

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09318

研究課題名（和文）蝸牛・前庭感覚上皮発生機序の解析とヒトiPS細胞を用いた難聴モデル作製への応用

研究課題名（英文）Analyses of the mechanisms for development of sensory epithelia in cochleae and vestibula and application to generating the model for deafness using hiPSC

研究代表者

大西 弘恵 (Ohnishi, Hiroe)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50397634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、蝸牛感覚上皮発生に特有な遺伝子や情報伝達系を同定し、それらを調節することによりヒトiPS細胞由来蝸牛感覚上皮細胞分化誘導法を確立し、難聴発症メカニズムの解析や治療法の確立に必要なin vitroモデルを作製することである。このため、同定された蝸牛特異的発現遺伝子の発現部位の確認と日齢による変化の検討を行いマーカーとしての有効性を確認した。並行して蝸牛型感覚上皮誘導法の確立に必要なゲノム編集ヒトiPS細胞作製条件の最適化とATOH1-GFP hiPSCを用いた条件検討による内耳オルガノイド誘導効率向上を行い、蝸牛感覚上皮細胞分化誘導に必要な基盤的要素と技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化や騒音等、様々な原因により感音難聴が起こるが、それに対する確実な予防効果、治療効果のある薬剤は開発されていない。発生後の哺乳類の蝸牛感覚上皮は一度障害されると再生しない。治療薬の開発には適切なin vitroモデルが必要であるが、ヒト蝸牛細胞の初代培養を研究に用いることはできず、適切な細胞株も存在しないため、スクリーニングに使用可能なヒト細胞モデルの確立が望まれる。本研究ではそのヒト細胞モデルとしてヒトiPS細胞由来蝸牛感覚上皮の誘導法確立に必須の基礎となる誘導法の導入と指標となる分子の同定を行った。この結果は今後の難聴予防・治療薬の開発に寄与するものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to identify genes and signaling pathways specific to cochlear sensory epithelial development and to establish a method to induce cochlear sensory epithelial cell induction derived from human iPS cells by regulating these genes and pathways, and to generate in vitro models necessary to analyze the mechanism of hearing loss and establish therapeutic methods. To this end, we confirmed the expression sites of the identified cochlear-specific expressed genes and examined their changes with age in days to confirm their effectiveness as markers. In parallel, we optimized the conditions for the generation of genome-edited human iPS cells necessary for the establishment of a cochlear-type sensory epithelium induction method and improved the efficiency of inner ear organoid induction by examining conditions using ATOH1-GFP hiPS cells, establishing the basic elements and technology necessary for the induction of cochlear sensory epithelial cell differentiation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 蝸牛 難聴モデル 前庭

1. 研究開始当初の背景

感音難聴には根本的な治療法がない。難聴メカニズムの研究と創薬において、有毛細胞と支持細胞から成る感覚上皮の *in vitro* モデルは必須であるが、不死化細胞株や初代培養など適切な解析モデルが存在しない。ヒト多能性幹細胞由来有毛細胞に期待が寄せられているが、蝸牛タイプの有毛細胞誘導法を確立する為の発生学的知見が不足している。その理由として、内耳が頭蓋骨内に埋もれているおり、また再生能力を持たないため、組織採取が難しく、他臓器に比べ解析が遅れていることが挙げられる。ヒト ES 細胞、iPS 細胞からの有毛細胞分化誘導法の検討がなされ(Chen 2013, Ronaghi 2014)、申請者も 2015 年にヒト iPS 細胞からの分化誘導法を報告している(Ohnishi 2015)。2017 年には Koehler らがヒト多能性幹細胞から有毛細胞を含む内耳オルガノイドと呼ばれる細胞塊を誘導する方法を報告した(Koehler 2017)。難聴研究の為には分化誘導する有毛細胞は前庭型ではなく蝸牛型でなければならないが、蝸牛型の有毛細胞誘導の論文報告はない。既存のヒト多能性幹細胞からの分化誘導法では、発生段階の耳胞に相当する内耳前駆細胞から有毛細胞への誘導過程で特定の誘導因子は使用せず、長期培養による自発的な分化誘導が行われている。発生過程では耳胞の一部から感覚上皮予定領域が誘導され、前庭、蝸牛それぞれの感覚上皮へと分化していくが、この過程に関する発生学的知見は乏しい。そのため、有毛細胞分化誘導法に発生学的知見を反映させられず、効率的に蝸牛型の有毛細胞を誘導することが困難となっている。この理由から、耳胞から内耳有毛細胞までの発生過程に働く誘導因子の詳細の解明と誘導される細胞のマーカーとなる遺伝子の同定は必須の課題である。中でも感覚上皮予定領域から前庭有毛細胞、蝸牛有毛細胞それぞれが分化する過程の違いを解明することは特に重要であると考えられた。

