

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11193

研究課題名（和文）オーディトリニューロパチーに対する再生治療の実現を指向した聴神経分化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism underlying differentiation of auditory neurons toward the realization of regenerative therapy for Auditory Neuropathy

研究代表者

下村 敦司（SHIMOMURA, Atsushi）

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・教授

研究者番号：50340237

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）：胚性幹細胞（ES細胞）にHomeobox因子Tlx3を過剰発現すると、聴神経に特有な遺伝子群の発現を引き起こす。これに一致し、Tlx3を発現するES細胞由来神経細胞は、聴神経の特性を示す。本研究計画の目的は、オーディトリニューロパチーに対する再生治療の実現を目指し、Tlx3による聴神経様細胞分化の分子メカニズムを解明することである。私たちの研究結果から、Tlx3がmRNAプロセシングに作用し、ES細胞を聴神経様細胞へと分化に導く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、Tlx3を強制発現させた幹細胞を聴神経様細胞へと分化誘導させる方法を開発した。しかし、この方法を治療に展開するには、分化効率が低い。本研究計画の結果から、RNAプロセシングが、幹細胞を聴神経様細胞への分化へと導いていることが示唆された。RNAプロセシング、特に分化に関わるmRNAスプライシングに注目して研究を進めてゆけば、オーディトリニューロパチーに対する再生治療を実現できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of Homeobox protein Tlx3 triggers auditory neural subtype-specific genes in embryonic stem (ES) cells. Consistent with this, ES cell-derived neurons expressing Tlx3 exhibits the properties of auditory neuron. The aim of our study is to elucidate the molecular mechanism of Tlx3-induced differentiation toward the realization of regenerative therapy for Auditory Neuropathy. Our study suggest the possibility that Tlx3 could affect mRNA processing, thereby leading to the differentiation of ES cells towards auditory nerve-like cells.

研究分野：再生医療

キーワード：ES細胞 Tlx3 聴神経様細胞 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に見ると難聴は人口の約1割以上に及んでいると言われており、大きな身体障害の一つである。また、重度になると患者のクオリティ・オブ・ライフの低下につながる。オーディトリニューロパチーは、聴神経が変性することにより引き起こされる感音難聴である。聴神経は自発的な再生能力を有していないため、オーディトリニューロパチーによる感音難聴は不可逆であり、難聴は半永久的に続く。このような背景のもと、申請者らは、オーディトリニューロパチーに起因する感音難聴の再生治療の実用を目指し、幹細胞から聴神経様細胞を産み出す技術開発を行ってきた。その結果、ホモオボックス型転写因子 Tlx3 を強制発現させた幹細胞を、聴神経様細胞へと分化誘導させる方法を開発した (Kondo, Shimomura et al. Stem Cells 2011)。分化した細胞は、聴神経の特性をよく反映している。しかし、この方法による分化効率は、in vitro で全幹細胞中 53%、in vivo での分化効率は移植細胞中 0.6% と極めて低い。このように、この方法を臨床研究や治療に展開するには、分化効率の改善が求められる。

本研究グループでは、より効率の高い分化誘導法の開発を目的とし、Tlx3 による分化誘導法の分子メカニズムを調べてきた。その結果、以下に述べる3つの過程から成る分化メカニズムを明らかにした (Shimomura et al. Plos One 2015 及び未発表データ)。過程1: 未分化の Tlx3 強制発現 ES 細胞では、Tlx3 とクロマチンアセチル化修飾因子 CBP は結合していない。過程2: 神経への分化誘導に伴って、転写因子 Pbx3 が発現する。この Pbx3 は、Tlx3 と CBP との結合を促す。過程3: Tlx3 と CBP の結合により、CBP のクロマチンアセチル化修飾活性が抑制される。以上から、Tlx3 は、広範囲にわたりクロマチン上のアセチル化修飾パターンを変化させ、新たな転写抑制領域を生みだすことが推測された。以上から、この新規アセチル化修飾パターンが聴神経分化運命決定に関わる遺伝子群の発現を調節し、ES 細胞を聴神経様細胞へと分化に導くシステムが存在することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、『1. 研究開始当初の背景』で述べた仮説 (ES 細胞を聴神経様細胞へと分化に導くシステム) に基づき、Tlx3 によるクロマチン修飾を介した聴神経運命分化決定機構を明らかにすることである。その結果を基に、将来、ES 細胞から高効率な聴神経様細胞の分化誘導法の開発へとつなげる。

