

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10748

研究課題名(和文) 色素性乾皮症患者由来iPS細胞を用いた感音性難聴発症機構の解析と疾患モデルの開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanisms of sensorineural hearing loss and establishment of disease model using XP-A patient-derived iPSCs

研究代表者

大西 弘恵 (Hireo, Ohnishi)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50397634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：XPA患者における聴神経変性モデル作製のため、患者由来細胞からグルタミン酸作動性神経細胞を誘導した。同じ方法で正常ヒトiPS細胞から誘導した神経前駆細胞及び神経細胞を用いモデル作製の検討を行った。蝸牛感覚上皮とヒトiPS細胞由来神経細胞の共培養をおこない、感覚上皮への神経突起の伸長を確認した。さらに前庭組織とヒトiPS細胞由来神経幹細胞の共培養を行い、組織内で分化した神経細胞でナトリウムチャネルの発現と自然発火を認めた。より内耳神経に近い神経細胞を誘導する為、ヒトiPS細胞から内耳神経の元となる内耳前駆細胞への分化誘導法を検討し、複数のマーカーを発現する内耳前駆細胞様細胞を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立されたヒトiPS細胞と内耳組織の共培養モデルとXPA患者由来神経幹細胞、神経細胞を用いることにより、XPA KOマウスでは不可能であった、XPA患者の神経変性モデルを作成することが可能になり、XPA患者における難聴発症メカニズムや治療法の検証に役立てることができる。また、ヒトiPS細胞由来内耳前駆細胞を介して内耳神経を誘導して共培養モデルに用いることにより、生体内耳に近いモデルの作出が可能なる。これにより神経変性のメカニズムが明らかになれば、感音性難聴だけでなくXPA患者における神経症状全般への治療の糸口になると予想され、本研究の社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To generate auditory nerve degeneration model for XP-A patients, we induced glutamatergic neurons from patient-derived iPSCs using our established induction method. And we generated in vitro model using normal hiPSCs for examination of neuronal functions. We observed the neurite outgrowth into cochlea explants in co-culture. Moreover, to examine the neuronal functions of hiPSC-derived neuron, hiPSC-derived neural stem cells were cultured with vestibular explants and then we performed electrophysiological analysis and histological analysis. As a result, hiPSC-derived neurons expressed the sodium channel and showed the spontaneous firing of nerves. Additionally, to induce the neuron that are more closely similar to auditory nerve, we examined induction method of otic progenitors which generate inner ear nerves and confirmed expression of some markers for otic progenitor in induced cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：疾患特異的iPS細胞 神経分化誘導 聴神経 内耳感覚上皮組織培養 色素性乾皮症 神経細胞 シナプス形成 共培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、感音性難聴において人工内耳が唯一の聴力獲得法であり、根本的な治療法も有効な薬剤も開発されていない。人工内耳は一定以上の聴神経の残存が無ければ機能し得ない。故に、聴神経障害による感音性難聴に対し、聴神経変性の予防や治療が必須である。

色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum, XP) A 群は進行性の感音性難聴を示す遺伝性疾患の一つであり、DNA 損傷を修復するヌクレオチド除去修復にかかわる遺伝子の一つである XPA に異常を持つ常染色体劣勢遺伝の遺伝子疾患である。日本では欧米に比べて患者数が多く一人に一人の頻度でみられるといわれている。本疾患患者は、感音性難聴、知能発育遅延、深部腱反射の低下、歩行障害、小頭症等、進行性の中樞神経障害及び末梢神経障害といった広範囲に及ぶ神経症状を呈する。聴神経障害による難聴はこれらの神経変性症状の中でも最も早期に発症すると考えられており、臨床経過も明らかにされている。まず聴神経変性を示す組織学的解析が報告されている (Viana et al., 2013)。加えて、XPA20 症例で聴性脳幹反応 (ABR) を経時的に検討した報告によると、聴力以上は 4 歳頃から見られ始め、10 歳以降になると全例無反応になることが示されている (Sugimoto et al., 1999)。これらの結果から、XPA 患者の聴神経はまず正常に発生して内耳有毛細胞とシナプス形成して聴力を獲得し、その後、変性が始まってその結果聴力を失うと考えられる。このことは、何らかの方法で聴神経変性を予防できれば、XPA 患者の感音性難聴が予防可能であることを示唆している。

