

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03803

研究課題名(和文) 蝸牛感覚上皮発生メカニズムの解明 - 単一細胞レベルでの感覚上皮マーカーの探索

研究課題名(英文) Elucidation of the developmental mechanism of the cochlear sensory epithelia based on the single cell analysis

研究代表者

山本 典生 (Yamamoto, Norio)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70378644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎生マウス内耳の単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析を通して、哺乳類の内耳発生に重要な遺伝子を同定することを目的と定めた。網羅的遺伝子発現解析の手法として、2つのアプローチをとった。1つは、マウスE13.5の蝸牛の上皮を材料としてマイクロアレイを用いる方法である。有毛細胞前駆細胞のマーカーであるSox2陽性細胞の一部に発現する遺伝子として2つの候補を同定した。もう1つは、マウス胎仔全身の単一細胞の公開データを用いて、内耳上皮の細胞のみに絞った解析である。本解析で、蝸牛特異的なマーカーをはじめ、内耳の様々な亜部位特異的なマーカーを発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だに完全には解明されていない、内耳蝸牛の発生に重要な役割を果たす可能性のある遺伝子を複数同定することができた。今後は、これらの遺伝子の機能をノックアウトマウスなどで解明することにより、蝸牛の発生をiPS細胞やdirect reprogrammingなどを用いて試験管で再現できるようになる。さらに、再生することができない生後哺乳類蝸牛有毛細胞の再生方法の開発につなげることができる。蝸牛有毛細胞の再生は、加齢性難聴をはじめとする内耳性難聴の根本的治療に必須であり、成功すれば国民の生活の質を大きく向上させると思われる。本研究はその端緒となるものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify genes essential for inner ear development. We used a single-cell-based comprehensive gene expression analysis of the embryonic mouse cochlea. Two different approaches were taken to achieve this aim. One is to perform microarray on cDNA prepared from single cells of mouse E13.5 cochlear epithelia. We took samples that were positive or negative for Sox2, which is a marker of the pro-sensory region in the cochlea. We identified two candidate genes expressed in only a part of Sox2-positive cells by this approach. The other is to use public comprehensive gene expression analysis data from two million mouse embryonic single cells. We took data of 5000 cochlear epithelial cells and re-analyzed the data. As a result, we identified various markers specific to sub-regions within inner ears, including cochlea-specific markers.

研究分野：耳科学

キーワード：網羅的遺伝子発現解析 蝸牛 有毛細胞 単一細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、世界の人口の5.3%、約3.5億人が苦しむ難聴は日常生活の質を低下させるだけでなく、他者とのコミュニケーションがとりにくくなるために認知症を誘発する因子とされ、いかに難聴を改善させるかは重要なテーマである。特に2010年に65歳以上人口が21%超をしめる超高齢社会になった我が国では、65歳以上の約6割に難聴を認め、75歳以上人口の4分の1が日常生活に支障をきたすほどの難聴を有している。

難聴の治療は、成因によってその難易が異なる。鼓膜や耳小骨に原因がある伝音難聴の場合は手術治療で根治も見込まれる。加齢性難聴や薬剤性難聴、音響外傷、多くの遺伝性難聴などの感音難聴の主責任部位である内耳の感覚上皮、有毛細胞は生後哺乳類ではいったん障害されると生理的な状態では再生しない。このため、感音難聴は手術による根治が不可能で、現在のところ有効な薬剤も存在しない。

