

Title	Wolfram症候群ヒト疾患iPS細胞による難聴の病態解明と革新的治療法の探索
Sub Title	In vitro "virtual biopsy" of cochlear cells by using Wolfram syndrome patients derived hiPSCs
Author	藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 大石, 直樹(Ōishi, Naoki)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>小型霊長類コモンマーモセットを用いてWFS1遺伝子の霊長類蝸牛での発現パターンを同定した(Suzuki N, 2016)。マーモセットでは齧歯類と異なって血管条基底細胞にも認められ, WFS1遺伝子変異を伴う遺伝性難聴の病理組織学的報告における細胞萎縮部位と一致を見た。これまで遺伝子改変モデルではヒトの複雑なWFS1関連難聴が再現されておらず, ヒト難聴の理解には血管条基底細胞の解析が重要と考えられた。この結果を踏まえ, 健常者由来iPS細胞からWFS1陽性内耳細胞を作成し, 機能解析を行った。現在患者由来iPS細胞で同様の検討を行っており, その表現形から新規病態発見と治療法の探索を進めていく。</p> <p>We identified the expression pattern of WFS1 gene in the primate cochlea using a small non-human primate common marmoset (Suzuki N, 2016). In marmosets, unlike rodents, WFS1 was also expressed in the basal cell of stria vascularis, where severe atrophy was reported in the temporal bone of Wolfram syndrome patients. Based on these findings, we generated WFS1 positive cochlear cells from human iPSCs and its function was analyzed.</p>
Notes	<p>研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2015～2017 課題番号：15K15624 研究分野：耳科学</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K15624seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K15624seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15624

研究課題名(和文) Wolfram症候群ヒト疾患iPS細胞による難聴の病態解明と革新的治療法の探索

研究課題名(英文) In vitro "virtual biopsy" of cochlear cells by using Wolfram syndrome patients derived hiPSCs

研究代表者

藤岡 正人 (Fujioka, Masato)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70398626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小型霊長類コモンマーモセットを用いてWFS1遺伝子の霊長類蝸牛での発現パターンを同定した(Suzuki N, 2016)。マーモセットでは齧歯類と異なって血管条基底細胞にも認められ、WFS1遺伝子変異を伴う遺伝性難聴の病理組織学的報告における細胞萎縮部位と一致を見た。これまで遺伝子改変モデルではヒトの複雑なWFS1関連難聴が再現されておらず、ヒト難聴の理解には血管条基底細胞の解析が重要と考えられた。この結果を踏まえ、健常者由来iPS細胞からWFS1陽性内耳細胞を作成し、機能解析を行った。現在患者由来iPS細胞で同様の検討を行っており、その表現形から新規病態発見と治療法の探索を進めていく。

研究成果の概要(英文)：We identified the expression pattern of WFS1 gene in the primate cochlea using a small non-human primate common marmoset (Suzuki N, 2016). In marmosets, unlike rodents, WFS1 was also expressed in the basal cell of stria vascularis, where severe atrophy was reported in the temporal bone of Wolfram syndrome patients. Based on these findings, we generated WFS1 positive cochlear cells from human iPSCs and its function was analyzed.

研究分野：耳科学

キーワード：疾患iPS創薬 WFS1 Wolfram症候群 遺伝性難聴 コモンマーモセット 橋渡し研究 ヒトiPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は未だ有効な治療法に乏しく病態生理の解明と有効な治療戦略が求められている。モデル動物や臨床試験から、一部の難聴の発症機序に酸化ストレスの関与が明らかとなってきたが、その緩和による治療効果は十分でない。小胞体ストレスは異常タンパクが小胞体に蓄積することで細胞死を引き起こす致死的ストレスの一種である。本研究が開始する以前に、研究分担者の大石はマウスへのアミノグリコシド投与による薬剤性難聴モデルで蝸牛ラセン神経節細胞死に小胞体ストレスが関与すること (Oishi et al, 2012 ARO)、音響外傷モデルで小胞体特異的タンパク質 GRP78 の発現が傷害後に変化することを示し (Oishi et al, 2012 ARO)、さらに加齢性難聴マウスを用いて、小胞体ストレスの軽減は加齢性難聴の予防に効果的であることを発見していた (Oishi et al, 投稿準備中)。ほぼ同時期に海外でも小胞体ストレス誘導剤の蝸牛内投与が有毛細胞死を引き起こすことが報告されており (J Pharmacol Sci, 2012) また臨床的にしばしば観察されるアセトアミノフェン長期投与による聴覚障害の発症機序に小胞体ストレスが関与する可能性も示唆されていた (Hear Res, 2014)。これらの背景から、小胞体ストレスは感音難聴発症のひとつの機序である可能性が高いものと思われ、より詳細な検討が必要と考えていた。

