

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09914

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞から内耳支持細胞への分化誘導法の開発と遺伝性難聴への応用

研究課題名（英文）generation of inner ear supporting cells from human iPS cells

研究代表者

福永 一郎（Fukunaga, Ichiro）

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教

研究者番号：20746581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ヒトiPS細胞からコネキシン26（CX26）ギャップ結合を構築する内耳支持細胞様細胞を作製した。これらの細胞は、細胞間においてCX26陽性のギャップ結合プラークを構築していた。また、免疫染色や遺伝子解析の結果、これらの細胞集団は内耳支持細胞で観察されるマーカーの組み合わせを発現していた。また、Dye transfer assayにより、細胞間コミュニケーションが観察され、内耳支持細胞と同様の機能性を有していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GJB2遺伝子を原因とする難聴は変異によって軽度～高度難聴までバリエーションがあることが報告されている。本研究課題を達成することで、GJB2遺伝子の異なる変異が聴力の病態に与える影響を解明することができ、変異の種類に対応した治療法を立てることができる。また、GJB2変異難聴だけでなく、蝸牛の非感覚領域の細胞を対象とした遺伝性難聴のIn vitroモデルを作製することが可能となる。これらのモデルは、遺伝性難聴を含めた内耳性難聴に対する病態解析、薬剤スクリーニング、細胞治療、遺伝子治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated inner ear supporting cells that construct connexin 26 (CX26) gap junctions from human iPS cells. These cells formed CX26-positive gap junction plaques in the cell-cell border. In addition, as a result of immunostaining and gene expression analysis, these cells expressed the combination of markers observed in inner ear supporting cells. In addition, cell-cell communication was observed by the Dye transfer assay, and it was clarified that it had the same functionality as inner ear supporting cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：内耳 遺伝性難聴 コネキシン26 ギャップ結合 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴は 1,600 出生に 1 人と高頻度で発症し、聴覚と言語発育に著しい障害を引き起こすため極めて高度な QOL の低下をもたらす。特に、コネキシン 26(Connexin26, Cx26)をコードする Gap junction beta 2 (GJB2)遺伝子は、世界最大の遺伝性難聴の原因遺伝子である。Cx26 は、Cx30 と共に内耳支持細胞・線維細胞において細胞間イオン輸送を行うギャップ結合プラーク(Gap Junction Plaque, GJP)を構築する重要な要素であり、内耳リンパ液中のイオン組成を保っている。これまで外的因子による内耳性難聴の治療は有毛細胞を対象としてきた。また、細胞治療を目的とした ES/iPS 細胞の分化誘導法が複数報告されているが、いずれも有毛細胞を対象としたものであった(Oshima 2010, Chen 2012, Kohler 2014)。これに対し、GJB2 難聴を含めた遺伝性難聴の原因となる細胞は、有毛細胞だけでなく支持細胞や線維細胞など多岐にわたることから新しい治療戦略が求められている。申請者の所属している研究グループは、GJB2 変異型遺伝性難聴モデルマウスを用いて、Cx26 が欠損することによりギャップ結合プラークが劇的に崩壊、細胞間イオン輸送能が低下することを明らかにした(Kamiya et al., J Clin Invest, 2014)。また、申請者らは 2016 年にマウス iPS 細胞から Cx26 ギャップ結合を構築する内耳支持細胞様細胞を作製した (Fukunaga et al., stem cell reports, 2016)。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞から Cx26 を発現しギャップ結合プラークを構築する内耳支持細胞や線維細胞への分化誘導法ははまだ報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞からコネキシン 26 ギャップ結合を構築する内耳支持細胞様細胞の作製を目指すとともに、申請者の所属する研究グループが所有する、蝸牛への細胞移植技術(Kamiya, 2007)、遺伝性難聴の疾患モデル(Kamiya, 2014)、疾患モデルへの遺伝子治療(Iizuka, 2015)、細胞導入効率の促進(Kamiya, 2015)といった技術的ツールを組み合わせることで、GJB2 変異型遺伝性難聴の根本的な治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト iPS 細胞から内耳細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から CX26 発現細胞への分化誘導法は、マウス iPS 細胞から内耳細胞への分化誘導法 (Fukunaga et al., 2016) を参考にし、改変して用いた。

すなわち、SFEBq 法による 3 次元培養と、それに続くマウス内耳由来のフィーダー細胞上での 2 次元培養を行い CX26 を発現する細胞シートを作製する。また、培養の各段階において qPCR や免疫染色を行い、分化誘導した細胞のキャラクタリゼーションを行った。さらに、作製した CX26 発現細胞の機能性を評価するため、Scrape loading assay による細胞間コミュニケーションの解析を行った。Scrape loading assay は gap junction を介した細胞間コミュニケーションを解析する手法であり、低分子の色素である Lucifer Yellow を用いる。コントロールには分化誘導前の iPS 細胞およびフィーダー細胞を用いた。

