

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09867

研究課題名（和文）YAP阻害による有毛細胞転写制御機構の解明および内耳再生治療への応用

研究課題名（英文）Transcriptomic profiles of HC regeneration induced by YAP inhibitors

研究代表者

喜多 知子（Kita, Tomoko）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：20362519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトが有毛細胞HC喪失による難聴を発症した場合、治療法は聴覚デバイスの利用であり、結果、患者は制限のある生活を送ることになる。国内外の多数の研究から、薬剤投与や遺伝子導入によってマーカー陽性の有毛細胞様細胞が作成可能になったものの、聴覚機能を担う成熟した有毛細胞再生には未だ到達していない。そこで本研究では、様々な組織で細胞の増殖・分化を担う「YAPシグナル」をターゲットとして、ニワトリ感覚上皮の再生モデルでの有毛細胞の分化・増殖に及ぼす役割解明について検討を行った。その結果、ニワトリHC再生におけるYapの主な役割は細胞分化でなく周囲の支持細胞の増殖作用であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ニワトリの聴覚再生過程におけるYap分子の役割の一端を明らかとした。これまでHippo-Yap経路は、他の組織で、他のシグナル伝達経路（Wnt, Notch, Shh, TGF など）とのクロストークが報告されてきたが、内耳蝸牛有毛細胞の再生過程における働きは不明であった。今回、蝸牛障害後の支持細胞の増殖にYapが寄与することは判明したものの、前駆細胞への作用についてはマーカー蛋白の同定が待たれる。世界的に聴覚障害は最も頻度の高い身体障害と言われている。本研究成果は、世界中で未だ到達できていない「聴覚再生医療の実現に向けた一歩として、社会的な意義を持つと考えられる。

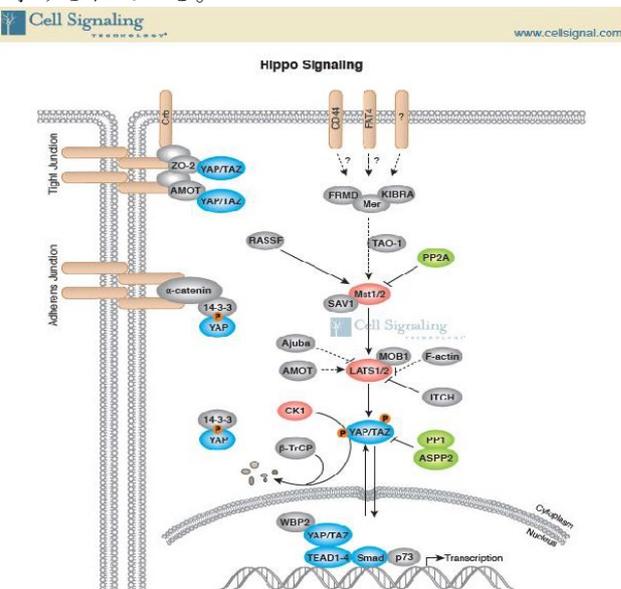
研究成果の概要（英文）：When humans develop hearing impairment due to hair cell (HC) loss, the only treatment is the use of hearing devices, resulting in a restricted life for the patient. Although numerous domestic and international studies have shown that marker-positive hair cell-like cells can be generated by drug administration and gene transfer, the regeneration of mature hair cells for auditory function has not yet been achieved. In this study, we investigated the role of YAP signaling, which is responsible for cell proliferation and differentiation in various tissues, in the differentiation and proliferation of hair cells in a chick sensory epithelium regeneration model. The results revealed that the main role of Yap in chick HC regeneration is not cell differentiation but proliferative effects on surrounding support cells.

研究分野：内耳研究

キーワード：発生再生 有毛細胞 蝸牛

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類において、聴覚ならびに平衡覚はセンサーの有毛細胞 (Hair cell, HC) が失われると2度と再生されず難聴となる。ところが鳥類・両生類などでは、HCが一旦消失しても、周囲の支持細胞 (Supporting cell, SC) から有毛細胞が再生し、聴覚および平衡覚機能が回復する。近年、様々な技術の進歩に後押しされ、薬剤投与または遺伝子導入により iPS 細胞からでもマーカー陽性かつ形態の類似した HC 「様」細胞を作ることができるようになった。一方で残された課題として、人工的に作製された HC は、未熟で聴覚機能を完全には有しないという点が挙げられている。



