

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16948

研究課題名(和文)鳥類内耳細胞を用いたマウスiPS細胞から内耳細胞への分化誘導と遺伝性難聴への応用

研究課題名(英文)generation of functional CX26 gap junction forming cell derived from mouse iPS cells and its application to hereditary deafness

研究代表者

福永 一郎 (Fukunaga, Ichiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20746581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性難聴は1,600出生に1人と高頻度で発症し、聴覚と言語発育に著しい障害を引き起こすため極めて高度なQOLの低下をもたらす。特に、コネキシン26(Connexin26, Cx26)をコードするGap junction beta 2 (GJB2)遺伝子は、世界最大の遺伝性難聴の原因遺伝子である。本研究課題では、これまで報告されていなかったマウスES/iPS細胞から機能性を持ったコネキシン26ギャップ結合構築細胞の分化誘導法を開発した。また、開発した分化誘導法を疾患iPS細胞に用いることで、本疾患における病態を再現した。また、培養条件を調整することで、より効率の良い分化誘導法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、ES/iPS細胞から感覚細胞への分化誘導法は複数報告されているが、CX26ギャップ結合を構築する蝸牛支持細胞を作製した報告はなかった。CX26をコードするGJB2遺伝子は世界最大の遺伝性難聴の原因遺伝子であり、疾患の対象となる細胞は蝸牛支持細胞などの非感覚細胞である。本研究の成果は、GJB2変異難聴を含めた、非感覚細胞を対象とする難聴の病態の解明や、治療法の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutation of the Gap Junction Beta 2 gene (GJB2) encoding connexin 26 (CX26) is the most frequent cause of hereditary deafness worldwide. In this study, we generated functional CX26 gap junction-forming cell (iCX26GJC) from mouse ESC/iPSC by using 3D and 2D culture. In 3D culture, iCX26GJC were observed in a part of the aggregate. Aggregates were subcultured in 2D culture, and proliferation of iCX26GJCs were observed. To investigate whether the iCX26GJC were functional, we performed scrape-loading assay and Ca<sup>2+</sup> imaging. In the iCX26GJC culture, we observed that Lucifer yellow diffused beyond the wounded parental cells. Furthermore, spontaneous Ca<sup>2+</sup> signaling activity was observed. Finally, we found that combination with growth factor and inhibitor has been shown to result in greater production of isolatable CX26-expressing region and higher Gjb2 mRNA levels, thereby increasing the yield of highly purified iCX26GJCs.

研究分野：発生生物学

キーワード：GJB2 遺伝性難聴 ES/iPS細胞 分化誘導 鳥類胚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴は 1,600 出生に 1 人と高頻度で発症し、聴覚と言語発育に著しい障害を引き起こすため極めて高度な QOL の低下をもたらす。特に、コネキシン 26(Connexin26, Cx26)をコードする Gap junction beta 2 (GJB2)遺伝子は、世界最大の遺伝性難聴の原因遺伝子である。

Cx26 は、Cx30 と共に内耳支持細胞・線維細胞において細胞間イオン輸送を行うギャップ結合プラーク(Gap Junction Plaque, GJP)を構築する重要な要素であり、内耳リンパ液中のイオン組成を保っている。申請者の所属している研究グループは、GJB2 変異型遺伝性難聴モデルマウスを用いて、Cx26 が欠損することによりギャップ結合プラークが劇的に崩壊、細胞間イオン輸送能が低下することを明らかにした(Kamiya et al., J Clin Invest, 2014)。これまでの外的因子による内耳性難聴の治療は有毛細胞を対象としてきた。また、細胞治療を目的とした ES/iPS 細胞の分化誘導法が複数報告されているが、いずれも有毛細胞を対象としたものであった(Oshima 2010, Chen 2012, Kohler 2014)。これに対し、GJB2 難聴を含めた遺伝性難聴の原因となる細胞は、有毛細胞だけでなく支持細胞や線維細胞など多岐にわたることから新しい治療戦略が求められている。しかしながら、ES/iPS 細胞から Cx26 を発現しギャップ結合プラークを構築する内耳支持細胞や線維細胞への分化誘導法はいまだ報告されていない。哺乳類において一旦障害・消失した有毛細胞は再生しないのに対し、鳥類は支持細胞が有毛細胞へと再分化し再生することが知られている。鳥類における有毛細胞の再生能は、難聴の治療法を開発する上でキーとなる存在であり、注目する研究者も多い。申請者は、鳥類胚を用いてマウス iPS 細胞から内耳前駆細胞への分化誘導法の開発を行ってきた(H26-H28 若手 B)。これまでの成果として、iPS 細胞から Cx26/30 陽性ギャップ結合プラークを構築する細胞への分化誘導法を世界で初めて開発した(Fukunaga, Stem cell reports,2016)。また、申請者の所属する研究グループでは、蝸牛への細胞移植技術(Kamiya, 2007)、遺伝性難聴の疾患モデル(Kamiya, 2014)、疾患モデルへの遺伝子治療(Iizuka, 2015)、細胞導入効率の促進(Kamiya, 2015)といった技術的ツールを有している。申請者は、これらの技術を複合することで、GJB2 変異型遺伝性難聴の根本的な治療法の開発が期待できると考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) iPS 細胞から分化誘導した CX26 発現細胞の機能性の評価