3. 研究の方法

(1) 継続的に、Tlx3 を強発現する Tlx3 発現 ES 細胞株を樹立する。

(2) 継代および分化誘導に無血清培地を用い、安定した聴神経様細胞への分化システムを構築した。

(3) Tlx3 により発現が変化する遺伝子が、聴神経様細胞への分化誘導に関わるものである。そこで、Tlx3 の強制発現により有意に発現が変化した遺伝子を、マイクロアレイ (Agilent Technologies 社) により網羅的に調べた。

(4) (3) の結果について、聴神経への分化への関りを調べるため、G0 解析と Pathway 解析といった遺伝子ネットワーク解析を行った。

4. 研究成果

当初予定していた計画に大幅な変更があった。本研究の目的であるクロマチン修飾を介した聴神経運命分化決定機構の解明には、至らなかったが、聴神経運命分化決定機構に関わる生体システムが明らかとなり、これを起点に今後の研究を広げてゆけば、ES 細胞から高効率な聴神経様細胞の分化誘導法の開発へとつなげることができると考えられる。研究成果を以下の(1)から(3)にまとめた。

(1) Tlx3 強制発現 ES 細胞株の樹立

Tlx3 強制発現 ES 細胞株を作製し保管していたが、この株での Tlx3 の発現量が継代と共に減少し、聴神経様細胞への分化効率が著しく落ちることが明らかになった。これを改善するために、安定かつ高い分化効率をもつ Tlx3 強制発現 ES 細胞株の樹立を行った。現状用いている発現ベクターは ES 細胞での発現維持には適さないと考え、ヒトポリペプチド鎖伸長因子遺伝子のプロモーター (ES 細胞に適しているとの報告があり) により発現を促す発現ベクターを用い、Tlx3 発現ベクターの構築を行った。これを ES 細胞に導入し、Tlx3 発現 ES 細胞株を3系統樹立した。5代継代を繰り返したが、コントロールの ES 細胞と比較して平均して9.5倍の Tlx3 の発現が維持できた。さらに、これまで用いてきた血清培地による ES 細胞の継代、および聴神経様細胞への分化効率・生存率は、血清のロットによるばらつきが大きく、今回目的とする実験結果に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、新規に開発された、無血清培地による継代と分化を、新しく作成した Tlx3 発現 ES 細胞株で試した。Tlx3 発現 ES 細胞の生存率さらに分化効率は、一定した結果を得ることができた。

(2) Tlx3 強制発現 ES 細胞株での発現変動遺伝子の同定

コントロールであるベクター導入 ES 細胞と Tlx3 強制発現 ES 細胞を比較し、Tlx3 の導入により発現が変化する遺伝子の同定を行った。G0 解析により、Tlx3 の強制発現により有意に発

現在上昇した遺伝子は 311、逆に下がった遺伝子は 113 であった。これら変動した遺伝子は、聴神経分化において“鍵”となる遺伝子が含まれている可能性がある。

(3) Tlx3 が関わる生体システム

Tlx3 により発現が変化する遺伝子が、聴神経様細胞への分化誘導に関わると考えられる。そこで、Pathway 解析による遺伝子ネットワーク解析を行い、Tlx3 による聴神経様細胞への分化誘導に関わる生体システムの推定を行った。その中で、統計解析により有意な生体システム mRNA プロセッシング (図) が明らかになった。

