

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15719

研究課題名（和文）転写因子導入による蝸牛有毛細胞の分化誘導

研究課題名（英文）direct conversion of mouse fibroblasts into cochlear hair cells by the defined transcription factors

研究代表者

伊木 健浩（Iki, Takehiro）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20755649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では特定の転写因子をマウス線維芽細胞に強制発現させることで蝸牛有毛細胞へと分化転換させることを目的とする。

まず、仔マウスコルチ器から作製したotosphereの遺伝子発現解析及び蝸牛感覚上皮、ES細胞との比較解析により100個の遺伝子を選定した。この中に幹細胞の特性を示す転写因子を同定した。さらに候補を絞るべく、iPS干渉法を用いることとし、細胞に導入するための各遺伝子を含んだベクターの作製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蝸牛幹/前駆細胞の構成維持に関わると思われる転写因子を複数同定した。効率の良い増幅法、分化法の発見に発展させることが可能であり、難聴研究や治療に寄与すると考えられる。また、otosphereに有意に発現する表面マーカーも同定し、蝸牛内の細胞に発現していることが明らかになった。蝸牛幹/前駆細胞を識別するマーカーとして期待され、一つの細胞から遺伝子解析が可能となった現在、より精密な遺伝子的特徴の把握に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is direct conversion of mouse fibroblasts into cochlear hair cells by promoting the expression of specific transcription factors.

We prepared a small population of stem cells, called "otospheres", from the cochlear sensory epithelium (CSE) of neonatal mice, and identified a hundred of candidate genes by comparing their gene expressions with those of CSE and ES cells. We also identified some transcription factors presenting the character of stemness in the candidates. To perform iPS cell interference assay for narrowing the candidate genes down, we produced the vectors transducing each gene.

研究分野：耳科学

キーワード：転写因子 蝸牛有毛細胞 otosphere

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛有毛細胞の死滅によって引き起こされる感音難聴は哺乳類では有毛細胞が再生しないため、不可逆的である。感音難聴の原因は多岐にわたり、日本でも数百万人が悩まされている症状である。有毛細胞の死滅の原因究明や保護薬の開発については有毛細胞を使用した実験が必要不可欠であるが、ヒトでは内耳が骨に包まれており、アプローチが困難であること、たとえ有毛細胞が採取できたとしても聴力の喪失を来すことが大きな障害となっており、主にマウスの蝸牛を用いた実験に留まっている。近年、ヒト ES 細胞のみならず、2007 年に山中らによって樹立されたヒト iPS 細胞によりヒトの有毛細胞の実験の可能性が開けた。そこで有毛細胞への stepwise な分化実験が行われてきたが、限定的には分化誘導に成功しているものの、再現性に乏しいまたは低効率であるため、実験に使用する素材としてはまだ不十分であるのが現状である。分化効率が悪い原因の一つに、内耳の発生に関して未解明な点が多いため、適切なサイトカインの使用や培養期間の設定が困難であることが考えられる。

他方、異なる分化誘導法として direct conversion という方法が存在する。Direct conversion とは複数の転写因子をある細胞に導入することで、形質の異なった細胞に分化転換 transdifferentiation させる方法である。ヒト iPS 細胞も SOX2、OCT3/4、KLF4、c-MYC の 4 つの転写因子を皮膚線維芽細胞に導入することで未分化な細胞を樹立したのであり、direct conversion の一種と言える。体細胞においても Ascl1、Brn2、Myt1l を用いてマウスの線維芽細胞から神経細胞が作製されたのをはじめ、血液細胞、肝細胞の作製も成功している。このことから内耳の細胞への direct conversion も成立する可能性があると考えられる。遺伝子の導入法については既にいくつかの方法が確立されており、安定した遺伝子発現が得られれば、効率の良い有毛細胞の分化誘導が期待できる。

2. 研究の目的

現状において低効率である stepwise な分化方法の代わりに direct conversion による蝸牛幹/前駆細胞への分化誘導、さらにはそこから有毛細胞への分化方法の確立を目指す。direct conversion に必要な転写因子の条件として、目的の細胞に常に発現していることが挙げられる。したがって、