### (2) 難聴患者由来の疾患 iPS 細胞株の樹立

GJB2 遺伝子に変異のある難聴患者または保因者から採血を行い、分離した PBMC から iPS 細胞を樹立する。分離した PBMC は KBM502 培地で増殖、CytoTune-iPS 2.0 Sendai

Reprogramming Kit によりリプログラミングした後、フィーダー細胞上でコロニーが確認されるまで培養を継続した。複数のコロニーをピックアップし、拡大培養を行い、未分化マーカーの発現量を比較、成績の良いものを選別した。樹立した iPS 細胞株は、核型解析、ダイレクトシーケンス、三胚葉分化による多分化能の評価を行った。

### (3) 効率的なコネキシン 26 発現細胞の分化誘導法の開発

これまでの成果から、2 次元培養で観察されたコネキシン 26 ギャップ結合構築細胞 (iCX26GJC) は、3 次元培養時に胚様体で観察されたコネキシン 26 を発現する細胞集団 (Small vesicle) に由来するものであり、胚様体における Small vesicle を大量に作製することで、iCX26GJC の作製効率も上がるのではないかと考えた。本実験では、マウス ES/iPS 細胞を用いてコネキシン 26 発現細胞を大量に作製するための培養条件を検討した。培養条件の評価は、Day7 における *Gjb2* および *Gjb6* 遺伝子の発現量と CX26 を発現する Small vesicle の量を指標として評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト iPS 細胞からコネキシン 26 を発現する蝸牛支持細胞への分化誘導法の開発

本研究では、ヒト iPS 細胞からコネキシン 26 を発現する蝸牛支持細胞様細胞 (iCX26GJC) への分化誘導法を開発した。コネキシン 26 を発現する細胞は 3 次元培養と 2 次元培養の組み合わせにより分化誘導される。最初に、3 次元培養における培養条件を内耳関連遺伝子の発現量および、免疫染色によりコネキシン 26 の発現量を指標として検討した。

その結果、Day7 における GJB2 や GJB6 の発現量が特定の培養条件において上昇した。さらに、PAX2, PAX8, GATA3 といった内耳前駆細胞の遺伝子マーカーの上昇も観察された (図 1)。次に、これらの細胞をマウス内耳由来のフィーダー細胞上で接着培養した。その結果、移動した胚様体から増殖したコロニーの一部に CX26 を発現する細胞細胞集団が観察された、またこれらの細胞は細胞間に CX26 ギャップ結合プラーク様構造を構築していた (図 2)。また、接着培養により増殖した CX26 発現細胞は、CX30 をはじめとした、内耳に関連するタンパク質を発現していた。また、これらの細胞の遺伝子発現を調べた結果、KIAA1199 や SPARCL1, MIA, OTOF といった内耳支持細胞関連の遺伝子の発現量が上昇していた (図 3)。これらのことから本研究により iPS 細胞から分化誘導したコネキシン 26 を発現する細胞は内耳支持細胞様細胞であると考えられた。上記の手法を用いて、GJB2 遺伝子の 235delC の変異をもつ難聴患者由来の iPS 細胞から内耳支持細胞を作製した。免疫染色により CX26 と CX30 の発現を調べた。CX30 は内耳支持細胞において CX26 とともにギャップ結合複合体を構築している。免疫染色の結果、患者由来の iPS 細胞から作成した細胞はコネキシン 26 を発現しておらず、また構築されたギャップジャンクションプラークの最大長も健常人のものに比べ短いことが明らかとなった (図 4)。次に、Scrape loading dye transfer assay を用いて分化誘導した細胞の機能性を評価した。その結果、健常者 iPS 細胞から作成した iCX26GJC は色素の拡散が見られたのに対し、未分化な iPS 細胞やフィーダー細胞では色素の拡散は全く見られなかった。難聴患者 iPS 細胞由来の iCX26GJC は色素の拡散が認められたものの、健常者と比べて著しく色素の移動距離が短かった (図 5)。このことから、GJB2 難聴患者において、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション能力が低下していることが示唆された。これらの成果は『Modeling Gap junction beta 2 gene-related deafness with human iPSC』というタイトルで Human Molecular Genetics に掲載された。

