

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11344

研究課題名(和文) Tlx3によるES細胞から内耳前駆細胞への分化誘導法の確立と内耳再生医療への応用

研究課題名(英文) Establishment of differentiation induction method from ES cells to inner ear progenitor cells by Tlx3 and application to inner ear regenerative medicine

研究代表者

秦 龍二 (Ryuji, Hata)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：90258153

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)：T-cell leukemia homeobox 3 (Tlx3) は内耳神経細胞へと発生運命の決定した細胞に発現し、内耳前駆細胞への分化誘導マーカーと考えられている。このTlx3遺伝子座にreporter gene (eGFP) をノックインさせたマウスES細胞を作成したが、eGFPの発現を認めなかった。そこで同様に内耳前駆細胞への分化誘導マーカーと考えられているNeurogenin2の遺伝子座にeGFPをノックインさせたマウスES細胞を作成したところ、Neurogenin2とeGFPの共発現を認めた。現在このES細胞株を用いて、ES細胞からの内耳前駆神経細胞への分化誘導法の確立を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では感音難聴は軽度なものを含めると65歳以上では約6割に認められ、75歳以上では実に3分の1が日常生活に支障をきたすレベルの感音難聴を有することが知られている。ヒトにおいては出生後は内耳有毛細胞や聴神経細胞は一度障害されると再生しないとされ、感音難聴の治療は不可能と考えられてきた。最近、ES細胞から聴神経細胞や内耳有毛細胞への分化が可能な内耳前駆細胞を誘導し、最終的には内耳様組織への分化誘導が可能であることが報告された。従って、ES細胞から効率良く内耳前駆細胞を誘導する方法を確立することは、将来の内耳再生療法を確立するための重要な基礎技術となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TLX3 is expressed in cells whose fate is determined to be inner ear progenitor cells and is considered to be an excellent marker for inducing differentiation into inner ear progenitor cells. To establish the methods for selecting inner ear progenitor cells, we produced mouse ES cells in which a reporter gene (= eGFP) was knocked in at the TLX3 locus. In these ES cells, however, GFP expression was not observed even after incubation under differentiation conditions.

Neurogenin2 is also considered to be an excellent marker for inducing differentiation into inner ear progenitor cells. We, therefore, produced mouse ES cells in which a reporter gene (= eGFP) was knocked in at the Neurogenin2 locus. and in these ES cells, eGFP expression was observed after incubation under differentiation conditions. Using this mouse ES cells, we are now trying to establish the methods for selecting inner ear progenitor cells.

研究分野：神経科学

キーワード：再生医療 内耳前駆細胞 ES細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

感音難聴の代表的な疾患である突発性難聴は40~50歳代に好発し、急激に発症して高度の感音難聴をきたす疾患であり、我が国では年間約2万5000人が罹患している(Clin. Otolaryngol. Allied Sci. 27: 458, 2002)。そして感音難聴の多くは内耳性難聴であり、内耳有毛細胞や聴神経細胞(=ラセン神経節細胞)に障害が見られることが報告されている。更に感音難聴は軽度なものを含めると65歳以上では約6割に認められ、75歳以上では実に3分の1が日常生活に支障をきたすレベルの感音難聴を有することが知られている。

哺乳類においては内耳有毛細胞(特に蝸牛有毛細胞)と聴神経細胞の形成は発生時に限られ、出生後は内耳有毛細胞や聴神経細胞は一度障害されると再生しないとされ、感音難聴の治療は不可能と考えられている。従って、従来治療不可能とされた感音難聴を治療する唯一の手段が各種幹細胞を用いた内耳再生療法と考えられる。実際神経幹細胞、胚性幹細胞(ES細胞)、iPS細胞などの移植によって内耳有毛細胞や聴神経細胞が再生することが報告されている(Regen Med. 8:309-18, 2013; Nat Rev Drug Discov. 14:346-65, 2015)。

