

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23229009

研究課題名(和文)内耳発生メカニズムの解明と再生医療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of inner ear development mechanisms and its application to regenerative medicine

研究代表者

伊藤 壽一(Ito, Juichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：90176339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 151,000,000円

研究成果の概要(和文)：根本的治療方法のない感音難聴に対して、その主要な責任部位である内耳蝸牛の発生メカニズムを解明し、内耳再生医療の確立を目指す本研究では以下の事を達成することができた。1.再生のための操作対象となる蝸牛内幹細胞群の同定、2.内耳発生に重要な役割を果たす新規遺伝子候補の同定、3. NotchシグナルやIGF1の内耳再生医療への応用、4. ヒトiPS細胞の有毛細胞への誘導プロトコルの改良。本研究で得られたこれらの成果を適切に組み合わせることにより、内耳再生医療のヒトへの応用に近づくことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：After many kinds of experiments to elucidate the mechanisms of mammalian cochlear development and to apply these to the regeneration of inner ears, we have gotten following achievements. 1. Identification of the stem cell population location within the cochlea; 2. Identification of novel candidate genes important for the cochlear development; 3. Usefulness of Notch signal inhibition and IGF1 for the achievement of regenerative medicine of the inner ear; 4. Improvement of induction protocol of iPS cells to inner ear hair cells.

We believe that the combination of these achievements will lead us to the successful regeneration of mammalian inner ears to treat sensorineural hearing loss, which has been considered intractable.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 幹細胞 再生 発生 成長因子 シグナル

1. 研究開始当初の背景

現在わが国で 600 万人以上が苦しむ難聴は、外耳、中耳に障害がある伝音難聴と内耳、神経に障害がある感音難聴とに分類される。感音難聴には、薬剤性難聴、老人性難聴、突発性難聴、先天性難聴などが含まれる。感音難聴のほとんどは、音の受容を司る内耳感覚上皮が傷害されて起こる。ところが哺乳類の内耳感覚上皮細胞は極度に分化した細胞で、発生後半にすでに細胞分裂を停止し、生後は傷害後に再生しないため、いまだに年間 3 万 5 千人が罹患する突発性難聴や、高齢者の半数が苦しむ老人性難聴などの感音難聴の根本的治療法はない。

内耳感覚上皮の再生を実現し、感音難聴の根本的な治療を確立する方法の一つとして、内耳感覚上皮の発生を再現する方法が考えられるが、その発生過程が詳細に解析されている網膜などと異なり、内耳感覚上皮の発生についてこれまでに得られている知識はごくわずかなものである。

2. 研究の目的

本研究では、内耳感覚上皮の発生過程を分子レベルで完全に解明することにより、これまで困難とされてきた内耳感覚上皮の再生を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 内耳発生過程の解明

本研究では以下のストラテジーを用いて、内耳発生過程を分子レベルで明らかにする。

その一つはマウス内耳発生段階の単一細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現プロファイル作成である。異なったプロファイルの細胞種間での遺伝子発現を比較し、各細胞種で作動する遺伝子を同定する。また、特定の遺伝子に注目し複数の段階にわたっての発現レベルの変動を時間軸に沿って解析する。これらによって、内耳発生に重要な役割を果たす遺伝子の候補を同定する。

また、内耳の発生期に数多くある細胞のうち、どの場所に存在する細胞に幹細胞が含まれるかも同定する。

内耳発生に重要な役割を果たす遺伝子の候補に関しては、発現部位、時期の解析を行い、その結果、重要な遺伝子であることが確実と予想される場合、マウスを用いて該当遺伝子の機能欠失実験を行い、その機能を同定する。

(2) 内耳感覚上皮再生医療の確立

内耳発生過程における重要な役割を確立した遺伝子の操作（過剰発現あるいは阻害）により新たな内耳感覚上皮再生手法の確立をおこなう。その対象として、A. ES 細胞あるいは iPS 細胞、B. 生後哺乳類蝸牛の器官培養、C. 哺乳類成体内耳、の 3 つがあり、それぞれに、遺伝子強制発現、RNAi や薬剤を用いた遺伝子機能阻害などをおこなう。特に、

