

Title	疾患iPS技術を用いた有毛細胞シリア障害 (cilliopathy) の病態解析研究
Sub Title	Modeling inner ear cilliopathy using patient derived iPS cells
Author	藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 北尻, 真一郎(Kitajiri, Shin'ichirō) 宇佐美, 真一(Usami, Shin'ichi) 西尾, 信哉(Nishio Shin'ya) 松永, 達雄(Matsunaga, Tatsuo)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>研究では蝸牛の本質的機能である音刺激から神経活動への変換を担当する有毛細胞の聴毛の障害に焦点を絞り、iPS細胞技術を用いて、既知変異・新規変異での病態解析研究の展開を試みた。このような遺伝性難聴3症例からiPS細胞の樹立に成功するとともに、昨年度に分化誘導プロトコルの改善と電気生理学的手法の確立を行った。その結果、より成熟した内外有毛細胞の大量分化誘導プロトコルの樹立に加え、内耳幹細胞をさらに効率よく正確に再現する分化誘導プロトコルの作成をし、知的財産権を出願した。</p> <p>In the research, we focused on the hearing impairment of hair cells, which are responsible for the conversion of sound stimulation to nerve impulses, which is an essential function of the cochlea. We succeeded in establishing iPS cells from these 3 cases of hereditary deafness, and improved the differentiation induction protocol and established the electrophysiological method. These newly established reliable and robust protocol was being applied for the patent.</p>
Notes	研究種目：挑戦的研究 (萌芽) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K19733 研究分野：耳鼻咽喉科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K19733seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K19733seika</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 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19733

研究課題名（和文）疾患iPS技術を用いた有毛細胞シリア障害(cilliopathy)の病態解析研究

研究課題名（英文）Modeling inner ear cilliopathy using patient derived iPS cells

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究では蝸牛の本質的機能である音刺激から神経活動への変換を担当する有毛細胞の聴毛の障害に焦点を絞り、iPS細胞技術を用いて、既知変異・新規変異での病態解析研究の展開を試みた。このような遺伝性難聴3症例からiPS細胞の樹立に成功するとともに、昨年度に分化誘導プロトコルの改善と電気生理学的手法の確立を行った。その結果、より成熟した内外有毛細胞の大量分化誘導プロトコルの樹立に加え、内耳幹細胞をさらに効率よく正確に再現する分化誘導プロトコルの作成をし、知的財産権を出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老人性難聴や突発性難聴、メニエール病など、感音難聴の多くは蝸牛障害による内耳性難聴で、本邦の身体障害者認定の約10%が難聴に関連している。本研究が開始された頃、次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子検査が保険収載され、過去に報告のない遺伝子変異（バリエーション）が多数報告されるようになっていた。そのため、検査としての遺伝子解析は急速にハイスループット化しているにもかかわらず、得られた遺伝子変異の解釈を行う生物学的解析の進歩が追いついていない状態だった。本研究成果はこの問題を解決するソリューションとなり得るものであり、内耳性難聴の病態の把握や理解とともに、診断技術の向上に役立つ意義がある。

研究成果の概要（英文）：In the research, we focused on the hearing impairment of hair cells, which are responsible for the conversion of sound stimulation to nerve impulses, which is an essential function of the cochlea. We succeeded in establishing iPS cells from these 3 cases of hereditary deafness, and improved the differentiation induction protocol and established the electrophysiological method. These newly established reliable and robust protocol was being applied for the patent.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：iPS細胞 遺伝性難聴 疾患iPS研究 創薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

