

Title	ヒトiPS細胞を用いた遺伝性進行性難聴DFNA5の病態解析と創薬スクリーニング
Sub Title	Pathological analysis and drug screening of hereditary progressive deafness DFNA5 using human iPS cells
Author	細谷, 誠(Hosoya, Makoto)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>健聴者由来iPS細胞に対してDFNA5遺伝子変異をCRISPR/Cas9システムを用いて導入し、DFNA5変異ヒトiPS細胞を作成した。DFNA5は難聴遺伝子として知られており、本遺伝子によって生じる難聴のメカニズムの解明を目指して、本iPS細胞より内耳細胞を誘導し正常iPS由来内耳細胞と比較検討を試みた。誘導されたDFNA5を発現する内耳細胞において、異常DFNA5がどのように疾患を生じさせるかを検討し、その分子生物学的特徴を明らかにした。</p> <p>A mutation of DFNA5 gene was introduced into normal human iPS cells using the CRISPR / Cas9 system to obtain DFNA5 mutant human iPS cells. DFNA5 is known as a deafness gene, and in order to elucidate the mechanism of deafness caused by this gene, we induced inner ear cells from this iPS cell and attempted a comparative study with normal iPS-derived inner ear cells. We investigated how abnormal DFNA5 causes disease in inner ear cells that express mutated DFNA5 protein, and clarified its molecular biological characteristics.</p>
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2020 課題番号：18K16856 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_18K16856seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K16856seika</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 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16856

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を用いた遺伝性進行性難聴DFNA5の病態解析と創薬スクリーニング

研究課題名（英文）Pathological analysis and drug screening of hereditary progressive deafness DFNA5 using human iPS cells

研究代表者

細谷 誠（HOSOYA, Makoto）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30645445

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：健聴者由来iPS細胞に対してDFNA5遺伝子変異をCRISPR/Cas9システムを用いて導入し、DFNA5変異ヒトiPS細胞を作成した。DFNA5は難聴遺伝子として知られており、本遺伝子によって生じる難聴のメカニズムの解明を目指して、本iPS細胞より内耳細胞を誘導し正常iPS由来内耳細胞と比較検討を試みた。誘導されたDFNA5を発現する内耳細胞において、異常DFNA5がどのように疾患を生じさせるかを検討し、その分子生物学的特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性難聴の原因となる難聴遺伝子の一つであるDFNA5遺伝子に注目して研究を展開した。これまでいくつかの難聴遺伝子においてヒトiPS細胞を用いた研究が有用であることが示されているが、DFNA5遺伝子変異においてもヒトiPS細胞を用いた研究が有用であることが示された。今後、同様の手法によってさまざまな検討が進むことにより難聴遺伝子の分子生物学的な機序の解明と治療薬の開発などにつながる可能性があり、学術的意義や社会的意義が高い研究手法と考えられる。

研究成果の概要（英文）：A mutation of DFNA5 gene was introduced into normal human iPS cells using the CRISPR / Cas9 system to obtain DFNA5 mutant human iPS cells. DFNA5 is known as a deafness gene, and in order to elucidate the mechanism of deafness caused by this gene, we induced inner ear cells from this iPS cell and attempted a comparative study with normal iPS-derived inner ear cells. We investigated how abnormal DFNA5 causes disease in inner ear cells that express mutated DFNA5 protein, and clarified its molecular biological characteristics.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝性難聴

## 1. 研究開始当初の背景

DFNA5 は、同名の *DFNA5* 遺伝子の変異によって生じる常染色体優性遺伝性の非症候性進行性難聴である。本疾患は言語獲得後に生じて進行する難聴であるため、薬剤治療による介入の可能性がある疾患であるが、その詳細な疾患メカニズムは明らかになっておらず、治療薬は存在しない。本研究においては、*DFNA5* を対象にヒト iPS 細胞を用いた研究を展開し、同疾患の治療候補薬を同定する。CRISPR/Cas9 システムを用い、正常 iPS 細胞にゲノム編集をすることで *DFNA5* 変異 iPS 細胞を樹立し、正常細胞および変異細胞から内耳 *DFNA5* 陽性細胞を誘導して、両者の細胞生物学的特徴を比較検討する。得られた表現形から本疾患における進行性難聴の原因となりうる病態生理を解析し、治療標的の同定とともに新規治療法の探索を行う。

