

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24038

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞からの内耳血管条辺縁細胞分化誘導系の確立

研究課題名(英文) Establishment of method to induce differentiation of human pluripotent stem cells into stria vascularis marginal cells in inner ear

研究代表者

三枝 智香 (Saegusa, Chika)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：00280800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてはヒトiPS細胞から内耳血管条辺縁細胞を分化誘導する系を構築した。辺縁細胞は内耳蝸牛内のイオン環境維持に必須の細胞であるが、これまで辺縁細胞分化誘導系は他研究グループから報告されておらず、本研究により構築した辺縁細胞分化誘導系は世界で初めて辺縁細胞(induced marginal cells, iMC)の分化誘導に成功した例である。iMC分化誘導の成功により、今後、難聴の病態解析や薬剤探索が大きく進むと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては内耳蝸牛内ホメオスタシス維持に重要である血管条辺縁細胞をヒトiPS細胞から分化誘導する系を構築した。新規内耳細胞様細胞分化誘導系として特許を申請している。induced marginal cells(iMC)は内在辺縁細胞と同様にタイトジャンクションタンパク質やチャネルタンパク質を発現していることから、ヒト難聴の病態解析や難聴に対する治療薬・保護薬の探索に応用可能であり、iMCを用いることで今後難聴研究が大きく進むと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Marginal cells in stria vascularis of inner ear play indispensable roles in maintaining homeostasis in cochlea. We have established the method to induce the differentiation of human pluripotent stem cells (hiPSCs) into marginal cell-like cells (iMC). Differentiation of iMCs from hiPSCs are induced by three-dimensional (3D)-stepwise method. This is the first report of the successful method to induce the differentiation of hiPSCs into iMCs. iMCs are useful for the analysis of the mechanisms of hearing loss and drug screening, and will contribute to develop novel therapies for hearing loss.

研究分野：耳科学・細胞生物学・幹細胞学

キーワード：内耳 血管条 辺縁細胞 iPS細胞 難聴 上皮細胞 タイトジャンクション カリウムチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

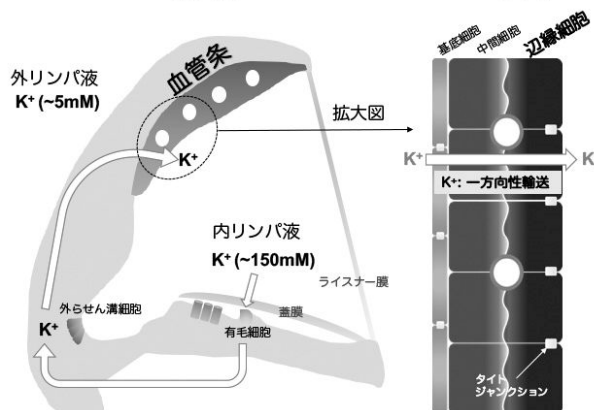
1. 研究開始当初の背景

難聴は QOL の著しい低下をもたらす疾患であり、特に高齢者の発症頻度は非常に高い(75 歳以上の約半数)が根本的な治療方法は未だ存在しない。また難聴は近年認知症などのリスクファクターとしても注目され、難聴の発症機構の理解および治療方法の確立は重要かつ緊急の課題である。難聴の原因の一つとして内耳蝸牛血管条の機能不全がある。血管条は内耳蝸牛におけるイオン環境の恒常性維持に必須の組織である(図 1)。外界からの音圧情報は蝸牛内リンパ液中の K^+ イオンなどが有毛細胞に取り込まれることで電気信号へ変換される。つまり蝸牛内のイオン環境が正常に保たれることは音圧情報が正しく電気信号に変換されるために必須である。蝸牛において内リンパ液中の高 K^+ イオン濃度を保ちイオン環境を維持する役割を持つ組織が血管条である。血管条の機能不全は多くの種類の難聴(遺伝性・薬剤性・加齢性・騒音性・ウイルス感染性)の原因となることが知られている。