- (1) マウスを用いて、今回目的とする蝸牛感覚上皮より抽出した前駆/幹細胞の遺伝子発現プロファイルを調査し、候補転写因子を選定していくという作業を行う。
- (2) さらに候補転写因子を direct conversion に必要かどうか個々に選別するアッセイにより、候補となる転写因子を絞っていく。
- (3) それらをヒト線維芽細胞あるいは多能性幹細胞に導入する。
必要となる転写因子がすべて含まれていれば、ターゲットとなる細胞に分化誘導できるはずである。

3. 研究の方法

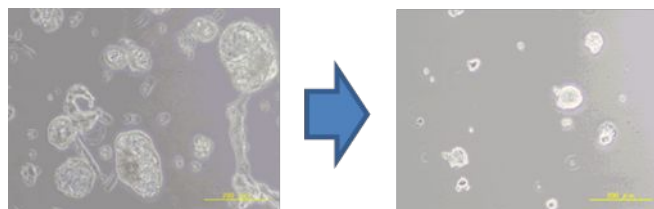
- (1) 適切な otosphere の作成、回収：ICR マウスの蝸牛細胞を単離培養し、otosphere を作成した。otosphere のうち、solid type は前駆/幹細胞を含有するが、培養中前駆/幹細胞を喪失した hollow type に形態変化することがある。マイクロアレイ解析を行うにあたり、hollow type を混入防止のため、hollow type が増殖しない培養条件および除去する方法を検討した。蝸牛由来の前駆/幹細胞における遺伝子発現の網羅的解析：otosphere サンプルを 6 回にわたり回収し、ES 細胞、蝸牛感覚上皮、MEF を比較サンプルとして、RNA を抽出しマイクロアレイを行い、解析した。候補転写因子の抽出：遺伝子

オントロジー (GO) 解析で "transcription, DNA-binding, DNA-dependent" の annotation を有する遺伝子を転写因子と考慮し、候補転写因子を抽出した。発現量において otosphere>ES 細胞、otosphere>感覚上皮、otosphere>MEF をそれぞれ満たす転写因子を otosphere での発現量が高い順に順位をつけ、3 つのグループでつけられた順位を転写因子ごとに平均化する。平均化された順位を良いものから 100 個選択して、これらを候補転写因子とした。 otosphere の character の調査：幹細胞としての性質を調べるため、ES 細胞と蝸牛感覚上皮細胞との比較解析により otosphere と ES 細胞で発現の高い遺伝子を抽出した。またマイクロアレイ解析から otosphere には表面マーカー Cd14 が有意に発現していることがわかり、実際の発現しているか検討した。

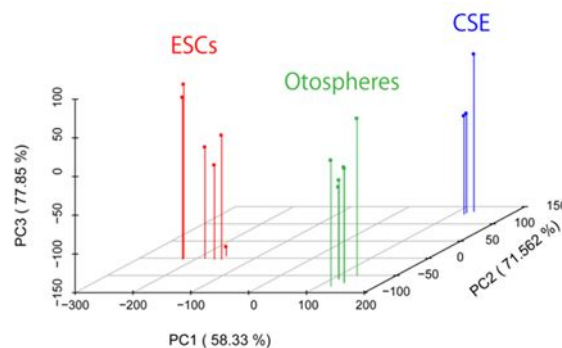
- (2) iPS 干渉法を用いて otosphere への分化転換に必要な転写因子を選定していくため、otosphere にレトロウイルスでの転写因子の導入を行うこととした。 tet-on マウス蝸牛の otosphere 作成：iPS 干渉法では otosphere に転写因子と Sox2、Oct3/4、Klf4、c-Myc の初期化 4 因子を導入する。この際、導入効率のばらつきを最小限にするため、初期化 4 因子を endogeneous に発現する doxycycline (Dox) 投与による tet-on 発現マウスを用いる。 tet-on マウス由来の otosphere から iPS 細胞が実際に樹立できるか調べる。