## 2. 研究の目的

遺伝性難聴のうち言語獲得後の進行性難聴 (post-lingual, progressive hearing loss) は、その進行予防により患者 QOL が維持されることが考えられ、難聴原因が奇形や内耳の構造的な障害による遺伝性難聴と異なり、すくなくともその一部は、将来的な薬剤治療による介入が期待できる疾患である。

*DFNA5* は、*DFNA5* 遺伝子変異によって生じる常染色体優性遺伝形式の言語獲得後 10 歳代～20 歳代からの進行性難聴を特徴とする疾患である。また、本遺伝子の SNP は、加齢性難聴および騒音性難聴のリスクファクターとしても知られている。

これまでに 1. ノックアウトマウスで難聴が生じないこと (Lut Van Laer et al. 2005)、2. 細胞株において異常 *DFNA5* の強制発現が細胞死を誘導すること (Lut Van Laer et al. 2004)、3. ヒト病理組織学的検討では蝸牛神経節および蝸牛感覚上皮の細胞数減少を生じること (Joseph B. Nadol Jr et al. 2015) から、遺伝子変異により生じる異常 *DFNA5* タンパクが細胞障害をもたらす何らかの機能を獲得すること (Gain of Function) で難聴を来すものと考えられてきた。一方で、ヒト蝸牛においては遺伝子発現部位に関する解析の報告はなく、現在のところ、難聴発症のメカニズムは全く未知である。

研究代表者らは、小型霊長類モデルであるコモンマーモセットを用いて、*DFNA5* の霊長類蝸牛における詳細な発現パターンを報告した (Hosoya et al. Scientific Reports 2016)。マウス蝸牛での *DFNA5* の発現は血管条に局限するのに対し、コモンマーモセット蝸牛で、本遺伝子は有毛細胞、支持細胞を含む蝸牛感覚上皮に幅広く発現していることを明らかにした。

本疾患における病態生理研究は、非内耳細胞株に対する *in vitro* 強制発現系の報告があり、変異 *DFNA5* 蛋白が細胞障害能を持つことが分かっている。一般に、細胞障害能を持つ異常蛋白の恒常的な発現は、早期の内耳細胞死およびそれによる先天性高度難聴を予想させるが、臨床的には、本疾患は、10 歳代以降に生じる緩徐進行性の難聴を来す。この差は、本疾患における進行性難聴が、異常蛋白の恒常的な発現によるのではなく、細胞に対する何らかの刺激により誘導され、閾値以上の異常蛋白の発現による緩徐な細胞死が断続的に引き起こされるために生じることを想起させる。しかし、強制発現系を用いた研究では、その実験原理的に、遺伝子発現の上流に存在するシグナルおよびトリガーとなる要素を解明することは不可能であり、病態生理研究およびそれに引き続く創薬研究のためには、内在的に *DFNA5* の発現を認める細胞 (すなわち、刺激応答性に *DFNA5* の発現をより *in vivo* に近い状態で誘導できる細胞) を用いた解析系が期待されていた。これに対して、研究代表者らは、ヒト iPS 細胞から内耳 *DFNA5* 陽性細胞の誘導に成功しており、同時に正常細胞において、細胞ストレス負荷時に *DFNA5* の発現量が増加することを報告している。このデータをもとに、今回、研究代表者は、本疾患においては、「内耳細胞への細胞ストレスに対する応答として *DFNA5* の発現上昇が起こり、その結果、患者の内耳細胞においては、細胞毒性を示す異常 *DFNA5* が多く発現し、細胞死が誘発され、難聴が進行するのではないかと推論した。本研究においては、この仮説を検証するとともに、これまでの研究代表者らの iPS 細胞創薬の経験を活かし、*DFNA5* による進行性難聴に対する進行抑制効果を示す候補薬を同定することを試みた。