研究代表者の藤岡のチームは、2012 年よりヒト iPS 細胞を用いた内耳性難聴研究を開始し、ヒト ES/iPS 細胞からの極めて高効率の内耳前駆細胞～内耳細胞誘導法を確立し (国内特許取得) 両側遺伝性進行性難聴の一つである Pendred 症候群/DFNB4 患者採血検体から iPS 細胞を樹立して内耳疾患細胞を作製し、in vitro の解析により、疾患細胞の脆弱性と異常タンパク凝集体形成を発見し、「内耳変性疾患」としての感音難聴という疾患概念を提示していた。さらにこのコンセプトに則って治療薬を探索し、mTOR 阻害剤である rapamycin のオートファジー促進作用が同疾患の細胞脆弱性低下をもたらすことを見出し (Hosoya et al, Cell Rep 2017) 難聴に対する疾患 iPS 創薬研究のアプローチが進められている最中であった。

## 2. 研究の目的

感音難聴の新規治療法樹立を目指し、近年難聴の原因として急速に着目されつつある小胞体ストレスの内耳細胞における病態生理への関与を、症候性難聴である Wolfram 症候群患者由来疾患特異的 hiPS 細胞を用いることで検討することを目指した。Wolfram 症候群は糖尿病、視神経萎縮、尿崩症、難聴、尿路異常、多彩な精神症状などを合併する劣性遺伝疾患で、その原因遺伝子として小胞体

機能に必須の膜タンパク WOLFRAMIN をコードする WFS1 遺伝子が同定されている。本症候群の特徴的な感音難聴の病態生理解析を目的に、ヒト ES/iPS 細胞からの高効率内耳細胞分化系を用いて、Wolfram 症候群患者から樹立された疾患 iPS 細胞より内耳細胞を分化誘導し、難聴発症の機序とその治療標的の探索を行うこととした。

## 3. 研究の方法

当疾患では WFS1 遺伝子変異で起きる小胞体ストレスへの脆弱性が病態生理であることが他臓器で示されている。本研究では当科で確立しているヒト ES/iPS 細胞からの内耳細胞誘導法を、WFS1 変異ヒト iPS 細胞に適用し、蝸牛内の各細胞における細胞レベルでの異常、小胞体ストレスを含む各種細胞ストレスへの脆弱性を検討することで難聴の病態生理および治療標的を患者内耳細胞で直接的に検討することとした。

## 4. 研究成果

### (1) 小型霊長類コモンマーモセット蝸牛を用いた WFS1 の発現解析

本疾患の原因となる疾患細胞が蝸牛内のどの部位にあたるかを同定するために、最初に、霊長類モデルであるコモンマーモセットの蝸牛における WFS1 遺伝子の発現パターンを、免疫組織化学染色により検討した。興味深いことにこの遺伝子のマーモセットでの WFS1 の遺伝子発現パターンは齧歯類と異なって血管条基底細胞にも認められ、WFS1 遺伝子変異を伴う遺伝性難聴の病理組織学的報告における細胞萎縮部位と一致を見た。また、過去に齧歯類で報告のあった一部の蝸牛支持細胞での発現についても確認をした。これまで WFS1 遺伝子に関する遺伝子改変モデルではヒトの複雑な WFS1 関連難聴が再現されていない。ヒト難聴の理解には血管条基底細胞の解析が重要と考えられ、この発現結果についてを英文誌へ論文報告した (Suzuki ら 2016)。

### (2) ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 内耳疾患モデルの作成

次に、健常者由来 iPS 細胞から WFS1 陽性内耳細胞の分化誘導を試みた。上述のように WFS1 は蝸牛支持細胞と血管条基底細胞に発現する。私達が過去に報告した高効率の内耳細胞誘導法を用いて作成した内耳幹細胞に、蝸牛外側壁への誘導因子を加えることにより、WFS1 陽性内耳細胞を作製することに成功した。すなわち、本疾患における内耳疾患 iPS 研究が技術的に可能であることが示された。

### (3) Wolfram 症候群患者由来ヒト iPS 細胞を用いた病態生理の検討

続いて、共同研究先より入手した疾患 iPS

細胞から耳包様内耳前駆細胞の誘導を試みた。しかしながら、残念ながら効率の良い誘導は困難で、解析に要する細胞数を得ることができなかった。これまで当科で樹立したiPSラインではこのような経験はないことから、海外の供与元での樹立法と国内の樹立法の違いや、輸送による影響がその理由として考えられた。