再生能がないとされてきた網膜や神経、心筋などではiPS細胞を用いた再生医療が臨床応用されようとしているが、これらの治療の要諦は初期化を行った細胞からもう一度ターゲットの臓器や細胞を発生させることである。効率よく臓器を再生させるには、各発生段階の重要なマーカーを用いて必要な細胞を選別する必要がある。内耳蝸牛有毛細胞は転写因子Sox2陽性の領域である感覚上皮予定領域からNotchシグナルやWntシグナルなどが関与して有毛細胞を取り囲む支持細胞と共に発生するとされているが、いまだにmaster geneの同定がされておらず、その後の各段階でのマーカー、すなわち重要な役割を果たす因子などを含めその全容は解明されていない。そのため、iPS細胞からの有毛細胞の誘導は網膜など他臓器に比べて非常に効率が悪く、感音難聴の治療に臨床応用できるには程遠い状態である。さらに、近年は、iPS細胞樹立を伴う細胞の初期化を行わずに他の分化細胞から目標の細胞を直接誘導するdirect reprogrammingもさまざまな臓器で実現されている。direct reprogrammingでは誘導しようとする臓器の発生に重要な役割を果たす転写因子を複数導入することにより目的が達成される。つまり、iPS細胞からの誘導にしろ、direct reprogrammingにしろ、内耳蝸牛感覚上皮の再生を目指すためには詳細な発生過程の解明が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究は、感音難聴の主責任部位である内耳蝸牛感覚上皮の再生実現のため、他臓器と比べて圧倒的に情報が不足している内耳蝸牛感覚上皮発生の分子機構を、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析を用いて解明することを目的とする。本研究で、内耳発生過程に重要なマーカーが同定されれば、iPS細胞などの多能性幹細胞からの内耳蝸牛感覚上皮誘導やdirect reprogrammingによる再生医療が効率よく行われることが可能となり、難聴患者の聴力再獲得による生活の質の改善や、難聴との関連が近年指摘されている認知症発症の予防が期待される。

3. 研究の方法

- (1) 蝸牛上皮由来の単一細胞からのcDNAライブラリーの調整
野生型マウスE13.5蝸牛の内耳骨包原基を除去して、膜迷路を剖出した後、血管条を機械的に除去した。さらに、サーモライシンを用いて結合組織を取り除いて上皮のみにしたのち薬剤を用いて細胞を単離した。単離した細胞を1つずつピックアップし、その単一細胞に対してRNAの抽出からcDNAの合成・増幅を、アダプターを用いて行った。
- (2) cDNAライブラリーの質の検定
cDNAの品質を検定するために、合成したcDNAを用いて2種類のハウスキーピング遺伝子、GapdhとArbpのプライマーを用いてPCRを行った。
- (3) マイクロアレイの施行と解析
マイクロアレイにハイブリダイズし、網羅的遺伝子発現解析を行った。解析では、Sox2陽性細胞群の一部の細胞のみに発現する遺伝子を見つけることを目的とした方法を用いた。具体的には、Sox2陰性細胞では決して発現していない遺伝子を同定後、それらの遺伝子の内、Sox2陽性細胞群の一部の細胞のみに発現する遺伝子を同定した。
- (4) 解析結果の確認
(3)で同定した遺伝子候補の発生蝸牛における発現の局在を、in situ hybridization法を用いて確認した。また、定量的RT-PCRで内耳発生の時期による発現量の変化を確認した。
- (5) ノックアウトマウスの作成と観察
(4)で局在を確認できた遺伝子候補のノックアウトマウスを、遺伝子編集技術を用いて作成した。その後、ノックアウトマウスの内耳の形態を観察した。
- (6) 単一細胞RNAseqの内耳におけるデータ再解析

公開された発生期マウスの全身の200万個の単一細胞網羅的遺伝子発現解析の結果を利用して、内耳の単一細胞網羅的遺伝子発現解析を行った。200万個の内、5000個が内耳上皮由来細胞とアノテーションされていたため、この5000個の細胞を用いた解析を行った。具体的には、クラスタリングを行い、既知の内耳構成細胞のマーカーでクラスターをアノテーション、各クラスター特異的な遺伝子を同定した。

(7) 蝸牛特異的発現遺伝子の発現パターンの解析

(6)で同定された遺伝子のうち、複数のものについて発生期マウス内耳内での局在の確認を *in situ hybridization* 法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 野生型マウス E13.5 蝸牛から単離した単一細胞から cDNA 合成を行って合計 176 サンプルを得た。