### 3. 研究の方法

本研究においては、DFNA5 変異 iPS 細胞由来内耳細胞を用いて、薬剤スクリーニングを行い細胞死抑制効果を指標に本疾患治療候補薬を見出すことを目的とした。

具体的な方法として、(1)Crispr/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術による DFNA5 変異 iPS 細胞の樹立 (2)同変異 iPS 細胞からの DFNA5 陽性細胞の誘導 (3)細胞ストレスによる DFNA5 の発現量の増加とそれに伴う異常 DFNA5 の細胞毒性の確認 (4) 薬剤スクリーニングを検討した。

(1)Crispr/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術による DFNA5 変異 iPS 細胞の樹立  
研究代表者らは、Pendred 症候群疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、TALEN システムを用いたゲノム編集技術によってその原因遺伝子 SLC26A4 異常の正常化を成功させている (Hosoya et al, Cell Reports, 2017)。今回は、TALEN よりも効率がよいとされる、Crispr/Cas9 システムを用いて、正常 iPS 細胞に DFNA5 変異の導入を行った。

#### (2)DFNA5 変異 iPS 細胞からの DFNA5 陽性細胞の誘導

正常細胞からの内耳 DFNA5 陽性細胞の誘導法を確立している。(Hosoya et al, Cell Reports, 2017) 本手法を用いて、正常 iPS 細胞から DFNA5 陽性細胞を高効率で誘導することが可能であり、本研究においては、この方法を用いて(1)で樹立した変異 iPS 細胞から同様の方法で DFNA5 発現細胞の誘導をおこなった。

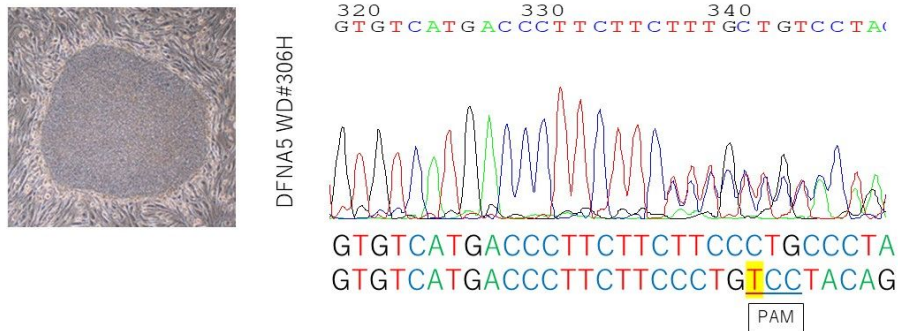
#### (3)細胞ストレスによる DFNA5 の発現量の増加とそれに伴う異常 DFNA5 の細胞毒性の確認

前述のように、本疾患における病態生理研究は、非内耳細胞株に対する invitro 強制発現系の報告しかなく、本遺伝子発現の上流に存在するシグナルおよびトリガーとなる要素が不明であり、病態生理研究および創薬研究の障壁となっていた。本研究においては、(1)(2)の順で、変異 DFNA5 発現内耳細胞を作成することにより、強制発現によらない細胞内における DFNA5 の発現量のコントロールを確認することが可能となる。予備実験による正常細胞由来内耳 DFNA5 陽性細胞においては、qPCR レベルでの確認による範囲であるが、DFNA5 の発現量は特定の細胞ストレスにより上昇することを確認しており本刺激により変異 DFNA5 の誘導が可能であるか検討をおこなった。DFNA5 の変異が、既報のような Gain of Function 型の細胞毒性の獲得をもたらせば、この細胞ストレスによる暴露は、細胞内での細胞毒性を伴う DFNA5 の発現上昇をもたらすより正常細胞には見られない細胞死を誘導するはずである。本研究において、正常細胞および DFNA5 変異細胞に細胞ストレスを負荷し、細胞ストレスに対する脆弱性を検証した。