現在、HC への分化を担う主役は Wnt シグナルと Notch シグナルであると言われているが、双方のシグナルとクロストークする Hippo シグナルの中心的役割を果たす転写共役因子 YAP こそ、HC 再生を制御する主役である可能性が高い¹。一方で、YAP の上流制御機構はいまだにブラックボックスであり、複数の結合転写因子 (TEAD, RUNX, SMAD 等) も含め関与因子が細胞種により異なる可能性が高い。Hippo/Yes 関連タンパク質 (YAP) シグナル伝達経路 (左図) は、細胞の増殖、分化、およびアポトーシスを制御することによって器官のサイズと恒常性を維持すると言われている。そこで本研究では、機能的な HC 再生が可能と言われているニワトリ蝸牛の「*in vitro* HC 再生モデル系」を用い、YAP シグナルが SC の分化および増殖においてどのような寄与をしているか? その役割解明を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ニワトリの蝸牛 HC 再生過程における YAP シグナルの役割を明らかにすることである。既に海外では、ニワトリの前庭 HC 再生過程²や、マウスの蝸牛 HC 障害過程³における YAP シグナルに関する報告がなされているが、ニワトリ蝸牛 HC については報告がなく、新規の取り組みとなる。具体的には、1) ニワトリまたはマウスの中・後期胚での蝸牛 HC 発生過程および *in vitro* 器官培養系 HC 再生モデルにおける YAP の時空間的な発現パターンを調べ、2) 支持細胞 (SC) の増殖・分化に作用する複数の既知シグナルについて調べ、哺乳類での蝸牛 HC 再生への YAP 活性化剤または YAP 阻害剤の可能性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 使用動物および組織サンプル:

発生期の内耳は、清水実験材料から購入した有色受精卵 (E8 または E11 のニワトリ胚) から蝸牛を摘出したものを用いた。また *in vitro* 器官培養系実験では、孵化後 1 日齢の雄ヒヨコ (後藤孵卵場)、および P2 の雌雄 C57BL6 マウス (清水実験材料) から摘出した蝸牛感覚上皮を用いた。摘出操作は実体顕微鏡下で行った。

(2) HC 障害 (再生) モデル:

器官培養は、48-well (ヒヨコ蝸牛) または 24-well プレートにカルチャーインサートを入れたもの (マウス蝸牛) で行った。培地は、ペニシリンと 1%FBS を加えた high glucose DMEM を用いた。蝸牛上皮は、(薬剤が直接触れるように) 蝸牛のルーフ部分を除去した後に、上面が上を向くように well 内に静置させた。薬剤添加は、摘出翌日から開始し、培養期間は最大 7 日間であった。HC 喪失には、ストレプトマイシン (SM, ヒヨコ蝸牛) またはネオマイシン (NM, マウス蝸牛) を用いた。また、各シグナル調節薬として、MST1/MST2 antagonist 兼 YAP agonist である XMU-MP-1 (XMU)、TGF- β antagonist の NOG、GSK3 inhibitor の CHIR99021 を至適濃度の範囲で使用した。かつて YAP を制御する研究は、MST1/2、LATS1/2、Mob1a/b、Salvador のノックアウトやノックダウン、或いは S5A-YAP や S127A-YAP などの constitutively active YAP などの手法が用いられてきたが、特異性の高い活性化剤・阻害剤の使用が一般的である。

(3) 評価方法：

各標本は、固定後 OCT 凍結ブロックを作製し、アキシアル面の切片標本またはホールマウントで免疫染色を行ない評価した。YAP および pYAP の染色、Sox2, Myosin7a, F-actin の共染色、EdU 添加および染色、の観察・カウントを主として行われた。

(4) bulk RNAseq のデータ解析：

YAP シグナルは複雑で、リガンドを介する場合と力学的（細胞接着）要因によるものの2つがある。我々は、耳鼻咽喉科で確立した *in vitro* 器官培養系 HC 再生モデルの感覚上皮だけを経時的にサンプリングして解析した bulk RNAseq データ 4 を所有している。そこでまず、YAP シグナルに関わる因子の特定を行った。また YAP の細胞分化への寄与の有無を判定するには、SC の細胞層から幹細胞を特定し、その分化を追うことが必要となるため、幹細胞の候補として TP63 遺伝子に着目し、解析を行った。

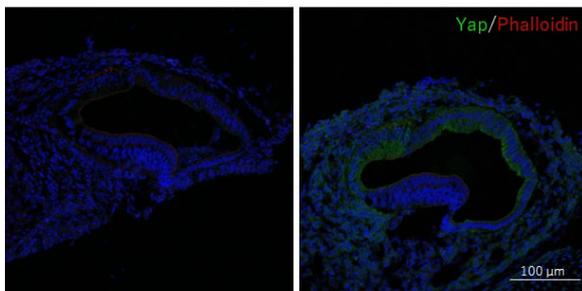


図1. ニワトリ胚発生中期における蝸牛のYap染色像 (アキシアル切断面)

