

Title	ヒトiPS細胞からの選択的外有毛細胞分化誘導法樹立と疾患iPS細胞による難聴研究
Sub Title	Establishment of selective outer hair cell differentiation induction method from human iPS cells and research of deafness by diseased iPS cells
Author	鈴木, 法臣(Suzuki, Noriomi) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 細谷, 誠(Hosoya, Makoto)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>①外有毛細胞への選択的な分化誘導の樹立：試薬の種類や濃度などの条件検討を行うことで、内耳前駆細胞から外有毛細胞への選択的な分化誘導方法を確立を目指した。霊長類であるコモンマーモセットのコルチ器における遺伝子発現パターンを念頭に試薬の種類、濃度、暴露する時間などの条件検討を進めた。②コモンマーモセットにおける遺伝子発現パターンの検討：小型霊長類であるコモンマーモセットを用いて、難聴を呈する遺伝性疾患の一つであるWolfram症候群の原因遺伝子であるWFS1の蝸牛上皮における発現パターンの検討を行った。</p> <p>①Establishment of selective differentiation induction to outer hair cells: We aimed to establish a selective differentiation induction method from inner ear progenitor cells to outer hair cells by examining conditions such as types and concentrations of reagents. We examined the conditions, such as type of reagent, concentration, and exposure time, with reference to the gene expression pattern in the common marmoset, which is a primate. ②Examination of gene expression pattern in common marmoset: We examined the expression pattern in the cochlear epithelium of WFS1, a gene responsible for Wolfram syndrome, which is one of hereditary diseases presenting with deafness, using the common marmoset, a small primate. In addition, we also examined the responsible gene for hereditary deafness whose expression in outer hair cells has been confirmed.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K20277 研究分野：聴覚
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20277seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20277seika</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.

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20277

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞からの選択的外有毛細胞分化誘導法樹立と疾患iPS細胞による難聴研究

研究課題名（英文）Establishment of selective outer hair cell differentiation induction method from human iPS cells and research of deafness by diseased iPS cells.

研究代表者

鈴木 法臣 (Suzuki, Noriomi)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：00573411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）： 外有毛細胞への選択的な分化誘導の樹立：試薬の種類や濃度などの条件検討を行うことで、内耳前駆細胞から外有毛細胞への選択的な分化誘導方法を確立を目指した。霊長類であるコモンマーモセットの蝸牛上皮における遺伝子発現パターンを念頭に試薬の種類、濃度、暴露する時間などの条件検討を進めた。

コモンマーモセットにおける遺伝子発現パターンの検討：小型霊長類であるコモンマーモセットを用いて、難聴を呈する遺伝性疾患の一つであるWolfram症候群の原因遺伝子であるWFS1の蝸牛上皮における発現パターンの検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小型霊長類のコモンマーモセットの内耳細胞への遺伝子の発現様式は、これまでの遺伝性難聴の研究で用いられた、マウスなどの齧歯類の内耳細胞への発現様式と異なる点が確認された。今後、疾患特異的なiPS細胞を用い、霊長類に特異的に認められた遺伝子の発現様式と難聴との関与を明らかにすることで、遺伝性難聴の原因を同定し、その発症や進行を遅らせる薬剤の発見につながる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： Establishment of selective differentiation induction to outer hair cells: We aimed to establish a selective differentiation induction method from inner ear progenitor cells to outer hair cells by examining conditions such as types and concentrations of reagents. We examined the conditions, such as type of reagent, concentration, and exposure time, with reference to the gene expression pattern in the common marmoset, which is a primate.

Examination of gene expression pattern in common marmoset: We examined the expression pattern in the cochlear epithelium of WFS1, a gene responsible for Wolfram syndrome, which is one of hereditary diseases presenting with deafness, using the common marmoset, a small primate. In addition, we also examined the responsible gene for hereditary deafness whose expression in outer hair cells has been confirmed.

研究分野：聴覚

キーワード：遺伝性難聴 外有毛細胞 コモンマーモセット 選択的分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

蝸牛は有毛細胞、血管条、神経節細胞など種々の細胞種から成り立つ。各細胞の機能異常は難聴の原因になるため難聴の病態生理の解明と治療方法の探索には細胞の種類ごとの検討が必要である。中でも外有毛細胞は聴毛からのカリウムイオンの流入により細胞の脱分極を起こし、電位依存性運動により蝸牛増幅の働きを担っており、外有毛細胞異常による難聴疾患は多数報告されている。