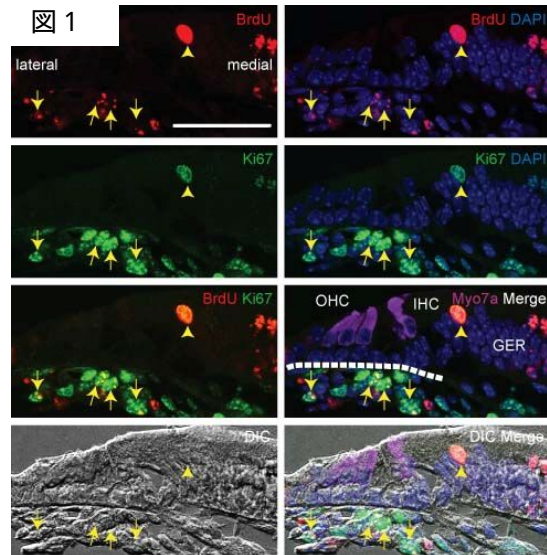
ヒト iPS 細胞への操作は、直接臨床応用可能な手法の開発を実現できる。

4. 研究成果

(1) 内耳発生過程の解明

内耳発生における幹細胞の存在部位について（図 1）

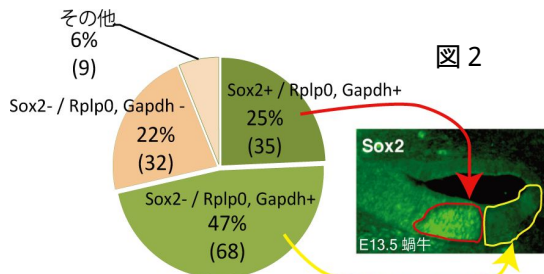
幹細胞の定義のひとつである「増殖し続けること」を利用した実験を本研究で行った。



胎生 13 日マウスに増殖細胞に取り込まれる BrdU を投与し、胎生 18 日でマウスの内耳を回収し、抗 BrdU 抗体と抗 Ki-67 抗体を用いて免疫染色を行い、BrdU と Ki-67 とが同時に陽性となる細胞（Label retaining cells, LRC）、つまり幹細胞の候補の同定を行った。LRC は、蝸牛の中では greater epithelial ridge (GER) に少量（図 1 矢頭）、また基板の鼓室階側に存在する Tympanic border cell に比較的多く認められた（図 1 矢印）。GER は過去の報告で *atoh1* 遺伝子を強制発現させると異所性の有毛細胞が出現する部位で幹細胞的な性質を有する部位である可能性がある。また、Tympanic border cell はこれまでその性質がはっきりとわかっていなかった細胞だが、過去の報告では音響外傷時に鳥や哺乳類で増殖を認めると報告されている。その性質を明らかにするために、中枢神経系では幹細胞のマーカーとされる Nestin の免疫染色を行ったところ、Tympanic border cell は陽性であった。このことから、Tympanic border cell も内耳感覚上皮の幹細胞である可能性が示唆された（Taniguchi et al., 2012）。

単一細胞の網羅的遺伝子解析による網羅的遺伝子発現プロファイル解析（図 2）

蝸牛の発生段階のうち、感覚上皮予定領域が形成されつつある E13.5 において解析を行った。胎生 13 日齢マウス内耳を採取したうえで、蝸牛のみを単離した。さらに、上皮と間質を分離させるためにサーモライシン処理を行い、上皮部分をトリプシン処理して単