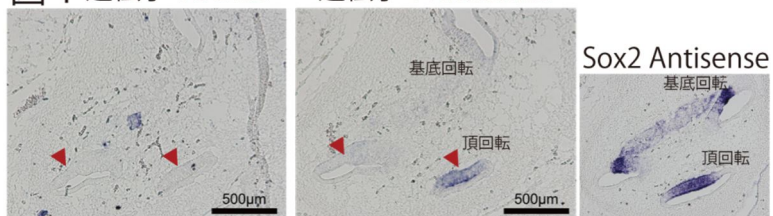
(2) 176 サンプルのうち、ハウスキーピング遺伝子を検出できたのは 129 サンプルで、全体の7割で良質な cDNA の合成に成功した。これらのうち、Sox2 陽性サンプルは 50 サンプルであった。また、Sox2 陰性サンプル 68 サンプルであった。

(3) Sox2 陽性サンプル 47 サンプルと Sox2 陰性サンプル 34 サンプルをマイクロアレイにハイブリダイズして、網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータを用いて、Sox2 陽性細胞の一部に発現する遺伝子を同定するため、以下のような遺伝子プローブの絞り込みを行った。まず、Sox2 陰性細胞由来のサンプル 34 サンプルすべてでマイクロアレイ上の発現値が 3 未満の遺伝子プローブを絞り込み、14424 のプローブを得た。これらのうち、47 の Sox2 陽性細胞由来のサンプルのうちで一つでも発現値が 4 以上になっているプローブは 2520 プローブ存在した。さらに絞り込みを行い、47 サンプルのうち、6 サンプル以上で発現が 6 以上になっているプローブに絞り込んだところ 28 のプローブ (いずれも異なる遺伝子) に絞り込まれた。

(4) 28 遺伝子のうち、1つは Sox2 であり、本実験の妥当性を担保することができた。Sox2 以外の 27 遺伝子のうち、3 遺伝子の発生期内耳における発現パターンを検討し、少なくとも

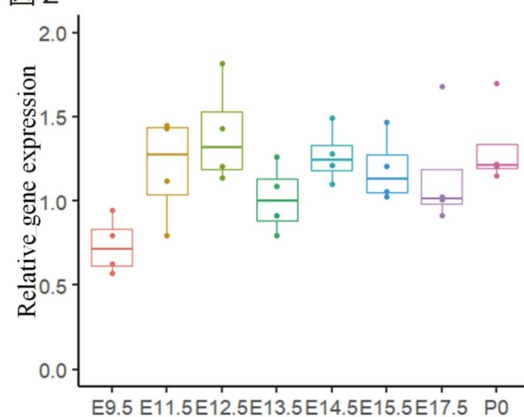
2つの遺伝子で蝸牛内の Sox2 陽性領域の一部に発現することが確認でき、今回の解析の目標である Sox2 陽性領域の一部に発現する遺伝子を発見することができた。

図 1 遺伝子 1 Sense 遺伝子 1 Antisense



このうち、遺伝子 1 は、E13.5 の蝸牛の基底回転から頂回転までである蝸牛の Sox2 陽性細胞のうち、頂回転の Sox2 陽性細胞にのみ発現することが確認された (図 1)。また、E9.5 から P0 までのマウス発生期内耳全体における遺伝子 1 の発現量を検討したところ、E11.5 以降は一定量の発現量であることが判明した (図 2)。

図 2



(ア) また、遺伝子 2 は E13.5 の蝸牛において、Sox2 陽性領域の一部の細胞に発現していることが確認できた (図 3)。また、Sox2 陽性領域よりも外側の領域にも陽性領域を認めた (図 3 矢頭)。E9.5 から P4 までの遺伝子 2 の内耳における発現量は、E13.5 でピークとなり、胎児期は一定の発現量を保ち、生後発現量が減少していた (図 4)。

