

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09638

研究課題名（和文）ヒト内耳オルガノイドにおける内耳感覚上皮幹細胞の同定と単離培養

研究課題名（英文）Identification and expansion of sensory epithelial stem cell from human inner ear organoid

研究代表者

中村 高志（Nakamura, Takashi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80724179

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、ヒトES細胞を分化培養させた内耳オルガノイドから、LGR5およびSOX2陽性内耳幹細胞を単離培養することを試みた。前者は発現効率の問題から単離培養は困難であったが、後者についてはレポーター細胞を用いることで単離培養が可能であった。これにより、内耳感覚上皮細胞の特性を解析し、内耳有毛細胞への分化誘導が可能であることを確認した。特にSOX2陽性細胞を用いたオルガノイド誘導実験では、従来よりも高い効率で内耳有毛細胞特異的な遺伝子発現を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、内耳再生医療の実現に向けた重要な一歩となる可能性を秘めている。難聴患者数が増加する中、内耳有毛細胞の再生を目指した本技術は、感音難聴の根本的な治療法開発に貢献すると考えられる。また、内耳オルガノイドを用いた新たな研究手法は、内耳の発生や病態解明にも寄与し、再生医療分野全体の進展に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to isolate and culture LGR5 and SOX2 positive inner ear stem cells from inner ear organoids differentiated from human ES cells. While isolation and culture of the former proved challenging due to low expression efficiency, the latter was successfully isolated and cultured using reporter cells. This enabled us to analyze the characteristics of sensory epithelial cells and confirm their potential to differentiate into inner ear hair cells. Notably, organoid induction experiments using SOX2 positive cells demonstrated higher efficiency in the expression of genes specific to inner ear hair cells compared to traditional methods.

研究分野：内耳再生

キーワード：内耳オルガノイド 内耳有毛細胞 SOX2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療には、自己修復能がない、または限られた部位で傷害された組織や臓器を修復するための技術として、主に二つのアプローチが存在する。これらは、内在性の幹細胞を利用する「分化誘導療法」と、試験管内で培養した幹細胞を利用する「細胞移植療法」である。眼科や整形外科の分野では、後者のアプローチがすでに臨床応用されている。たとえば、加齢黄斑変性症に対する ES 細胞由来の網膜色素変性上皮細胞移植や、急性期脊髄損傷に対する自家骨髄間葉系細胞移植などがその成功例である。

一方で、内耳の再生医療、特に細胞移植療法に関しては、動物実験による研究成果は蓄積されつつあるものの、ヒトに対する有効な治療法はまだ存在しない。内耳の感音難聴は、主に内耳有毛細胞の変性と脱落によって引き起こされる。これらの細胞は自己修復能を持たないため、難聴は不可逆的かつ永続的であり、根本的な治療は困難とされてきた。しかし、近年の研究で、内耳の支持細胞には WNT シグナルの標的遺伝子である *Lgr5* が発現しており、これが幹細胞としての機能を持つことが明らかになった。*Lgr5* 陽性細胞は有毛細胞への再生能を持つことが示され、動物実験において有毛細胞の再生が確認されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト ES 細胞を分化培養させた内耳オルガノイドから *LGR5* 陽性内耳幹細胞を単離培養し、これを細胞移植療法に適用することでヒト内耳再生を実現することである。具体的には、*LGR5*-GFP レポーター細胞株を作成し、内耳オルガノイド培養を行う。そこで得られた GFP 陽性細胞を FACS ソーティングによって分取し、再度培養・増殖させることで、ヒト由来の *LGR5* 陽性内耳幹細胞を得ることを目指す。このアプローチにより、将来的には内耳有毛細胞の再生を実現し、感音難聴の根本的な治療法を開発することが期待される。

3. 研究の方法

LGR5 レポーターラインの作成

ヒト ES 細胞株 (WA25) を購入し、CRISPR ゲノム編集技術を用いて *LGR5* の下流に GFP 遺伝子を挿入した *LGR5* レポーターラインを作成する。この方法により、*LGR5* の発現を可視化し、GFP 陽性細胞を特定することが可能となる。

