

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20293

研究課題名(和文)ラセン神経節グリア細胞の可塑性解析と聴神経再生への応用

研究課題名(英文) Investigation of plasticity of spiral ganglion glial cells and its application to regeneration of primary auditory neurons

研究代表者

西村 幸司 (NISHIMURA, KOJI)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：20405765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難聴の多くは蝸牛有毛細胞や一次聴神経の変性が原因であるが、これらの細胞は一度障害されると自発的には再生されない。本研究では、神経分化に重要な役割をもつ遺伝子群の導入により、一次聴神経の近傍に存在するグリア細胞から、聴神経類似の神経細胞の作製に試験管内で成功した。作製した神経細胞は電気生理学的に機能し、末梢の音受容感覚細胞(蝸牛有毛細胞)や脳幹に存在する蝸牛神経核細胞への結合の可能性が示された。また、研究の過程で偶然、一次聴神経の一部の神経細胞にのみ、Gata3と呼ばれる遺伝子が成体マウスにおいて高く発現していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度難聴患者に対しては補聴器、重度難聴患者には人工内耳が臨床では用いられているが、いずれも難聴を根本的に治療する方法ではない。本研究の成果は、聴神経に存在する内在性のグリア細胞から聴神経類似の神経細胞を作製したことである。すなわち、本研究は一次聴神経が生体内でも再生される可能性があることを示唆し、その場合、補聴器、人工内耳の効果が高まるのみならず、それらの機械の使用を不要とする新規難聴治療法開発の端緒となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We converted endogenous cells into replacement primary auditory neurons using gene therapy to ameliorate hearing loss. Recent reports have demonstrated that somatic mouse cells and glial cells can be directly converted to functional neurons by overexpression of transcription factors in vitro and in vivo. Moreover, induced neurons can be directed towards distinct neuronal phenotypes when the appropriate transcriptional cues are provided with the conversion factors. A target cell population for endogenous regeneration and induction is the spiral ganglion glial cells which surround auditory neurons and survive after neuron degeneration. We generated functional induced neurons from spiral ganglion glial cells in vitro. Serendipitously, we found out murine type II auditory neurons highly expressed Gata3, which is a known transcription factor expressed in embryonic primary auditory neurons, even in adulthood.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 蝸牛神経 転写因子 ラセン神経節 シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

難聴はもっとも重要な身体障害の一つである。本邦では障害者手帳を有する高度感音難聴者は約37万人存在する。さらに70歳以上は半数が難聴者であり、高齢化社会を迎える本邦では特に今後ますます切実な社会問題となることが予想される。加えて先天性難聴は1000人に1人に認められ難聴は先天性障害のなかでももっとも頻度が高い。難聴者は他者と意思疎通が十分に取れないことが多く、社会からの疎外感を感じる原因となっている。従って、根本的な難聴の治療法の開発は難聴者・社会双方にとって喫緊の課題といえる。

中等度感音難聴者には残存蝸牛有毛細胞を音信号の増幅で刺激する補聴器が、高度感音難聴者には聴神経を直接電気刺激する人工内耳が用いられている。しかし、どちらの使用者も騒音下での聞き取り、音楽の享受については健聴者と比べて依然大きな隔りがある。しかしながら、聴覚感覚細胞である蝸牛有毛細胞あるいは聴神経は一度障害されると自発的には再生しない。したがって、人為的に蝸牛有毛細胞あるいは聴神経を再生できれば、現在存在しない新規難聴治療開発につながると考えられる。これまで、聴神経の障害は蝸牛有毛細胞の障害に続発する二次性障害がほとんどであると考えられてきたが、近年、音響外傷や老化による一次性的聴神経障害が報告されており(Kujawa and Liberman, 2009; Lin et al., 2011; Engle et al., 2013; Furman et al., 2013)、本邦に近い将来到来する超高齢社会において一次性聴神経障害による難聴はますます増加すると言って良い。

申請者は留学時代も一貫して聴神経再生のテーマに取り組み、蝸牛非感覚上皮からの神経細胞のダイレクトリプログラミングに成功した(Nishimura et al., 2014)。本申請においては、内耳の内因性の非神経細胞特にグリア細胞の聴神経への分化可塑性を明らかにしてそこで得られた知見を聴神経の再生に応用したい。聴神経近傍に存在するグリア細胞は神経障害後も生存し(Hurley et al., 2007; Lang et al., 2011)、増殖する(Lang et al., 2011)。さらに、シュワン細胞マーカーの p75 で選別した聴神経近傍のグリア細胞は神経幹細胞の培養と同じ条件で sphere を形成し、sphere 由来神経細胞が得られている(Lang et al., 2015)。