図 4

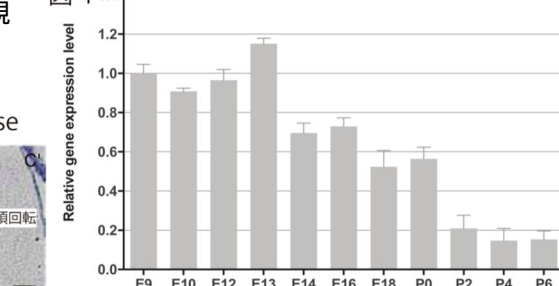
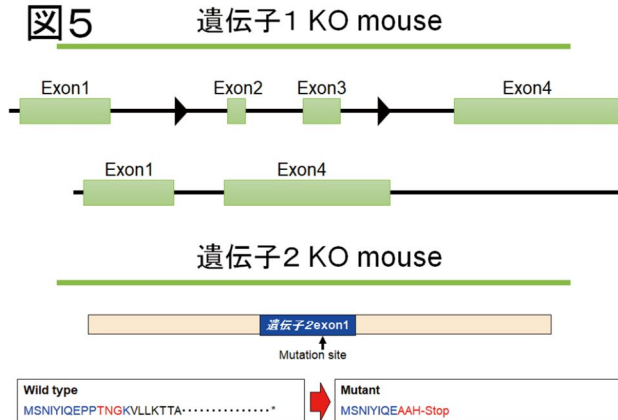


図 3

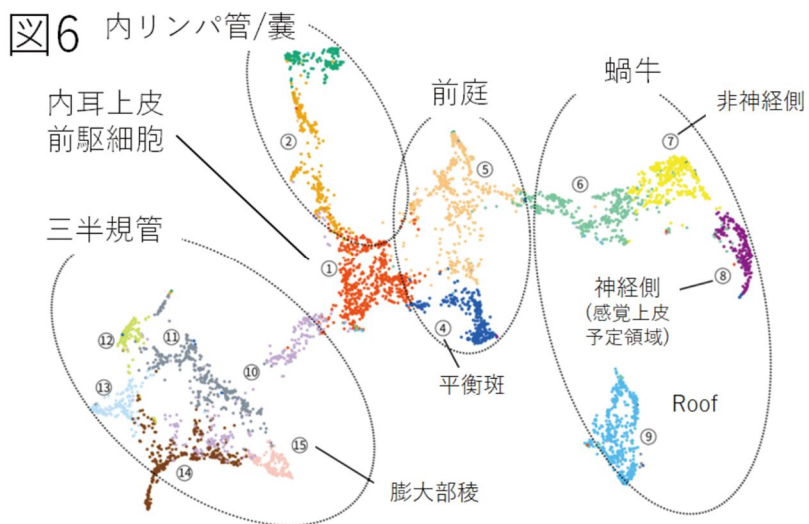
遺伝子 2 antisense 遺伝子 2 sense Sox2 Antisense



- (5) (4)から遺伝子1、遺伝子2は発生期蝸牛において Sox2 陽性領域の一部に発現していることが判明したため、両遺伝子のノックアウトマウスを作成した(図5)。遺伝子1のノックアウトマウスは、遺伝子1が蝸牛の頂回転に発現していたため、蝸牛の伸長などに関係していると推測していたが、蝸牛長を含めて、内耳の形状に異常がなく、機能が類似する他遺伝子による代償が働き、表現型が表れていないのではないかと考えられる。遺伝子2のノックアウトマウスは、マクロでの観察を行ったところ、通常よりも小さい内耳が形成されており、今後解析を行う予定である。