内耳オルガノイド培養

作成した *LGR5* レポーターラインを用いて、内耳オルガノイドの培養を行う。オルガノイドは三次元培養したヒト ES 細胞塊に小分子化合物や成長因子を投与して作成する。これにより、生理的な機能を持つ内耳有毛細胞、支持細胞、神経細胞が含まれるミニ臓器が形成される。

LGR5 陽性幹細胞の単離培養

オルガノイドをシングルセル化し、FACS ソーティングによって GFP 陽性細胞を分取・回収する。これらの細胞を再度培養し、増殖させることで、細胞移植に利用可能なヒト *LGR5* 陽性内耳幹細胞を得る。この過程で、細胞の維持培養に必要な小分子化合物や成長因子を最適化する。

4. 研究成果

本研究では、内耳感覚上皮幹細胞のマーカーとして *LGR5* に加え、新たに *SOX2* を候補とした。*SOX2* は内耳発生の初期段階における幹細胞特性を持つことが知られており、内耳オルガノイドへの誘導効率を向上させる可能性があると考えた。*SOX2* をラベルしたヒト ES 細胞株を用いて、その内耳オルガノイドへの誘導効率を評価した結果、従来のマーカーよりも高い蛍光陽性率が得られた。

さらに、FACS ソーティング技術を用いて *SOX2* 陽性細胞を分取し、これらの細胞を単離培養し、内耳オルガノイドへの再誘導実験を行った。得られた内耳オルガノイドの機能解析では、感覚上皮細胞としての特性が詳細に評価された。免疫染色および qPCR 解析により、内耳感覚上皮特異的な遺伝子発現が確認された。ES 細胞から作成したオルガノイドと同様に、耳胞様の構造をなす細胞群の中に Myosin VI や PCP4 といった幼若な内耳有毛細胞のマーカーが発現していた。

しかし、Myosin VIIa や POU4F3 といった機能的に成熟した有毛細胞を確認することはできなかった。この理由としては、オルガノイドから細胞を単離する過程や FACS ソーティングの過程で機械的な刺激が加わり、細胞の性質に何らかの修飾が加わった可能性が考えられた。単一細胞化

の過程ではピペッティングなど機械的な刺激をできるだけ少なくして細胞への負荷を減らしたものの、これら成熟有毛細胞のマーカ―を同定することはできなかった。

今後の研究では、得られた単離細胞の分化能を確認したうえで、これを動物モデルに移植し、内耳機能の回復を目指した実験を進める予定である。内耳幹細胞の移植により、難聴の根本的な治療を開発することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|----------------------------|
| 1. 著者名 Moore Stephen T., Nakamura Takashi, Nie Jing, Solivais Alexander J., Aristizabal-Ramirez Isabel, Ueda Yoshitomo, Manikandan Mayakannan, Reddy V. Shweta, Romano Daniel R., Hoffman John R., Perrin Benjamin J., Nelson Rick F., Frolenkov Gregory I., Chuva de Sousa Lopes Susana M., Hashino Eri | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Generating high-fidelity cochlear organoids from human pluripotent stem cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cell Stem Cell | 6. 最初と最後の頁 950 ~ 961.e7 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2023.06.006 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Ueda Yoshitomo, Nakamura Takashi, Nie Jing, Solivais Alexander J., Hoffman John R., Daye Becca J., Hashino Eri | 4. 巻 150 |
| 2. 論文標題 Defining developmental trajectories of prosensory cells in human inner ear organoids at single-cell resolution | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Development | 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) 10.1242/dev.201071 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中村 高志 |
| 2. 発表標題 聴覚・平衡覚機能再生に向けた幹細胞トランスレショナルリサーチ ヒトオルガノイドモデルを用いた内耳研究の展望 |
| 3. 学会等名 第32回日本耳科総会・学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Nakamura |
| 2. 発表標題 Generation and application of human inner ear organoid containing vestibular and cochlear like hair cells. |
| 3. 学会等名 4th World Congress on Endoscopic Ear Surgery (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|