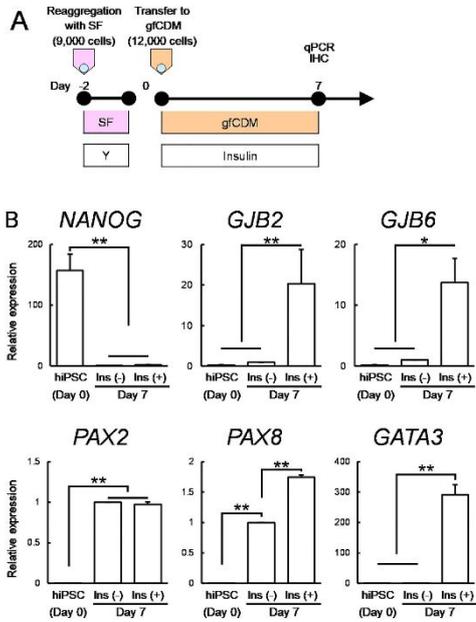


図 1. 分化誘導法の模式図および Day7 における内耳前駆細胞の遺伝子発現

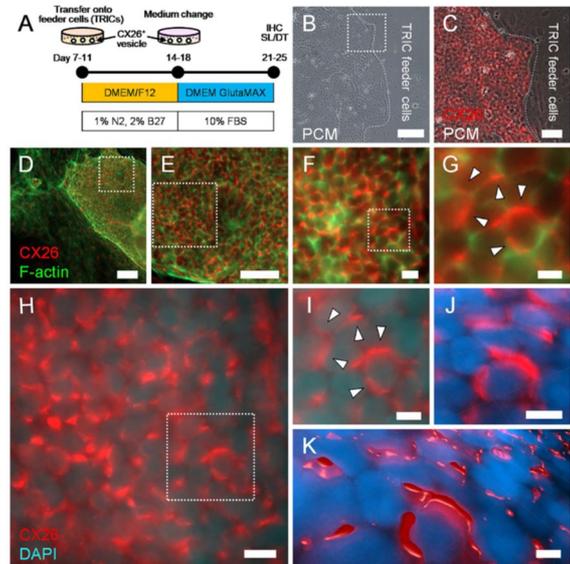


図 2. 分化誘導法の模式図および 2 次元培養で観察されたコネキシン 26 ギャップ結合構築細胞

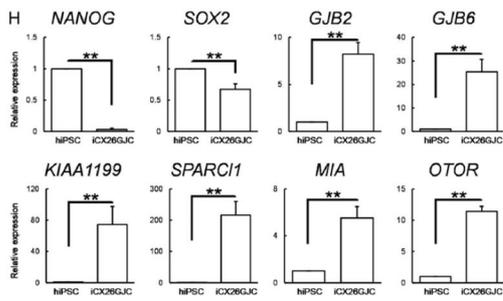


図 3. 2 次元培養における内耳関連遺伝子の発現

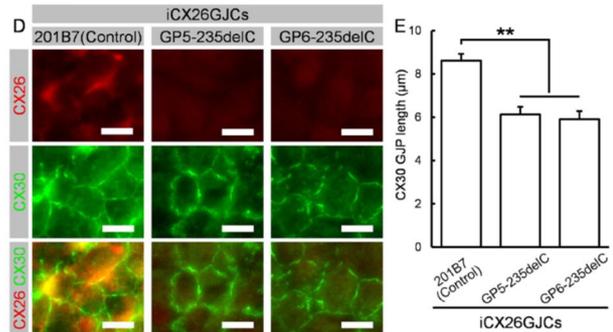


図 4. 患者由来の iPS 細胞から作成した内耳支持細胞様細胞における CX26 および CX30 の発現様式

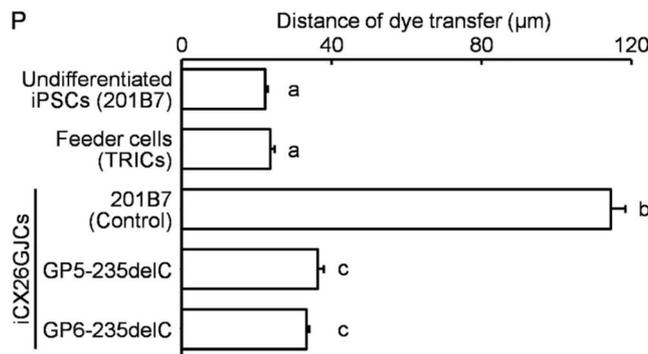


図 5. CX26 発現細胞における Scrape loading dye transfer assay の結果

## (2) GJB2 遺伝子に変異を持つ難聴患者および健常者からの iPS 細胞樹立

難聴の原因となる GJB2 遺伝子の変異は 100 以上報告されており、軽度～重度難聴まで様々な聴力像を示す。

本研究では、本邦の GJB2 難聴の患者における患者数が多い 3 つの遺伝子変異すなわち、c.235delC, p.V37I, p.G45E/Y136X の変異をホモまたはヘテロで持つ患者や兄弟姉妹から血液を採取し、iPS 細胞を樹立した。これらの細胞株はいずれも、SOX2 や Oct3/4 といった未分化マーカーを発現しており、また、各胚葉への分化能を有していた。