我々も神経幹細胞を内耳に移植したところ、内耳有毛細胞に分化して虚血性内耳障害が軽減する事を明らかにした(Neuroreport. 16:1545-49, 2005)。更に造血幹細胞や骨髄単核球は、内耳有毛細胞や聴神経細胞には直接分化しないがGDNF等の液性保護因子を分泌することで、虚血性内耳障害を軽減させることを明らかにした(Neuroscience. 145: 923-30, 2007; Neuroreport. 25: 807-813, 2014)。一方ヒトiPS細胞や神経幹細胞の分化機構に関しても基礎的検討を行ってきた(J Neurochem. 98: 459-70, 2006; BBRC 394:843-7, 2010; Cell Stem Cell 12:487-96, 2013)。

2. 研究の目的

内耳再生に用いられる幹細胞としては、ES細胞、iPS細胞や内在性内耳幹細胞が挙げられる。最近、ES細胞から耳胞(otic vesicles)を経て、聴神経細胞や内耳有毛細胞への分化が可能な内耳前駆細胞を誘導し、最終的には内耳様組織(inner ear organoid)への分化誘導が可能であることが報告された(Nature. 500: 217-21, 2013; Nat Protoc. 9: 1229-44, 2014)。我々も追加確認実験を行ったが、目的の組織に分化誘導できたものは数%に過ぎなかった。従って内耳前駆細胞を分別する方法を確立する必要性が考えられた。

T-cell leukemia homeobox 3(Tlx3、別名Hox11L2、Rnx)はオーファンホメオボックス遺伝子の1つであり、GABA作動性ニューロンをグルタミン作動性ニューロンへ移行させるセレクター遺伝子として働くことが知られている(Nat Neurosci. 7: 510-517, 2004)。Tlx3はマウスでは発生の初期(E9)に内耳神経節(cochleovestibular ganglion, VIII)で発現が認められ、耳胞から遊出して内耳神経節を形成する神経前駆細胞にもその発現が認められることが知られている(PNAS USA, 105: 5780-85, 2008)。その後の検討で、Tlx3は内耳神経細胞へと発生運命の決定した細胞に発現し、Wntシグナル系を介して、知覚性神経細胞を分化・誘導する機能を有していることが明らかとなった(Stem Cells 29: 836-846, 2011)。

以上よりTlx3の発現は内耳神経細胞の発生に極めて重要であり、Tlx3は内耳前駆細胞への優れた分化誘導マーカーと考えられた。そこで本研究では、Tlx3にreporter gene(EGFP)をノックインさせ、マウスES細胞からの内耳前駆神経細胞への分化誘導法の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) ES細胞

理化学研究所バイオリソースセンターから提供されたマウスES細胞EB5(RBRC-AES0151)を実験に用いた。EB5は14tg2aより作成されたES細胞であり、Pou5f1遺伝子座にIRES-BSD-pAカセットを導入することにより、抗生物質BlasticidinS存在下で未分化細胞のみが維持される。

(2) ゲノム編集によるノックイン

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集にはベクター-pX330 (addgene) を用いた。標的配列はウェブデータベースを使用した。ベクターの導入には Nucleofector 2b (Lonza) と Amaxa Mouse ES Cell Nucleofector Kit (Lonza) を用いた。Tlx3 遺伝子の翻訳終了点 (= TGA) 直後にレポーター遺伝子の eGFP をノックインさせ、Tlx3 が発現すると緑色の蛍光を発する ES 細胞を作製した。

(3) 細胞培養

作成した ES 細胞を維持培地から内耳分化誘導培地へ変更し分化誘導を行った。そして Tlx3 遺伝子を発現して eGFP 陽性となっている内耳前駆細胞を FACS Sorter で選別することを試みた。内耳細胞への分化誘導は Koehler 等の方法 (Nat Protoc. 9:1229-44, 2014) に従って BMP4 や FGF2 などを順次添加することで内耳系への分化誘導を行った。

(4) 免疫組織化学および免疫細胞化学

胚様体を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、スクロース溶液で置換し、続いて O. C. T. Compound に包埋、凍結切片を作成した。一次抗体として抗 GFP 抗体を、二次抗体として抗ウサギ抗体 Alexa568 を作用させた。分散培養した神経幹細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、一次抗体、二次抗体を作用させた。観察には蛍光顕微鏡を用いた。