2. 研究の目的

上記研究背景から、本研究の目的は、難聴研究や治療薬開発等に必要ヒト多能性幹細胞由来蝸牛型有毛細胞を得るため、前庭と蝸牛の感覚上皮発生過程の詳細と両組織の有毛細胞における遺伝子発現の違いを解明し、解明された知見を応用してヒト iPS 細胞から蝸牛感覚上皮の効果的な誘導法を確立することである。現在報告されているヒト多能性幹細胞由来内耳有毛細胞分化誘導法では、耳胞に相当する前駆細胞から有毛細胞までの分化誘導のステップで、特定の誘導因子の添加を行っていない。そこで本研究では日齢ごとに前庭・蝸牛予定部位をサンプリングし遺伝子発現の変化を比較検討することにより、新たな誘導因子と分化マーカーとなる遺伝子を見出し、それを応用して高効率な蝸牛型有毛細胞分化誘導法の確立をめざす。本研究の成果が得られれば、内耳の発生学的に重要な知見が得られるとともに、ヒト難聴モデルが確立されれば難聴治療への大きな進捗となる。本研究の波及効果として、ヒト多能性幹細胞由来蝸牛型有毛細胞の効果的な分化誘導法が確立されれば、疾患モデルを用いた治療法の開発や、難聴予防薬、治療薬、副作用の検討に関する薬剤スクリーニングが可能になり、難聴治療への大きな貢献となる。

3. 研究の方法

本研究では、発生各日齢のマウスの前庭感覚上皮、蝸牛感覚上皮各予定領域および各周辺組織の遺伝子発現解析を行い、各部位の遺伝子発現を継時的に比較することにより、蝸牛感覚上皮発生に特有な遺伝子や情報伝達系を同定・解析する。次にヒト iPS 細胞由来内耳前駆細胞で同定された遺伝子や情報伝達系を調節し、それらが実際に分化誘導過程で機能しているということを証明するとともに、蝸牛型の感覚上皮誘導法を確立する予定であった。

(1) 蝸牛感覚上皮発生に特有な遺伝子の同定

内耳組織の単離と RNA 抽出

感覚上皮予定領域から前庭感覚上皮と蝸牛感覚上皮が発生していく過程の違いを理解するため、耳包形成(E10)から有毛細胞形成まで(E16)の各日齢の周辺組織を含むマウス内耳組織切片を作成する。前庭・蝸牛感覚上皮予定領域(時期によっては感覚上皮領域)および、周辺組織で誘導因子が産生されている可能性を考慮して内耳の外側の間質部位をレーザーマイクロダイセクション等によって回収し RNA 抽出の検討を行ったが、組織が小さくかなり困難であった。代替案としてイメージングマスでの解析を考えたが、COVID19 の流行で施設間の交流が難しく断念した。結果的に研究分担者が行った「公共データベースからの発生初期内耳各部位での遺伝子発現解析(Yamamoto, 2021)」の結果から蝸牛特異的な発現が予想される候補遺伝子が複数同定されたため、これを応用することにし、RT-PCR、in situ hybridization、免疫染色法により発現、局在を検討した。

(2) 蝸牛型感覚上皮誘導法の確立

ヒト iPS 細胞由来内耳前駆細胞での候補遺伝子の検討

既存の有毛細胞分化誘導法及びそれらを改変した方法により、ヒト iPS 細胞由来内耳前駆細胞から有毛細胞への分化誘導過程における候補遺伝子の効果の検討を行う予定であった。(1)で同

定された候補遺伝子の発現を、Tet 発現誘導システムや、siRNA などにより有毛細胞分化誘導の過程で一過的に調節し、蝸牛化への効果を調べる予定であり、本研究で同定された前駆細胞を含む蝸牛感覚上皮特異的マーカーがあればそれも指標とする予定であった。これらの検討の為、ヒト iPS 細胞への遺伝子等導入効率向上のための検討を行った。

ヒト iPS 細胞由来内耳前駆細胞を用いた蝸牛誘導因子の検討

ヒト iPS 細胞由来内耳前駆細胞から有毛細胞への分化誘導時の誘導培地へアゴニストや阻害剤を添加することにより、(1)で同定された誘導因子候補の検討を行う予定であった。COVID19 の影響で蝸牛化因子の探索が不十分かつ、長期の分化誘導もかなり難しい状況であったため、一部の過程ごとに誘導時間や添加因子の濃度などの検討を重ね、誘導効率向上と安定化の検討を行った。