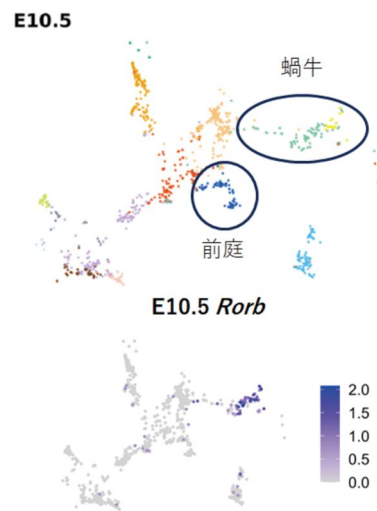
- (6) 200 万個の発生期マウス胎仔由来の単一細胞のうち、内耳上皮とアノテーションされたのは5000個の細胞であった。この5000個の細胞の網羅的遺伝子発現データを再解析し、クラスタリングを行った結果、15のクラスターに分けることができ、既知の内耳内各領域の部位の特異的マーカーですべてのクラスターのアノテーションを行うことができた(図6)。



これらの情報を用いて、蝸牛特異的遺伝子、前庭・三半規管特異的な遺伝子の候補を同定することができた(図7)。また、その他の内耳内領域特異的な遺伝子の候補も複数同定することができた。

図7

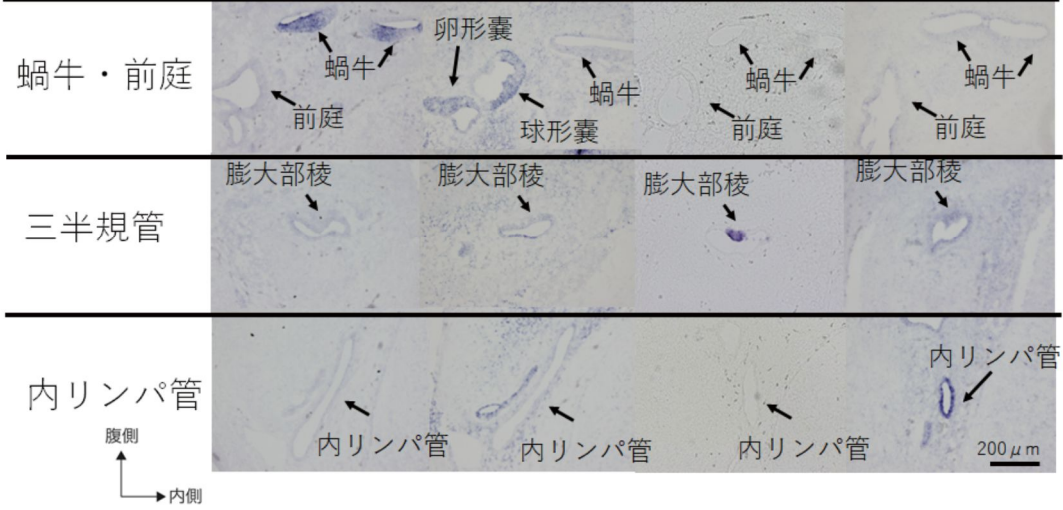
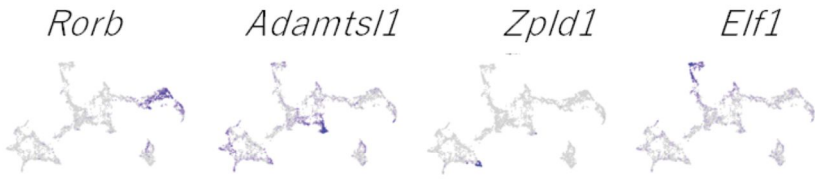
蝸牛	前庭
<i>Sulf1</i>	<i>Adamts1</i>
<i>Rorb</i>	<i>Pde4b</i>
<i>Pax2</i>	<i>Ccser1</i>
<i>Gpc5</i>	<i>Npas3</i>
<i>Dach1</i>	<i>ErbB4</i>
<i>Trappc9</i>	<i>EfnA5</i>
<i>Nr2f1</i>	<i>Ctnna2</i>
<i>Itih5</i>	<i>Sh3gl2</i>
<i>Prdm16</i>	<i>Zfp536</i>
	<i>Ntf3</i>
	<i>Ptprt</i>
	<i>Ebf3</i>
	<i>Plxna4</i>
	<i>Gas1</i>