2. 研究の目的

目的1. 聴神経近傍のグリア細胞の単離

動物はマウスを用いる。聴神経近傍のグリア細胞が既知のグリアのマーカーが陽性であることを免疫組織化学により確認したのちに、聴神経とグリア細胞の集合体であるラセン神経節を解剖して酵素処理により単細胞化し、FACSによりグリア細胞を回収する。FACSの細胞選別の妥当性は、細胞選別後に、細胞選別に用いたものとは異なるグリアマーカーを用いて確認する。

目的2. 単離したグリア細胞の可塑性解析(in vitro)

FACSにより細胞選別した後の細胞を種々の培養条件で培養し、グリア細胞の神経細胞への可塑性を検討する。培養条件の検討項目には浮遊培養、接着培養、培地の組成、培養器の二酸化炭素濃度が含まれる。また、神経分化に重要な転写因子を強制発現させて、グリア細胞とそれ以外の細胞の competence を比較検討する。聴神経細胞のサブタイプ(双極性神経・グルタミン酸作動性神経)に最もよく分化する分化条件を決定し、その分化条件で培養したグリア細胞と、発生中の内因性聴神経細胞の遺伝子発現の差異を比較検討する。

目的3. グリア細胞から聴神経への誘導(in vivo)

目的2で決定した in vitro の結果を in vivo に応用する。聴神経障害のモデル動物を作成し、グリア細胞に遺伝子導入あるいは成長因子の投与を試みる。グリア細胞からの神経分化は組織評価にて行い、聴覚の機能解析は聴性脳幹誘発反応(ABR)あるいは電気刺激による聴性脳幹誘発反応(eABR)を用いる。

3. 研究の方法

目的1に対する方法: 生後の Sox10-Venus マウス(シュワン細胞に Venus を発光するマウス)あるいは Sox2-GFP マウスのラセン神経節を摘出し、酵素(トリプシン)処理して単細胞化する。その後 FACSにて GFP 陽性神経細胞(グリア細胞)と GFP 陰性細胞に分別する。GFP 陽性グリア細胞から RNA を抽出し-80°C で保存し後からトランクリプトーム解析に用いる。単離したグリア細胞に既知のグリア細胞特に、シュワン細胞のマーカー p75(Whitlon et al., 2010), Sox10(Wakaoka et al., 2013), Sox2 (Lang et al., 2015)が発現していることを、免疫組織化学・定量的 PCR 法により確認し、FACSによる細胞選別の妥当性を示す。

目的2Aに対する方法: 遺伝子導入によるグリアから神経細胞へのダイレクトリプログラミング Sox10-Venus 陽性グリア細胞に Ascl1, Neurog2, Nurr1, Myt1l などのロバストな神経誘導能のある遺伝子, 加えて NeuroD1, Neurog1, Eya1, などの聴神経発生に必要な遺伝子をトランスフェクトする。トランスフェクトには Lipofectamine® LTX Reagent あるいは電気穿孔法を用いる。使用するベクターは pIRES2.DsRedExpress2(Clontech)を用い、本ベクターの MCS に発現

させたい遺伝子の CDS を挿入する。目的遺伝子がトランスフェクトされたことは DsRed の発光で確認可能である。本ベクターは申請者がかつて所属しかつ現在共同研究している Dabdoub 研究室で申請者自身が作成しいつでも利用可能である。作成した神経細胞が他の神経マーカー (TuJ1, Map2) 加えて聴神経特異的なマーカー遺伝子 (Prox1, Gata3, Vglut1) を発現しているか否か調べてより聴神経に近い神経細胞 (iPAN) を作成する。

目的 2B に対する方法 : sphere 作成によるグリアから神経細胞への自発的誘導に対する方法
ラセン神経節の sphere 形成能を持つ細胞の本体はグリア細胞であると本年報告された (Lang et al., 2015)。目的 1A では転写因子の強制発現による神経誘導を検証するが、本実験においては sphere 形成からの自発的な聴神経細胞への誘導を試みる。Lang らの報告では分化された神経のサブタイプの検証は行っていないが、本実験では聴神経と同じ双極性・興奮性グルタミン酸作動性神経に分化した神経細胞の誘導効率を定量化し、聴神経への分化誘導効率を最大化する条件を検討する。