当研究チームは内耳領域でのヒト iPS 細胞研究を進めており、内耳前駆細胞への誘導効率が約 80%と国内外の他機関と比較して非常に高効率な分化誘導系を確立し、さらに有毛細胞、外らせん溝細胞、血管条辺縁細胞、神経節細胞など蝸牛における各細胞種の試験管内での分化誘導も可能となっている(図 1)。しかしながら外有毛細胞へ分化誘導しようとした際、現状では外有毛細胞と支持細胞が混在した状態で分化される状況で、外有毛細胞への選択的かつ高効率な分化誘導法は、まだ確立していない。この状況では、外有毛細胞の電気生理学的解析や外有毛細胞異常に関連する疾患の病態解析を行うにあたり効率性に欠ける。

他施設の報告に目を向けると、ヒト ES/iPS 細胞からの外有毛細胞の選択的分化誘導は世界的にも樹立されていないことがわかる。Stanford 大学の Oshima らが 2010 年にマウス ES/iPS 細胞からの有毛細胞への分化誘導に関する研究を報告しているが、その効率は 0.1%弱にとどまっている。ヒトにおいてはさらに困難を極めており、同研究チームからの世界で唯一の報告においても効率は極めて低く、また成熟した聴毛構造を有する有毛細胞の樹立は得られていない。

外有毛細胞を効率よく得るためには、外有毛細胞と支持細胞が混在した状況から外有毛細胞のみを収集するという方法と、前駆細胞から外有毛細胞へ直接分化誘導する方法の 2 つが考えられるが、外有毛細胞は外界からの機械的刺激に依存して電気活動を行う細胞であり、前者では sorting により外有毛細胞に損傷をきたしてしまう可能性があり実現性に欠ける。本研究ではこれらの技術的な問題を解決し、内耳前駆細胞から外有毛細胞への選択的な誘導法の確立を行う。また、得られた分化誘導系を用いることにより外有毛細胞異常に起因して難聴を発症する疾患の疾患解析を展開する。

高効率な分化誘導法を確立したあとに、難聴疾患の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、疾患解析を目指す。それに先だてて難聴の原因とされる遺伝子の霊長類における蝸牛上皮への発現パターンを確認する必要がある。これまでのトランスレーショナルリサーチでは齧歯類であるマウスを用いることが一般的であったが、難聴の原因とされる遺伝子のノックアウトマウスを作製した際に、難聴が生じない遺伝子があることも報告されている。われわれは、この種差に関する問題の一部を、小型霊長類であるコモンマーモセットにおける遺伝子発現パターンを示すことで解決してきた。これまでの我々の検討では、齧歯類と霊長類で発現パターンが著しく異なり、遺伝子改変マウスでの表現形がヒト疾患における難聴を再現できない理由となっている疾患が多数ある。

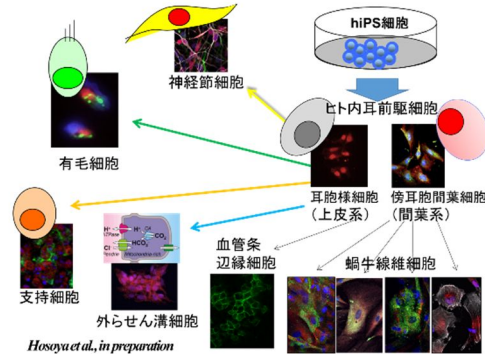
## 2. 研究の目的

外有毛細胞を効率よく得るためには、外有毛細胞と支持細胞が混在した状況から外有毛細胞のみを収集するという方法と、前駆細胞から外有毛細胞へ直接分化誘導する方法の 2 つが考えられるが、外有毛細胞は外界からの機械的刺激に依存して電気活動を行う細胞であり、前者では sorting により外有毛細胞に損傷をきたしてしまう可能性があり実現性に欠ける。本研究ではこれらの技術的な問題を解決し、内耳前駆細胞から外有毛細胞への選択的な誘導法の確立を行う。また、得られた分化誘導系を用いることにより外有毛細胞異常に起因して難聴を発症する疾患の疾患解析を展開する。

高効率な分化誘導法を確立したあとに、難聴疾患の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、疾患解析を目指す。それに先だてて難聴の原因とされる遺伝子の霊長類における蝸牛上皮への発現パターンを確認する必要がある。これまでのトランスレーショナルリサーチでは齧歯類であるマウスを用いることが一般的であったが、難聴の原因とされる遺伝子のノックアウトマウスを作製した際に、難聴が生じない遺伝子があることも報告されている。われわれは、この種差に関する問題の一部を、小型霊長類であるコモンマーモセットにおける遺伝子発現パターンを示すことで解決してきた。これまでの我々の検討では、齧歯類と霊長類で発現パターンが著しく異なり、遺伝子改変マウスでの表現形がヒト疾患における難聴を再現できない理由となっている疾患が多数ある。