#### (4)今後の展望

4-(2)で示したよう、健常人からのヒト蝸牛WFS1陽性細胞の分化誘導法は確立しており、解析症例があれば研究が行える状態にある。本研究室では難聴遺伝外来との密な連携で、不定期ながらも、解析を要すると考えられた症例からは疾患iPS細胞の樹立を行っている。本研究が終了した2018年3月時点においては残念ながらWolfram症候群と診断される症例に恵まれなかったが、今後解析に適した症例があれば、採血・iPS細胞樹立から当科で行い、検討を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計7件)

Yamamoto N, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S, Nishi Y, Nakano A, Masuda S, Fujioka M, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T. Prevalence of TECTA mutation in patients with mid-frequency sensorineural hearing loss. *Orphanet J Rare Dis* 25;12(1).2017.157 DOI: 10.1186/s13023-017-0708-z. 査読有

Suzuki N, Hosoya M, Oishi N, Okano H, Fujioka M, Ogawa K. Expression pattern of wolframin, the WFS1 (Wolfram syndrome-1 gene) product, in common marmoset (*Callithrix jacchus*) cochlea. *Neuroreport* 3;27(11).2016.833-6 DOI: 10.1097/WNR.0000000000000624. 査読有

Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S, Akamatsu W, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Rep* 3;18(1).2016.68-81. DOI:10.1016/j.celrep.2016.12.020. 査読有

Hosoya M, Fujioka M, Ogawa K, Okano H. Distinct Expression Patterns Of Causative Genes Responsible For Hereditary Progressive Hearing Loss In Non-Human Primate Cochlea. *Scientific Reports*. 26;6.2016. 22250. DOI: 10.1038/srep22250. 査読有

Inagaki Y, Fujioka M, Kanzaki S, Watanabe K, Oishi N, Itakura G, Yasuda A,

Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ogawa K. Sustained Effect of Hyaluronic Acid in Subcutaneous Administration to the Cochlear Spiral Ganglion. *Plos One*. 21;11.2016.e0153957. DOI:10.1371/journal.pone.0153957. 査読有

Hosoya M, Fujioka M, Kobayashi R, Okano H, Ogawa K. Overlapping expression of anion exchangers in the cochlea of a non-human primate suggests functional compensation. *Neuroscience Research*. S0168-0102(16). 2016. 3000006. DOI: 10.1016/j.neures.2016.04.002 査読有

Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, Niwa K, Endo S, Fujioka M, Shiotani A. ERK2 mediates inner hair cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Scientific Reports*. 18;5.2015. 16839. DOI: 10.1038/srep16839. 査読有

##### [学会発表](計27件)

藤岡正人 両側進行性難聴の病態解明と新規治療法開発～iPS創薬の立場から～ 第17回日本抗加齢医学会総会 2017年

Makoto Hosoya, Masato Fujioka, Tatsuo Matsunaga, Kaoru Ogawa, Cochlear cell modeling using disease-specific iPSCs unveiled a degenerative phenotype and treatments of a congenital progressive hearing loss. ENT World Congress IFOS Paris 2017 2017年

藤岡正人 『両側進行性難聴に対するiPS細胞研究～モデル動物不在の疾患への挑戦～』BIOtech 第16回バイオ・ライフサイエンス研究展 2017年

Masato Fujioka. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. 8th World Gene Convention-2017 2017年

佐伯翼・藤岡正人・細谷誠・西山崇経・松崎佐栄子・松永達雄・小川郁 Pendred症候群患者特異的iPS細胞由来内耳細胞におけるPENDRINタンパク質の局在の検討 第27回日本耳科学会総会・学術講演会 2017年

松崎佐栄子・藤岡正人・細谷誠・西山崇経・松崎佐栄子・松永達雄・小川郁 EYA4遺伝子変異特異的疾患iPS細胞の樹立 第27回日本耳科学会総会・学術講演会 2017年

藤岡正人 内耳性難聴に対するiPS細胞を用いた創薬研究 第38回大阪耳疾患セミナー 2017年

Masato Fujioka Predicting clinical effects of therapeutics by iPS-based in vitro model of genetic deafness: another promising approach of precision medicine 国際検討会 Precision Medicine For Deafness 2017年

Masato Fujioka Therapeutics in genetic deafness by iPS-based in vitro model 臺大醫院演講 2017年

藤岡正人 老化と聴力 百寿総合研究センターセミナー 2017年

藤岡正人・松永達雄・長谷部夏希・神崎晶・大石直樹・平賀良彦・鈴木法臣・松崎佐栄子・川浦光弘・小川郁 母親にのみ新規 EY44 遺伝子変異を認めた家族性難聴の1例 第78回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会 2016年