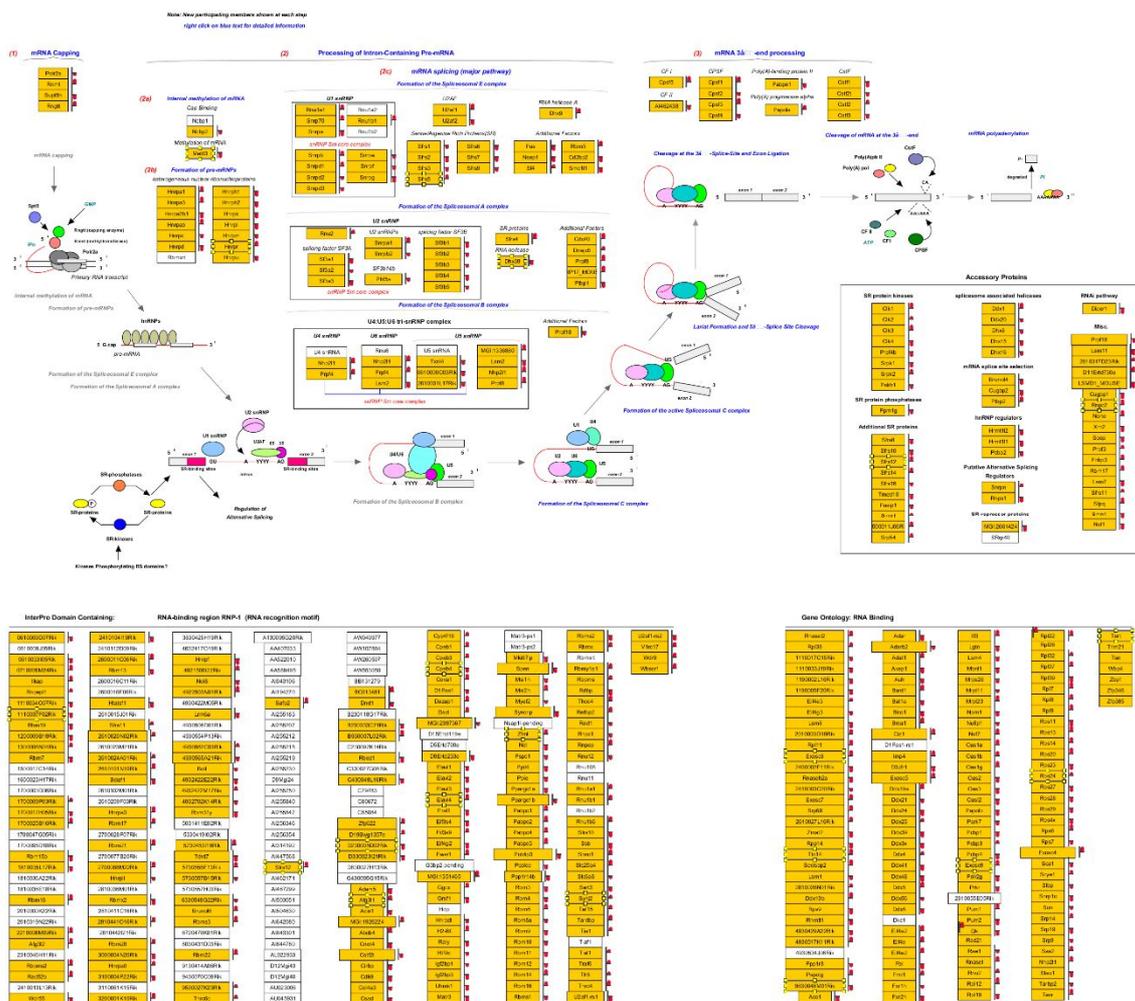


図 mRNA プロセッシング

mRNA プロセッシングとは、転写された mRNA が、RNA スプライシング、5'末端へのキャップ付加、3'末端へのポリ(A)鎖の付加などの過程を経て、成熟した mRNA に変換される反応をいう。この反応の中で、RNA スプライシングは、遺伝子中に含まれる介在配列イントロンを、スプライシングによって mRNA から除く。すなわち、mRNA を切り貼りする。そのため、一遺伝子から複数種の mRNA を生成することが可能となる。これにより、タンパク質を多様化し、時空間的な生体システムとして分化に重要な役割を果たす。Tlx3 の ES 細胞での高発現は RNA スプライシングに影響し、結果として ES 細胞を聴神経細胞への分化に導いている可能性が示唆される。

今回は明らかにできなかったが、これまで私たちが明らかにしてきた Tlx3 のクロマチン化学修飾的作用から (文献)、Tlx3 は mRNA プロセッシングに関わる遺伝子のクロマチン構造に変化を加え、これらの遺伝子発現に影響した可能性がある。

< 引用文献 >

Atsushi Shimomura, Dharmeshkumar Patel, Sarah M Wilson, Karl R Koehler, Rajesh Khanna Eri Hashino ,Tlx3 Promotes Glutamatergic Neuronal Subtype Specification Through Direct Interactions With the Chromatin Modifier CBP., PLoS One, 10(8), 2015, e0135060.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Dharmeshkumar Patel, Atsushi Shimomura, Sreeparna Majumdar, Matthew C. Holley, Eri Hashino	4. 巻 13
2. 論文標題 The histone demethylase LSD1 regulates inner ear progenitor differentiation through interactions with Pax2 and the NuRD repressor complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0191689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0191689	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 該当する

1. 著者名 Atsushi Shimomura, Akiko Iizuka-Kogo, Naoki Yamamoto and Ryuji Nomura	4. 巻 49
2. 論文標題 A lower volume culture method for obtaining a larger yield of neuron-like cells from mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 119-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-015-0131-2	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	太田 亨 (OHTA Toru) (10223835)	北海道医療大学・健康科学研究所・教授 (30110)	
研究分担者	向後 晶子 (KOGO Akiko) (20340242)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	