マウス胎児へのヒト iPS 細胞由来蝸牛上皮前駆細胞の移植による検討

上記 COVID19 の影響で蝸牛へ方向づけた細胞は作製できなかったが、検証のための移植法の検討を行った。ATOH1-GFP hiPSC から誘導した内耳オルガノイドの GFP 陽性断片をマウスでは微細すぎて現実的ではなかったため、モルモット内耳に移植した。

4. 研究成果

研究の主な成果として、(1)蝸牛感覚上皮発生にかかわる遺伝子を複数同定し、蝸牛内で特異的な部位に局限して発現することを見出し、蝸牛マーカーとしての有用性を確認した。さらに、(2)ヒト iPS 細胞由来内耳有毛細胞誘導法の効率の向上と安定化に関する検討を行った。

(1) 蝸牛感覚上皮発生に特異的な遺伝子の同定と検証

内耳各部位からマイクロアレイに用いる RNA の調整法の確立のための組織採取法などの検討を行なったが COVID-19 感染症の影響による研究の制限や試薬入手困難などから網羅的解析を行うことが困難であったため、研究期間延長申請を行ったが、状況が改善しなかったため、やむを得ず共同研究者が行った「公共データベースからの内耳各部位局在遺伝子の同定」を基に見いだされた蝸牛特異的発現遺伝子をターゲットとし、発生過程マウスでの発現解析をおこなった。胎生何日齢から発現しているか、どのような局在を示すか、これらの分化マーカーとしての有効性を 9 日齢以降のマウス胎児で qPCR, ISH 及び免疫染色により解析し、マーカーとしての有効性を検討した。内耳部位特異的遺伝子が複数明らかになり、頂端部に局在を示すもの、感覚上皮外側に収束していくもの等、蝸牛の極性形成の確認のためのマーカーとして有用なものが多数確認された。既知の内耳感覚上皮発現遺伝子は前庭、内耳神経、中枢神経でも発現がみられるものが多いが、本研究で見出された 1 遺伝子はこれらの組織では発現が見られず内耳蝸牛感覚上皮が誘導されたことの指標とするのに大変有効であることが分かった。

(2) ヒト iPS 細胞由来内耳有毛細胞樹立法の効率の向上と安定化

こちらも COVID-19 感染症の影響による研究の制限や試薬入手困難などから誘導途中での中止などがあり、進捗ははかばかしくなかったが、ある程度の検討を進めることができた。内耳有毛細胞マーカーである ATOH1 が発現すると GFP が発現するレポーターヒト iPS 細胞株を用いて内耳有毛細胞誘導法の検討を行った。まず野生型ヒト iPS 細胞から Koehler らが 2017 年に報告したヒト内耳オルガノイドの誘導法の再現実験を行い、SOX2+前庭型有毛細胞を多数含む内耳オルガノイドの誘導に成功した。続いて ATOH1-GFP ヒト iPS 細胞から内耳オルガノイドの誘導を行い、GFP 陽性の細胞集団を確認した。これにより蝸牛化因子同定後に検証するための基本的な実験系が導入できた。さらに蝸牛化を検証するため前述の蝸牛特異的発現遺伝子に蛍光タンパク質を融合させた knock-in iPS 細胞の作製を目指し、Lipofectamin 法による Cas9 vector とターゲティングベクターの導入条件を検討し、5 割以上の細胞への導入に成功した。また hiPSC 細胞由来内耳細胞を移植した。予定ではマウス胎児であったが、COVID-19 感染症の影響で研究分担者が条件検討を重ねることが困難であったため、モルモット内耳に移植し、その結果、プレリミナリーな結果ではあるが内耳組織構成細胞への分化を確認した。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクトについてであるが、前庭と蝸牛の有毛細胞の遺伝子発現の相違に関して、シングルセル解析(Yizhar-Barnea, 2017)(Yamamoto, 2021)によるアプローチも行われているが、「前庭と蝸牛の感覚上皮の違いを生み出すものが何か？」という問いにこたえ得る解析いまだはなく、内耳オルガノイドを含め、ヒト多能性幹細胞から、蝸牛特有の有毛細胞形態や極性を持つものを誘導した報告はない。本研究では今まで報告のなかった 3 遺伝子につき蝸牛内での局在を確認した。うち 1 つは内耳に局在する遺伝子としては珍しく中枢神経への局在が見られず分化誘導時のマーカーとして非常に有用であり、今後蝸牛と前庭の形成メカニズムの解析においても貴重な指標となる重要な知見であると考えられる。また蝸牛型オルガノイドを誘導するためのヒト iPS 細胞でのゲノム編集効率の向上と、内耳オルガノイド誘導法の安定化はこれらの遺伝子機能を応用し、蝸牛型オルガノイドを誘導するための一助となる成果である。本研究の成果は、内耳の発生学的に重要な知見であり、またヒト多能性幹細胞由来蝸牛型有毛細胞の効果的な分化誘導法の確立に寄与すると考えられる。