目的 2C に対する方法 : グリア細胞由来聴神経様細胞の網羅的遺伝子解析による聴神経分化誘導法の洗練

オリジンとなるラセン神経節グリア細胞、内因性の聴神経細胞、グリア細胞から誘導された神経細胞の単一細胞から RNA を抽出し、RNA-seq を行う。発生中の内耳感覚上皮の遺伝子プロファイルを単一細胞で行う報告がなされた (Burns et al., 2015) が、本研究においては、より内因性の神経に近い細胞を誘導する手がかりを得るために、人為的に作成した神経細胞と内因性の神経細胞のプロファイルの比較検討を行う。

目的 3 に対する方法 : グリア細胞由来聴神経細胞の生体内 (in vivo) での作成と聴覚機能の解析
まず聴神経障害の動物モデルを作成する。Na-K-ATPase 阻害剤のウアバインの局所投与が聴神経を選択的に阻害することが報告されている (Schmiedt, 2002; Lang 2005; Yuan, 2013)。申請者は同報告に準じてモルモットの聴神経障害モデルを作成した経験がある。聴神経の障害後もラセン神経節中のシュワン細胞は死滅せず増殖することが報告されている (Lang 2011)。ラセン神経節のシュワン細胞への高い導入効率が報告されている AAV-8 を遺伝子導入に利用する (Kilpatrick 2011)。遺伝子導入の別の方法として人工内耳電極を電気穿孔法の電極として使用する方法が報告されている (Pinyon 2014) ので、アデノ随伴ウイルスベクターの方法と並行して電気穿孔法も試みる。遺伝子導入と合わせて神経成長因子 (BDNF, NT-3) を浸透圧ポンプ経路で蝸牛内に投与する。聴覚機能は遺伝子投与から 3 ヶ月後まで毎週 ABR, eABR (電気刺激聴性脳幹誘発反応 : 電極で直接聴神経を刺激して脳幹反応を測定する聴覚検査) を測定する。組織評価にて行う。

4. 研究成果

平成 28 年度

一次聴覚神経細胞であるラセン神経節細胞をシュワン細胞から誘導することが当研究の目的である。ラセン神経節細胞には内有毛細胞に接続する I 型ラセン神経節細胞と外有毛細胞に接続する II 型ラセン神経節細胞が存在するが、共通の神経芽細胞からどのようなメカニズムでそれぞれのラセン神経節細胞に分化するかは知られていなかった。各神経細胞分化メカニズムを解明する端緒として、I 型、II 型ラセン神経節細胞に特異的に発現する転写因子の探索を試みた。成獣マウス蝸牛の凍結切片を用いて免疫組織化学的手法により、I 型ラセン神経節細胞は Gata3 が、II 型ラセン神経節細胞は Prox1 がアップレギュレートされることを見いだした。これらの結果は学術雑誌 PLOS ONE に Dynamic Expression of Sox2, Gata3, and Prox1 during Primary Auditory Neuron Development in the Mammalian Cochlea のタイトルで論文発表した。また、生体内でのシュワン細胞からラセン神経節細胞へのダイレクトリプログラミングを目指して、聴神経の変性動物モデルを作成した。成獣マウスに神経毒のウアバインを内耳局所投与し、聴覚機能検査 (聴性脳幹誘発反応) 組織学的検査を行った。ウアバイン投与 1 週後で聴性脳幹誘発反応は大幅に上昇し、組織学的にラセン神経節細胞の選択的な変性を確認した。ロバストな神経誘導転写因子である ASCL1 をアデノ随伴ウイルスベクター (AAV8) により成獣マウス内耳に局所投与を行った。ウイルスはラセン神経節細胞を取り囲むシュワン細胞に感染したが、ASCL1 によるシュワン細胞から神経細胞への形質転換は確認することが出来なかった。

平成 29 年度

ラセン神経節非神経細胞からラセン神経節へのダイレクトリプログラミングを試みた。in vitro 実験として生直後のラセン神経節非神経細胞から神経細胞の誘導に成功した。誘導された神経細胞は、蝸牛有毛細胞 (末梢) や蝸牛神経核細胞 (中枢) に向けて神経突起を伸張した。誘導された神経細胞から RNA を抽出し RNAseq による解析を行った。結果、誘導された神経細胞は元のラセン神経節非神経細胞と目的とするラセン神経節細胞の中間的な性質を持つことが判明した。今後の目標は培養期間を長くする、あるいは誘導に用いる転写因子を増やして、誘導神経細胞の品質を向上させることである。成体のラセン神経節非神経細胞の培養系の樹立を試