これまで難聴の発症機構の解析には遺伝子改変マウスや薬剤投与マウス・ラットなどの齧歯類がモデル動物として主に用いられてきたが、齧歯類モデル動物の表現型が必ずしもヒトの病態と一致しない例も数多く報告されており、ヒトの細胞・組織を用いて病態の解析を行うことが近年特に重要視されるようになった。しかしながら、他の内耳組織と同様に血管条をヒトから解剖学的に非侵襲的に採取することが困難であり、さらに難聴自体は致死的な疾患ではないためヒト病理組織を入手することが困難である、などの理由から、ヒトの細胞・組織を用いて難聴の発症機構を解析することは容易ではない。こういった問題点を克服するために申請者はヒト多能性幹細胞(iPS 細胞)から血管条細胞を分化誘導し、その細胞を用いて難聴の発症機構を明らかにしたいと考えた。

図 1A: 蝸牛断面図

図 1B: 血管条模式図



これまで難聴の発症機構の解析には遺伝子改変マウスや薬剤投与マウス・ラットなどの齧歯類がモデル動物として主に用いられてきたが、齧歯類モデル動物の表現型が必ずしもヒトの病態と一致しない例も数多く報告されており、ヒトの細胞・組織を用いて病態の解析を行うことが近年特に重要視されるようになった。しかしながら、他の内耳組織と同様に血管条をヒトから解剖学的に非侵襲的に採取することが困難であり、さらに難聴自体は致死的な疾患ではないためヒト病理組織を入手することが困難である、などの理由から、ヒトの細胞・組織を用いて難聴の発症機構を解析することは容易ではない。

こういった問題点を克服するために申請者はヒト多能性幹細胞(iPS 細胞)から血管条細胞を分化誘導し、その細胞を用いて難聴の発症機構を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

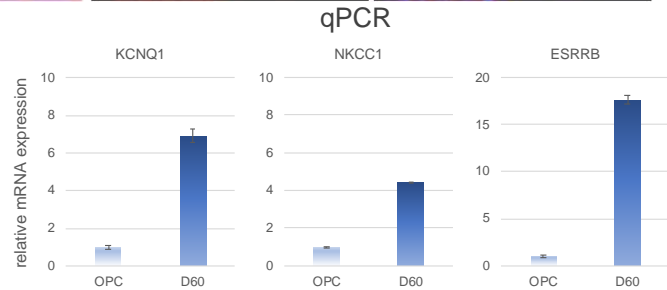
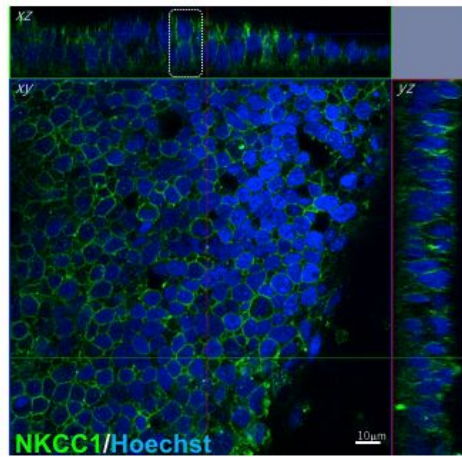
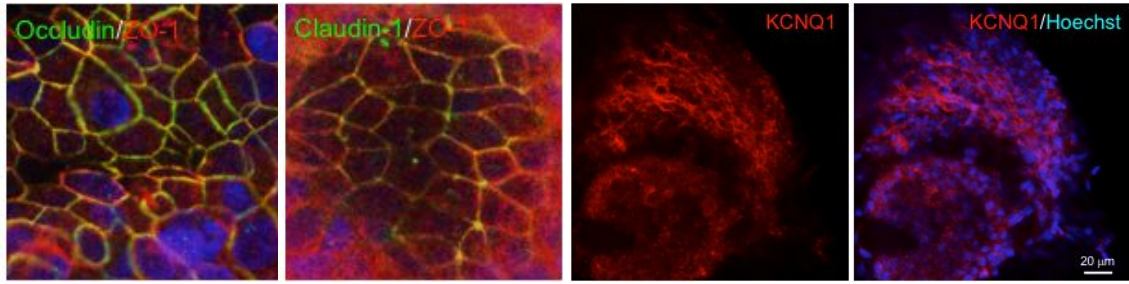
これまでに報告された多能性幹細胞からの内耳細胞分化誘導系のほとんどは有毛細胞やらせん神経節細胞の分化誘導を目的としている[Koehler *et al.*, Nat Biotechnol. (2017) 35:583-589 など]。ヒト血管条は有毛細胞・らせん神経節細胞と並んで、聴覚機能に必須の組織であるが、多能性幹細胞から血管条細胞の分化誘導に成功した例は未だ報告されていない。そこで、本研究においては、難聴の発症機構の解明および治療薬の探索を見据え、ヒト iPS 細胞から血管条細胞を分化誘導する系の確立を目的とした。血管条を構成する辺縁細胞・中間細胞・基底細胞(図 1B)のうち、バリア形成・イオン輸送に最も重要であり、さらに細胞の発生・分化の分子機構についての知見が最も豊富である辺縁細胞に焦点をあて、その分化誘導系の構築を試みた。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から血管条辺縁細胞への分化誘導条件を検討した。添加する栄養因子の種類・濃度・添加のタイミング、血清代替物の種類、培養環境(静置、振盪) 培養日数などについて条件を振って培養し、辺縁細胞マーカー(Claudin-1, ZO-1, Occludin, Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, KCNQ1, KCNE1, PAX2, ESRRB, LMX1A, LRP2 など)の発現を qPCR や免疫染色で解析することで、各分化誘導条件を評価した。培養は三次元の浮遊培養で行った。また分化誘導した辺縁細胞様細胞のバリア機能を評価する目的で、4kDa-FITC-Dextran 透過実験を行った。