- (7) (6)で同定された遺伝子について、発生期マウス内耳内での発現部位・パターンを in situ hybridization を用いて検討し、クラスタリングの結果と一致することが確認できた(図8)。今後は、これらの遺伝子の機能をノックアウトマウスを用いて検討していく予定である。

8

in situ hybridization (ISH) at E13.5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kohei Yamahara, Norio Yamamoto, Fumihiko Kuwata and Takayuki Nakagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuroprotective role of insulin-like growth factor 1 in auditory and other nervous systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 18437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-437	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 -
1. 著者名 Ryosuke Yamamoto, Hiroe Ohnishi, Koichi Omori, Norio Yamamoto	4. 巻 469
2. 論文標題 In silico analysis of inner ear development using public whole embryonic body single-cell RNA-sequencing data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 160-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2020.10.009.	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 Matsunaga Mami, Kita Tomoko, Yamamoto Ryosuke, Yamamoto Norio, Okano Takayuki, Omori Koichi, Sakamoto Satoko, Nakagawa Takayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Initiation of Supporting Cell Activation for Hair Cell Regeneration in the Avian Auditory Epithelium: An Explant Culture Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 583994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2020.583994	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 -
1. 著者名 Gao Li, Kita Tomoko, Katsuno Tatsuya, Yamamoto Norio, Omori Koichi, Nakagawa Takayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Insulin-Like Growth Factor 1 on the Maintenance of Ribbon Synapses in Mouse Cochlear Explant Cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 571155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2020.571155	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 -

1. 著者名 Gao Li、Nakagawa Takayuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Insulin-like growth factor 1: role in the auditory system and therapeutic potential in otology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 286 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/M00.0000000000000652	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 Kishimoto Ippei、Okano Takayuki、Nishimura Koji、Motohashi Tsutomu、Omori Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Early Development of Resident Macrophages in the Mouse Cochlea Depends on Yolk Sac Hematopoiesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.01115	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 -

1. 著者名 Okano Takayuki、Kishimoto Ippei	4. 巻 10
2. 論文標題 Csf1 Signaling Regulates Maintenance of Resident Macrophages and Bone Formation in the Mouse Cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.01244	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Norio Yamamoto
2. 発表標題 Regenerative medicine of the middle and inner ear
3. 学会等名 7th East Asian Symposium on Otology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本典生
2. 発表標題 シンポジウム6 20年後を語ろう-耳科学に込められた「夢」と「希望」- 20年後の内耳発生・再生研究
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本典生
2. 発表標題 単一細胞の網羅的遺伝子発現解析による内耳発生機構の解明
3. 学会等名 第68回聴覚生理研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿子島大貴、山本亮介、大西弘恵、大森孝一、山本典生
2. 発表標題 マウス内耳発生過程における転写因子Ebfファミリーの機能解析
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本亮介、大西弘恵、大森孝一、山本典生
2. 発表標題 単一細胞RNAシーケンシング公開データを利用した蝸牛の発生機構の探究
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryosuke Yamamoto, Hiroe Ohnishi, Takayuki Nakagawa, Koichi Omori, Norio Yamamoto
2. 発表標題 Identification of the Cochlear Duct Progenitor Using Published Single Cell RNA-Sequencing Data
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology. The 44th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本典生
2. 発表標題 ネクストジェネレーションセッション4 内耳領域の再生医療研究・温故知新 Original からStandard へ : 蝸牛有毛細胞再生促進因子の探索 Notch シグナルから網羅的解析まで
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本典生、山本亮介、中川隆之、大森孝一
2. 発表標題 Car13遺伝子の発生期蝸牛における発現の検討
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会総会・学術講演会
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
研究分担者	西村 幸司 (Nishimura Koji) (20405765)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中川 隆之 (Nakagawa Takayuki) (50335270)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	大西 弘恵 (Ohnishi Hiroe) (50397634)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	岡野 高之 (Okano Takayuki) (60642931)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

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