

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19581

研究課題名（和文）進化動物学的知見からの発生時間軸の種差を応用した聴覚器発生の高時間分解解析

研究課題名（英文）Highly time-resolved analysis of cochlear development with application of species differences in developmental time axis.

研究代表者

細谷 誠（Hosoya, Makoto）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30645445

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、胚発生に長時間を要する動物をあえて発生研究に用いて「時間分解能」高く発生現象を観察し、聴覚器である内耳蝸牛における内耳細胞の多様性形成のメカニズムの解明を目指した。対象として150日の発生期間を要するコモンマーモセットを用いることにより従来のモデル動物であるマウスより高い時間分解能で内耳発生を検討することが可能であった。網羅的遺伝子発現解析を組み合わせることで、霊長類と齧歯類との間で内耳発生に関する多数の種差が存在することが明らかになり、本研究手法を用いた今後の内耳研究への応用可能性が広がるとともに、今後の治療法の開発につなげられる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、コモンマーモセット内耳における発生現象を解析することで、従来のマウスとは異なる複数の新しい知見が得られた。これは、内耳発生における生命現象を従来の齧歯類のみでの検討では見逃していたことを示唆している。霊長類モデル動物を用いることにより今後も新たな知見が得られる可能性を示している。今回の手法を用いて内耳の発生に関する知見が深まるとともに、今後は治療法開発などへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of inner ear cell diversity formation in the inner ear cochlea by observing developmental phenomena with a high "temporal resolution" using animals that require a long embryonic development period for developmental studies. By using common marmosets, which have a developmental period of 150 days, it was possible to study inner ear development with a higher temporal resolution than in the mouse. Combined with comprehensive gene expression analysis, we found numerous species differences in cochlear development between primates and rodents, suggesting the possibility of applying this research method to future inner ear research and to the development of future therapies.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：コモンマーモセット 内耳 聴覚 蝸牛

1. 研究開始当初の背景

感音難聴は未だに有効な治療法に乏しい重要な研究対象である。診断技術の向上および疫学的研究の成果により、感音難聴の診断は大幅に向上し、多くの知見が集積されてきた。一方で、治療法の開発の進捗は世界的にも乏しい。治療法の確立が困難な理由の一つとして、内耳研究においてヒト細胞やヒト組織の利用が非常に困難なことが挙げられる。すなわち、腹腔内臓器や骨盤臓器などと異なり病的細胞の生検の機会が非常に乏しい。内耳の剖検の機会も限られている。稀少なヒト側頭骨検体の利用も試みられてはいるが、解剖学的・組織学的検討の目的の利用が主であり、分子生物学的な利用に耐えうるヒト側頭骨検体(死後数時間以内の剖出が必須)は国内外を問わず限られている。特に日本国内での利用の機会は限定されている。このため、内耳研究において、その代替として細胞株やモデル動物が広く用いられてきた。中でも遺伝子改変マウスは、その汎用性の高さから強力な研究ツールとして利用され、内耳研究に有用な情報をもたらしてきた。一方で、これらのモデルによって解決できなかった科学的課題も多く存在する。

これまでに研究代表者らは霊長類モデル動物であるコモンマーモセットおよびヒト iPS 細胞由来内耳細胞を用いて内耳研究をすすめ、従来当該分野の研究に多く使われてきたマウスモデルと比較し、「内耳細胞の分子生物学的性質は齧歯類と霊長類においてどれくらい保存されており、またどれくらい異なるのか」について検討をおこなってきた。具体的には、*in vivo* モデルとして、小型霊長類であるコモンマーモセットを用いた検討を展開し、*in vitro* モデルとして、ヒト iPS 細胞由来内耳細胞を用いた研究を展開している。実際、これまでの研究により、既存のモデルで未解明だった科学的課題に対して新しい展開をもたらした。このように、「進化学的な種差」に注目し、霊長類およびヒト検体を用いる研究を展開する中で、本動物の内耳発生研究を行っていたが、その過程の中で、内耳発生に要する時間がコモンマーモセットおよびヒトでは共通して、マウスの約3倍の時間を要することを報告してきた(Hosoya M et al. *FEBS journal*, 2021)。同時にこの過程でこれまでにマウスでは発現が報告されていない一過性の遺伝子発現や二峰性の発現パターンなどを観察するに至った。その考察過程において、「3倍の時間を要する」という事実は、実験に時間を要するという点ではマイナスであるが、前述の一過性の遺伝子発現や二峰性の発現パターンなどを観察に必要となる「時間分解能」の点からは非常に有用であることに気が付き本研究計画を着想した。すなわち、従来のマウスを用いた内耳研究では見逃されていた生命現象を新しい動物モデルを用いることによりとらえられるのではないかと考え本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、胚発生に長時間を要する動物をあえて発生研究に用いて「時間分解能」高く発生現象を観察し、聴覚器である内耳蝸牛における内耳細胞の多様性形成のメカニズムの解明を目指した。