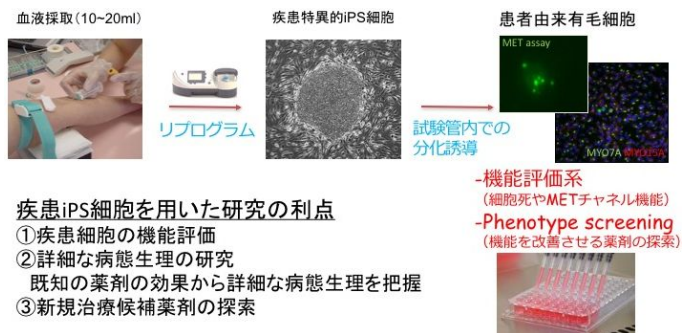
### 1. 研究開始当初の背景

老人性難聴や突発性難聴、メニエール病など、感音難聴の多くは蝸牛障害による内耳性難聴で、本邦の身体障害者認定の約10%が難聴に関連している。本邦の高度難聴（聾啞）者は30万人、補聴器を要する中等度難聴を含めると罹病者数は600万人とされ、世界的には65才以上の人口の30~40%が難聴によるハンディキャップを有しているとの報告もある（WHO Global burden report）。先天性難聴は最も頻度の高い先天性疾患で、出生500~1000対1の頻度で難聴者が生まれる。どの感音難聴の方であれ、「見た目は正常」だけど「会話ができない」ハンディキャップを持ちながら社会生活を送ることは常に困難を伴い、就労困難、貧困、ひきこもりにつながる。このように感音難聴はCommon Diseaseでありながら未解決で社会的にもその対策は重要だが、そのほとんどは依然として原因不明であり、病態については長い間諸説が議論されてきている。

その中で遺伝性難聴については難聴家系毎に研究するアプローチ（連鎖解析）で研究が進み、研究開始当初の時点では80強の原因遺伝子が同定されていた。一方で、本研究が開始する前の2015年から本邦では次世代シーケンサー（NGS）を用いた難聴遺伝子検査が保険収載され、過去に報告のない遺伝子変異（バリエーション）が多数報告されるようになった。NGS登場前は、同じ変異に関する過去の報告を参考に診断し、未知の変異に対してはヒト型変異動物モデルを作成して難聴の再現を行うことで研究されてきたが、NGS解析は検査としての感度が高く膨大な希少変異が発見されるため、全てのバリエーションにおいてこのようなアプローチを取ることは現実問題不可能であった。また、希少変異の場合、単一の変異以外の「体質」に相当する要素（遺伝学的背景）の影響が一層大きくなり、ヒトとは種差のある齧歯類モデルで再現されない可能性が高くなる。さらに病態の首座である内耳は解剖学的制約から生検そのものが難聴を増悪させるため、実際に病気が進行している細胞を観察することは事実上不可能である。このように、本研究が開始された2017年初頭の本研究領域においては、検査としての遺伝子解析は急速にハイスループット化しているにもかかわらず、その結果の解釈を行う生物学的解析(wet biology)の進歩が追いついていない状態だった。

他方、ヒトiPS細胞の技術（初期化=リプログラミング）により、人類は皮膚や血液などの既に分化した細胞から多能性幹細胞を経て、原理的にほぼすべての体細胞を試験管内に作成することが可能となった。我々の研究グループではヒトES/iPS細胞から蝸牛前駆細胞を高効率かつ再現性を持って再現するシステムを確立し、細胞の構造や遺伝子発現パターン、さらには機能を有する蝸牛有毛細胞の分化誘導に成功してきていた（特願2014-100017）。ヒトiPS細胞技術を用いた内耳細胞の作製とその疾患病態

のin vitroでの再現技術は「見られない細胞を見る」という点で画期的で、停滞していた進行性難聴研究に大きなブレイクスルーをもたらす可能性を秘めた技術であり、またヒト疾患型遺伝子改変マウスモデルを作成するよりは時間がかからず、解析面でもNGSにより得られる新規変異のシームレスな理解に役立つ可能性が考えられた。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、両側感音難聴患者からNGS解析で数多く同定される新規変異を、疾患iPS研究を用い細胞生物学的に検討する新規評価系の樹立にある。従来、in vivoではヒト変異導入齧歯類の作成、in vitroでは細胞株への変異遺伝子強制導入で評価していたが、前者は時間がかかる上にヒトとは種差がある点、後者は簡便だが実際の疾患細胞とはかけ離れたモデルで評価している点が問題であった。そこで本研究では疾患iPS細胞研究のアプローチにより、種差とコスト（時間・費用）の問題を解決し、しかも実際の患者疾患細胞を解析する新技術の確立を目指した。この手法の樹立により、難聴遺伝子診断の領域に新たなブレイクスルーをもたらす、新規病態の解明や原因遺伝子の新規機能の発見、ひいては両側進行性難聴などの症例における将来の治療標的の同定を目指した。