(5) 定量 PCR

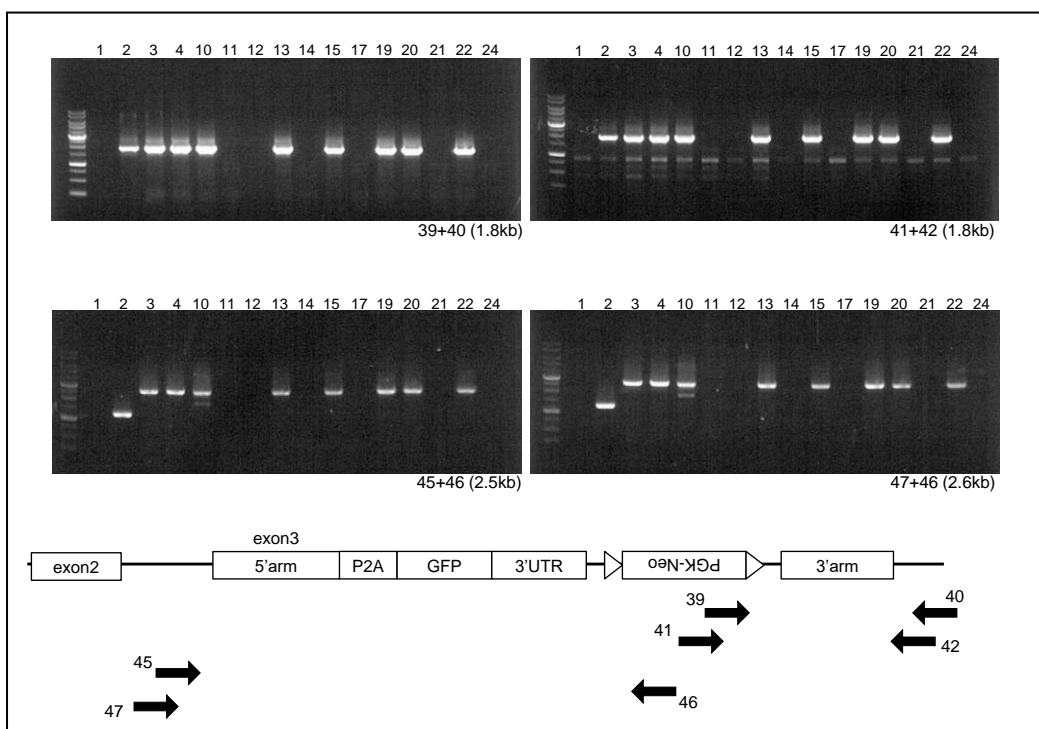
定量 PCR は Thunderbird qPCR Master Mix (Toyobo) および 7900HT (ABI) で実施した。

(6) セルソーティング

セルソーティングは Astirios (Beckman Coulter) を用いて行った。

4. 研究成果

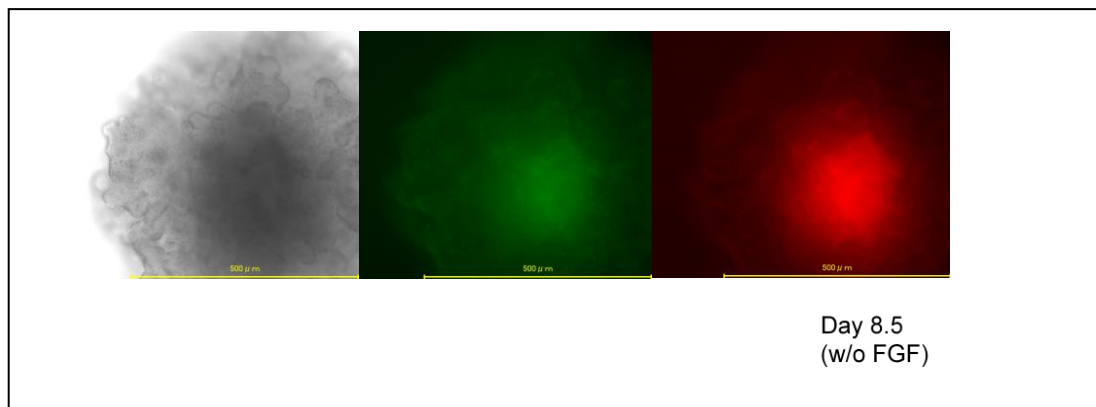
1) Tlx3 遺伝子の翻訳終了点 (= TGA) 直後にレポーター遺伝子の eGFP をノックインさせ、Tlx3 が発現すると緑色の蛍光を発する ES 細胞を作製した。Nucleofection により EB5 にターゲティングベクターと CRISPR/Cas9 (#11) を導入し、G418 耐性コロニーから 16 クローンを取得した。この 16 クローンより更に PCR によってスクリーニングを行い、8 クローンを得た。