4. 研究成果

(1) 発生期の YAP 局在：

ニワトリ発生中期胚の内耳蝸牛において、感覚上皮には YAP が発現しておらず、周囲組織の細胞膜のみに観察された (図1)。よって HC の発生において YAP の寄与は低いと考えられた。

(2) *in vitro* ニワトリ HC 再生モデルにおける YAP 局在およびシグナル調節薬による影響：

再生期には SC の一部、感覚上皮の両端 (neural 側と abneural 側)、で YAP の核への高い集積が観察された (図2)。なお再生後の感覚上皮は、YAP 自体の発現が極端に低下し、周辺細胞では YAP の発現維持を認めたものの、主に細胞質 (核以外) であった。

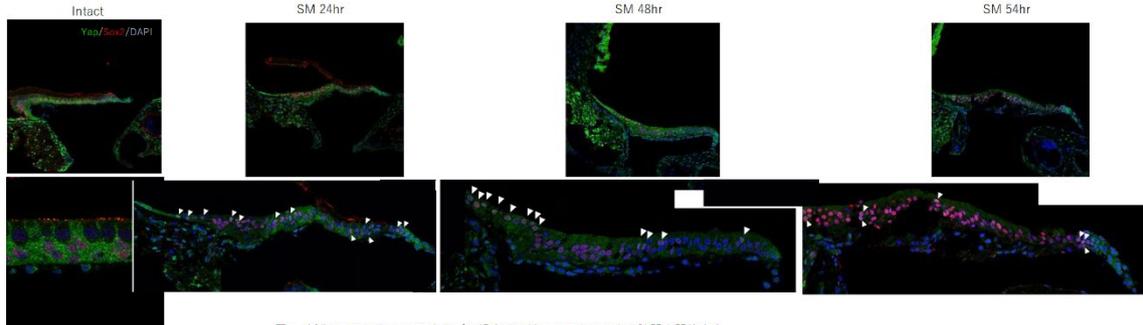


図2. 孵化1日目ヒヨコHC再生モデル蝸牛におけるYAPタンパクの時間空間的变化

また、シグナル調節薬 NOG と CHIR99021 添加により、過去の報告と同様⁵、EdU 陽性増殖細胞数は変化せず、核局在 YAP の数も変わらなかった (図3)。さらに YAP agonist である XMU の添加によって、核集積した YAP および再生 HC は増加傾向にあった。有意差がでなかった理由として、再生 HC の流動化によるカウントの困難さが挙げられ、領域を絞る (periferal, middle, distal の区別だけでなく、Zone 別に計測する⁴) 等の工夫が必要であると考えられた。

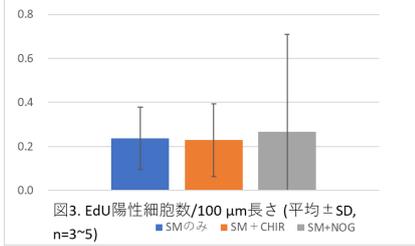


図3. EdU陽性細胞数/100 μm長さ (平均±SD, n=3~5)

(3) *In vitro* 器官培養系マウス HC 障害モデルにおける YAP の局在：

マウス器官培養における YAP 発現について、Pre-culture と SM 処置後とで比較した結果、basal turn では変化がなかったが、middle turn ではコルチ器外側の SC、apical turn ではコルチ器内側の SC において、陽性細胞の有意な増加が見られた (図4)。ここ

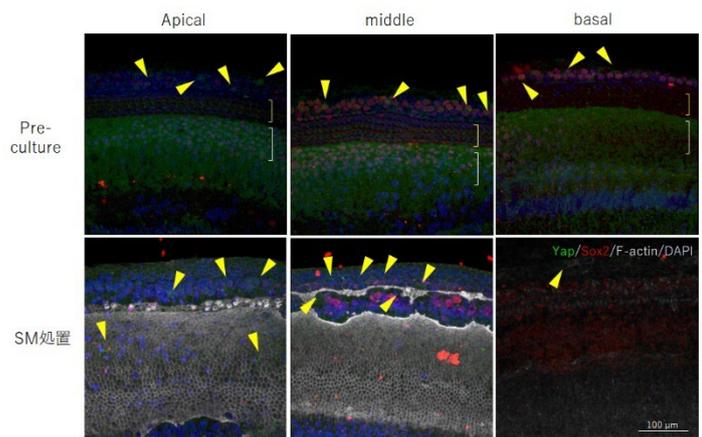


図4. P2マウス蝸牛の器官培養サンプルのYapおよびSox2のwhole mount染色像

で得られた結果は、既報と同様であった³。

(4) ニワトリ蝸牛感覚上皮 bulk RNAseq のデータ解析 (YAP 関連因子の探索/TP63 発現) :