XPA 患者における皮膚がんなどの皮膚症状は前述のヌクレオチド除去修復の破綻によることが知られており、紫外線照射などがその原因となることが分かっている。しかしながら、神経症状に関しては、紫外線照射とは無関係に生じることが分かっており、また細胞増殖の止まった神経細胞でおこることから DNA 複製時におけるヌクレオチド除去修復の破綻によるものであるとは考えにくく、発症メカニズムは明らかになっていない。近年、アルツハイマー等のいくつかの脳神経疾患において酸化ストレスが関与することが示されてきた。2005 年、林らにより、XPA 患者の剖検脳の解析において、酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の沈着及び、フリーラジカルスカベンジャーの減少等が報告されており、XPA の脳神経症状が酸化ストレスにより引き起こされている可能性が示唆されている。酸化ストレスにより、サイクロプリンなどの DNA 損傷が引き起こされるが、その修復過程においてもヌクレオチド除去修復が関与しているという報告がある。これらの損傷は、DNA 複製だけでなく転写反応においても異常をきたす。XPA 患者ではヌクレオチド除去修復に障害があるためこれらの DNA 損傷を修復することができず、神経細胞の DNA では加齢とともに損傷が蓄積し、神経変性を引き起こしている可能性が考えられる。しかし、これらの仮説だけでは神経細胞の変性が起こることは説明できても、神経系のみならず障害が現れることを十分に説明できず、神経変性の発症メカニズムは依然として不明である。

XPA 患者の神経疾患のメカニズムを解明するために、XPA ノックアウトマウスが作成された (Nakane et al., 1995、連携研究者である弓場らのグループによる報告)。このノックアウトマウスは紫外線や化学物質により皮膚がんを発症し、XPA の皮膚症状のモデルマウスとして大変有効であった。しかしながら、寿命を向かうまで経時的に検討しても神経症状は示さず、難聴も見られなかったため、神経変性の研究モデルにはなりえなかった。他の遺伝子修復関連遺伝子のノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウス作製や、遺伝的バックグラウンドの変更などにより、神経症状を発症させる試みも行われてきたが、ヒトでは XPA 遺伝子単独の変異で神経症状を発症することからこれらのマウスで起こる現象がヒトと同じとは考え難い。

XPA ノックアウトマウスで神経症状がみられない原因としてマウスとヒトの種間の差による可能性も考えられる。近年様々な疾患のモデルとしてヒト iPS 細胞が有効活用されていることから、XPA 患者由来 iPS 細胞を用いることにより、マウスでは再現できない XPA の聴神経変性を再現するためのヒト由来細胞を用いた新たな *in vitro* モデルを作製し、疾患モデルの開発と感音性難聴発症メカニズムの解析を行える可能性がある。申請者は産業技術総合研究所に勤務していたおり、既に XPA 患者からの iPS 細胞樹立を行っており、神経系への分化誘導が可能であることを確認し、2015 年に論文発表した。そこで、この iPS 細胞を用いて聴神経変性モデルを作成し、発症メカニズムの解析と治療法開発に用いることを考えた。

### 2. 研究の目的

XPA の脳神経症状は進行性であり、原因が不明であるため治療法は存在しない。また XPA ノックアウトマウスも神経症状を呈しなかったことから解析モデルが存在せず、発症メカニズムの解析やそれを基にした治療法の開発も進んでいない。そこで、本研究では、XPA 患者から iPS 細胞を樹立し、聴神経を分化誘導して内耳組織との共培養モデルを作成し、疾患モデルとする。具体的にはヒト iPS 細胞由来聴神経を内耳感覚上皮組織と共培養して内耳有毛細胞とシナプス形成させ、必要に応じて各種酸化ストレス等の刺激を与えながら XPA タンパク質や関連分子の挙動を見ることで聴神経変性の発症メカニズムを分子レベルで解析し、*in vitro* で XPA 聴神経変性モデルを作製する。聴神経変性モデルが作製されれば各種抗酸化ストレス物質等による治療効果についての検討とともに、遺伝子治療の可能性についても検討し、治療モデルの開発を目指す。研究期間内に以下の項目を行うことを目指した。

- (1). XPA 患者由来 iPS 細胞を用いた聴神経変性モデルの作成
- (2). XPA 患者由来 iPS 細胞から誘導された神経系細胞を用いた神経変性症状の再現

