

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16903

研究課題名(和文) 高度前庭障害に対する多能性幹細胞を用いた細胞移植治療の開発

研究課題名(英文) Development of cell transplantation therapy using pluripotent stem cells for severe vestibular disorders

研究代表者

阪上 雅治 (Sakagami, Masaharu)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：50745437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内耳前庭有毛細胞への特異的分化誘導法の開発を目的に、卵形嚢由来の上皮細胞(Vestibular cells: VCs)の利用を試みた。Math1-GFP-ES細胞を用い、新生児マウスの内耳前庭組織よりVCsを樹立し、継代培養したVC由来細胞の培養上清を回収した(VC derived-conditioned medium: V-CM)。V-CMおよびES-DM(市販ES用培養液)により2週間接着培養を行い、前庭・蝸牛有毛細胞関連マーカー遺伝子の発現を検討した結果、V-CMは、ES細胞の内耳前庭有毛細胞様細胞への分化を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、前庭細胞由来液性因子を用いることで、前庭有毛細胞への特異的分化誘導制御が実現可能となった。この新しい知見は、内耳再生医学の基礎的視点から前庭有毛細胞の分化・再生メカニズムを解明する上で重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vestibular hair cells (V-HCs) in the inner ear have important roles and various functions. When V-HCs are damaged, crippling symptoms, such as vertigo, visual field oscillation, and imbalance, are often seen. Recently, several studies have reported differentiation of embryonic stem (ES) cells, as pluripotent stem cells, to HCs, though a method for producing V-HCs has yet to be established. In the present study, we used vestibular cell conditioned medium (V-CM) and effectively induced ES cells to differentiate into V-HCs. Expressions of V-HC-related markers (Math1, Myosin6, Brn3c, Dnah5) were significantly increased in ES cells cultured in V-CM for 2 weeks, while those were not observed in ES cells cultured without V-CM. On the other hand, the cochlear HC-related marker Lmod3 was either not detected or detected only faintly in those cells when cultured in V-CM. This result demonstrates that V-CM has an ability to specifically induce differentiation of ES cells into V-HCs.

研究分野：内耳

キーワード：内耳有毛細胞 ES細胞 内耳再生 分化誘導 前庭

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞は、特定の細胞種への分化プロセスを解明するために有用なソースである。近年、難聴疾患治療の重要なターゲットである内耳有毛細胞 (inner ear hair cells : HCs) への分化誘導法の報告が散見されるが、HC 様細胞への誘導効率は低く操作過程には幾重もの作業を要する難点があった。我々は間葉系細胞株である ST2 細胞の培養上清を用いることで簡便に効率良く HC 様細胞を分化誘導することに成功した (HIST2 法: *CDDis*, 2012)。また、HC 分化のマスター遺伝子である転写因子 *Math1* を正に制御することによっても効率よく HC 様細胞を誘導できることを示した (*CDDis*, 2013)。さらに、これら両法を組み合わせることにより、いずれの単法に比べて一層高効率に HC 様細胞を分化誘導が可能であることを報告した (*Stem Cell Res.*, 2017)。これまでの知見から、HC 分化には液性因子等の誘導因子が鍵になると考えられた。

2. 研究の目的

今回、内耳前庭有毛細胞 (vestibular HCs : V-HCs) への特異的分化誘導法の開発を目的に、卵形嚢由来の上皮細胞 (Vestibular cells : VCs) の利用を試みた。

3. 研究の方法

(1) 卵形嚢由来細胞 (VC) の単離・形態 及び VC の継代培養と培養上清 (V-CM) の調製

新生児マウス (C57BL/6) 内耳卵形嚢を顕微鏡下に単離し、Phalloidin 染色により確認した

(**図 1A**)。10%FBS+DMEM (LIF 除去) (ES-M) 下で、卵形嚢由来上皮細胞 (Vestibular cells : VCs) の増殖形態を確認、樹立した (**図 1B**)。次に、継代培養した VC 由来細胞を ES-M を用いて 24 時間培養し、回収、遠心、0.22  $\mu$ m filter で濾過後、培養上清 (VC derived-conditioned medium : V-CM) として使用した (**図 1C**)。