4. 研究成果

- (1) 1 回の継代を挟み 8 日間の維持培養が妥当であった。また培養するに従い、両者のサイズの違いが鮮明となり、セルストレイナーで分離可能であった。その結果、90%以上の純度で solid type の otosphere を回収することが可能となった。



クラスタリング解析で otosphere サンプル同士の異質性が少ないことが確認された。マイクロアレイ解析の妥当性を検討するために、代表となる約 50 の遺伝子に対し、qPCR で遺伝子発現を調べ、いずれもマイクロアレイ解析の結果と矛盾しなかった。

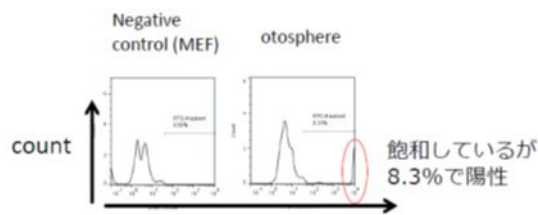


Otosphere、蝸牛感覚上皮 (CSE)、ES 細胞間での評価

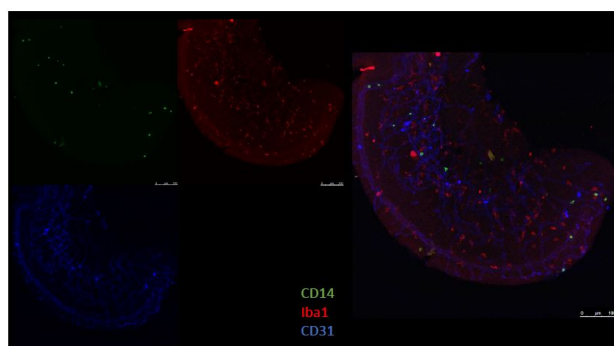
アルゴリズムに従って、100 個の候補となる転写因子を抽出した。以下の表に一部を示す。

順位	s. epithel	vs. ES	vs.MEF	GeneSymbol	Fold change (I CR] vs [epithelia]	Fold change (I CR] vs [mESO]	Fold change (I CR] vs [MEF]
1		3	10	Rarb		228.29	30.76
2		15	2	Pop2l		53.54	103.46
3	26	8		Aebp1	8.97	70.32	
4	3		31	Egr4	53.58		11.27
5		12	29	Trib20		59.37	12.04
6		27	15	S100a1		35.79	24.31
7		36	6	Sox10		25.39	50.02
8		1	42	Nr2f1		496.19	8.46
9		28	16	S100a1		33.54	21.40
10		29	17	Irf1		32.78	20.99
11	4		49	Atf3	42.53		7.43
12	51		9	Batf3	6.31		31.30
13	32	99	64	Batf	7.81	10.92	5.67
14	6	70		Fosl2	24.17	15.48	
15	45		34	Ehf	6.52		10.06
16	61		19	Bhlha15	5.80		19.39
17		67	13	Hnf		15.95	26.46
18	11		76	Rasl11a	16.68		5.14
19		66	25	Pou3f3		16.36	12.69
20		2	90	Nfya		429.80	4.54
21		13	82	Sox1		57.27	4.87
22		4	95	Nfya			4.42
23		96	4	Irf2		11.21	68.45
24	71	30		Rarg1		32.40	
25	34		74	Nr1h3	7.63		5.24
26	65	47		Irf1	5.44	21.43	
27		37	81	Ablim1		25.08	4.90
28			1	Ebrp7			191.88
29	1			Cdtn2a	172.75		
30	2			Bcl2	69.46		

