

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02953

研究課題名(和文) 遺伝子改変難聴モデルマウスとiPS細胞を用いた聴毛形成と周波数弁別機構の解明

研究課題名(英文) Hair bundle formation and tonotopy in genetic hearing loss models and the iPS cells

研究代表者

神谷 和作 (kamiya, kazusaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10374159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、音感の異常を主訴とする周波数弁別の異常が散見されるが、その原因は不明で客観的診断基準がなくその解明が求められる。我々は、周波数弁別異常を持つマウスを発見し、予測される基底回転(高音域)から頂回転(低音域)への基板振動の伝搬異常を確認した。さらにこの異常の原因となりうる変動要素を蝸牛モデルのシミュレーションにより解析し、高音難聴モデルでは、入力音と異なる周波数を知覚する可能性が示唆された。さらにiPS細胞から蝸牛細胞を作製する技術開発により難聴病態を再現し、同様の方法で有毛細胞の作製を行うことに成功しており、今後内耳細胞治療の臨床応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、周波数弁別の異常が散見されるがその原因は不明である。我々は遺伝子改変マウスの外有毛細胞の聴毛形成異常により、周波数弁別異常を持つ聴覚障害を発見した。同マウスは周波数弁別異常を持つ初めてのモデル動物であり、周波数弁別機構と聴覚神経系発達への影響を解明できる有用なモデルとなる。さらに我々はiPS細胞から蝸牛細胞を作製する技術開発により難聴病態を再現し、同様の方法で有毛細胞の作製を行った。周波数弁別異常マウスおよび同マウスiPS細胞由来有毛細胞を用いた生理学、分子生物学的解析により聴毛形成異常の機構や周波数弁別による聴覚神経系の適応発達の機構を解明しており、今後新しい内耳治療法が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, abnormalities in frequency discrimination have been observed in some patients with abnormal sound perception, but the cause of these abnormalities is unknown and there are no objective diagnostic criteria. We reported the mice with abnormal frequency discrimination and confirmed the predicted abnormal propagation of basal membrane vibration from basal (high frequency) to apical (low frequency) rotation. We further elucidated the possible causes of this abnormality by simulating the cochlear model and suggested the possibility that high frequency hearing loss model abnormally recognize the sound as a low frequency sound. Furthermore, by developing a technology to generate cochlear cells from iPS cells, they were able to reproduce the pathophysiology of hearing loss and succeeded in generating hair cells using the same method, which is expected to lead to clinical applications of inner ear cell therapy in the future.

研究分野：難聴

キーワード：蝸牛器官培養 遺伝性難聴 人工多能性幹細胞 難聴マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難聴は患者の QOL を著しく低下させることが知られているが、その根本的な治療法は開発されていない。蝸牛では音の周波数帯により特定領域の有毛細胞に限定的に振動を伝える機構により厳密な音の周波数弁別を可能としているが、近年、音感の異常を主訴とする周波数弁別の異常が散見されている。しかし、その原因は不明で客観的診断基準がなく、その解明が強く求められている。

### 2. 研究の目的

蝸牛では音の周波数帯により特定領域の有毛細胞に限定的に振動を伝える機構により厳密な音の周波数弁別を可能としている。近年、音感の異常を主訴とする周波数弁別の異常が散見されるがその原因は不明で客観的診断基準がないのが現状である。我々は遺伝子改変マウスの外有毛細胞の聴毛形成異常により、著しい周波数弁別異常を持つ全く新しいタイプの聴覚障害を発見した。同マウスは周波数弁別異常を持つ初めてのモデル動物であり、周波数弁別機構と聴覚神経系発達への影響を解明できる有用なモデルとなる。さらに iPS 細胞から蝸牛細胞を作製する技術開発により難聴病態を再現し、同様の方法で有毛細胞の作製を行っている。本課題では**周波数弁別異常マウスおよび同マウス iPS 細胞由来有毛細胞を用いた生理学、分子生物学的解析により聴毛形成異常の機構や周波数弁別による聴覚神経系の適応発達の機構を解明**する。

### 3. 研究の方法

聴毛形成過程の iPS 細胞を用いた再現と形成異常機構の比較解析申請者らが開発した iPS 細胞からの内耳細胞作製の技術は、既報の有毛細胞作製技術を応用しており有毛細胞の作製も可能であった。この **iPS 細胞由来有毛細胞をマウスから作製し、聴毛形成の変化をリアルタイム解析するための分化誘導法の最適化を行った。**

(1) iPS 細胞からの内耳有毛細胞の作製これまで開発した内耳への分化誘導法 (Fukunaga, Stem Cell Reports, 2016) を改良し、有毛細胞を含む蝸牛上皮シートを作製する最適な培養法を検討した。