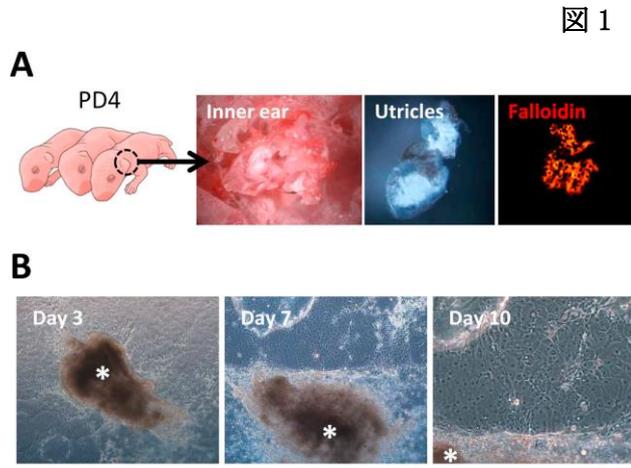


図 1

(2) 分化誘導方法

*Math1* 遺伝子に連動して GFP を発現する ES 細胞株 (*Math1*-GFP-ES) を用いた。(理研 CDB・非対称細胞分裂研究チーム・六車恵子博士より供与)。Hanging drop 法 (3000 個/ $20 \mu$ l) (**図 2A**)、により ES-M 下で 4 日間培養し、胚様体 (EBs) を形成した。その後、V-CM 及び ES-M により 35-mm gelatin-coated dishes (10 EBs per dish) 上で 2 週間接着培養を行った (**図 2B**)。GFP 発現を蛍光顕微鏡及び、フリーサイトメトリーで解析し、前庭・蝸牛有毛細胞関連マーカー遺伝子の発現を real time PCR および免疫染色により検討した。

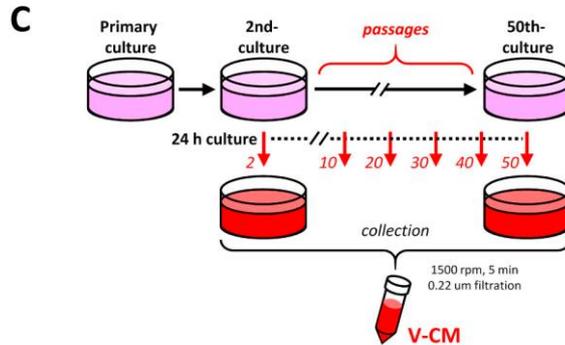
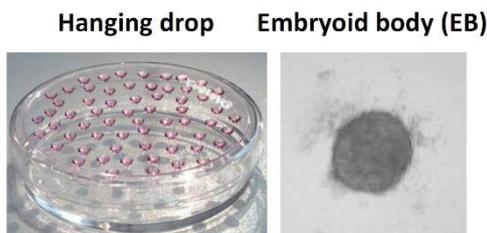
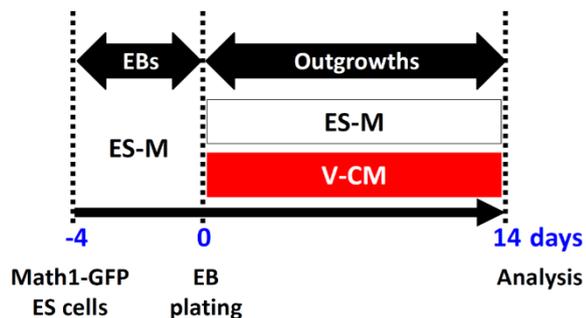