この患者由来 iPS 細胞を用いることにより、今まで不可能であった聴神経変性の経時的観察や、分子生物学的、生化学的検討が可能になり、XPA 聴神経変性発症メカニズムの分子レベルでの解明が可能になる。神経変性の分子メカニズムを明らかにすることにより、特異的な阻害剤の使用等、治療法開発にも有効であると考えられる。さらに聴神経変性を制御する方法が明らかになれば、XPA 患者における感音性難聴だけでなく、中枢から末梢まで広範囲に及ぶ神経症状全般の治療の糸口になると予想される。

### 3. 研究の方法

#### (1). XPA 患者由来 iPS 細胞を用いた聴神経変性モデルの作成

##### XPA 患者由来 iPS 細胞からの聴神経誘導

XPA 患者由来 iPS 細胞を産業技術総合研究所から入手した。親細胞は独立行政法人医薬基盤研究所 細胞バンクから入手した XPA 患者由来線維芽細胞で、

- ・神経症状の重篤なイントロン 3 スプライス異常のホモ接合体変異型
- ・神経症状が極めて軽微なエキソン 6 のナンセンス変異型

の 2 タイプの遺伝的背景のある 2 株からそれぞれ iPS 細胞を樹立しており、臨床症状と *in vitro* 表現形との比較検討が可能である。コントロール及び共培養実験の確立のために正常 iPS 細胞 (201B7, Takahashi et al., 2007) も用いた。XPA 患者由来 iPS 細胞に正常型 XPA 遺伝子を導入したリバート細胞を作製するためのターゲティングベクターを構築した。まず、XPA 患者由来 iPS 細胞が聴神経と同じグルタミン酸作動性神経に分化可能であるかどうか検討した。グルタミン酸作動性神経分化誘導は 2011 年の Liらの報告を改変した方法により行った。ヒト iPS 細胞を GSK3 阻害剤と TGF 阻害剤及びヒト LIF を含む無血清培地で培養することにより神経幹細胞を誘導した。これらの神経幹細胞を無血清培地で 1 - 2 週間ほど培養することにより聴神経マーカーである VGLUT1 陽性の神経細胞を高効率に分化誘導可能である (Ohnishi et al., 2017)。

##### XPA 患者由来 iPS 細胞と蝸牛組織との共培養系の確立と検証

新生児マウスから内耳の蝸牛感覚上皮を含む組織を取り出してマトリゲルコートしたガラスボトム dish で培養する。一晚培養して接着させたのち、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞から作製した neurosphere を加え、無結成培地で 5 日間培養した。培養後の組織及び細胞を PFA で固定し、神経細胞マーカー III tubulin 抗体などによる免疫染色や phalloidin 染色により評価した。

##### XPA 患者由来 iPS 細胞と前庭組織との共培養系の確立と検証

新生児マウスから内耳の前庭感覚上皮を含む組織を取り出してマトリゲルコートした dish で培養する。一晚以上培養して接着させたのち、GFP 発現ヒト iPS 細胞から前述の方法で分化誘導した神経幹細胞をガラス針で injection し、数日培養した。ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞が機能的な神経に分化しているかどうか検討するため電気生理学的解析を行い、培養後の組織及び細胞を PFA で固定し、抗ナトリウムチャンネル抗体などによる免疫染色により評価した。

##### 聴神経分化誘導法の検討

より生体に近い解析を行うため、iPS 細胞から聴神経への分化誘導法の検討を行った。聴神経は外胚葉から分化したプラコードの一部が耳プラコードへ分化し、これが陥入して内耳前駆細胞を含む耳胞を形成し、この内耳前駆細胞の一部が遊走し聴神経へと分化する。我々は以前 iPS 細胞から内耳有毛細胞への分化誘導を行い内耳前駆細胞への分化誘導法も確立したが、誘導効率が 0.04% と聴神経の分化誘導へ応用するには低く困難が予想された。そこで、他グループからの報告を参考に bFGF 以外に BMP4 阻害剤、GSK3 阻害剤などの添加因子の濃度や添加時期を検討し誘導法の再検証を行った。分化誘導効率は内耳前駆細胞マーカーである PAX2 の免疫染色で判定し、その後 RT-PCR 解析と免疫染色により複数の内耳前駆細胞マーカーの発現を検討した。