蝸牛の本質的な機能は音刺激から神経活動への情報変換と言える。本研究では蝸牛の本質的な機能である音刺激から神経活動への変換を担当する有毛細胞の聴毛の障害に焦点を絞り、既知変異・新規変異での病態解析研究を展開することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 聴毛を構成する遺伝子に変異を有する遺伝性難聴症例からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立

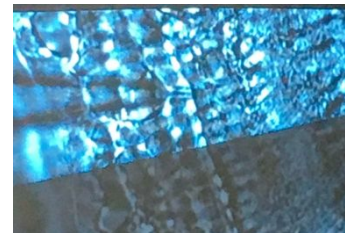
本邦の遺伝性難聴症例情報が集まる、信州大および NHO 東京医療センターのデータベースから該当する症例を選出し、同意取得の下、患者末梢血からヒト iPS 細胞を樹立した。(慶應義塾大学医学部倫理委員会承認番号 20140172, UMIN000018051)

#### (2) 不動毛の微細構造を再現する、成熟した内外有毛細胞の大量分化誘導プロトコルの樹立

私たちの既報(細谷法:特願 2014-100017)は、有毛細胞も得られるが、Pendred 症候群の解析を主目的にしており、効率面では蝸牛外側壁やコルチ器外側の支持細胞の分化誘導に最適化されている手法だった。そこで今回の研究では、まず有毛細胞の誘導に最適化したプロトコルの樹立を行った。具体的には、内耳幹細胞をさらに効率よく正確に再現する分化誘導プロトコルと、不動毛の微細構造を再現する、成熟した内外有毛細胞の大量分化誘導プロトコルを確立し、知的財産権取得の準備を行った。

#### (3) 有毛細胞不動毛機能評価を含めた電気生理学的検査の確立

研究協力者である慶應義塾大学生理学教室のサポートを得て、有毛細胞の電気生理学的解析方法を確立した。まずは生後 5 日以内のマウスコルチ器器官培養系で測定法を確立し、ヒト iPS 細胞由来蝸牛有毛細胞へ応用可能な形とした。



### 4. 研究成果

#### (1) 聴毛を構成する遺伝子に変異を有する遺伝性難聴症例からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立

以下の 2 疾患から疾患特異的 iPS 細胞を樹立することに成功した

MY015A 本遺伝子は不動毛の伸張に寄与するモータータンパクと考えられており、遺伝子欠損動物では短小な不動毛が観察されると同時に高度難聴を来す。N 末にフレームシフト変異のある大欠失症例と、C 末付近の FERM ドメインに新規変異を有する進行性難聴症例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、有毛細胞を誘導した。

CDH23 不動毛間を結ぶ tip-link の構成タンパクとして知られる。この CDH23 に病的変異を持つ症例からも、1 症例で疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

#### (2) 不動毛の微細構造を再現する、成熟した内外有毛細胞の大量分化誘導プロトコルの樹立

ヒト iPS 細胞から内耳幹細胞をさらに効率よく正確に再現する分化誘導プロトコル  
以前より用いていた細谷らのプロトコルを改善し、蝸牛感覚上皮マーカーがより精緻に発現するプロトコルを樹立した。