個体発生に要する時間は動物種により大きく異なることが知られている。モデル動物の中でも発生に要する時間は大きく異なり、ゼブラフィッシュは受精後約24時間で器官形成が終わり3日でふ化する一方で、マウスやラットは出産に約20日を要する。ヒトにおいては初期胚の器官形成期は約8週目までであるが、中枢神経系は胎生38週まで成熟を続ける。大型動物になればなるほど、妊娠期間は長い傾向が知られており、キリンは460日、ゾウに至っては650日の妊娠期間を要する。霊長類においては、ゴリラ257日、ニホンザル173日と齧歯類に比較して長い発生期間を要する。しかし、本研究で利用したコモンマーモセットは霊長類の中では小型であるが、150日と長い発生期間を維持している。

このように胚発生に要する時間の種差は非常に大きいですが、現在の分子生物学的な実験では、効率の良さから発生時間の短い動物が好んで使われる。しかし発生に時間を要しないことは、発生過程において一過性の発現パターンを示す遺伝子の挙動の解析や複数のシグナル経路が一部重複して発現していた場合の解析などの際の「時間分解能」の観点からは不利であること。すなわち、全体としての観察には効率的であるが、時間的に局所で生じる現象の理解が困難である。例えば、内耳発生研究に頻用されるマウスでは、内耳発生に要する時間は胎生10日から生後14日目までの約21日間であり、特に前半の10日間の間に、蝸牛の回転構造の形成、神経伸長・シナプス形成、有毛細胞・支持細胞の運命決定と極めて重要な発生的イベントが集中して生じる。近年網羅的な研究が進み特にシングルセル解析を用いた解析は、細胞一つ一つの遺伝子発現パターンを解析することが可能であり「空間的な分解能」の高い内耳遺伝子発現プロファイリングを可能にした。しかし、マウスにおいては、(進化学的な見地からは)極めて短期間に内耳発生のイベントが集中し、たとえ連日の解析を行ったとしても、「時間的な分解能」には限界がある。

本研究は、従来の研究では、認識することさえ困難であった「時間分解能」に注目し、あえて長時間の発生時間を要するモデル動物を発生研究に用いることで新たな生命現象の観察に挑

んだ。ゆっくりとした発生現象を解析することにより時間分解能高く発生現象を解析することが可能である。「時間分解能」高く内耳発生を解析しさらにその知見をもとに内耳細胞の多様性形成のメカニズムを従来研究とは異なる角度から観察しなおすことを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、これまでの検討をもとに「時間分解」「空間分解」とともに高く内耳発生を検討するため、下記の手法を用いて検討を行った。

(1) シングルセル RNA-Seq を用いた網羅的遺伝子発現プロファイルの解析

胎生 80 日から 150 日にかけて約 10 週間かけて進むコモンマーモセットの内耳の発生をシングルセル RNA シークエンス法を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。今回の検討においては、胎生期の 3 ポイント、および出生直後のコモンマーモセット内耳サンプルを用いてシングルセル RNA シークエンス法による解析を行った。具体的な方法としては、目的とする妊娠週数のコモンマーモセット母体に対して麻酔下に帝王切開を行い胎児を摘出、内耳蝸牛を剖出後、細胞解離液を用いて細胞解離を行った後に、フィルターを通し生細胞のみを回収。一般的なプロトコルに従って油滴法にて単一細胞化したのちに RNA 抽出を行いシーケンサーで発現解析を行った。既存のコモンマーモセットのデータベースより発現遺伝子を同定し解析を行った。