(2) マルチ電極システムによる電位測定: iPS 由来内耳細胞シートにより自発的活動を示す電位変化を測定し、聴毛配列異常による活動電位への影響を解析した。

#### 蝸牛シミュレーションモデル解析による蝸牛トノトピーに及ぼす外有毛細胞の影響

##### ヒト蝸牛における二音抑制のシミュレーション解析

ヒト蝸牛における二音抑制を再現するために、プローブ音と抑制音からなる複合音を active 状態のモデルのアブミ骨頭に与え、その際の基底板の振動挙動を解析した。プローブ音の周波数 ( $f_p$ ) を 4 kHz とし、抑制音の周波数 ( $f_s$ ) はそれより低い 1 kHz とした。プロ

ーブ音の音圧 ( $L_p$ ) は外耳道において 60 dB SPL とした。ここで、中耳のテコ比と面積比による増幅を 40 dB と仮定し、実際にはアブミ骨頭に 2 Pa の圧力を負荷して解析を行った。抑制音の音圧 ( $L_s$ ) は、プローブ音との音圧差 ( $L_s - L_p$ ) が 20 ~ 40 dB となる様にした。プローブ音のみを与えた解析と複合音を与えた解析を行い、基板振動の様子を比較した。

#### 高音難聴耳における基板振動挙動の解析

20 ~ 40 kHz の CF 位置に該当する基板上の外有毛細胞の 80 ~ 90% に異常があるマウス、すなわち高音難聴が生じているマウスに 27, 32, 40 kHz の音刺激を入力すると、入力周波数より低い周波数である約 12 kHz を知覚する可能性が報告されていた。この実験では、特に入力周波数よりも 1 ~ 2 オクターブ低い音として知覚する可能性があった。ヒトにおいても高音難聴を患っている患者が高周波数の音をより低い周波数の音として知覚する可能性があることが臨床的に報告された。しかし、この現象のメカニズムは解明できていなかった。そのため、外有毛細胞の加振力減少時の基板振動解析からそのメカニズムの解明を試みた。

基板の基部側ほど、その CF は高周波数となるため、高音難聴を患っている場合には、基板基部側の外有毛細胞の働きが減少しているものと考えられた。そこで、図 7 の様に 4 kHz の CF 位置 (正規化距離 0.43) より基部側の加振力を正常の active 状態の 0.1 倍 (OHC0.1 状態) とし、4 kHz 以上の高音難聴耳を模したモデルを作成した。音刺激として周波数 4 kHz ( $f$ )、音圧 ( $L$ ) 60 dB および 100 dB の純音を用いた。passive 状態、active 状態、OHC0.1 状態のモデルのアブミ骨頭に音刺激を与え、それぞれの基板の振動挙動を解析した。また、臨床報告等により、入力周波数より 1 ~ 2 オクターブ低い周波数が知覚される可能性が示唆されているため、ここでは最小可聴値である音圧 0 dB で、入力周波数より 2 オクターブ低い周波数である 1 kHz の純音を用いた解析も同様に行い、基板振動の周波数成分を比較することで音知覚の可能性を検証した。