### 4. 研究成果

2018 年度に、研究計画に基づいて正常 iPS 細胞に CRISPR/Cas9 を用いて DFNA5 疾患特異的 iPS 細胞を樹立した (図 1)。これら疾患 iPS 細胞から DFNA5 陽性細胞が誘導可能であるかを検討し、実際に誘導が可能であることを確認している。また、正常細胞における DFNA5 の発現の変化を RNA レベルおよびタンパクレベルで解析し、細胞ストレスに対する応答によりこれらの発現量および分子量が変化するかを検討し、ストレス負荷時に発現量が変化すると同時に、合成された DFNA5 タンパクの切断により分子量の変化を生じることを確認していた。2019 年度は、本現象が疾患ラインで生じるか、また、正常細胞由来内耳細胞と比較して特異的な反応を来すかどうかを検討した。さらに、生じるとしたらその変化が仮説通りに細胞死を誘導するかどうかを検討した。我々の検討では、疾患 iPS 細胞由来内耳細胞においても正常細胞と同様に特定の細胞ストレスに反応し、DFNA5 遺伝子の発現量の増加が生じることが分かった (図 2)。また、正常細胞と同様に合成された DFNA5 タンパクの切断により分子量の異なる産物が生じることが分かった。2020 年度は、患特異的 iPS 細胞由来内耳細胞から誘導される異常 DFNA5 の分子生物学的な特徴の更なる解析を行った。具体的には、上述のとおりストレス反応に応じて、切断されて生じたと考えられる低分子量の DFNA5 タンパクが生じるが、本タンパクが正常 iPS 細胞由来内耳細胞と変異 iPS 細胞由来内耳細胞の間で、分子生物学的挙動が異なるかを検討した。その結果、従来の説と異なり正常細胞と疾患細胞で明らかな低分子量 DFNA5 の発現量の差を認めなかった。しかしながら、分化に伴い低分子量タンパクの発現量は変化することが確認できた。既報で報告されていたような変異 DFNA5 の発現亢進に伴う細胞死の亢進を確認することはできなかった。