Masato Fujioka. Minding species gaps in the cochlea: non-human primate and patient derived- hiPSC models for the study of hereditary hearing loss. IEB 2016 2016年

藤岡正人・細谷誠・鈴木法臣・大石直樹・松崎佐栄子・小川郁 両側進行性内耳性難聴の病態生理研究～疾患 iPS 創薬の立場から～ 第26回日本耳科学会総会・学術講演会 2016年

Masato Fujioka. Cochlear disease modeling and drug discovery by using human iPSC-based technologies. 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2016年

Noriomi Suzuki, Masato Fujioka, Makoto Hosoya, Kaoru Ogawa. Expression pattern of Wolfram, the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product, in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) inner ear. The 13rd. Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2015年

Masato Fujioka. Translating back and forth in between benchside and bedside by hiPS based-technology and a primate model. The 13rd. Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2015年

藤岡正人 大石直樹・栗原 涉・神崎 晶・小島 博己・小川 郁 9.4T MRI を用いたヒト固定側頭骨の高解像度描出のこころみ(第2報) 第60回日本聴覚医学会総会・学術講演会 2015年

細谷誠 藤岡正人 小川郁 コモンマーモセット蝸牛における SLC26A および SLC4A ファミリー陰イオン交換輸送体の発現パターンの検討 第60回日本聴覚医学会総会・学術講演会 2015年

藤岡正人 再生医学的アプローチと幹細胞医学による内耳性難聴の研究 日本耳科学会学術講演会・聴覚生理研究会 2015年

細谷誠・藤岡正人・小川郁 コモンマーモセット蝸牛における CRYM 遺伝子、CONNEXIN31 遺伝子および COCH 遺伝子の発現パターンの検討 日本耳科学会学術講演会・聴覚生理研究会 2015年

① Makoto Hosoya, Noriomi Suzuki, Masato Fujioka, Kaoru Ogawa. Expression pattern

of GRHL2, an age-related hearing impairment gene, in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) inner ear. Inner Ear Biology Workshop - IEB2015. 2015年

② Noriomi Suzuki, Masato Fujioka, Makoto Hosoya, Kaoru Ogawa. COMMON MARMOSET;&(CALLITHRIX JACCHUS): A USEFUL NON-HUMAN PRIMATE MODEL FOR HEARING AND AUDIOLOGY RESEARCH. Inner Ear Biology Workshop - IEB2015. 2015年

③ Masato Fujioka. Inflammatory and immune responses in the cochlea: perspective of basic research toward clinics. Inner Ear Biology Workshop - IEB2015. 2015年

④ 藤岡正人・細谷 誠・松永 達雄・小川 郁・岡野 栄之 MY015A 新規遺伝子変異症例からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立と解析 第38回日本神経科学大会 2015年

⑤ 細谷誠・藤岡正人・岡本理志・曾根岳史・松永達雄・赤松和土・小川郁・岡野栄之 PENDRED 症候群疾患特異的 iPS 細胞由来内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング 第36回日本炎症・再生医学会 2015年

⑥ 藤岡正人・細谷誠・小川郁・岡野栄之 ヒト ES/iPS 細胞をソースとした高純度内耳有毛細胞誘導系と人工蝸牛感覚上皮シート作成のこころみ 第36回日本炎症・再生医学会 2015年

⑦ 細谷誠・藤岡正人・松永達雄・小川郁 PENDRED 症候群疾患特異的 iPS 細胞由来内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング 第116回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2015年

〔図書〕(計2件)

藤岡正人, 全日本病院出版会, Monthly Book ENTONI (エントーニ) 218 耳鼻咽喉科における新生児・乳幼児・小児への投薬 update <増刊号>, pp.109-113, 2018

佐伯翼, 藤岡正人, 岡野栄之、ニューサイエンス社, 月刊「細胞」「タンパク質老化の病態解明: iPSC 及びマーモセットモデルを用いた Pendred 症候群のヒト特異的病態の解明と治療法開発」, pp.253-256, 2018

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
日経サイエンス 2017年4月号 NEWS SCAN 読売新聞 2017年1月18日夕刊 THOMSON REUTERS BIOWORLD TODAY 2017年1月13日 日本経済新聞 2017年1月12日夕刊(12面) 日刊工業新聞 2017年1月12日朝刊(3面)

朝日新聞 2017年1月5日朝刊(3面)  
ウェブサイト「慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室研究紹介」  
<http://www.ent.med.keio.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤岡 正人(FUJIOKA, Masato)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号: 70398626

### (2) 研究分担者

小川 郁(OGAWA, Kaoru)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)教授  
研究者番号: 00169179

大石 直樹(NAOKI, Oishi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号: 10348740

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし