

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390318

 研究課題名（和文）ES 細胞由来内耳細胞の効率的誘導  
 —細胞移植による聴覚機能回復にむけて—

 研究課題名（英文）Effective induction of inner ear hair cells from  
 mouse embryonic stem cells

研究代表者

吉川 正英 (YOSHIKAWA MASAHIDE)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50230701

## 研究成果の概要（和文）：

本研究計画では、内耳難聴疾患のキーとなる内耳有毛細胞に焦点を当て、多分化能を有する胚性幹細胞（ES 細胞）より有毛細胞を調製し、それらを用いた細胞移植治療を目的とした。ES 細胞から内耳有毛細胞への効率的な分化誘導をスクリーニングし、あるストローマ細胞の培養上清を用いると効率よく分化誘導が可能であることを発見した。これを HIST2 法と命名した。HIST2 法によって得られた有毛細胞様細胞は、トリ胚あるいは難聴マウス内耳への移植により生着を認め、移植細胞のソースとなり得ることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Hearing loss is mainly caused by loss of sensory hair cells (HCs) in the organ of Corti or cochlea. Although embryonic stem (ES) cells are a promising source for cell therapy, little is known about the efficient generation of HC-like cells from ES cells. In the present study, we developed a single-medium culture method for growing embryoid bodies (EBs), in which conditioned medium (CM) from cultures of ST2 stromal cells (ST2-CM) was used for 14-day cultures of 4-day EBs. At the end of the 14-day cultures, up to 20% of the cells in EB outgrowths expressed HC-related markers, including Math1 (also known as Atoh1), myosin6, myosin7a, calretinin,  $\alpha$ 9AChR and Brn3c (also known as Pou4f3), and also showed formation of stereocilia-like structures. Further, we found that these cells were incorporated into the developing inner ear after transplantation into chick embryos. The present inner ear HC induction method using ST2-CM (HIST2 method) is quite simple and highly efficient to obtain ES-derived HC-like cells with a relatively short cultivation time.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻科学

キーワード：内耳、再生医学、有毛細胞、幹細胞、耳鼻科、分化誘導、聴覚再生、細胞移植

## 【1. 研究開始当初の背景】

ES細胞は高い増殖能と分化多能性を有し、それゆえES細胞を*in vitro*でさまざまな細胞種に分化誘導させ、これを細胞移植に用いようとする研究は数多く進められている。しかし、*in vitro*においてES細胞から聴覚系神経細胞を作成したという報告は極めて乏しく、とりわけ内耳有毛細胞の作成については、LiらのEB-based stepwise methodによるマウスES細胞からの内耳有毛細胞様細胞誘導の報告のみ(PNAS, 100:13495-13500, 2003)であった。一般に、未分化ES細胞を*in vitro*で特定細胞種に分化させる手段として、大きく分けると①胚様体(EB)形成、②分化関連転写因子の遺伝子導入、③分化調節因子の培養液中への添加、④他の細胞や組織との共培養などがあり、これら単独あるいは組み合わせが使用される。これまでに、研究代表者はこれらの方法を駆使して、マウスES細胞から肝細胞、インスリン分泌細胞、神経幹細胞、ドーパミン産生細胞、感覚器官細胞である網膜関連神経細胞への分化誘導に成功し、さらに霊長類ES細胞から肝細胞への誘導も報告した。そこで、特に網膜関連神経細胞への分化誘導の成績を踏まえ、前述した内耳治療を背景に、発生学的にも類似した耳関連細胞への応用を考案した。すなわち、ES細胞から内耳有毛細胞への分化誘導法の開発と分化メカニズムの解明、さらに、内耳治療を目的としたそれらの細胞移植を目標に、本研究を計画した。

## 【2. 研究の目的】

ヒトをはじめとする哺乳動物の聴覚系神経細胞(有毛細胞・双極細胞)の自己再生能力は極めて乏しく、それ故、それらに分化し得る幹細胞を用いた移植は代替治療として期待される。感音性難聴の主たる原因は内耳有毛細胞の障害・消失によることが知られているが、聴覚の機能再生に関する多くの研究において、有毛細胞にフォーカスした研究は乏しい。有毛細胞をES細胞から作成しその移植により難聴モデル動物の聴覚機能再生を試みる研究は、感音性難聴の病因を直視したきわめてstraightforwardな治療戦略であり、ヒトES細胞やiPS細胞の使用も眼前に望まれる今日、21世紀の感音性難聴に対する細胞移植療法に大きく貢献すると考えられた。そこで本研究では、マウスES細胞より内耳有毛細胞の効率的な*in vitro*作成法を開発し、トリ胚および難聴モデルマウスへの内耳細胞移植を行うことを目的とした。

## 【3. 研究の方法】

### (1) マウス ES 細胞から有毛細胞への分化誘導

ES細胞は、初期分化を促進するために、胚様体(EB)を形成させた後、種々の培養液を用いることで、分化誘導を試みた。培養液には、神経幹細胞を誘導する培養液をはじめ、種々の神経系細胞培養添加物(N2、B27など)、血清代用KO-serumなどや細胞株の培養上清を用いた。培養細胞株は、PA6、OP9、ST-2、WISH、BeWo、TM-4を使用した。

培養7、14、21、28日目に、神経細胞マーカー(Nestin、MAP2、GFAPなど)および内耳有毛細胞マーカー(Math1、Brn3c、Myosin7aなど)をRT-PCRおよび免疫染色にて調べ、分化誘導効率を算出し、誘導効率の最も高い条件をスクリーニングした。

また、誘導した細胞の機械的刺激応答を調べるため、FM1-43FXを用いた色素染色による判定や、Phalloidin染色によるstereocilia様構造の確認、走査線電子顕微鏡(SEM)による微細構造の観察を行うことで、ES細胞由来有毛細胞様細胞のキャラクタリゼーションを行った。

### (2) 遺伝子導入によるマウス ES 細胞から有毛細胞への効率的分化誘導

有毛細胞のマーカーである転写因子Math1に着目し、ES細胞へ遺伝子導入することで、有毛細胞への分化効率に影響するのかを調べた。ES細胞への遺伝子導入には、ドキシサイクリン添加により遺伝子発現が制御可能なTet-Onシステムを採用した。樹立したMath1遺伝子制御可能なES細胞(Math1-ES)を用いて、有毛細胞への分化誘導を行った。Wild typeを対照とし、胚様体(EB)を形成させた後、種々の培養液を用いることで、分化誘導を試み、培養7、14、21、28日目に、神経細胞マーカーおよび内耳有毛細胞マーカーをRT-PCRおよび免疫染色にて調べ、分化誘導効率を算出した。

さらに、FM1-43FXによる機械的刺激応答細胞の解析およびSEMによる微細構造の観察し、Math1-ES細胞より分化誘導した有毛細胞様細胞のキャラクタリゼーションを行った。

### (3) マウス ES 細胞由来有毛細胞様細胞の移植

(1)、(2)で得られた成績をもとに、ES細胞由来有毛細胞様細胞をトリ胚あるいは難聴モデルマウス内耳に移植することで、細胞移植療法の基礎的検討を行った。

トリ胚への細胞移植：*in vitro*で作成したES細胞由来有毛細胞様細胞を単細胞化して移植細胞液を準備した。トリ胚の発生学的特徴

から、発生開始後 H-H stage 18 に出現する otic vesicle 内に移植細胞を注入後、トリ胚を取り出し、固定、凍結切片を作製した。凍結切片は、HE 染色による組織構築、GFP 抗体、抗 Myosin7a 抗体・抗 Espin 抗体による ES 細胞由来有毛細胞の適所生着性、phalloidin 染色による有毛細胞の確認を行った。

**難聴マウスモデルへの移植：**カナマイシンおよびエタクリン酸併用投与により難聴モデルマウスを作成した。側頭部を開創し、鼓室囊を露出させた後、蝸牛に直径 0.1mm の穴を開け、細胞懸濁液を送液した。移植後 2 週間、1 ヶ月、3 ヶ月後に蝸牛を摘出し、固定、脱灰処理後、凍結切片を作製した。HE 染色による組織構築の確認および、移植細胞を抗 GFP 抗体を用いた免疫染色にて識別し、有毛細胞マーカー (myosin7a, espin, paralbumin3) との 2 重染色にて有毛細胞の解析を行った。

#### (4) 霊長類 ES 細胞から有毛細胞への分化誘導

霊長類 ES 細胞は、カニクイザル由来 ES 細胞を用いて、(1)の成績を踏まえたうえで、有毛細胞への分化誘導実験を行った。初期分化を促進するために、マウス ES 細胞と同様に胚様体 (EB) を形成させた後、種々の培養液を用いることで、分化誘導を試みた。培養液は、(1)の条件と同様の成分で行った。培養 7、14、21、28 日目に、神経細胞マーカーおよび内耳有毛細胞マーカーを RT-PCR および免疫染色にて調べ、分化誘導効率を算出し、誘導効率の最も高い条件をスクリーニングし、霊長類 ES 細胞より分化誘導した有毛細胞様細胞のキャラクタリゼーションを行った。