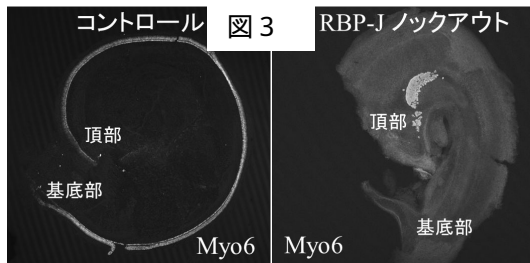


一細胞を得た。得られた単一細胞を一つずつピックアップして RNA 抽出、その後逆転写反応を行い cDNA を作成・増幅し、2 種類の異なったハウスキーピング遺伝子 (Rplp0 と Gapdh) の cDNA が合成されていることを確認した。増幅が成功していると確認できた細胞は 144 個の採取細胞のうち、103 個で、72% の増幅成功率であった (図 2)。このうち、内耳感覚上皮前駆細胞のマーカである Sox2 が多く発現している細胞からのサンプルは 35 個、Sox2 が発現していない細胞からのサンプルは 68 個を採取できた。これらのうち、Sox2 陽性細胞 32 サンプルと、Sox2 陰性細胞 8 サンプルについて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Sox2 陰性細胞と比べて Sox2 陽性細胞に高発現している遺伝子を検討したところ、Isl1、Tecta、Eya1、Jag1、Foxg1、Hey2、Gata3 など従来 Sox2 陽性細胞と共発現している可能性が言われている遺伝子も含まれていた。また、Sox2 陰性細胞由来の 8 サンプルすべてで発現が確認できなかったプロブはマイクロアレイチップ上の 45102 のプロブのうち 8493 に絞ることができた。このうち、Sox2 陽性細胞からのサンプルで、6 つ以上のサンプルで高発現であった遺伝子のプロブは 488、そのうち転写因子はあるいは DNA と関係するものは 84 遺伝子であった。

内耳発生に重要な役割を果たす遺伝子の発現・機能解析

内耳発生に重要な役割を果たすと予想されるシグナルのうち、Notch シグナルと Hedgehog シグナルの内耳発生における役割を解析するため、条件付きノックアウトマウスのシステムを用いて研究を行った。

Notch シグナルの役割解明のため、Notch シグナルの転写共活性化因子である Rbpj の条件付きノックアウトマウスや、Notch シグナルの下流分子である Hes/Hey の複合ノックアウトマウスの解析を行った。Rbpj



条件付きノックアウトマウスの解析からは、

Notch シグナルが感覚上皮そのものの誘導よりもむしろ感覚上皮の維持に大きな役割を果たしていることが示された (図 3) (Yamamoto et al. 2011)。また、Notch シグナル下流のさまざまな Hes/Hey ファミリーに属する遺伝子は、有毛細胞と支持細胞との運命決定に関わっていることも示された (Tateya et al. 2011)。

Hedgehog シグナルの解析では、Hedgehog シグナルのエフェクターである *smoothed* の条件付きノックアウトマウスと強制発現マウスの解析が行われ、Hedgehog シグナルが内耳蝸牛有毛細胞の適切な分化、複雑な配置パターンの形成および聴覚に必須であることが示された (Tateya et al. 2013)。

(2) 内耳感覚上皮再生医療の確立

ヒト iPS 細胞の有毛細胞への誘導プロトコルの確立 (図 4)

これまでマウスでは ES 細胞や iPS 細胞の

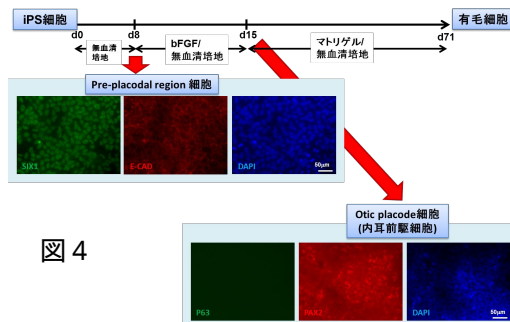


図 4

有毛細胞への誘導が報告されていた。しかし、ヒト iPS 細胞を効率的に誘導する報告はなかった。我々は、ヒト iPS 細胞 (201B7 株) を無血清培地で一定期間培養し、さらにこれらの細胞群を一定期間 bFGF で処理した結果、Six1、E-cadherin 共陽性の preplacodal 様細胞へ分化していることが分かった。また、bFGF 処理後の細胞群で Pax2 陽性、p63 陰性の内耳前駆細胞様細胞の存在が確認された。Six1、E-cadherin 共陽性の preplacodal 様細胞へは 97.4% が分化していることが分かった。Pax2 陽性、p63 陰性の内耳前駆細胞様細胞の誘導効率率は 0.047% であることが確認された。さらに、約 50 日間培養することにより、有毛細胞様の細胞の誘導にも成功した。有毛細胞のマーカである Myosin7a 陽性細胞は 0.01% の確率で誘導できることを示した (Ohnishi et al. 2015)。