#### (2). XPA 患者由来 iPS 細胞から誘導された神経系細胞を用いた神経変性症状の再現

1. の a で記載した分化誘導法を用い、正常及び XPA 患者由来 iPS 細胞からグルタミン酸作動性神経を誘導し、低酸素条件下で培養し、生存・増殖について検討した。

### 4. 研究成果

#### 平成 27 年度

産業技術総合研究所から XPA 患者由来 iPS 細胞の入手に日数を要したため、理研セルバンクから入手可能であった健常者由来の 201B7 株を用いて内耳組織との共培養法を検討した。iPS 細胞由来 neurosphere と蝸牛感覚上皮の explant culture を無血清培地内で 5 日間共培養し、neurosphere から感覚上皮に向けて軸索伸長が確認できた。XPA 患者由来細胞からグルタミン作動性ニューロンを分化誘導し SOX2, Nestin, -III tubulin などのマーカーの発現を免疫染色法で検討した結果、誘導過程の神経幹細胞、神経細胞とも分化が認められたが、201B7 株で見られるよりも誘導効率は低かった (<50%)。ヒト iPS 細胞の分化誘導においては株間の差が大きいため、ある分化誘導法を用いる際に、試薬の濃度などを検討し、使用する細胞に合うよう調整が必要な場合が多い。XPA 患者由来 iPS 細胞における添加因子至適濃度の検討が必要である

と考えられた。

平成 28 年度

前年度検討したヒト iPS 細胞からグルタミン作動性神経への分化誘導法を用いて誘導した神経幹細胞が機能的な神経へ分化するかどうか確認するため、蝸牛と同様に有毛細胞を含む内耳組織である前庭組織との共培養を行い、電気生理学的解析と組織学的解析を行った。その結果、iPS 細胞由来神経細胞はナトリウムチャンネルを発現しており、自然発火を認めた。これらのことからヒト iPS 細胞由来神経幹細胞が内耳組織との共培養系内で成熟神経へ分化することが示された。

また、聴神経分化誘導のための内耳前駆細胞分化誘導効率向上の検討では、BMP4 阻害薬、GSK3 阻害薬、bFGF、レチノイン酸などの濃度と処理期間を検討することにより 50-100 倍ほど分化誘導効率を向上させることに成功した。

平成 29 - 30 年度

昨年度改良方法でヒト iPS 細胞から誘導した内耳前駆細胞の検証を行った。RT-PCR 解析及び免疫染色法により、PAX2, PAX8, SIX1, EYA1 等複数の内耳前駆細胞マーカーの発現を確認した。その後、マトリゲルを含む無結成培地で長期間培養することにより神経細胞への分化も確認できた。

また、XPA 患者の神経変性症状を *in vitro* で再現するため、正常及び XPA 患者由来 iPS 細胞からグルタミン酸作動性神経を誘導し、低酸素条件下で 1 - 7 日までの期間培養し、細胞死が起こる条件を検討したが両細胞株間の生存、増殖に有意な差は認められなかった。

さらに患者由来 iPS 細胞に正常型の XPA 遺伝子を恒常的に発現させたコントロール株の作製を行った。XPA は常染色体劣性遺伝であるため、正常な XPA 遺伝子が発現していれば発症しないはずである。そこで染色体上で他の遺伝子発現に影響を及ぼさない位置に XPA 遺伝子を恒常的に発現するようなプロモーター下で発現させるシステムの確立を試みた。XPA 遺伝子を挿入する為のターゲティングベクターを作製した。同時に予備検討として GFP 発現株の作製を試みた。GFP を発現するコロニーを得、PCR によりゲノム上に遺伝子挿入された株のスクリーニングを行ったが、GFP の発現は一過的なものであったらしくゲノム PCR の結果、GFP 挿入株は取れなかった。薬剤処理の期間や濃度をさらに検討する必要があると思われた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件) 英語論文はすべて査読有

Ohnishi H, Kawasaki T, Deguchi T, Yuba S. Generation of Xeroderma pigmentosum-A patient-derived induced pluripotent stem cell lines for use as future disease models. Cell Reprogram. 2015, 17(4):268-274.

Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Nakagawa T. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. Neurosci Lett. 2015, 599:49-54.