### 【4. 研究成果】

#### (1) マウス ES 細胞から有毛細胞への分化誘導

ES 細胞から内耳有毛細胞への効率的な分化誘導をスクリーニングし、それらの細胞のキャラクタリゼーションを行うため、まずはマウス ES 細胞を用いた基礎的検討を行った。未分化なマウス ES 細胞から hanging drop 法により胚様体 (EB) を形成させ、その後、種々の細胞株 (主にマウス由来ストローマ細胞) と共培養または隔離培養、あるいは培養上清を用いることで分化誘導を試みた。その結果、ある種のストローマ細胞 (ST2) の培養上清を用いた場合、分化培養 3 週間後より内耳有毛細胞のマーカー (Math1、Myosin7a など) の遺伝子およびタンパク質発現を認めた (RT-PCR による遺伝子発現解析および細胞免疫染色による；**図 1**)。さらに、この効率的に分化誘導した有毛細胞様細胞の形態学的

な解析 (走査型電子顕微鏡による観察) を行ったところ、hair bundles (聴毛) と思われる特徴的な形態を有することが明らかとなった (**図 2**)。以上の成績から、我々は本法を Hair cell induction method using ST2 stromal cell conditioned medium (HIST2) 法と命名した。

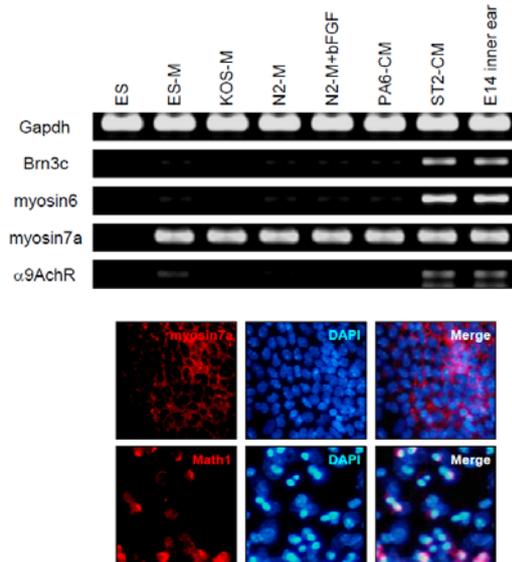


図 1

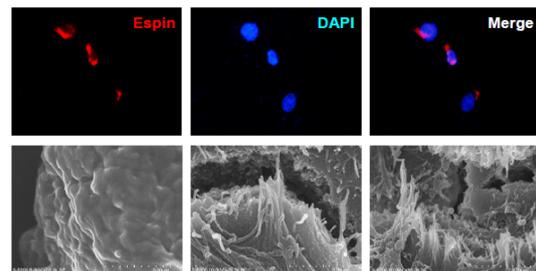


図 2

#### (2) 遺伝子導入によるマウス ES 細胞から有毛細胞への効率的な分化誘導

ES 細胞から内耳有毛細胞へ分化誘導に際し、有毛細胞の分化に必須の転写因子 Math1 に着目し、Math1 強制発現が分化誘導に及ぼす影響を調べた。まず、ES 細胞へドキシサイクリン添加により Math1 遺伝子発現が制御可能な Tet-On システムを導入した ES 細胞株 (Math1-ES) を樹立し、有毛細胞への分化誘導を行った。その結果、Math1 は ES 細胞から有毛細胞への分化誘導に効果的な因子であることが実証され、さらに HIST2 法によって分化誘導された有毛様細胞は、Math1 依存的に誘導することが明らかとなった (**図 3**)。

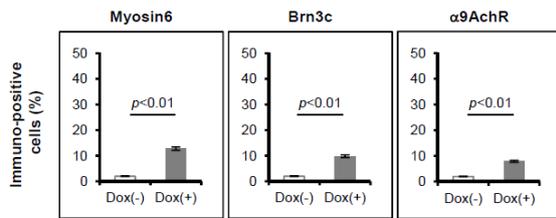


図 3

### (3) マウス ES 細胞由来有毛細胞様細胞の移植

(1)で得られた ES 細胞由来有毛細胞様細胞を用いてトリ胚への移植実験を行った結果、内耳（蝸牛管および半規管）への生着、および有毛細胞のマーカーの発現を確認した（図 4）。さらに、難聴モデルマウス蝸牛への移植を行った結果、細胞生着を認め、それらの細胞は有毛細胞のマーカーを発現維持していることが明らかとなり、*in vivo* における移植治療の基盤的知見を得ることができた。