分化誘導した細胞に対し Scrape loading assay や Ca<sup>2+</sup>イメージング等を行い、蝸牛支持細胞と同様の機能を持っているか明らかにする。

### (2) CX26 発現細胞の株化と臨床応用に向けた分化誘導条件の開発

CX26 発現細胞の株化、疾患モデル iPS 細胞由来の細胞から分化誘導と細胞株の樹立を目指す。また、臨床応用に向けた分化誘導法の開発を行う。

### (3) 難聴モデルマウスへの細胞移植

分化誘導した細胞を難聴モデルマウスの蝸牛に移植し、蝸牛機能および聴力の回復を図る。移植した細胞の動向や聴力の継時的な変化を観察し評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) iPS 細胞から分化誘導した Cx26 発現細胞の機能性の評価

・ Scrape loading assay による細胞間コミュニケーションの解析

Scrape loading assay は gap junction を介した細胞間コミュニケーションを解析する手法であり、低分子の色素である Lucifer Yellow を用いる。コントロールには分化誘導前の iPS 細胞およびフィーダー細胞を用いる。

- ・ Ca<sup>2+</sup> imaging による細胞間コミュニケーションの解析

Ca<sup>2+</sup> imaging は Ca<sup>2+</sup>依存的な神経等における細胞間コミュニケーションを解析する手法であり、Ca<sup>2+</sup>シグナルの自家発火と伝播は発達期の蝸牛においても観察することができる。(Anselmi et al., 2008; Tritsch et al., 2007)。本実験では、分化誘導した細胞が蝸牛同様に Ca<sup>2+</sup>依存的なシグナル伝達が行われているかを明らかにする。

(2) CX26 発現細胞の株化と臨床応用に向けた分化誘導条件の開発

- ・ 鳥類胚を用いた iPS 細胞の分化誘導

本実験では、Li et al (2003)の報告を参考に、三次元培養により作製した様々な分化段階の iPS 細胞をニワトリ胚の聴覚器に移植し培養する、その後酵素処理および単離培養により大量増殖が可能な内耳前駆細胞群を得る新規分化誘導法を確立させる。

- ・ 疾患モデル iPS 細胞の樹立と内耳細胞への分化誘導

本実験では、疾患モデルマウス由来の iPS 細胞から内耳支持細胞様細胞への分化誘導を目指す。

- ・ 効率的なコネキシン 26 発現細胞の分化誘導法の開発

以前の研究成果では、3次元培養時に BMP4 の添加を添加することで胚様体において GJB2/GJB6 の mRNA 量が上昇することや、コネキシン 26 陽性の細胞集団 (small vesicle) が形成されることが明らかになっている (Fukunaga et al., 2016)。

本実験では、iCX26GJC の作製効率を高めるため、分化誘導条件の検討を行った。具体的には 3次元培養時における分化誘導因子の種類、濃度等の検討を行い、mRNA 発現量や免疫染色等により評価を行う。