(2) 一過性短期間局所発現もしくは多峰性発現パターンを示す遺伝子の同定

I の検討で得られたデータも参考に、「一過性短期間局所発現」もしくは「多峰性発現パターン」を示す遺伝子の検討を行った。発現パターンを免疫組織化学的に追加検討を行った。従来検討されてきた動物種では、発生器官の短さから検知することが難しかった超短期発現パターンもしくは従来の手法では単峰性の発現パターンと認識されてしまっていた発現パターンを、あえてゆっくり発生が進む本動物を用いて行うことにより検出することを試みた。

(3) 内耳細胞の時空間的な再分類

II で得られた複数の遺伝子の発現パターンを従来の内耳細胞の分類法に重ね合わせることで内耳細胞の時空間的な再分類（細分類化）を行った。また、(2) で行った免疫組織染色において、細胞内局在の変化が捕らえられた遺伝子産物も存在したため、その詳細も合わせて検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果、得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究を通して、まずコモンマーモセット胎児および新生児におけるシングルセル RNAseq 法による遺伝子発現解析の手法が確立された。現在、得られた網羅的な遺伝子発現解析を用いた二次解析を施行中である。特徴的な遺伝子発現パターンが得られた遺伝子も存在し、後述の免疫組織学的な検討とあわせて多数の遺伝子発現パターンに関する時空間的な種差に関する示唆が得られた。続いて、本研究によって実際に得られた二峰性もしくは齧歯類では知られていなかった遺伝子発現パターンについて下記にまとめる。

内有毛細胞とラセン神経節との間のシナプス形成期における観察により、OTOF 遺伝子が内有毛細胞に発現する時期が二峰性を示すことが明らかとなった。(Hosoya M, et al., *Developmental Neurobiology*, 2021) (後図①)。また、本検討によりラセン神経節の発生過程における齧歯類と霊長類の間での時空間的な遺伝子発現の差が少なくとも一部存在することを明らかにした。

本動物における有毛細胞発生時期より前の早期発生についても検討を行った。本動物における蝸牛内における感覚上皮の決定時期の遺伝子発現パターンの検討を行うことにより、齧歯類と霊長類における遺伝子発現パターンの違いが、発生早期においても存在することを明らかにした(Hosoya M, et al., *Neural Development*, 2022) (後図②)。とくに、*SOX2*, *CDKN1B*, *JAG1* の時空間的な発現パターンの前後関係が霊長類と齧歯類では異なっており、後述の Notch シグナルの構成要素の発現パターンとあわせて、蝸牛内の感覚上皮の領域決定に霊長類と齧歯類の間で差がある可能性が示唆され、今後の研究領域として期待される。

コネクシン遺伝子の発現パターンについても検討を行った。代表的な難聴遺伝子 GJB2 と GJB6 のコモンマーモセット内耳における発現パターンも検討を行い、マウスと比較して非常にゆっくり蝸牛が発生することを反映して、コネクシンの時空間的な発現パターンの詳細を観察することが可能であった。齧歯類では報告のなかったコネクシンによるギャップジャンクションの細胞内局在の発生過程における変化も確認し英文誌に報告を行った(Hosoya M. et al., *Genes*, 2022) (後図③)。

続いて血管条における発生過程の遺伝子発現パターンに関する検討を行った。血管条辺縁

細胞においては、従来 ATP1A1 遺伝子や BSND 遺伝子、SLC12A2 遺伝子などがマーカー遺伝子として知られていたが、これらの遺伝子の発現パターンが同期して発現するのではなく、時空間的に異なる発現時期、発現局在を示しながら最終的に血管条辺縁細胞に局在することを明らかにした。これらの発現は、マウスでは従来報告されておらず、おそらく本研究のメリットである発生に時間がかかる動物を研究対象に選んだために得られた結果であると考えた。同様に、中間細胞の血管条辺縁細胞間への侵入過程など、コモンマーマセットにおける血管条の詳細な形成過程を明らかにすることができた。なお、今回の検討により、本動物は霊長類モデル動物で唯一血管条の詳細な発生過程が明らかになっている動物となった。本検討についても国際誌に報告をおこなった (Hosoya M. et al., *Scientific Reports*, 2022) (後図④)。