みるも難渋した。理由は成体では蝸牛が骨化するために細胞の採取が困難で、かつ骨組織の除去が初代培養においては特に困難であったことによる。ラセン神経節非神経細胞の培養法については、Method paper として Front Neurosci. 誌に平成 30 年度アクセプトされた (Meas et al., 2018)。In vivo 実験としてラセン神経節の障害モデル動物 (モルモット) を作成した。その過程で、マウスを用いて見いだしたタイプ II ラセン神経節の新たなマーカー Gata3 がモルモットにおいてもタイプ II ラセン神経節細胞に発現することを見いだした。In vivo 実験においてラセン神経節細胞の障害と、ラセン神経節非神経細胞への遺伝子導入を同時に施行することで、遺伝子導入から 3 週後、機能的な聴覚回復は得られなかったものの、組織学的に非神経細胞から神経細胞へリプログラミングされた細胞を確認した。

平成 30 年度

生後 1 日目のマウスラセン神経節を酵素で単細胞化して、in vitro での培養に成功した。ラセン神経節には神経細胞、非神経細胞が含まれるが、非神経細胞はさらに、グリア細胞と非グリア細胞に分類される。Sox2-GFP マウスを用いて、ラセン神経節を Sox2 陽性グリア細胞と、Sox2 陰性グリア細胞に FACS でソートした。グリア細胞と非グリア細胞の神経細胞へ分化転換する能力 (competence) を転写因子 Ascl1 を強制発現させて、比較した。結果、グリア細胞から神経細胞への分化誘導効率が有意に高かった。また、神経細胞は、ラセン神経節細胞に発現する、Prox1 や Vglut1 を発現した。さらに、野生型の成獣マウスラセン神経節細胞を単細胞化し、ラセン神経節内のグリア細胞の培養に成功した。継代により骨組織を除去し、培養皿は Matrigel でコートすることで比較的均一なグリア細胞を死滅させずに培養できた。また、酵素で単細胞化しないラセン神経節を器官培養し、神経突起の伸張や、グリア細胞の生存を確認した。成果は、Front Neurosci 誌に論文発表した。昨年度、マウスラセン神経節細胞の障害モデルを、Na-K-ATPase 阻害剤のウアバイン内耳局所投与により作製したが、同モデルの前庭神経節細胞を免疫組織化学的に解析した。前庭神経節内の神経細胞には Na-K-ATPase 陽性細胞と Na-K-ATPase 陰性細胞が存在することが判明し、機能的な相関が示唆された。また、マウスラセン神経節細胞の障害モデルはローリングの行動異常を呈するために、前庭眼反射を測定して前庭機能の評価した。ウアバイン投与側で、コントロール群と比べて VOR gain が低下していた。本成果は、2019 年 2 月米国ボルチモアで開催された第 42 回基礎耳鼻咽喉科学会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Meas, SJ, Nishimura K, Scheibinger M, Dabdoub A. In vitro methods to cultivate spiral ganglion cells, and purification of cellular subtypes for induced neuronal reprogramming. Front Neurosci. 2018 Nov 13;12:822. doi: 10.3389/fnins.2018.00822. eCollection 2018.
2. Yamahara K, Nishimura K, Ogita H, Ito J, Nakagawa T, Furuta I, Kita T, Omori K, Yamamoto N. Hearing preservation at low frequencies by insulin-like growth factor 1 in a guinea pig model of cochlear implantation. Hear Res. 2018 Oct;368:92-108. doi:10.1016/j.heares.2018.07.004.
3. Noda T, Meas SJ, Nogami J, Amemiya Y, Uchi R, Ohkawa Y, Nishimura K, Dabdoub A. Direct Reprogramming of Spiral Ganglion Non-neuronal Cells into Neurons: Toward Ameliorating Sensorineural Hearing Loss by Gene Therapy. Front Cell Dev Biol. 2018 Feb 14;6:16. doi: 10.3389/fcell.2018.00016. eCollection.
4. Nishimura K, Noda T, Dabdoub A. Dynamic Expression of Sox2, Gata3, and Prox1 during Primary Auditory Neuron Development in the Mammalian Cochlea. PLoS One. 2017 Jan 24;12(1):e0170568.
5. Dabdoub A, Nishimura K. Cochlear Implants Meet Regenerative Biology: State of the Science and Future Research Directions. Otol Neurotol. 2017 Sep;38(8):e232-e236.
6. Ueyama T, Ninoyu Y, Nishio SY, Miyoshi T, Torii H, Nishimura K, Sugahara K, Sakata H, Thumkeo D, Sakaguchi H, Watanabe N, Usami SI, Saito N, Kitajiri SI. Constitutive activation of DIA1 (DIAPH) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. EMBO Mol Med. 2016 Nov 2;8(11):1310-1324.
7. Mulvaney JF, Thompkins C, Noda T, Nishimura K, Sun WW, Lin SY, Coffin A, Dabdoub A. Kremen1 regulates mechanosensory hair cell development in the mammalian cochlea and the zebrafish lateral line. Sci Rep. 2016 Aug 23;6:31668.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Nishimura K, Ogita H, Meas SJ, Taura A, Ito J. Generation of a mouse model of unilateral vestibular dysfunction. The 42nd annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, February