Notch シグナルによる有毛細胞再生

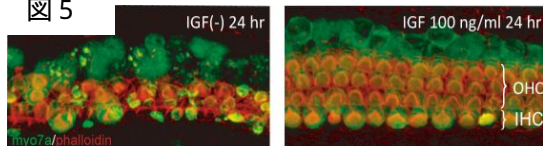
上記の (1) の結果に基づき、内耳前庭器官培養を用いて Notch シグナルの操作により内耳有毛細胞の再生が可能かを解析した。Notch シグナルを小分子を用いて抑制することに加えて、有毛細胞の不動毛の構成タンパク質である Espin 遺伝子を導入することにより、不動毛を有する機能的な有毛細胞の再生が可能であることが示された (Taura et al. 2016) さらに、In vivo でも、Notch シグナル阻害による有毛細胞再生の試みを行った。

音響外傷を加えたモルモットに Notch シグナルを阻害する小分子 (MDL29170) を加えると、コントロールの実験群よりも有意に多くの外有毛細胞を認め、Notch シグナルの阻害薬が、急性感音難聴の有用な治療薬の候補であることが明らかになった (Tona et al., 2014)

インスリン様成長因子 1 (IGF1) による生後マウス蝸牛有毛細胞の再生 (図 5)

内耳の発生において重要な役割を果たすといわれている成長因子 IGF1 が、内耳障害によって引き起こされる急性感音難聴 (突発性難聴) の治療に効果があることを示し (Nakagawa T, et al. 2012) IGF1 による内耳有毛細胞の保護は、IGF1 の受容体の下流のシグナル伝達系のほとんどが駆動され、有毛細胞のプログラム細胞死の抑制と支持細胞の増殖を誘導することによることを示した (Hayashi et al. 2013) (図 5)。また、そ

図 5



の下流遺伝子の候補として Gap43 と Netrin1 があることも示した (Hayashi et al. 2014)

Otosphere の解析

新生児マウスの内耳から確立した Otosphere と呼ばれる細胞群が幹細胞の性質をもち、有毛細胞を産生することを示した (Lou et al. 2013)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 41 件)

1. Taura A., Taura K., Koyama Y., Yamamoto N., Nakagawa T., Ito J., and Ryan A. F.: Hair cell stereociliary bundle regeneration by espin gene transduction after aminoglycoside damage and hair cell induction by Notch inhibition. *Gene Ther* 2016. (査読有) doi: 10.1038/gt.2016.12.
2. Sekiya T., Holley M. C., Hashido K., Ono K., Shimomura K., Horie R. T., Hamaguchi K., Yoshida A., Sakamoto T., and Ito J.: Cells transplanted onto the surface of the glial scar reveal hidden potential for functional neural regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3431-3440, 2015. (査読有) doi: 10.1073/pnas.1501835112.
3. Ohnishi H., Skerleva D., Kitajiri S., Sakamoto T., Yamamoto N., Ito J., and Nakagawa T.: Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple
- stepwise method. *Neurosci Lett* 599: 49-54, 2015. (査読有) doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.032.
4. Taniguchi M., Matsuo H., Shimizu S., Nakayama A., Suzuki K., Hamajima N., Shinomiya N., Nishio S., Kosugi S., Usami S., Ito J., and Kitajiri S.: Carrier frequency of the GJB2 mutations that cause hereditary hearing loss in the Japanese population. *J Hum Genet* 60: 613-617, 2015. (査読有) doi: 10.1038/jhg.2015.82.
5. Ishikawa M., Ohnishi H., Skerleva D., Sakamoto T., Yamamoto N., Hotta A., Ito J., and Nakagawa T.: Transplantation of neurons derived from human iPS cells cultured on collagen matrix into guinea-pig cochleae. *J Tissue Eng Regen Med* 2015. (査読有) doi: 10.1002/term.2072.
6. Yamazaki H., Naito Y., Moroto S., Tamaya R., Yamazaki T., Fujiwara K., and Ito J.: SLC26A4 p.Thr410Met homozygous mutation in a patient with a cystic cochlea and an enlarged vestibular aqueduct showing characteristic features of incomplete partition type I and II. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 78: 2322-2326, 2014. (査読有) doi: 10.1016/j.ijporl.2014.10.038.
7. Tona Y., Hamaguchi K., Ishikawa M., Miyoshi T., Yamamoto N., Yamahara K., Ito J., and Nakagawa T.: Therapeutic potential of a gamma-secretase inhibitor for hearing restoration in a guinea pig model with noise-induced hearing loss. *BMC Neurosci* 15: 66, 2014. (査読有) doi: 10.1186/1471-2202-15-66.
8. Taura A., Ohnishi H., Ochi S., Ebisu F., Nakagawa T., and Ito J.: Effects of mouse utricle stromal tissues on hair cell induction from induced pluripotent stem cells. *BMC Neurosci* 15: 121, 2014. (査読有) doi: 10.1186/s12868-014-0121-7.
9. Tateya T., Imayoshi I., Tateya I., Hamaguchi K., Torii H., Ito J., and Kageyama R.: Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development* 140: 3848-3857, 2013. (査読有) doi: 10.1242/dev.095398.
10. Lou X. X., Nakagawa T., Nishimura K., Ohnishi H., Yamamoto N., Sakamoto T., and Ito J.: Reprogramming of mouse