今後の展望として、蝸牛特異的遺伝子が複数同定されたため、各遺伝子をマーカーとし、hiPSC

から蝸牛特有の立体構造と極性を有した蝸牛型オルガノイドの確立を目指す。またこれらの遺伝子の機能解析を通じて蝸牛形成メカニズムの解析を行い、難聴治療薬開発のための *in vitro* モデル作製を目指したい。

<引用文献>

Chen J, Streit A, Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors, *Hear Res*, 2013, 297:3-12

Ronaghi M, Nasr M, Ealy M, Durruthy-Durruthy R, Waldhaus G, Diaz GH, Joubert JM, Oshima K, and Heller S, Inner Ear Hair Cell-Like Cells from Human Embryonic Stem Cells, *Stem Cells Dev*. 2014 23(11): 1275–1284

Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Nakagawa T, Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method, *Neurosci Lett.*, 2015 599 49-54

Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E, Liu X, Lee J, Holt JR, Hashino E, Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol* 2017 35 6 583-589

Yamamoto R, Ohnishi H, Omori K, Yamamoto N, In silico analysis of inner ear development using public whole embryonic body single-cell RNA-sequencing data. *Dev Biol*. 2021 Jan 1;469:160-171.

Yizhar-Barnea O, Avraham KB, Single cell analysis of the inner ear sensory organs, *Int J Dev Biol*. 2017;61(3-4-5):205-213.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryosuke Yamamoto, Hiroe Ohnishi, Koichi Omori, Norio Yamamoto	4. 巻 469
2. 論文標題 In silico analysis of inner ear development using public whole embryonic body single-cell RNA-sequencing data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental biology	6. 最初と最後の頁 160-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2020.10.009	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 Taura A, Ohnishi H, Nishimura K, Ogida H, Nakagawa T, Yamamoto N, Okano T, Omori K, Ito J	4. 巻 78
2. 論文標題 Future View of Regenerative Research for Vestibular Disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 219-227
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 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 Taura A, Ohnishi H, Nishimura K, Ogita H, Miwa T, Ito J	4. 巻 80
2. 論文標題 Possible application of regenerative medicine to bilateral vestibulopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Equilibrium Research	6. 最初と最後の頁 216-222
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 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ohnishi H, Skerleva D, Okuyama H, Miyamoto T, Matsuura S, Kirino K, Yamamoto N, Ito J, Omori K, Saito M, Tsukita K, Inoue H and Nakagawa T.
2. 発表標題 Trial for Improvement of Hair Cell Induction Method from Human Induced Pluripotent Stem Cell
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 42th MidWinter Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 弘恵、デシスラヴァ スケルレヴァ、奥山 英晃、宮本 達雄、松浦 伸也、桐野 浩輔、山本 典生、伊藤 壽一、大森 孝一、齋藤 潤、月田 香代子、井上 治久、中川 隆之。
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの内耳有毛細胞誘導法改良の試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohnishi H, Skerleva D, Okuyama H, Yamamoto N, Ito J, Omori K, and Nakagawa T
2. 発表標題 Improvement of Otic Induction from Human Induced Pluripotent Stem Cell
3. 学会等名 Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西弘恵、玉木佑季、山本亮介、大森 孝一、伊藤 壽一、中川 隆之、山本 典生
2. 発表標題 発生初期内耳における炭酸脱水素酵素の発現と組織内局在の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 弘恵、玉木佑季、山本亮介、大森孝一、伊藤壽一、中川隆之、山本典生
2. 発表標題 分化マーカーとしての利用を目指した内耳局在遺伝子の解析
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	石川 正昭 (Ishikawa Masaaki) (10813743)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	中川 隆之 (Nakagawa Takayuki) (50335270)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	宮本 達雄 (Miyamoto Tatsuo) (40452627)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	山本 典生 (Yamamoto Norio) (70378644)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	田浦 晶子 (Taura Akiko) (70515345)	藍野大学・医療保健学部・教授 (34441)	

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