4. 研究成果

血管条辺縁細胞マーカーを発現する細胞をヒト iPS 細胞から分化誘導するために適した条件を検討した。その結果、iPS 細胞からまず二次元で内耳前駆細胞(Otic Progenitor Cell, OPC)を分化誘導し、その後三次元培養系で添加する栄養因子の組み合わせを変えながら、およそ 60 日間培養することで辺縁細胞様細胞(induced marginal cell, iMC)を分化誘導できることが分かった。この方法で分化誘導した iMC においては、血管条辺縁細胞のバリア機能に重要なタイト



ジャンクションタンパク質である Claudin-1, ZO-1, Occludin や、方向性を持ったイオン輸送に重要な Na⁺/K⁺-ATPase、NKCC1、K チャネルタンパク質 alpha subunit の KCNQ1、K チャネル beta subunit の KCNE1 などの発現を認めることができた(上図)。辺縁細胞が蝸牛のホメオスタシス(イオン濃度勾配維持)に寄与

する上で非常に重要なこれらのタンパク質の発現が認められたことから、本研究で構築した系で分化誘導した iMC は、内在辺縁細胞に近い性質を有しており、病態の解析や薬剤探索に応用可能であると考えられる。内在辺縁細胞で発現の認められている転写因子 PAX2, LMX1A, ESRRB についても発現を認めることができた。本分化誘導系の構築につき、特許申請中ならびに論文投稿準備中である。

また FITC-Dextran 取り込み実験を行ったところ、4kDa-FITC-Dextran は細胞間を透過できなかったが、EDTA 処理することで 4kDa-FITC-Dextran が細胞間を透過できるようになった。このことから iMC は上皮細胞特有の Ca²⁺ 依存的なバリア機能を有していることが示唆された。しかしながら、本研究で構築した iMC 分化誘導系は三次元培養系であり、イオン輸送機能・ポンプ機能の解析を行うのは困難である。そのため iMC が内在辺縁細胞と同様のイオン輸送機能・ポンプ機能を持つかどうかの検討は不十分である。二次元での iMC 分化誘導系を構築し、iMC のイオン輸送機能・ポンプ機能を解析することが次の課題である。