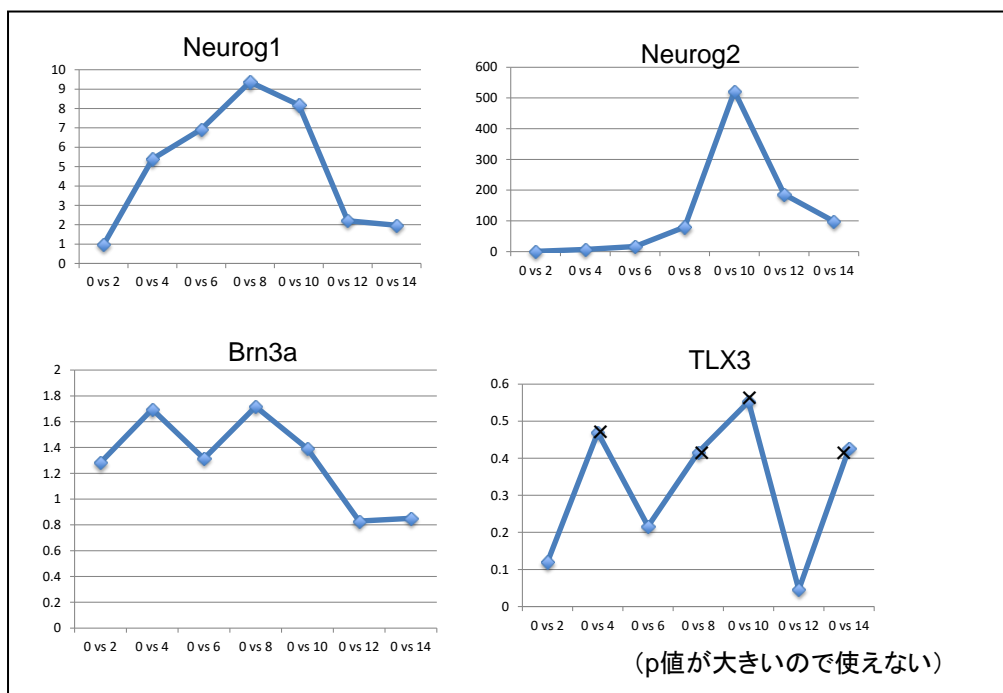
2) 作成した ES 細胞の内耳系の分化誘導

Koehler 等の方法 (Nat Protoc. 9:1229-44, 2014) に従って BMP4 や FGF2 など を順次添加することで内耳系への分化誘導を行った。