# CRISPR/Cas9を用いたDFNA5疾患特異的iPS細胞の作製



片方のアリルにおいて、目的の変異を導入した DFNA5疾患特異的iPS細胞が作製された

図 1: 遺伝子編集技術により DFNA5 変異ヒト iPS 細胞の樹立を行った。

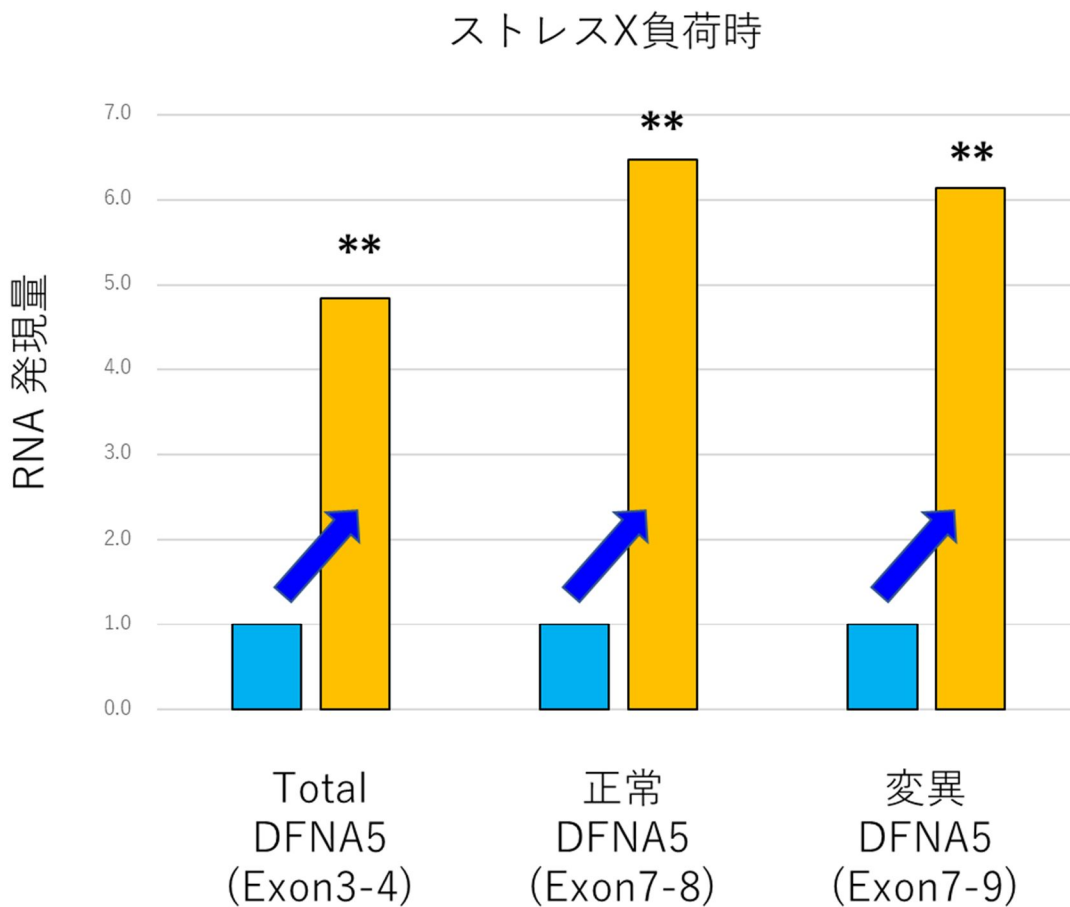


図 2: 細胞ストレス負荷をかけることにより正常 DFNA5、変異 DFNA5 とともにその発現量の上昇を認めた。

本検討の結果ではヒト iPS 細胞を用いた研究によって既報の in vitro の研究で得られていた変異 DFNA5 による細胞障害性を再現することはできなかった。この結果が、ヒト iPS 細胞由来内耳細胞を用いたことによる現象であるのか、それとも検討自体が不十分であるのかなどを今後の検討で解析を試みる必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 細谷 誠、藤岡 正人	4. 巻 122
2. 論文標題 ヒトiPS細胞を用いた内耳疾患研究および治療法開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 1508-1515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3950/jibi.inkoka.122.1508	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 細谷 誠	4. 巻 29
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 131-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11289/otoljpn.29.131	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 細谷 誠	4. 巻 28
2. 論文標題 ヒトiPS細胞を用いた遺伝性難聴治療薬の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 83～90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11289/otoljpn.28.83	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 Hosoya Makoto, Fujioka Masato, Murayama Ayako Y., Okano Hideyuki, Ogawa Kaoru	4. 巻 288
2. 論文標題 The common marmoset as suitable nonhuman alternative for the analysis of primate cochlear development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 325～353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15341	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 細谷 誠
2. 発表標題 ヒトiPS細胞と小型霊長類コモンマーモセットを用いた内耳性難聴の治療法開発
3. 学会等名 日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷 誠
2. 発表標題 ヒトiPS細胞と霊長類モデル動物を用いた内耳疾患病態生理解明と治療法開発
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷 誠
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による遺伝性難聴DFNA5特異的iPS細胞作成と病態生理解析
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷 誠
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 日本耳科学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷 誠
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 American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷 誠
2. 発表標題 Cochlear cell modeling using iPSCs unveils a degenerative phenotype and suggests treatments for hereditary hearing loss
3. 学会等名 European Academy of Otology & Neuro-Otology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------