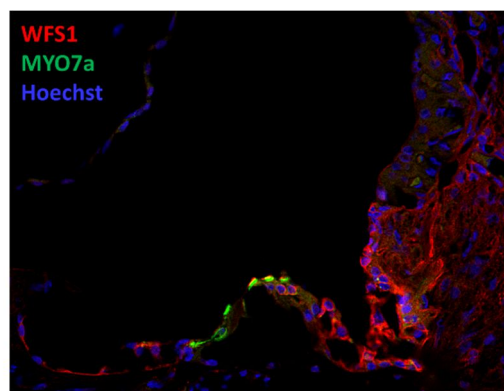
図 1

ヒトES/iPS細胞からの内耳細胞の作成とその医用応用



そこで当研究では、まず日本人で外有毛細胞の異常が難聴の原因とされている疾患において、蝸牛管上皮で外有毛細胞に発現が確認されている難聴遺伝子のコモンマーマセットにおける発現を検討する。たとえばこれまでに外有毛細胞への発現が確認されている遺伝性難聴の原因遺伝子としては WFS1、MYOSIN15A、SLC26A5、DFNA5、KCNQ4 などがある。

図 2



Expression pattern of WFS1 in Common Marmoset inner ear

たとえば我々はこれまでに、難聴や糖尿病を呈する遺伝性疾患である Wolfram 症候群の原因遺伝子である WFS1 のコモンマーマセットの蝸牛上皮における発現パターンを検討している(図 2)。Wolfram 症候群の患者にみられる感音難聴は典型的には進行性の高音障害型感音難聴であるが、変異によっては低音障害型を呈するという報告もある。さらに過去の WFS1 変異による難聴症例の側頭骨病理の報告によると、有毛細胞障害と血管条障害が蝸牛内の別の部位に生じていることが示されている。マウスにおいては蝸牛上皮に広範かつ一様に分布しているものの、血管条には発現がないため、難聴の表現型が複数存在することや血管条障害を説明することは困難であり、事実マウスモデルでは難聴が得られていない。興味深いことにコモンマーマセットでは外有毛細胞、血管条辺縁細胞などへの強い発現を認め、霊長類と齧歯類においては遺伝子発現が異なることを示してきた。

このように、疾患によっては遺伝性難聴疾患においてもマウスのみでは病態解明することは困難な場合がある。こういったケースでは、ヒト難聴の内耳細胞を直接扱える疾患特異的 iPS 細胞研究が有用であることが想定される。以上のような疾患の解析と新規治療法樹立を目標として、当研究ではヒト外有毛細胞への特異的分化誘導法を樹立し、疾患特異的 iPS 細胞を推進したい。

### 3. 研究の方法

#### (1)平成 28 年度

##### 外有毛細胞への選択的な分化誘導の樹立

内耳前駆細胞から各感覚上皮に分化誘導するにあたり、有毛細胞と支持細胞は同一の前駆細胞から分化することが知られている。この運命決定には隣接細胞間での Notch 情報伝達系が重要で、当研究チームでは、Notch 阻害薬により有毛細胞の *in vivo* での誘導に成功している (Mizutani et al, 2013)。しかしながら hES/iPS 細胞由来前駆細胞では、この方法では有毛細胞ないし支持細胞の作り分けはできなかった。そこで本研究では様々な条件検討を行うことで選択的な外有毛細胞への分化誘導法を確立する。国内外でヒト ES/iPS 細胞からの分化誘導に難渋していることを踏まえ、霊長類であるマーマセットのコルチ器における遺伝子発現パターンを念頭に条件検討を進める。

##### コモンマーマセットの蝸牛上皮における遺伝子発現パターンの検討

我々の経験で、マウスとコモンマーマセットでは、内耳における遺伝子発現パターンが大きく異なることに複数遭遇しているため、本研究では霊長類であるコモンマーマセットを用いて難聴遺伝子の発現パターンを詳細に検討する。

霊長類である若年成体のコモンマーマセットから側頭骨を剖出したのち、脱灰固定し、内耳蝸牛の凍結切片を作成する。作成した切片を用いて免疫染色を行い、遺伝子の蝸牛上皮への発現を検討する。コモンマーマセット側頭骨は本来入手困難であるが、当研究室ですでに実験動物中央研究所と検体提供について供与契約を締結しており、定期的に検体を入手している。

我々はすでに、難聴や糖尿病を呈する遺伝性疾患である Wolfram 症候群の原因遺伝子である WFS1 のコモンマーマセットの蝸牛上皮における発現パターンの検討をすすめているが、同様の方法を用いて他遺伝子についても検討を行う。本研究では、外有毛細胞への発現が確認されている遺伝性難聴の原因遺伝子である MYOSIN15A、SLC26A5、DFNA5、KCNQ4 を検討対象とする。