図 2

A



B

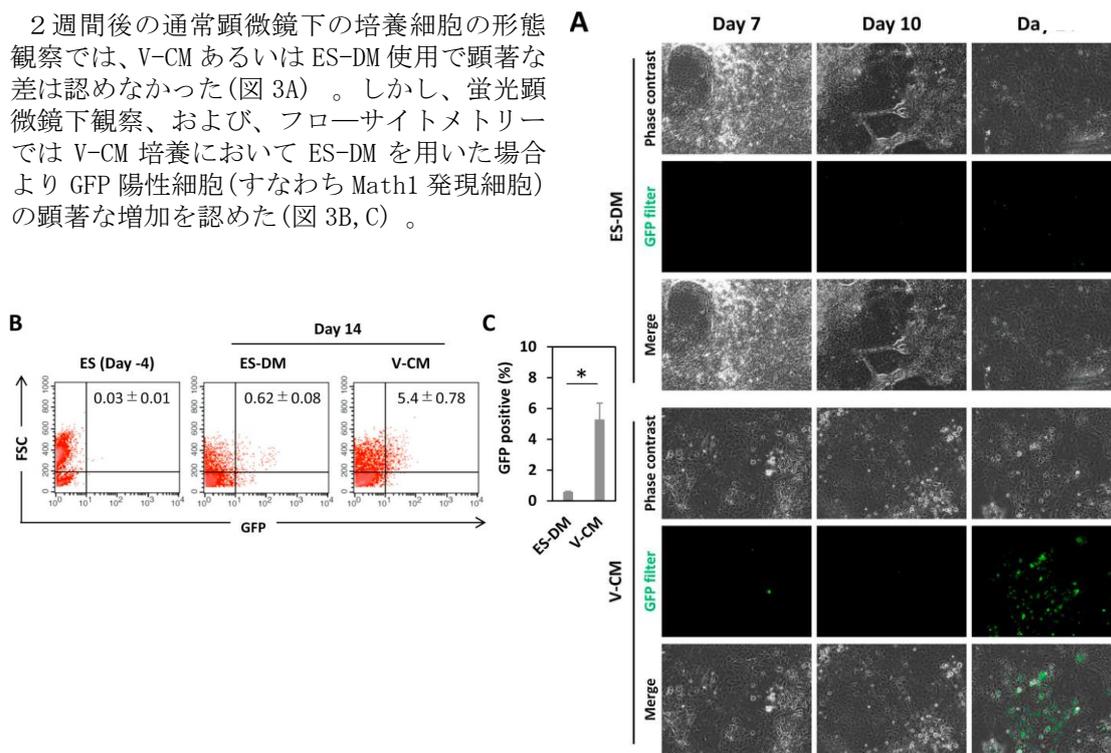


4. 研究成果

(1) 分化誘導後の細胞形態と GFP 発現

図 3

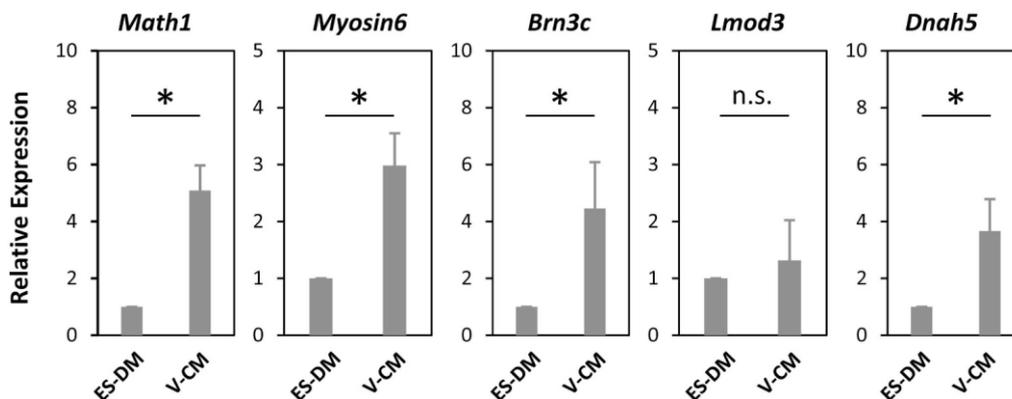
2 週間後の通常顕微鏡下の培養細胞の形態観察では、V-CM あるいは ES-DM 使用で顕著な差は認めなかった(図 3A)。しかし、蛍光顕微鏡下観察、および、フローサイトメトリーでは V-CM 培養において ES-DM を用いた場合より GFP 陽性細胞(すなわち Math1 発現細胞)の顕著な増加を認めた(図 3B, C)。