分化誘導 8 日目 で検討したが、緑の蛍光を発する細胞は肉眼的には認められなかった。

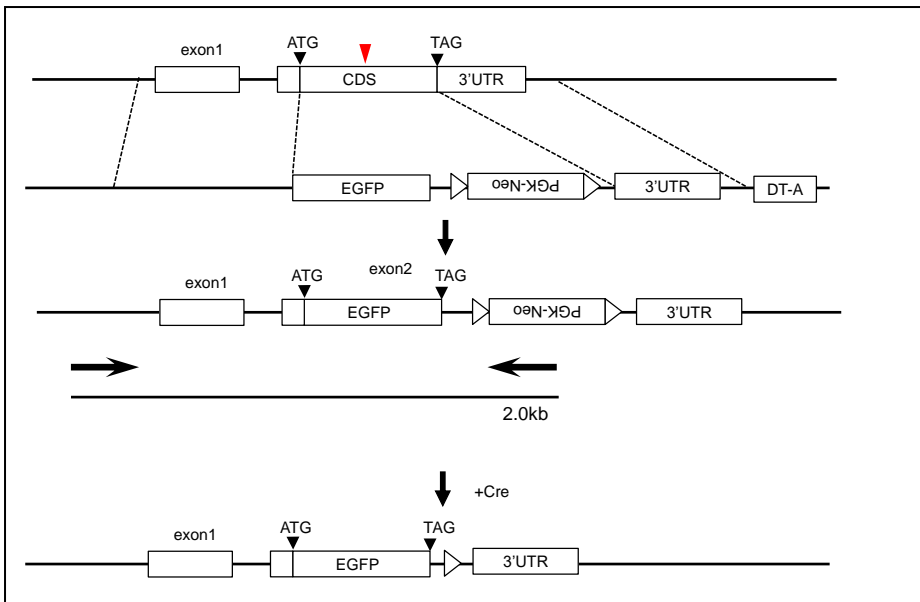


このため定量 PCR 法を用いて Tlx3 や他の知覚神経系へのマーカー遺伝子である neurogenin1、neurogenin2、Brn3a の遺伝子発現解析を行った。その結果 neurogenin1、neurogenin2 の発現上昇を認めたが、Brn3a と Tlx3 の発現変化を認めなかった。