In vitro HC 再生モデルの bulk RNAseq データ解析から、YAP 上流因子では、SAV1 が HC 障害直後に一過性的上昇を示すとともに、MST1 が HC 障害後～SC 増殖期にかけて 3 倍以上の増加を示し (図 5)、YAP の急激な活性化の制御に寄与していると考えられた。また、YAP 下流

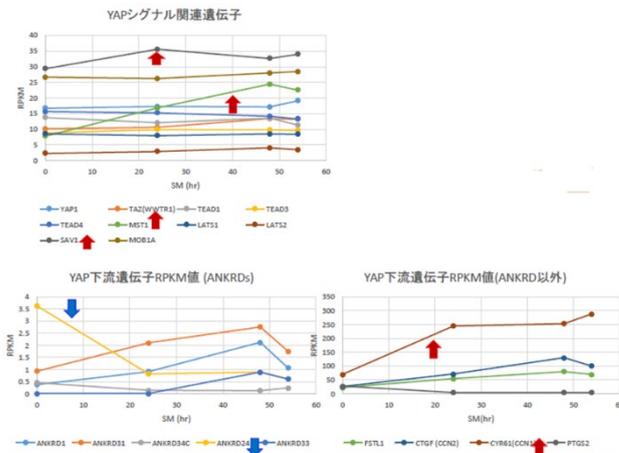


図5. 孵化1日目ヒヨコHC再生モデル蝸牛bulk RNAseqデータにおけるYAP関連遺伝子の発現変化

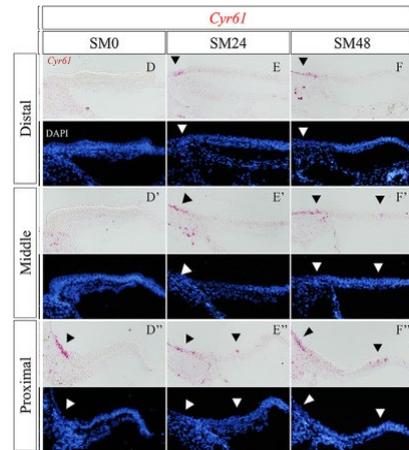


図6. YAP下流因子CYR61のin situ hybridization染色

因子では、ANKRD24 の減少と CYR61 (CCN1) の増加が認められた。これらは遺伝子発現量であり、シグナル伝達経路について考察するには、リン酸化を含めたタンパクレベルでの検証が必要と考えられる。

CYR61 については、*in situ* hybridization 染色 (RNAscope) が、YAP の核染色陽性部位 (両端) と同じ領域で確認されたことから (図 6)、CYR61 が YAP の下流因子であると推察された。

(2)の結果から、YAP が SC の増殖に影響する可能性が示唆されたが、SC の HC 分化への YAP の寄与については不明であった。理由の1つに、SC の幹細胞を特定しないと、その他多数の sox2 陽性 SC に埋もれてしまうことが挙げられる。そこで、bulk RNAseq とシングルセル RNAseq のデータ解析から、転写因子 p53 ファミリーの p63(tumor protein TP63)に着目した。この遺伝子では、2種類の特徴的な isoforms (dN と TA)が、その発現比に時間的な違いを生じることが確認された (図 7)。すなわち SM54 において TAp63 が消失しており、それは細胞増殖を止め、分化が開始すること、を示唆する。シングルセル RNAseq データ (PCA 解析) で TP63 の発現パターンを調べた結果、CD44 を共発現する TP63 陽性細胞が、neural crest 由来細胞等のクラスターで確認された (図 8)。そこで、isoform 特異的な TP63 の免疫染色を行った結果、神経領域に陽性細胞の存在が確認されたものの、蝸牛感覚上皮には認められず、TP63 陽性遺伝子が SC の幹細胞であるとは言えなかった。



図7. bulk RNAseqデータ解析、4つのサンプリングタイム (SM0,24,48,54) における TP63のisoform

以上から、ニワトリ蝸牛の「*in vitro* HC 再生モデル系」において、YAP シグナルが SC の増殖に影響していることが推察されたが、SC の HC 分化への影響については評価できなかった。今後、遺伝子変異ニワトリによるトレーサー実験が可能となれば、新たな知見の発見に繋がるかもしれない。