不動毛の微細構造を再現する、成熟した内外有毛細胞の大量分化誘導プロトコル  
既存の我々のプロトコルの分化誘導の各段階と、小型霊長類コモンマーモセット蝸牛とにおいて、蝸牛感覚上皮発生段階で内有毛細胞、外有毛細胞領域に発現し、かつ分化誘導に関与しうるようなシグナル分子の発現を多数検討した。この結果に基づき、外有毛細胞を選択的に得るプロトコルを得ることに成功した。

知的財産権取得へ向けた、国内特許出願

上述 について、国内特許出願の準備を行った。本研究報告書が公開される際には、出願が完了している予定である。この有毛細胞分化誘導系はその効率・再現性ともに世界最高峰であり、新規性・進歩性ともに極めて高い技術である。

#### (3) 有毛細胞不動毛機能評価を含めた電気生理学的検査の確立

有毛細胞の電気生理学的解析方法を確立した。まずは生後 5 日以内のマウスコルチ器器官培養系で測定法を確立し、ヒト iPS 細胞由来蝸牛有毛細胞へ応用可能な形とした。

上述(2)の完了に予想以上に時間を費やしたが、現在選択的かつ多量の有毛細胞誘導が可能となっており、今後、患者由来ヒト iPS 細胞から分化誘導して得た疾患有毛細胞における電気生理学

的検討を行っていく予定である。これにより、上述の難聴遺伝子が来す遺伝性難聴の病態生理の詳細を wet-biology で把握し新規治療法を見出すのみならず、これらの構造タンパク異常がもたらす疾患の細胞レベルでの病態を記述することを通して、有毛細胞の音圧依存的活動電位生成 (Mechanoelectrical transduction: MET)に関する未知の生命現象を導き出すことも期待される。

研究種目名 挑戦的研究(萌芽)