Taura A, Nakashima N, Ohnishi H, Nakagawa T, Funabiki K, Ito J, Omori K. Regenerative therapy for vestibular disorders using human induced pluripotent stem cells (iPSCs): neural differentiation of human iPSC-derived neural stem cells after in vitro transplantation into mouse vestibular epithelia. Acta Oto-Laryngologica, 2016, 136(10):999-1005

Ishikawa M\*, Ohnishi H\*, Skerleva D, Sakamoto T, Yamamoto N, Hotta A, Ito J, Nakagawa T. (\*These authors contributed equally to this work) Transplantation of neurons derived from human iPS cells cultured on collagen matrix into guinea pig cochleae. J Tissue Eng Regen Med., 2017, 11(6):1766-1778.

大西 弘恵, Desislava Skerleva, 北尻 真一郎, 坂本 達則, 山本 典生, 伊藤 壽一, 中川 隆之. 段階的分化誘導法を用いたヒト iPS 細胞からの内耳有毛細胞様細胞の誘導. 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス、vol.30、Page 40 - 43、平成 28 年 5 月発行

田浦 晶子 大西 弘恵 「前庭障害に対する iPS 細胞移植の可能性」、月刊 臨床神経科学 Clinical neuroscience、34 巻 10 号、Page 1142-1144、2016 年 10 月 1 日発行、中外医学社

田浦 晶子、大西 弘恵 「iPS 細胞の安全・高品質な作製技術、第 6 章、第 4 節 ヒト iPS 細胞からの前庭神経節細胞作製の開発」、株式会社 技術情報協会 出版 2016.10 Page 361-364.

〔学会発表〕(計 8 件)

Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Nakagawa T. A simple stepwise method for hair cell induction from human induced pluripotent stem cells. Inner Ear Biology Workshop, Rome (Italy), Sep 14, 2015.

Ohnishi H, Kitajiri S, Lou X, Taura A, Taniguchi M, Ebisu F, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Omori K, Nakagawa T. A Trial of Establishment for TRIOBP KO In Vitro Model

Using Induced Pluripotent Stem Cells. Inner Ear Biology Workshop, Montpellier (France), Sep 20, 2016.

Ohnishi H, Kitajiri S, Lou X, Taura A, Taniguchi M, Ebisu F, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Omori K, Nakagawa T. Examination of in vitro model for functional analysis of TRIOBP. 1st International symposium on inner ear therapies, Marrakech (Morocco), Nov. 2, 2017.

Ohnishi H, Skerleva D, Okuyama H, Miyamoto T, Matsuura S, Kirino K, Yamamoto N, Ito J, Omori K, Saito M, Tsukita K, Inoue H and Nakagawa T. Trial for Improvement of Hair Cell Induction Method from Human Induced Pluripotent Stem Cell. Association for Research in Otolaryngology 37th MidWinter Meeting, Baltimore (USA), Feb 11, 2019.

大西 弘恵、Desislava Skerleva、北尻 真一郎、坂本達則、山本典生、伊藤壽一、中川隆之。段階的分化誘導法を用いたヒト iPS 細胞からの内耳有毛細胞様細胞の誘導。第 33 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、2015 年、大阪

大西 弘恵、北尻 真一郎、Xiangxin Lou、田浦 晶子、谷口 美玲、戎 富美、坂本 達則、山本 典生、伊藤 壽一、大森 孝一、中川 隆之。TRIOBP 欠損 in vitro モデル作出への試み。第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年、大阪

大西 弘恵、Desislava Skerleva、北尻 真一郎、坂本 達則、山本 典生、伊藤 壽一、中川 隆之。ヒト iPS 細胞から内耳有毛細胞様細胞を誘導するための段階的分化誘導法の検討 第 37 回日本炎症・再生医学会、2016 年、京都

大西 弘恵、デシスラヴァ スケルレヴァ、奥山 英晃、宮本 達雄、松浦 伸也、桐野 浩輔、山本 典生、伊藤 壽一、大森 孝一、齋藤潤、月田 香代子、井上 治久、中川 隆之。ヒト iPS 細胞からの内耳有毛細胞誘導法改良の試み 第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年、神戸

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：中川 隆之

ローマ字氏名：(NAGKAGAWA, takayuki)

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：50335270

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：弓場 俊輔

ローマ字氏名：(YUBA, shyunsuke)

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松田 外志朗

ローマ字氏名：(MATSUDA, toshi rou)

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。