(3) 疾患モデルマウスへの細胞移植

本実験では、作製した iPS 細胞由来の移植用細胞を難聴モデルマウスの蝸牛に移植することで、移植細胞の動向および聴力の回復について明らかにする

#### 4 . 研究成果

(1) iPS 細胞から分化誘導した CX26 発現細胞の機能性の評価

iPS 細胞から分化誘導した CX26 ギャップ結合構築細胞 (iCX26GJC) が構築したギャップ結合が機能的であるか調べるため、Scrape loading dye transfer assay を行った。その結果、未分化な iPS 細胞やフィーダー細胞では色素(Lucifer yellow)の拡散が観察されなかったのに対し、分化誘導した細胞(iCX26GJC)では色素の拡散が観察された。つぎに、分化誘導した細胞に対しカルシウムイメージングを行った。その結果、発達期の蝸牛で観察されるようなカルシウムシグナルの自家発火と伝播が観察された。観察されたカルシウムシグナルが ATP/Hemichannel 依存的なものであるか調べるため、p2x レセプター阻害剤 (PPADS) とコネキシンヘミチャネルブロッカー (FFA) の投与試験を行った。その結果、PPADS/FFA の投与により可逆的なカルシウムシグナル伝播の抑制が観察された。分化誘導した細胞で観察されたカルシウムシグナルの伝播は ATP/Hemichannel 依存的なものであり、同様の現象が発達期蝸牛でも観察されている。

以上の結果から、iPS 細胞から分化誘導したコネキシン 26 ギャップ結合を構築する細胞は、蝸牛支持細胞、特に outer- inner-sulcus cells で観察される特徴を有していることから、蝸牛支持細胞様細胞であると考えられた。

(2) CX26 発現細胞の株化と臨床応用に向けた分化誘導条件の開発

- ・ 疾患モデル iPS 細胞の樹立と内耳細胞への分化誘導

遺伝性難聴は 1,600 出生に 1 人と高頻度で発症し、聴覚と言語発育に著しい障害を引き起こす

ため極めて高度な QOL の低下をもたらす。特に、コネクシン 26(Connexin26, Cx26)をコードする Gap junction beta 2 (*GJB2*)遺伝子は、世界最大の遺伝性難聴の原因遺伝子である。申請者の所属している研究グループは、*GJB2* 変異型遺伝性難聴モデルマウスを作製・Cx26 が欠損することによりギャップ結合プラークが劇的に崩壊、細胞間イオン輸送能が低下することを明らかにした(Kamiya et al., J Clin Invest, 2014)。本研究では、*GJB2* 変異型難聴モデルマウスの蝸牛線維細胞から iPS 細胞を樹立、申請者らの開発した分化誘導法を用いて内耳細胞を作製した。その結果、*GJB2* 変異型遺伝性難聴の分子病態であるギャップ結合複合体の崩壊を再現した。

・効率的なコネクシン 26 発現細胞の分化誘導法の開発

これまでの成果から、2次元培養で観察されたコネクシン 26 ギャップ結合構築細胞(iCX26GJC)は、3次元培養時に胚様体で観察されたコネクシン 26 を発現する細胞集団 (Small vesicle) に由来するものであり、胚様体における Small vesicle を大量に作製することで、iCX26GJC の作製効率も上がるのではないかと考えた。本実験では、コネクシン 26 発現細胞を大量に作製するための培養条件を検討した。具体的には、以前報告した BMP4 ベースの 3次元培養を行い(Fukunaga et al., 2016) 追加の因子として Activin/Nodal/TGF-beta 阻害剤 (SB431542: SB) を添加した。SB431542 は ES/iPS 細胞の分化誘導において中内胚葉への分化を阻害することが知られている。3次元培養 7 日目における *Gjb2* および *Gjb6* の mRNA 発現量を調べた結果、BMP に SB を添加した群は *Gjb2* および *Gjb6* の発現量が BMP 単独群と比べ有意に上昇した。これに対し、SB 単独群では mRNA の上昇は認められなかった (図 1)。