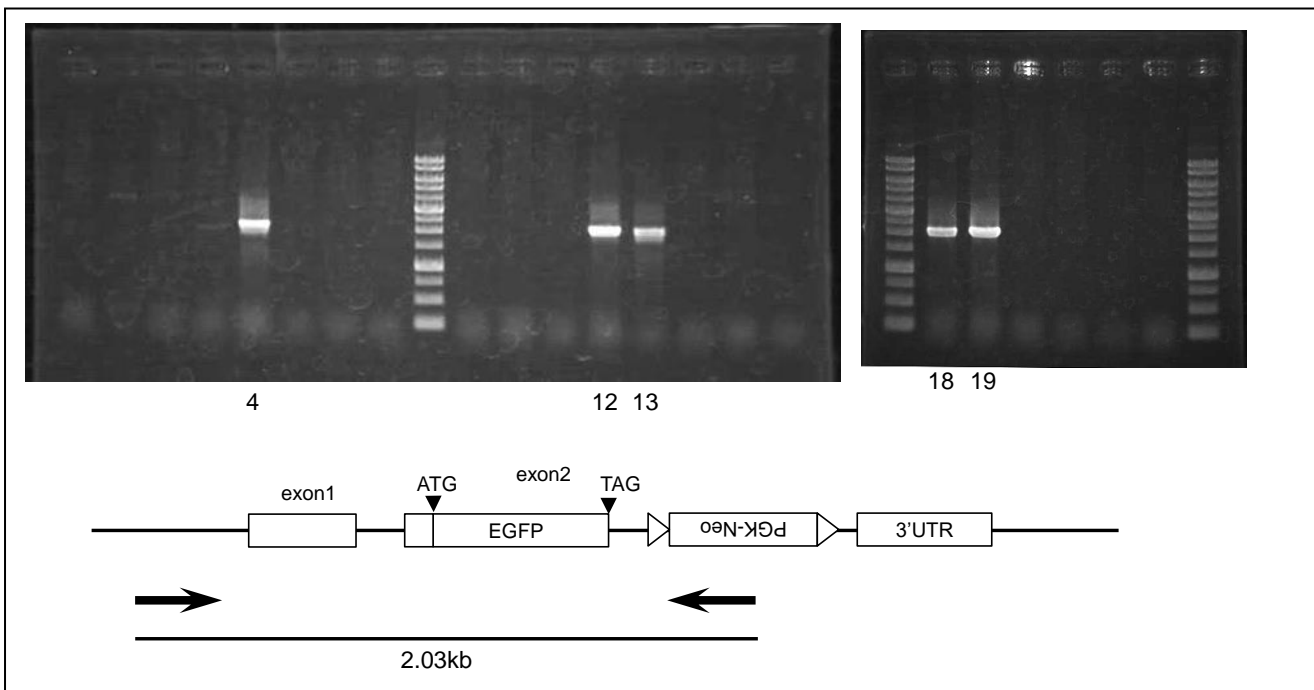


次ぎに分化条件を変更し Wnt-1 を始めとして様々な因子を追加投与し、Tlx-3 の発現が見られるかどうか検討したが、発現上昇を認めなかった。

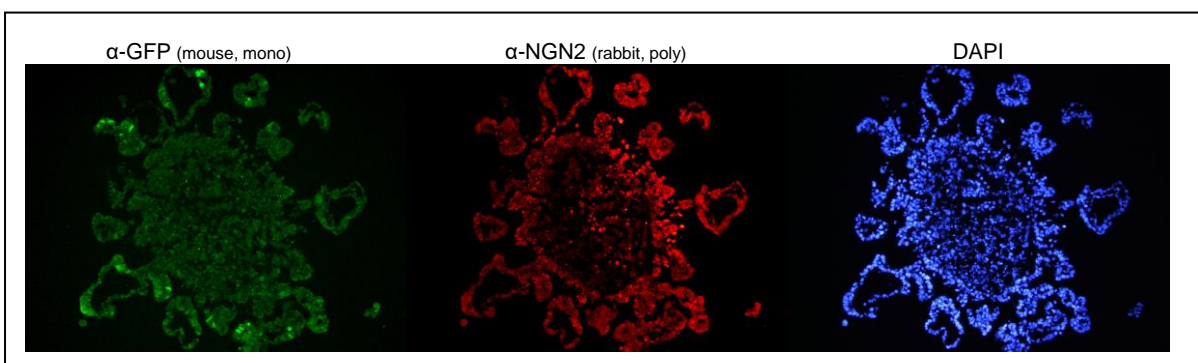
そこで、Tlx-3 ではなく明らかに発現上昇を認めた Neurogenin-2 に reporter 遺伝子 (eGFP) をノックインした ES 細胞の作成を試みた。



上記 targeting vector と Cas9 ベクターを EB5 に導入し、G418 耐性コロニーから 20 クローンを取得した。この 16 クローンより更に PCR によってスクリーニングを行い、5 クローンを得た。



更に免疫染色により neurogenin2 の発現と GFP の発現を検討した。その結果両者が共発現していることを確認した。



現在この新たに作成した ES 細胞株を用いてマウス ES 細胞からの内耳前駆神経細胞への分化誘導の条件の検討を開始している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Yahata, Yuji Matsumoto, Minoru Omi, Naoki Yamamoto, Ryuji Hata	4. 巻 7
2. 論文標題 TALEN-mediated Shift of Mitochondrial DNA Heteroplasmy in MELAS-iPSCs With m.13513G>A Mutation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1038/s41598-017-15871-y	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八幡直樹、松本祐嗣、尾身 実、山本直樹、秦 龍二
2. 発表標題 TALENを用いたMELAS患者由来iPS細胞における変異ミトコンドリアDNA比率の改変
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡直樹、松本祐嗣、尾身 実、山本直樹、秦 龍二
2. 発表標題 TALENを用いたMELAS患者由来iPS細胞における変異ミトコンドリアDNA比率の改変
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡直樹、松本祐嗣、尾身 実、山本直樹、秦 龍二
2. 発表標題 TALENを用いたMELAS患者由来iPS細胞における変異ミトコンドリアDNA比率の改変
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ミトコンドリア病誘発変異型mtDNA率の異なるiPS細胞群	発明者 秦 龍二等	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6463439	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	尾身 実 (Omi Minoru) (00400416)	藤田医科大学・医学部・助教 (33916)	
研究分担者	内藤 健晴 (Naitou Kensei) (10172248)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	吉岡 哲志 (Yoshioka Satoshi) (20648539)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	