今後の再生医療学的な展開も念頭に本動物における感覚上皮および有毛細胞・支持細胞分化期における Notch シグナル関連遺伝子の発現パターンの検討を行った。Notch シグナルの発現パターンに関しても発生後期において特に齧歯類と霊長類の間で差が目立ち、従来マウスと知られていたパターンと異なる時空間的な遺伝子発現パターンを示すという結果が得られた (Hosoya M et al., *Frontiers in Neuroanatomy*, 2023) (後図⑤)。発生後期における遺伝子発現パターンは、霊長類特異的な感覚上皮細胞の運命決定後の制御機構の存在を示す可能性があり、科学的な意義は高いと考えられる。

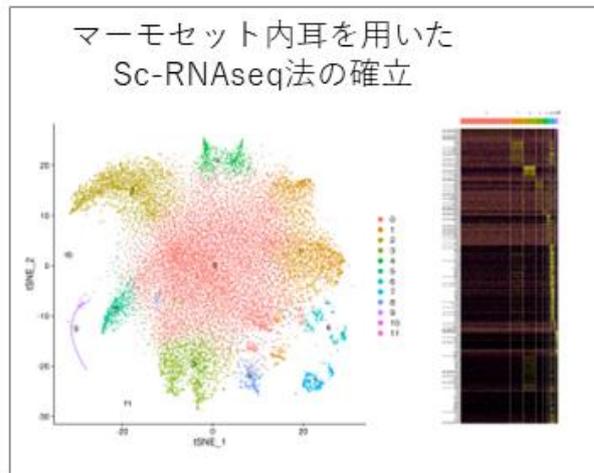
研究期間の成果は、2023 年 5 月までの時点で、代表者を筆頭著者として、英文誌 5 報に掲載され、その他 2023 年 5 月現在、2 報投稿中である。また、国内誌にも 2 報総説として本研究成果を報告した。本研究に関する演題でシンポジウムを 3 回行っており、本課題を通して従来不利と考えられた発生に時間がかかる動物を用いて、時空間的に高解像度での発生現象をとらえるという研究手法の有用性は確立されたことは、国内外で大きなインパクトを与えているものと考えられる。

(2) 今後の展望

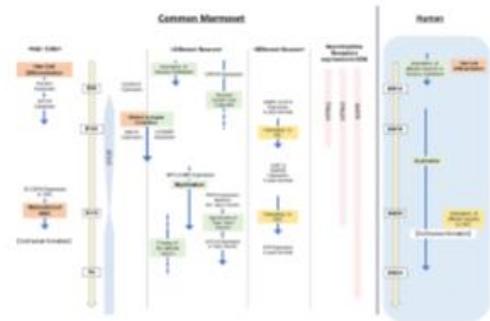
今回の検討により、本手法を用いた研究方法の有用性が明らかになり萌芽研究としての十分な知見が集積できたと考えられる。また、齧歯類と霊長類の内耳発生における遺伝子発現パターンの差が想像よりさらに多く検出できたことは、今後の霊長類内耳研究の重要性を示唆し、今後本研究を基にした更なる研究が進むと考えられる。このことは、本研究を始める際に研究代表者が予測した以上に、齧歯類を中心とした内耳発生の観察のみでは見落としている生命現象が存在することを示しており、今後の新しい研究領域・手法を切り開ける可能性を示唆している。

本研究を通して霊長類を用いた内耳における網羅的な遺伝子発現パターンの解析手法が確立された点も大きい。網羅的遺伝子解析の結果は現在更なる 2 次解析中であるが、本動物を用いた遺伝性難聴の治療法開発や霊長類特異的な感音難聴治療法の開発につなげていける可能性もあり、本動物を用いた内耳研究のさらなる発展が期待される。

本課題による研究により得られた成果



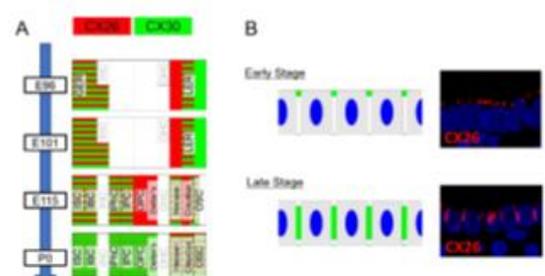
① コモンマーモセット
内毛細胞における *OTOF* 遺伝子の二峰性発現
(Hosoya M et al. *Developmental Neurobiology*, 2021)



