における質疑応答では培養継代数と分化誘導効率の関係など実験の詳細にわたって的確に返答し、遺伝子網羅解析から分化誘導因子を同定する戦略などについても明確なアイデアを示した。以上総合して審査委員全員が適と判定した。

## 参 考 論 文

1. Hunt 症候群罹患後に遷延するめまいに関する検討  
阪上雅治、山下哲範、山中敏彰、北原 紘  
Facial Nerve Research (印刷中)
2. Isolation and culuture of pleural mesothelial cells  
Kawai N, Ouji Y, Sakagami M, Tojo T, Sawabata N, Yoshikawa M, Taniguchi S  
Exp Lung Res. 2019 May-Aug;45(5-6):151-156.
3. Effect of covering with cross-linked gelatin glue on tissue regeneration in a rat lung injury model  
Kawai N, Suzuki S, Ouji Y, Takeda M, Sakagami M, Tojo T, Sawabata N, Yoshikawa M, Ikada Y, Taniguchi S  
Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2019 Jul 1;29(1):1-7.
4. Meniere's disease with unremitting floating sensation is associated with canal paresis, gravity-sensitive dysfunction, mental illness, and bilaterality  
Kitahara T, Sakagami M, Ito T, Shiozaki T, Kitano K, Yamashita A, Ota I, Wada Y, Yamanaka T  
Auris Nasus Larynx. 2019 Apr;46(2):186-192.

5. Idiopathic benign paroxysmal positional vertigo with persistent vertigo/dizziness sensation is associated with latent canal paresis, endolymphatic hydrops, and osteoporosis

Kitahara T, Ota I, Horinaka A, Ohyama H, Sakagami M, Ito T, Shiozaki T, Wada Y, Yamanaka T

*Auris Nasus Larynx*. 2019 Feb;46(1):27-33.

6. 当院めまいセンターにおけるめまい疾患統計および  
めまい検査異常検出率

阪上雅治、北原紘、伊藤妙子、西村忠己、和田佳郎、山中敏彰

*Equilibrium Research*,77 卷 3 号 Page136-142(2018.06)

7. Induction of lung-like cells from mouse embryonic stem cells by dellularized lung matrix

Kawai N, Ouji Y, Sakagami M, Tojo T, Sawabata N, Yoshikawa M, Taniguchi S

*Biochem Biophys Rep*. 2018 Jun 20; 15:33-38.

8. Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from mouse ES cells using combination of Math1 transfection and conditioned medium from ST2 stromal cells

Ouji Y, Sakagami M, Omori H, Higashiyama S, Kawai N, Kitahara T, Wanaka A, Yoshikawa M

*Stem Cell Res*. 2017 Aug; 23:50-56.

9. Negative prognostic factors for psychological conditions in patients with audiovestibular diseases  
Sakagami M, Kitahara T, Okayasu T, Yamashita A, Hasukawa A, Ota I, Yamanaka T  
Auris Nasus Larynx. 2016 Dec; 43(6):632-636.
  
10. A Two-Year Randomized Trial of Interventions to Decrease Stress Hormone Vasopressin Production in Patients with Meniere's Disease-A Pilot Study.  
Kitahara T, Okamoto H, Fukushima M, Sakagami M, Ito T, Yamashita A, Ota I, Yamanaka T  
PLoS One. 2016 Jun 30; 11:(6):e0158309
  
11. Surgical results and psychological status in patients with intractable Ménière's disease  
Yokota Y, Kitahara T, Sakagami M, Ito T, Kimura T, Okayasu T, Yamashita A, Yamanaka T  
Auris Nasus Larynx. 2016 Jun;43(3):287-291.
  
12. Effects of posterior tympanotomy with steroids at round window on hearing recovery after revision surgery for intractable Meniere's disease.,  
Sakagami M, Kitahara T, Ito T, Ota I, Nishimura T, Nishimura A, Otsuka S, Yamanaka T  
Acta Otolaryngol. 2015 Jul;135(7):667-672.

13. 副甲状腺癌の遺伝子解析と Cetuximab・Docetaxel・S-1 を用いた治療経験  
榎本圭佑、島津宏樹、長井美樹、武田和也、原田祥太郎、阪上雅治、内野  
眞也、今村亮一、山口誓司、伏見博彰、坂田義治  
日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 31 卷 3 号 Page232-237 (2014.09)

以上、主論文に報告された研究成績は、参考論文とともに耳鼻咽喉・頭頸部機能制御医学の進歩に寄与するところが大きいと認める。

令和2年3月5日

学位審査委員長

機能形態学

教授 和中 明生

学位審査委員

脳神経生理学

教授 齋藤 康彦

学位審査委員(指導教員)

耳鼻咽喉・頭頸部機能制御医学

教授 北原 糺