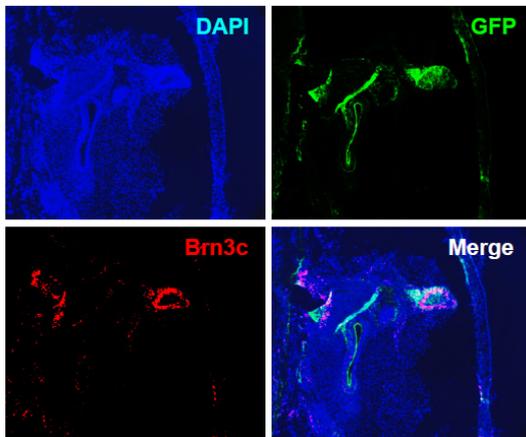


図 4

### (4) 霊長類 ES 細胞から有毛細胞への分化誘導

カニクイザル由来 ES 細胞を用いて、(1)の成績を踏まえたうえで、有毛細胞への分化誘導実験を行った結果、培養 28 日目に、神経細胞マーカーおよび内耳有毛細胞マーカーの発現が認められた。すなわち、霊長類 ES 細胞から有毛細胞様細胞の作製に、HIST2 法が効果的であることが明らかとなった。

### (5) 結論と今後の展望

我々は、マウス ES 細胞から HIST2 法を用いることで、有毛細胞の分化効率が飛躍的に亢進することを見出した。しかしながらその分化メカニズムは未だ不明な点が多く、今後は更なる解析を進め、そのメカニズムの解明と霊長類 ES 細胞への応用を展開する。さらに、iPS 細胞を用いた HIST2 法の適用を勘案し、患者自身の細胞を用いたオーダーメイド医療の基盤研究にも取りかかっている。

## 【 5. 主な発表論文等】

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Nishiofuku M, Yoshikawa M, Ouji Y, Saito K, Moriya K, Ishizaka S, Nishimura F, Matsuda R, Yamada S, Fukui H. Modulated differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells by coculture with hepatic stellate cells. *J Biosci Bioeng.* 査読有  
Vol. 111、2011、pp71-77.  
DOI : 10.1016/j.jbiosc.2010.08.005
- ② Ouji Y, Ishizaka S, Yoshikawa M. Dermal papilla cells serially cultured with Wnt-10b sustain their hair follicle induction activity after transplantation into nude mice. *Cell Transplant.* 査読有  
Vol. 21、2012、pp2313-2324.  
DOI : 10.3727/096368912X636867
- ③ Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell Death & Disease* 査読有  
Vol. 3、2012、pp e314-324.  
DOI : 10.1038/cddis.2012.56
- ④ Yamada S, Matsuda R, Nishimura F, Nakagawa I, Motoyama Y, Park YS, Nakamura M, Nakase H, Ouji Y, Yoshikawa M. Carnitine-induced senescence in glioblastoma cells. *Exp. Ther. Med.* 査読有  
Vol. 4、2012、pp21-25.
- ⑤ Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Wanaka A, Yoshikawa M. Induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells. *Cell Death & Disease* 査読有  
印刷中、2013

[学会発表] (計 6 件)

- ① Ouji Y, Yoshikawa M, Ishizaka S.  
In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cells using stromal cells.  
43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network  
2010年6月21日、京都
- ② Ouji Y, Yoshikawa M, Ishizaka S.  
In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell by stromal cells.  
The 16th International Conference of the International Society of the Differentiation  
2010年11月16日、奈良
- ③ 王寺幸輝、吉川正英  
ES 細胞から内耳有毛細胞への効率的分化誘導法の開発  
奈良脳神経ネットワーク研究会  
2012年1月13日、奈良
- ④ Yukiteru Ouji, Masahide Yoshikawa.  
Differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cells.  
第11回 国際幹細胞学会 (ISSCR)  
2012年6月15日、横浜
- ⑤ Yukiteru Ouji, Shigeaki Ishizaka, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Akio Wanaka, Masahide Yoshikawa.  
In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cells.  
第35回 日本分子生物学会年会  
2012年12月14日、福岡
- ⑥ Yukiteru Ouji, Shigeaki Ishizaka, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Akio Wanaka, Masahide Yoshikawa.  
Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells.  
CiRA International Symposium 2013  
2013年3月11日、京都市

## 【6. 研究組織】

- (1) 研究代表者  
吉川 正英 (YOSHIKAWA MASAHIDE)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50230701
  - (2) 研究分担者  
王寺 幸輝 (OUJI YUKITERU)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50343421
- 和中 明生 (WANAKA AKIO)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90210989