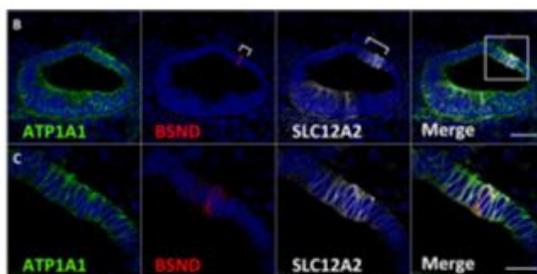
② コモンマーモセット内耳発生における
SOX2, *JAG1*, *CDKN1B* 発現の齧歯類との差
(Hosoya M et al. *Neural Development*, 2022)



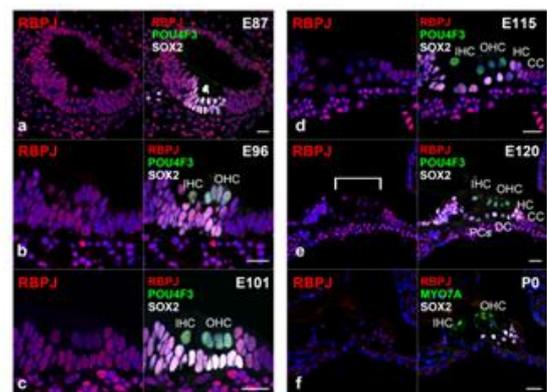
③ 難聴遺伝子 *GJB2* 発現局在の変化
(Hosoya M et al. *Genes*, 2022)



④ 血管条発生過程における
ATP1A1, *BSND*, *SLC12A2* 遺伝子の差
(Hosoya M et al. *Scientific Reports*, 2022)



⑤ 内耳発生における霊長類特異的な
NOTCHシグナル関連遺伝子の発現パターン
(Hosoya M et al. *Frontiers Neuroanatomy*, 2023)



シングルセルRNAseq法を用いた発生過程のコモンマーモセット内耳の解析手法を確立した。本研究を通して、齧歯類と比較した際の多数の時空間的な遺伝子発現パターンの違いがあることが明らかとなり今後の新しい研究手法としての有用性が示され、萌芽研究としての目的を達したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Hosoya Makoto, Fujioka Masato, Murayama Ayako Y., Ogawa Kaoru, Okano Hideyuki, Ozawa Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Dynamic Spatiotemporal Expression Changes in Connexins of the Developing Primate's Cochlea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1082 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12071082	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 Hosoya Makoto, Fujioka Masato, Murayama Ayako Y., Ozawa Hiroyuki, Okano Hideyuki, Ogawa Kaoru	4. 巻 81
2. 論文標題 Neuronal development in the cochlea of a nonhuman primate model, the common marmoset	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Neurobiology	6. 最初と最後の頁 905 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dneu.22850	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 細谷 誠	4. 巻 31
2. 論文標題 【「各種の側頭骨・脳幹・大脳標本から見えてくる聴覚機能の進化と内耳奇形の病態」】進化の観点から眺める霊長類モデル動物側頭骨を用いた発生研究: 齧歯類モデル動物との類似点と相違点	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 383 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hosoya Makoto, Fujioka Masato, Okahara Junko, Yoshimatsu Sho, Okano Hideyuki, Ozawa Hiroyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Early development of the cochlea of the common marmoset, a non-human primate model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural 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) 10.1186/s13064-022-00162-8	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 Hosoya Makoto, Kitama Tsubasa, Iwabu Kaho, Nishiyama Takanori, Oishi Naoki, Okano Hideyuki, Ozawa Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of the stria vascularis in the common marmoset, a primate model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-24380-6	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 細谷 誠	4. 巻 125
2. 論文標題 小型霊長類コモンマーモセットを用いた新規内耳研究プラットフォームの創生	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Tokeibugeka Gakkai Kaiho(Tokyo)	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3950/jibi inkotokeibu.125.12_1633	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 細谷 誠
2. 発表標題 臨床から基礎研究へ、その間をつなぐモデル動物プラットフォームの作成：再生医療と 遺伝子治療の「臨床応用のその 先」に必要な内耳基礎研究
3. 学会等名 第31回日本耳科学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細谷 誠
2. 発表標題 次世代リーダーの育成 新規手法による内耳・難聴研究への挑戦 新しい研究プラットフォームとしてのiPS細胞と小型霊長類モデル動物の内耳研究への応用(会議録)
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉頭頸部外科学会総会・学術講演 (招待講演)
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
---------	---------