研究課題名 疾患 iPS 技術を用いた有毛細胞シリア障害(cilliopathy)の病態解析研究

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hosoya M, Saeki T, Saegusa C, Matsunaga T, Okano H, Fujioka M, Ogawa K.	4. 巻 17;10
2. 論文標題 Estimating the concentration of therapeutic range using disease-specific iPSCs: Low-dose rapamycin therapy for Pendred syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.11.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 佐伯翼, 藤岡正人, 岡野栄之	4. 巻 50巻6号
2. 論文標題 【脳タンパク質老化と認知症制御】 iPSC及びマー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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 315-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto N, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S, Nishi Y, Nakano A, Masuda S, Fujioka M, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T.	4. 巻 25;12(1)
2. 論文標題 Prevalence of TECTA mutation in patients with mid-frequency sensorineural hearing loss.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Orphanet J Rare Dis	6. 最初と最後の頁 157-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-017-0708-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 5件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S, Akamatsu W, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H.
2. 発表標題 Cochlear cell modeling using iPSCs unveils a degenerative phenotype and suggests traetments for hereditary hearing loss
3. 学会等名 European Academy of Otology and Neurotology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Fujioka, Tomohiko Yoshida, Makoto Hosoya, Kaoru Ogawa, Hiromi Kojima
2. 発表標題 Highly Efficient, Well-reproducible Cochlear Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Cells: A Candidate Method of the Drug Development for Spiral Ganglion Neuron
3. 学会等名 European Academy of Otolology and Neurotology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いた難聴の創薬研究 動物モデル不在の病気へのチャレンジ
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Fujioka・Tsubasa Saeki・Kaoru Ogawa
2. 発表標題 Low-dose rapamycin therapy proposed by an in vitro chronic disorder model of Pendred Syndrome using disease specific iPS cells
3. 学会等名 55th Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Fujioka
2. 発表標題 Bridging rodent experiments to human clinical trials in gene therapy: non-human primate models and a novel DDS for rAAV mediated- gene transfe
3. 学会等名 International Symposium for Gene Tehrapy and Inherited Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 幹細胞生物学を応用した内耳性難聴治療法の開発研究
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷誠、藤岡正人、小川郁
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の内耳病態研究への応用と未来への展望～その長所・短所と位置付け～
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hosoya M, Fujioka M, Matsunaga T, Ogawa K
2. 発表標題 In vitro modeling of hereditary hearing loss with human iPSC technology: Cellular pathology and drug discovery
3. 学会等名 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO Experience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正人、細谷誠、佐伯翼、三枝智香、廣井有香、岡野栄之、小川郁
2. 発表標題 遺伝性難聴Pendred症候群/DFNB4に対する疾患iPS創薬研究
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学大会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 幹細胞生物学を応用した内耳性難聴の研究
3. 学会等名 ディレグラWebセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷 誠, 藤岡正人, 小川 郁
2. 発表標題 小型霊長類コモンマーモセット内耳発生の解析: 霊長類有毛細胞への再生医学的アプローチの基礎的知見として
3. 学会等名 第63回日本聴覚医学会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 iPS創薬の実際: 感音難聴の治療法開発
3. 学会等名 第17回ENT病診連携カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 幹細胞医学を応用した内耳再生医療創薬
3. 学会等名 神戸再生医療勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯翼、細谷誠、芝田晋介、小川郁、藤岡正人、岡野栄之
2. 発表標題 疾患 iPS 細胞でのプロテオミクスが明らかにした Pendred 症候群の新規病態メカニズム
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 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～
3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Hosoya, Masato Fujioka, Tatsuo Matsunaga, Kaoru Ogawa,
2. 発表標題 Cochlear cell modeling using disease-specific iPSCs unveiled a degenerative phenotype and treatments of a congenital progressive hearing loss
3. 学会等名 ENT World Congress IFOS Paris 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 『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～』
3. 学会等名 第16回バイオ・ライフサイエンス研究展BI0tech
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤岡正人
2. 発表標題 内耳性難聴に対するiPS細胞を用いた創薬研究
3. 学会等名 第38回大阪耳疾患セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Fujioka
2. 発表標題 Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss
3. 学会等名 8 th World Gene Convention-2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第27回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松崎佐栄子・藤岡正人・細谷誠・佐伯翼・阿部聡子・松永達雄・宇佐美真一・小川郁
2. 発表標題 EYA4遺伝子変異特異的疾患iPS細胞の樹立
3. 学会等名 第27回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Fujioka
2. 発表標題 Predicting clinical effects of therapeutics by iPS-based in vitro model of genetic deafness: another promising approach of precision medicine
3. 学会等名 国際検討会 Presicion Medicine For Deafness (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Fujioka
2. 発表標題 Therapeutics in genetic deafness by iPS-based in vitro model
3. 学会等名 臺大醫院演講 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 内耳前駆細胞の製造方法、内耳有毛細胞の製造方法、薬剤の評価方法、及び内耳細胞分化誘導用組成物	発明者 藤岡正人、佐伯翼、 細谷誠、岡野栄之	権利者 学校法人慶應義塾、株式会社オトリンク
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-100055	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 内耳有毛細胞の製造方法、薬剤の評価方法、及び細胞分化誘導用組成物	発明者 藤岡正人、佐伯翼、 細谷誠、岡野栄之	権利者 学校法人慶應義塾、株式会社オトリンク
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-100056	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室研究紹介 <a href="http://www.ent.med.keio.ac.jp">www.ent.med.keio.ac.jp</a>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 郁  (OGAWA Kaoru)  (00169179)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授    (32612)	
研究分担者	北尻 真一郎  (KITAJIRI Shinnichiro)  (00532970)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師    (13601)	
研究分担者	宇佐美 真一  (USAMI Shin-ichi)  (10184996)	信州大学・学術研究院医学系・教授    (13601)	
研究分担者	西尾 信哉  (NISHIO Shinnya)  (70467166)	信州大学・医学部・特任講師    (13601)	
研究分担者	松永 達雄  (MATSUNAGA Tatsuo)  (90245580)	独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・部長    (82643)	