#### 4 . 研究成果

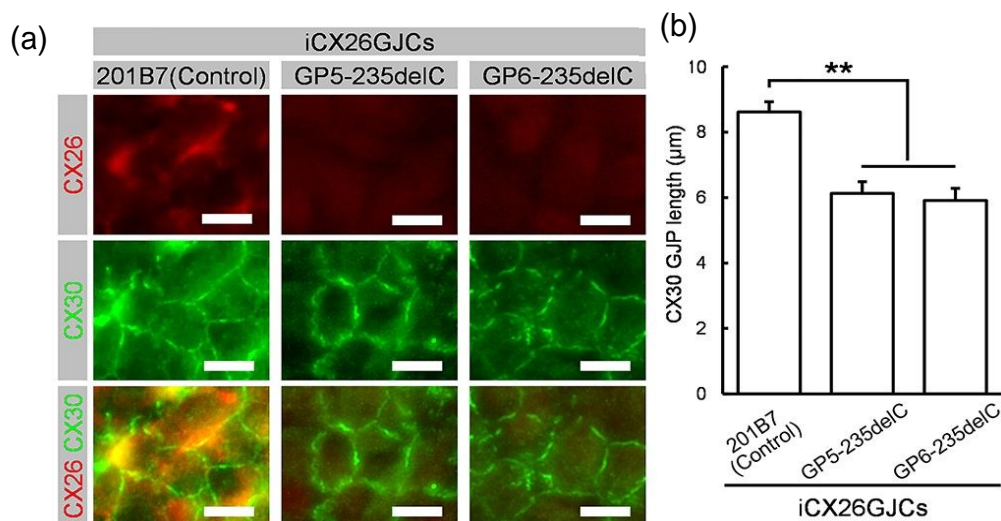
蝸牛では音の周波数帯により特定領域の有毛細胞に限定的に振動を伝える機構により厳密な音の周波数弁別を可能としている。近年、音感の異常を主訴とする周波数弁別の異常が散見されるがその原因は不明で客観的診断基準がないのが現状である。我々は遺伝子改変マウスの外有毛細胞の聴毛形成異常により、著しい周波数弁別異常を持つ全く新しいタイプの聴覚障害を発見した。同マウスは周波数弁別異常を持つ初めてのモデル動物であり、周波数弁別機構と聴覚神経系発達への影響を解明できる有用なモデルとなる。さらに iPS 細胞から蝸牛細胞を作製する技術開発により難聴病態を再現し、同様の方法で有毛細胞の作製を行った。周波数弁別異常を持つ難聴マウスは基底回転 (高音域) から頂回転 (低音域) への基板振動の伝搬異常があることが予測される。この現象の原因となる物理的要因を探索することが周波数弁別異常を解明するための鍵となるが、基板の直接観察は計測が困難なため、電通大・小池研究室で構築されたシミュレーションによる蝸牛モデルを改変することにより、基底回転有毛細胞の異常から頂回転側への伝搬が異常になる変動要素を探索した。その結果、高音難聴モデル (基板基部側の OHC の activity を低下させたモデル) に純音を入力した場合に、より低い周波数成分が基板基部側に発生することを純音の音

圧変化により振動振幅等を示唆した。また、iPS 細胞から蝸牛上皮の効率的な分化誘導法を開発した。

#### iPS 細胞からの内耳分化誘導法の開発

iPS 細胞から内耳への分化誘導実験により蝸牛上皮細胞の Connexin26、Connexin30 を発現してギャップ結合を形成する細胞シートの作成法を効率化した。この方法により難聴患者の内耳における病態を培養ディッシュ上で再現することに成功した (Fukunaga, Human Molecular Genetics, 2021 )

さらに蝸牛器官培養の技術により、in vitro での有毛細胞への効率的な遺伝子導入の条件を検討した。特に転写因子の遺伝子導入等により分化促進効果が見られた。



図(a) : 正常 (201B7) または患者 (GP05-235delC、GP06-235delC) iPSC 由来 iCX26GJC における GJP 形成。(抗 CX26 (赤) および抗 CX30 (緑) 抗体で共標識) (b) : 単一の細胞境界に沿った最大の GJP 長さ  $**P < 0.01$  (Scheffe の多重比較検定) (Fukunaga, Human Molecular Genetics, 2021)

#### 蝸牛シミュレーションモデル解析による蝸牛トノトピーに及ぼす外有毛細胞の影響

##### ヒト蝸牛における二音抑制のシミュレーション解析

抑制音とプローブ音の音圧差が 30 dB 以上の場合に、プローブ音のみを入力した場合よりも複合音を入力した場合のほうが基板振動におけるプローブ音成分が減少しており、本モデルにおいても二音抑制が生じていることが分かる。二音抑制が生じている時の外有毛細胞の加振力はほぼ抑制音成分が主成分となる周期関数の波形を示し、頭打ちしていた。これは、抑制音による外有毛細胞の加振力が飽和域に至っていることが原因である。そのため、抑制音の増加につれて、抑制音成分の加振力は飽和し、基板速度に対する OHC の加振力の傾きが減少するため、プローブ音成分の加振力は減少した。実際の耳においても、抑制音を入力することで、プローブ音成分の外有毛細胞の加振力が減少し、プローブ音成分が抑制され、二音抑制が生じると考えられる。

##### 高音難聴耳における基板振動挙動の解析

外有毛細胞の加振力を 0.1 倍した領域の基板振動は passive 状態と同様な包絡線を示

し変位もほぼ等しかったため、外有毛細胞の加振力を 0.1 倍とすると加振力が全く働いていない場合と同じ状態になることが示唆される。OHC<sub>0.1</sub> 状態では蝸牛頂部側で入力周波数 4 kHz よりも低い周波数成分が広く分布しており、これらの周波数成分は頂部側の正常外有毛細胞によって生成されたものと考えられる。4 kHz, 100 dB 入力時に生成される 1 kHz 成分は、1 kHz の CF 位置において、最小可聴値である 0 dB の 1 kHz の純音を入力した場合の振動成分よりも大きいため、4 kHz, 100 dB の純音入力時に 1 kHz 成分を知覚できる可能性が示唆される。