(2) 遺伝子発現解析

ES-M 及び、V-CM により 2 週間接着培養を行い、前庭・蝸牛有毛細胞関連マーカー遺伝子の発現を real time PCR により検討した。近年、蝸牛有毛細胞マーカーとして Lmod3 が、前庭有毛細胞マーカーとして Dnah5 がそれぞれの有毛細胞特異的マーカーとして報告されている(Scheffer et al., J Neurosci, 2015)。有毛細胞関連マーカー (Math1、Myosin6、Brn3c) は V-CM を用いた分化誘導において顕著に発現亢進を認め、Dnah5 (前庭有毛細胞マーカー) 発現も有意に増加していた(図 4)。一方で、Lmod3 (蝸牛有毛細胞マーカー) では ES-M、V-CM において有意な差は認めなかった。

図 4



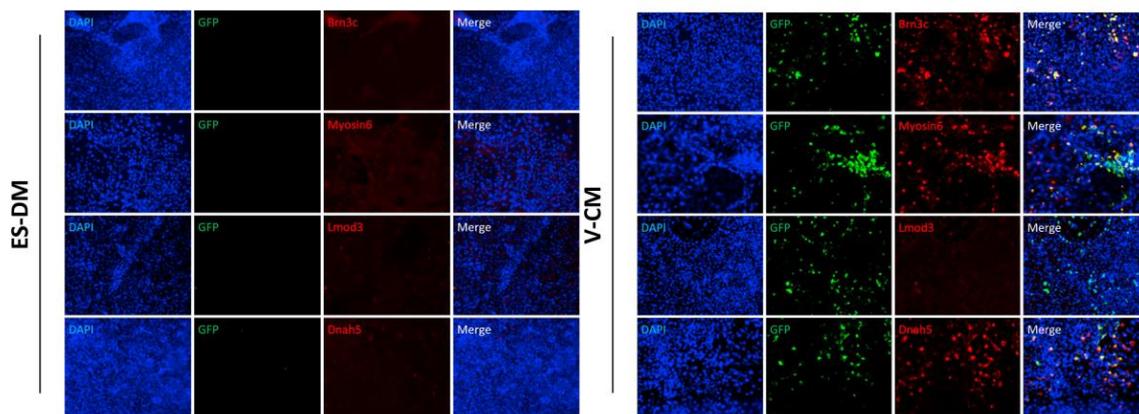
### (3) 細胞免疫染色解析

ES-DM 及び、V-CM により 2 週間接着培養を行い、前庭・蝸牛有毛細胞関連マーカーの発現を細胞免疫染色により検討した。ES-DM 培養においていずれの有毛細胞関連マーカー (Myosin6, Brn3c)、および前庭・蝸牛有毛細胞関連マーカー (Lmod3, Dnah5, respectively) も観察されず(図 5A)、GFP 陽性細胞における Myosin6、Brn3c もしくは Dnah5 の発現は、V-CM 培養にて誘導され GFP 陽性細胞にのみ観察された(図 5B)。一方、Lmod3 はわずかに観察されるのみであった。以上の成績から、V-CM は V-HC 様細胞への特異的分化補助特性を有する作用が示唆された。

A

B

図 5



### (4) 結論

以上の成績から前庭由来細胞の培養上清 (V-CM) は、ES 細胞の内耳前庭有毛細胞 (V-HC) 様細胞への分化を誘導すること可能性が示唆された。

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 Sakagami Masaharu, Ouji Yukiteru, Kawai Norikazu, Misu Masayasu, Yoshikawa Masahide, Kitahara Tadashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Differentiation of embryonic stem cells into inner ear vestibular hair cells using vestibular cell derived-conditioned medium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100649 ~ 100649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100649	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 1件）

1. 発表者名 Sakagami M, Ouji Y, Kawai N, Kitahara T, Yoshikawa M
2. 発表標題 Differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear cell-like cells using vestibular cell-conditioned medium
3. 学会等名 16th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阪上雅治、王寺幸輝、北原紘、吉川正英
2. 発表標題 ES細胞から内耳前庭有毛細胞への効率的分化誘導法の開発
3. 学会等名 第28回日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阪上雅治、王寺幸輝、北原紘、吉川正英
2. 発表標題 卵形嚢由来細胞を用いたES細胞から内耳前庭有毛細胞への分化誘導法の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----