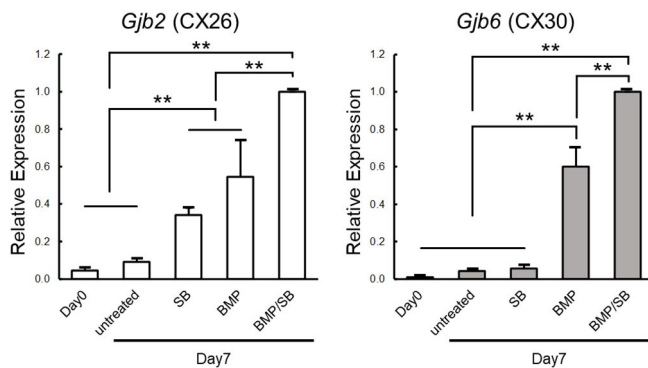


図 1. *Gjb2* および *Gjb6* の mRNA 発現量

また、胚様体におけるコネクシン 26 発現細胞の局在を調べるため、免疫染色を行った。その結果、胚様体内に Small vesicle が多数形成されていた。胚様体内における CX26<sup>+</sup> Small vesicle の数を計測した結果、無添加群 (BMP<sup>-</sup>, SB<sup>-</sup>) や SB 単独群 (BMP<sup>-</sup>, SB<sup>+</sup>) では Small vesicle の形成が認められなかったのに対し、BMP4 単独群 (BMP<sup>+</sup>, SB<sup>-</sup>) や BMP/SB 群 (BMP<sup>+</sup>, SB<sup>+</sup>) では Small vesicle の形成が認められた。さらに、BMP4 に SB を添加することで、Small vesicle の形成数が有意に上昇した (図 2)。

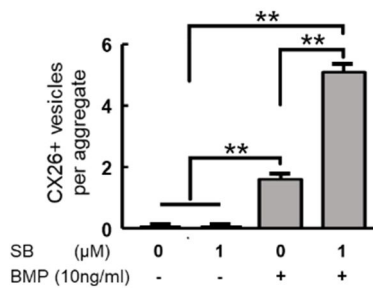


図 2. 胚様体中における CX26<sup>+</sup> Small vesicle 形成数

また、本実験において作成された CX26<sup>+</sup> Small Vesicle は実体顕微鏡下でのハンドソーティングが可能であり、これらを接着培養することで均一なコネクシン 26 ギャップ結合構築細胞のシートを作製することが可能となった。

・ In vivo におけるマウス iPS 細胞から内耳細胞への分化誘導法の開発

Li らのマウス ES 細胞を鳥類胚の耳胞(内耳原器)へ移植する方法を参考に、マウス iPS 細胞胚様体を孵卵 50 時間後のニワトリ胚の耳胞へ移植した。細胞移植 24 時間後に蛍光顕微鏡下で観察した結果、耳胞への細胞の定着が確認された。また、Oshima ら(2010)がマウス ES/iPS 細胞から内耳有毛細胞へ分化誘導する際に用いた、鳥類内耳由来のフィーダー細胞株を樹立した。

(3) 疾患モデルマウスへの細胞移植

薬剤の局所投与により人為的に誘発した蝸牛線維細胞損傷部において、他臓器における幹細胞ホーミング因子とされる MCP1(Monocyte Chemotactic Protein-1)および SDF1(Stromal cell-derived factor-1)が高発現することを発見した。更に、MCP1 や SDF1 の受容体である CCR2(C-C chemokine receptor type-2)および CXCR4(CXC Chemokine Receptor)の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて評価し、これらを強発現する骨髄間葉系幹細胞の作製法を開発した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Fukunaga Ichiro, Fujimoto Ayumi, Hatakeyama Kaori, Kurebayashi Nagomi, Ikeda Katsuhisa, Kamiya Kazusaku	4. 巻 51
2. 論文標題 Generation of Functional CX26?Gap Junction Plaque Forming Cells with Spontaneous Ca <sup>2+</sup> Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Stem Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1002/cpsc.100">https://doi.org/10.1002/cpsc.100</a>	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ichiro Fukunaga
2. 発表標題 Generation of Stem Cell derived inner ear Connexin 26 gap junction plaque forming cells
3. 学会等名 Inner Ear Biology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福永一朗
2. 発表標題 ES細胞の3次元培養におけるコネクシン26を高発現する条件の検討と内耳細胞への分化誘導
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 福永一朗
2. 発表標題 iPS細胞から機能性を持ったConnexin26ギャップ結合を構築する細胞への分化誘導
3. 学会等名 第27回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ichiro Fukunaga
2. 発表標題 Generation of functional Cx26-gap junction plaque forming cells that exhibit spontaneous Ca <sup>2+</sup> transients from induced pluripotent stem cells.
3. 学会等名 Inner Ear Biology, 54th Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福永一朗
2. 発表標題 iPS細胞から機能性を有するConnexin26ギャップ結合プラークを構築する内耳細胞への分化誘導
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ichiro Fukunaga
2. 発表標題 Generation of inner ear Cx26-gap junction plaque forming cells derived from induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----