- cochlear cells by transcription factors to generate induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 15: 514-519, 2013. (査読有) doi: 10.1089/cell.2013.0020.
11. Lou X. X., Nakagawa T., Ohnishi H., Nishimura K., and Ito J.: Otophospheres derived from neonatal mouse cochlea retain the progenitor cell phenotype after ex vivo expansions. *Neurosci Lett* 534: 18-23, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.001.
 12. Hayashi Y., Yamamoto N., Nakagawa T., and Ito J.: Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after pharmacological hair cell injury in neonatal mice. *Mol Cell Neurosci* 56: 29-38, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.mcn.2013.03.003.
 13. Taniguchi M., Yamamoto N., Nakagawa T., Ogino E., and Ito J.: Identification of tympanic border cells as slow-cycling cells in the cochlea. *PLoS One* 7: e48544, 2012. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0048544.
 14. Yamamoto N., Chang W., and Kelley M. W.: Rbpj regulates development of prosensory cells in the mammalian inner ear. (査読有) *Dev Biol* 353: 367-379, 2011. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.03.016.
 15. Tateya T., Imayoshi I., Tateya I., Ito J., and Kageyama R.: Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development. (査読有) *Dev Biol* 352: 329-340, 2011. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.01.038.

〔学会発表〕(計 142件)

1. 伊藤 壽一. Transplanting stem cells in the inner ear: Current concepts. Royal Society of Medicine, Meeting of the Otolaryngology & Rhinology Sections. Feb 6. 2015. London
2. Ito J. Presidential lecture : Regeneration medicine for the inner ear disorders. Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. Nov 1-4. 2014. kyoyo
3. Ito Juichi. Panel A : Inner Ear Regeneration, Otoprotection and Drug Delivery to the Inner Ear. 11th European Symposium on Paediatric Cochlear Implantation (ESPCI 2013). May 23-26. 2013. Istanbul, Turkey
4. 伊藤 壽一. ランチョンセミナー「内耳障害の再生医学的アプローチ」. 第 22 回日

本耳科学会. 10月4日~6日. 2012. 名古屋

5. Ito J. Regeneration medicine for the inner ear disorders. 8th International Academic Conference / Workshop in Otolaryngology and Laryngology. August 22-24. 2012. Malaga, Spain
6. 伊藤 壽一. 公開シンポジウム: 感覚器窓外の治療の研究「聴覚障害の治療の進歩」. 日本学術会議臨床医学委員会感覚器分科会 公開シンポジウム 感覚器医学ロードマップ 感覚器障害の克服と支援を目指す 10年間 中間報告会. 8月9日. 2011. 東京都

〔図書〕(計 1件)

Ito J.ed. Springer Japan, Tokyo, *Regenerative Medicine for the Inner Ear*, 2014, 321
ISBN: 978-4-431-54861-4

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

名称: 移植後の生着能を有する神経細胞と個体3次元マトリックスとの複合体
発明者: 大西弘恵、中川隆之、伊藤壽一
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-182472
出願年月日: 2013年9月3日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 壽一 (ITO, Juichi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90176339

(2) 研究分担者

中川 隆之 (NAKAGAWA, Takayuki)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 50335270

田浦 晶子 (TAURA, Akiko)
京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70515345

山本 典生 (YAMAMOTO, Norio)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70515345

坂本 達則 (SAKAMOTO, Tatsunori)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60425626

北尻 真一郎 (KITAJIRI, Shinichiro)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00532970

平海 晴一 (HIRAUMI, Harukazu)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10374167

(3)連携研究者
なし