外有毛細胞の加振力を考慮したヒト蝸牛モデルを用いて、(1) 二音抑制と(2) 高音難聴耳に対して高周波数音を入力すると低周波数音を知覚する現象の数値シミュレーションを行った。解析結果より、以下の知見が得られた。

(1) 二音抑制は抑制音の音圧が増加すると、外有毛細胞の加振力が飽和し、プローブ音成分の加振力が減少するため生じると考えられる。

(2) 4 kHz 以上の周波数における難聴耳において、100 dB 相当の 4 kHz の純音を入力した場合、基底板上には閾値を超える振幅を持った 1 kHz の振動が生成された。よって、高音難聴耳では、入力音と異なる周波数を知覚する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tajima S, Danzaki K, Ikeda K, Kamiya K.	4. 巻 52
2. 論文標題 Degradation and modification of cochlear gap junction proteins in the early development of age-related hearing loss.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 166-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukunaga I, Shiga T, Chen C, Oe Y, Danzaki K, Ohta S, Matsuoka R, Anzai T, Hibiya-Motegi R, Tajima S, Ikeda K, Akamatsu W, Kamiya K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Generation of the induced pluripotent stem cell (hiPSC) line (JUFMD0i004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p.V37I) mutation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukunaga I, Fujimoto A, Hatakeyama K, Kurebayashi N, Ikeda K, Kamiya K.	4. 巻 51
2. 論文標題 Generation of Functional CX26-Gap-Junction-Plaque-Forming Cells with Spontaneous Ca <sup>2+</sup> Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Stem Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Fujimoto Ayumi, Hatakeyama Kaori, Kurebayashi Nagomi, Ikeda Katsuhisa, Kamiya Kazusaku	4. 巻 51
2. 論文標題 Generation of Functional CX26?Gap Junction Plaque Forming Cells with Spontaneous Ca <sup>2+</sup> Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Stem Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpsc.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Shiga Takahiro, Chen Cheng, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Matsuoka Rina, Anzai Takashi, Hibiya-Motegi Remi, Tajima Shori, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kamiya Kazusaku	4. 巻 43
2. 論文標題 Generation of the induced pluripotent stem cell (hiPSC) line (JUFMD0i004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p.V37I) mutation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101674 ~ 101674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tajima Shori, Danzaki Keiko, Ikeda Katsuhisa, Kamiya Kazusaku	4. 巻 52
2. 論文標題 Degradation and modification of cochlear gap junction proteins in the early development of age-related hearing loss.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 166 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-020-0377-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kazusaku Kamiya
2. 発表標題 Drug Screening and AAV Gene Therapy for GJB2 Related Hearing Loss with iPS cells
3. 学会等名 ARO midwinter meeting 2019, San Jose, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazusaku Kamiya
2. 発表標題 Disease modelling and drug screening for GJB2 related hearing loss with iPS cells
3. 学会等名 Inner Ear Biology 2019, Padua, Italy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazusaku Kamiya
2. 発表標題 Drug Screening and AAV Gene Therapy for GJB2 Related Hearing Loss with iPS cells.
3. 学会等名 ARO midwinter meeting 2019, San Jose, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazusaku Kamiya
2. 発表標題 Disease modelling and drug screening for GJB2 related hearing loss with iPS cells.
3. 学会等名 Inner Ear Biology 2019, Padua, Italy (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 神谷 和作	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 97-100
3. 書名 JOHNS耳鼻咽喉科・頭頸部外科【解説/特集】難聴を治す-2020年版 感音難聴と遺伝子治療	

1. 著者名 神谷 和作	4. 発行年 2020年
2. 出版社 JOHNS耳鼻咽喉科・頭頸部外科	5. 総ページ数 97-100
3. 書名 【解説/特集】難聴を治す-2020年版 感音難聴と遺伝子治療	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ギャップ結合機能制御剤のスクリーニング方法	発明者 神谷 和作	権利者 学校法人順天堂 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-149966	出願年 2019年	国内・外国の別 国内



産業財産権の名称 ギャップ結合機能制御剤のスクリーニング方法	発明者 神谷 和作	権利者 学校法人順天堂 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-149966	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	小池 卓二  (Koike Takuji)  (10282097)	電気通信大学・大学院情報理工学研究科・教授   (12612)	
研究分担者	安齋 崇  (Anzai Takashi)  (20624852)	順天堂大学・医学部・助教   (32620)	
研究分担者	福永 一朗  (Fukunaga Ichiro)  (20746581)	順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教   (32620)	
研究分担者	池田 勝久  (Ikeda Katsuhisa)  (70159614)	順天堂大学・医学部・特任教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------