本研究の成果は、それぞれ『Generation of the induced pluripotent stem cell (hiPSC) line (JUFMDOi004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p. V37I) mutation.』、『Generation of two induced pluripotent stem cell lines from PBMCs of siblings carrying c. 235delC mutation in the GJB2 gene associated with sensorineural hearing loss.』、『Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p. G45E/Y136X mutation in GJB2.』というタイトルで Stem cell research に掲載された。

## (3) 効率的なコネキシン 26 発現細胞の分化誘導法の開発

これまでの成果から、2 次元培養で観察されたコネキシン 26 ギャップ結合構築細胞 (iCX26GJC) は、3 次元培養時に胚様体で観察されたコネキシン 26 を発現する細胞集団 (Small vesicle) に由来するものであり、胚様体における Small vesicle を大量に作製することで、iCX26GJC の作製効率も上がるのではないかと考えた。本実験では、マウス ES/iPS 細胞を用いてコネキシン 26 発現細胞を大量に作製するための培養条件を検討した。具体的には、以前報告した BMP4 ベースの 3 次元培養を行い (Fukunaga et al., 2016) 追加の因子として Activin/Nodal/TGF-beta 阻害剤 (SB431542: SB) を添加した。SB431542 は ES/iPS 細胞の分化誘導において中内胚葉への分化を阻害することが知られている。3 次元培養 7 日目における Gjb2 および Gjb6 の mRNA 発現量を調べた結果、BMP に SB を添加した群は Gjb2 および Gjb6 の発現量が BMP 単独群と比べ有意に上昇した。これに対し、SB 単独群では mRNA の上昇は認められなかった。

また、胚様体におけるコネキシン 26 発現細胞の局在を調べるため、免疫染色を行った。その結果、胚様体内に Small vesicle が多数形成されていた。胚様体内における CX26<sup>+</sup> Small vesicle の数を計測した結果、無添加群 (BMP-, SB-) や SB 単独群 (BMP-, SB+) では Small vesicle の形成が認められなかったのに対し、BMP4 単独群 (BMP+, SB-) や BMP/SB 群 (BMP+, SB+) では Small vesicle の形成が認められた。さらに、BMP4 に SB を添加することで、Small vesicle の形成数が有意に上昇した。

また、本実験において作成された CX26<sup>+</sup> Small Vesicle は実体顕微鏡下でのハンドソーティングが可能であり、これらを接着培養することで均一なコネキシン 26 ギャップ結合構築細胞のシートを作製することが可能となった。

これらの成果は、『Activin/Nodal/TGF-β Pathway Inhibitor Accelerates BMP4-Induced Cochlear Gap Junction Formation during In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells』というタイトルで Frontiers in Cell and Developmental Biology に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Shirai Kyoko, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Shiga Takahiro, Chen Cheng, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kawano Atsushi, Kamiya Kazusaku	4. 巻 47
2. 論文標題 Generation of two induced pluripotent stem cell lines from PBMCs of siblings carrying c.235delC mutation in the GJB2 gene associated with sensorineural hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101910 ~ 101910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101910	査読の有無 無
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, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Chen Cheng, Iizumi Madoka, Shiga Takahiro, Matsuoka Rina, Anzai Takashi, Hibiya-Motegi Remi, Tajima Shori, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kamiya Kazusaku	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p.G45E/Y136X mutation in GJB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102290 ~ 102290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102290	査読の有無 無
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 e100
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, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Chen Cheng, Shirai Kyoko, Kawano Atsushi, Ikeda Katsuhisa, Kamiya Kazusaku	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling gap junction beta 2 gene-related deafness with human iPSC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1429 ~ 1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab097	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 Fukunaga Ichiro, Oe Yoko, Chen Cheng, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Koike Akito, Ikeda Katsuhisa, Kamiya Kazusaku	4. 巻 9
2. 論文標題 Activin/Nodal/TGF- Pathway Inhibitor Accelerates BMP4-Induced Cochlear Gap Junction Formation During in vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.602197	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福永一朗
2. 発表標題 SFEBq培養におけるConnexin26を指標とした培養条件の検討と内耳細胞への分化誘導
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 内耳前駆細胞の作製法	発明者 福永一朗, 神谷和作	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、2016-030662	出願年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------