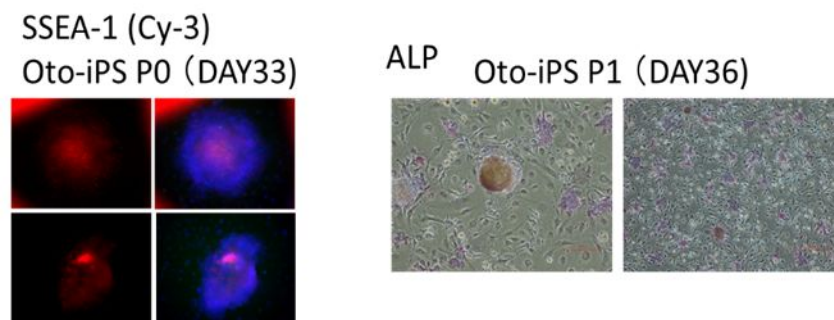
GO 解析から「幹細胞らしさ」という単語を含む GO は認めなかったが、「細胞周期」にかかわる遺伝子を複数同定した。いくつかは細胞周期を抑制する働きを持つ遺伝子であり、培養の影響が関わっている可能性が示唆された。さらに転写因子の抽出を行ったところ、Trib3、Klf5、Hmga2 といった多能性に関連する転写因子を同定した。qPCR ならびにフローサイトメリーにより、otosphere での Cd14 の発現上昇を確認した。また免疫染色像では、マウス蝸牛感覚上皮において、CD31 陽性血管内皮細胞や Iba1 陽性マクロファージ細胞とは独立して局在する CD14 陽性細胞が確認された。



CD14(+) cells in P0 mice Cochlear



(2) マイクロアレイ解析の結果から得られた100個の候補転写因子うち95個について、個々の転写因子のオープンリーディングフレーム (ORF) をクローニングした後、pMX をバックボーンとするプラスミドベクターにサブクローニングした。ICR マウスでのプロトコール(1)に従ったところ、得られた otosphere は1回の継代をはさみ8日間の維持培養が可能であった。所属研究室にて既に確立していた Dox マウスの MEF (マウス胎仔繊維線維芽細胞) からの iPS 細胞樹立プロトコールをもとに検討を進めた。MEF 由来では2週間でコロニー形成が確認されたが、Otosphere 由来では1ヶ月以上を要した。得られたコロニーにつき、幹細胞マーカー (SSEA-1、ALP) で染色した結果、強陽性コロニーは5-10%であった。そこで iPS 細胞樹立を促進する目的で、ACTH をはじめとする様々な誘導剤の併用を試みたが、顕著な効果は見られなかった。



5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Iki T, Tanaka M, Kitajiri S, Kita S, Kawasaki Y, Mizukoshi A, Fujibuchi W, Nakagawa T, Nakahata T, Ito J, Omori K and Saito MK. Microarray analyses of otospheres derived from the cochlea in the inner ear identify putative transcription factors that regulate the characteristics of otospheres. PLoS One. 2017; 12(6): e0179901. Published online 2017 Jun 29. doi: 10.1371/journal.pone.0179901.
京都大学学術情報レポジトリ: <http://hdl.handle.net/2433/232071>

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 喜多知子, 伊木健浩, 水越彬文, 宇佐美真一, 北尻真一郎. ヒト iPS 細胞を用いたミトコンドリア 1555 変異難聴の病態解明. 第 28 回日本耳科学会総会・学術講演会. 2018.10.5. 大阪
- 2) 伊木健浩, 楯谷一郎, 大森孝一. 術中 CT 画像診断が有用であった顎下腺唾石摘出術例. 第 31 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会. 2018.9.14. 名古屋
- 3) 伊木健浩, 北尻真一郎, 水越彬文, 中川隆之, 伊藤壽一, 大森孝一. otosphere のマイクロアレイ比較解析による内耳の蝸牛幹 / 前駆細胞維持にかかわる転写因子の探索. 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2018.6.1. 横浜
- 4) Iki T, Harada H, Ito M, Tateya I, Omori K. The Intraoperative CT Scan during Surgeries for the Sialoliths of the Wharton 's Ducts. The 14th Taiwan-Japan Conference. 2017.12.2. 高雄

〔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〕

1) CiRA ニュース

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/170710-160000.html>

2) CiRA Reporter Vol.12

3) 京都大学 iPS 細胞研究所 斎藤潤研究室

<https://msaito8.wixsite.com/cirakahata/lab-news>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：喜多 知子

ローマ字氏名：KITA Tomoko