幹細胞から辺縁細胞を分化誘導する系は未だ他研究グループから報告されていない。本研究で構築した辺縁細胞分化誘導系は申請者独自の系であり、本手法で分化誘導した iMC は、難聴の病態解析や薬剤探索に有用であり、今後の難聴研究に大きく寄与するものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 4件）

1. 著者名 Saeki, T., Yoshimatsu, S., Ishikawa, M., Hon, C.-C., Koya, I., Shibata, S., Hosoya, M., Saegusa, C., Ogawa, K., Shin, J.W., Fujioka, M., Okano, H	4. 巻 20
2. 論文標題 Critical roles of FGF, RA, and WNT signalling in the development of the human otic placode and subsequent lineages in a dish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 165 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.04.008	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 Saegusa C, Hosoya M, Nishiyama T, Saeki T, Fujimoto C, Okano H, Fujioka M, Ogawa K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Low-dose rapamycin-induced autophagy in cochlear outer sulcus cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investig Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 520-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.392.	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 Nishiyama T, Fujioka M, Saegusa C, Oishi N, Harada T, Hosoya M, Saya H, Ogawa K.	4. 巻 534
2. 論文標題 Deficiency of large tumor suppressor kinase 1 causes congenital hearing loss associated with cochlear abnormalities in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 921-926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.073.	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 Cheng YF, Chan YH, Hu CJ, Lu YC, Saeki T, Hosoya M, Saegusa C, Fujioka M, Okano H, Weng SM, Hsu CJ, Chang KH, Wu CC.	4. 巻 40
2. 論文標題 Generation of a human iPS cell line (CGMH.SLC26A4919-2) from a Pendred syndrome patient carrying SLC26A4 c.919-2A>G splice-site mutation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	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) 10.1016/j.scr.2019.101524.	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三枝智香、 細谷誠、 藤岡正人、 佐伯翼、 小川郁
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞からの血管条辺縁細胞分化誘導系の確立
3. 学会等名 第29回 日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三枝智香、藤岡正人、細谷誠、神崎晶、小川郁
2. 発表標題 網羅的遺伝子発現解析による新規自己免疫性難聴モデルマウスの分子生物学的検討
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡正人、水足邦雄、三枝智香、神崎晶
2. 発表標題 感覚上皮と内リンパ嚢の免疫学的クロストーク:T細胞依存性感覚上皮特異的自己免疫性難聴トランスジェニックマウスが示すこと
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三枝智香、細谷誠、藤岡正人、小澤宏之
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞からの血管条辺縁細胞分化誘導系の検討
3. 学会等名 第31回日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤岡 正人、山野遼義晴、吉浜圭祐、細谷誠、三枝智香、小澤宏之、小崎健次郎、松永達雄
2. 発表標題 当院の難聴遺伝外来における基礎・臨床一体型研究
3. 学会等名 第66回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chika Saegusa, Hiroyuki Ozawa, Hideyuki Okano, Masato Fujioka
2. 発表標題 Induced marginal cells of inner ear from human iPS cells as the disease models for hearing loss
3. 学会等名 ISSCR Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 内耳前駆細胞の製造方法、内耳有毛細胞の製造方法、薬剤の評価方法、及び内耳細胞分化誘導用組成物	発明者 佐伯翼、藤岡正人、三枝智香、細谷誠、岡野栄之他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/ 21862	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 内耳有毛細胞の製造方法、薬剤の評価方法、及び細胞分化誘導用組成物	発明者 佐伯翼、藤岡正人、三枝智香、細谷誠、岡野栄之他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/21863	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 内耳血管条辺縁細胞の製造方法、薬剤の評価方法、及び薬剤評価用細胞培養物	発明者 三枝智香、藤岡正人、岡野栄之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-144125	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
---------	---------