#### (2)平成 28 ~ 29 年度

##### 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

我々は公開されたマイクロアレイのデータ (SHIELDS など) を用いて *in silico* の網羅的な解析を行い、下図にあるような遺伝子が外有毛細胞で特に選択的に発現することを確認している。さらに前年度のコモンマーマセットを用いた検討で得られた霊長類における難聴遺伝子の発現パターンの確認により、ヒト内耳外有毛細胞での遺伝子発現の類推が可能になる。以上を総合し、外有毛細胞での機能が重要と思われる難聴遺伝子を絞り込み、遺伝性難聴症例から iPS 細胞を樹立し、疾患外有毛細胞を作成して病態解析を行う。これにより新規治療標的候補を同定する。

コモンマーマセットの外有毛細胞に発現が確認された遺伝子を原因とする難聴疾患の患者よ

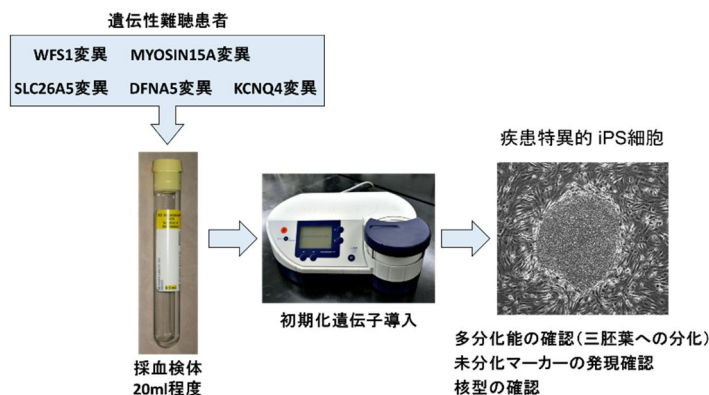
り採血を行い、初期化遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, p53shRNA) をエピソード・プラスミドで導入する。得られた細胞から未分化な細胞を選択し、コロニー化する(図3)。

iPS細胞はライン間の差異があることが知られている。細胞樹立後は、継代可能で未分化性が十分維持され、かつ内耳細胞様細胞への効率よく誘導しうるラインを選別する。

当研究グループではこれまでに、次世代スクリーニングによりMYOSIN15Aの新規変異が指摘された難聴患者由来の血液から、上記の手法を用いて効率よく疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、内耳細胞に誘導可能な細胞ラインの選別に成功している。

また、当研究グループには疾患特異的 iPS 細胞を樹立する専任のスタッフがあり、すでに疾患特異的 iPS 細胞の量産体制に入っている。

図 3



### (3)平成29年度

疾患 iPS 細胞由来外有毛細胞の機能解析 (鈴木、藤岡)

で得られた分化誘導法を得た iPS 細胞に用い、外有毛細胞を可及的大量に調整して in vitro で解析を加える。解析内容は疾患の原因遺伝子ごとに注意深く選択するが、特に細胞死抑制と、機能解析におけるレスキュー実験を重要視する。

## 4. 研究成果

(1)外有毛細胞への選択的な分化誘導の樹立：内耳前駆細胞から各感覚上皮に分化誘導するにあたり、有毛細胞と支持細胞は同一の前駆細胞から分化することが知られている。本研究では試薬の種類や濃度などの条件検討を行うことで、外有毛細胞への選択的な分化誘導方法を確立する。国内外でヒト ES/iPS 細胞からの分化誘導に難渋していることを踏まえ、霊長類であるコモンマーモセットの角膜上皮における遺伝子発現パターンを念頭に試薬の種類、濃度、暴露する時間などの条件検討を進めた。

(2)コモンマーモセットの蝸牛上皮における遺伝子発現パターンの検討：これまでの経験で、マウスとコモンマーモセットでは、内耳における遺伝子発現パターンが大きく異なることに複数遭遇しているため、本研究では霊長類であるコモンマーモセットを用いて難聴遺伝子の発現パターンを詳細に検討した。若年成体のコモンマーモセットから側頭骨を剖出したのち、脱灰固定し、内耳蝸牛の凍結切片を作成した。作成した切片を用いて免疫染色を行い、遺伝子の蝸牛上皮への発現を検討した。コモンマーモセット側頭骨は本来入手困難であるが、当研究室ですでに実験動物中央研究所と検体提供について供与契約を締結しており、定期的に検体を入手している。本研究では、難聴を呈する遺伝性疾患の一つである Wolfram 症候群の原因遺伝子である WFS1 のコモンマーモセットの蝸牛上皮における発現パターンの検討を行った。さらに、外有毛細胞への発現が確認されている遺伝性難聴の原因遺伝子である MYOSIN15A、SLC26A5、DFNA5、KCNQ4 も追加検討対象とした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：藤岡 正人  
ローマ字氏名：FUJIOKA, Masato  
研究協力者氏名：細谷 誠  
ローマ字氏名：HOSOYA, Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。