- 9-13, 2019.
2. 西村幸司、野田哲平、山本亮介、伊藤壽一、大森孝一 . Gata3 陽性タイプ II ラセン神経節細胞はタイプ IIA とタイプ IIB に分類される . 第 28 回日本耳科学会総会・学術講演会、2018 年 10 月 4 - 5 日、大阪 .
 3. 西村幸司、牛呂幸司、小紫彩奈、松本昌宏、藤野清大、大森孝一 . C4/5 椎間孔から生じた類皮嚢胞の 1 例 . 第 129 回日耳鼻京滋合同地方部会、2018 年 3 月 17 日、大津 .
 4. 西村幸司、大森孝一 . ダイレクトリプログラミングによる蝸牛神経の再生 遺伝子治療による感音難聴治療戦略の開発 . 第 63 回日本聴覚医学会総会・学術講演会、2018 年 10 月 18-19 日、神戸 .
 5. Nishimura K, Ogita H, Nakagawa T, Ito J. Hearing preservation after the implantation of an artificial auditory epithelium in the guinea pig cochlea. The 41st annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology. San Diego, CA, USA, February 10-14, 2018.
 6. Nishimura K, Ito J, Omori K. Cochlear implantation in otosclerosis: usefulness of intraoperative NRT and EABR monitoring to prevent facial nerve stimulation. 15th international conference on cochlear implants and other implantable auditory technology. Antwerp, Belgium, June 27-30, 2018.
 7. 西村幸司、松岡卓、松本昌宏、藤野清大 . 咽頭梅毒の 1 例 . 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 . 2017 年 5 月 18 日-20 日、広島 .
 8. 西村幸司、松本昌宏、扇田秀章、伊藤壽一 . 耳硬化症に対する人工内耳手術 術中 NRT および eABR の有用性の検討 . 第 27 回日本耳科学会総会・学術講演会、2017 年 11 月 23 - 24 日、横浜 .
 9. Nishimura K, Noda T, Dabdoub A. Expression of Sox2, Sox10 and Gata3 during spiral ganglion development and maturation in the mammalian cochlea. The 40th annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, February 11-15, 2017.
 10. 西村幸司、野田哲平、ダブドゥブアラン . ダイレクトリプログラミングによる聴神経の再生 . 第 37 回日本炎症・再生学会、2016 年 6 月 16-17 日、京都 .
 11. 西村幸司、野田哲平、ダブドゥブアラン . マウスラセン神経節における Sox2 および Sox10 の時空間的発現パターン解析 . 第 26 回日本耳科学会、2016 年 10 月 5-8 日、長野 .
 12. 西村幸司、山原康平、扇田秀章、中川隆之、伊藤壽一、山本典生 . 人工内耳電極挿入による蝸牛障害保護を目的とした rhIGF-1 内耳局所投与-モルモットを用いた検討-. 第 61 回日本聴覚医学会総会・学術講演会、2016 年 10 月 20-21 日、盛岡 .
 13. Nishimura K, Ogita H, Yamahara K, Yamamoto N. A role of recombinant human insulin-like growth factor-1 in the prevention of cochlear damage due to electrode insertion using a guinea pig as an animal model. 14th international conference on cochlear implants and other implantable technologies. Toronto, Canada, May 11-14, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

1. 西村幸司、田浦晶子 . 10 章 遺伝子、その他難病における診断・治療の現状と求める医薬品・医療機器・再生医療像 第 12 節 突発性難聴 . 株式会社 技術情報協会 発刊書籍 No.1969「希少疾患用医薬品の適応拡大と事業性評価」pp531-538(2018年11月)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : アラン・ダブドゥブ

ローマ字氏名 : Alain Dabdoub

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。