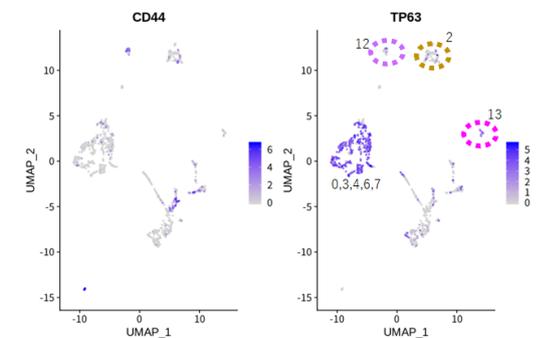


図8. シングルセルRNAseqデータ、主成分解析結果にTP63の発現を当てはめたもの。CD44を共発現するTP63陽性細胞がクラスター2と12で認められた。

引用文献

1. Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):811-28. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.044.
2. Rudolf MA, Andreeva A, Kozlowski MM, Kim CE, Moskowitz BA, Anaya-Rocha A, Kelley MW, Corwin JT. YAP Mediates Hair Cell Regeneration in Balance Organs of Chickens, But LATS Kinases Suppress Its Activity in Mice. *J Neurosci*. 2020 May 13;40(20):3915-3932. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0306-20.2020.
3. Wang M, Dong Y, Gao S, Zhong Z, Cheng C, Qiang R, Zhang Y, Shi X, Qian X, Gao X, Guan B, Yu C, Yu Y, Chai R. Hippo/YAP signaling pathway protects against neomycin-induced hair cell damage in the mouse cochlea. *Cell Mol Life Sci*. 2022 Jan 19;79(2):79. doi: 10.1007/s00018-021-04029-9.
4. Matsunaga M, Kita T, Yamamoto R, Yamamoto N, Okano T, Omori K, Sakamoto S, Nakagawa T. Initiation of Supporting Cell Activation for Hair Cell Regeneration in the Avian Auditory Epithelium: An Explant Culture Model. *Front Cell Neurosci*. 2020 Nov 12;14:583994. doi: 10.3389/fncel.2020.583994.
5. Lewis RM, Keller JJ, Wan L, Stone JS. Bone morphogenetic protein 4 antagonizes hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *Hear Res*. 2018 Jul;364:1-11. doi: 10.1016/j.heares.2018.04.008.
6. Matsunaga M, Yamamoto R, Kita T, Ohnishi H, Yamamoto N, Okano T, Omori K, Nakagawa T. Stepwise fate conversion of supporting cells to sensory hair cells in the chick auditory epithelium. *iScience*. 2023 Jan 25;26(2):106046. doi: 10.1016/j.isci.2023.106046.

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 2件）

1. 著者名 Matsunaga Mami, Kita Tomoko, Yamamoto Ryosuke, Yamamoto Norio, Okano Takayuki, Omori Koichi, Sakamoto Satoko, Nakagawa Takayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Initiation of Supporting Cell Activation for Hair Cell Regeneration in the Avian Auditory Epithelium: An Explant Culture Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 583994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2020.583994	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 Gao Li, Kita Tomoko, Katsuno Tatsuya, Yamamoto Norio, Omori Koichi, Nakagawa Takayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Insulin-Like Growth Factor 1 on the Maintenance of Ribbon Synapses in Mouse Cochlear Explant Cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 571155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2020.571155	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 Yamada Yuma, Maruyama Minako, Kita Tomoko, Usami Shin-ichi, Kitajiri Shin-ichiro, Harashima Hideyoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 The use of a MITO-Porter to deliver exogenous therapeutic RNA to a mitochondrial disease's cell with a A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene results in an increase in mitochondrial respiratory activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 134 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mito.2020.09.008	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 Matsunaga M, Yamamoto R, Kita T, Ohnishi H, Yamamoto N, Okano T, Omori K, Nakagawa T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Stepwise fate conversion of supporting cells to sensory hair cells in the chick auditory epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106046.	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 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松永 麻美 , 喜多 知子 , 山本 亮介 , 山本 典生 , 大森 孝一 , 中川 隆之
2. 発表標題 鳥類蝸牛有毛細胞再生初期過程の発現変動遺伝子群におけるプロモータ領域のモチーフ解析
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Kita, Mami Matsunaga, Tomomi Miyatake, Li Gao, Ryosuke Nakamura, Norio Yamamoto, Takayuki Nakagawa, Koichi Omori
2. 発表標題 YAP Signals During Direct Transdifferentiation of Supporting Cells in Cochlear Explant Culture of Chicken and Mouse
3. 学会等名 ARO 43rd MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	大森 孝一 (Oomori Kouichi) (10233272)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	中村 亮介 (Nakamura Ryosuke) (40736708)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	

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