

令和 6 年 4 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09708

研究課題名（和文）鳥類内耳有毛細胞再生初期過程の解明：哺乳類における有毛細胞再生効率化への応用

研究課題名（英文）Mechanisms for the initial process of hair cell regeneration in avian inner ears

研究代表者

中川 隆之（Nakagawa, Takayuki）

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50335270

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）：哺乳類蝸牛有毛細胞は、一旦喪失すると再生せず、感音難聴は恒久的となる。一方、鳥類では、有毛細胞が再生し、聴覚機能が回復する。本研究では、鳥類での有毛細胞再生過程を分子生物学的に解明し、哺乳類での有毛細胞再生誘導に応用することを目的とした研究を実施した。鶏聴覚感覚上皮器官培養を用いた網羅的遺伝子解析から、再生初期過程にIFN/JAK/STAT経路およびTGF beta情報伝達系が関与することが示され、一旦支持細胞が前駆細胞に脱分化することが示された。エピゲノム解析により、鶏有毛細胞再生過程におけるATOH1遺伝子発現制御に関連する特異的なエンハンサー領域を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類聴覚感覚上皮における有毛細胞再生に関する網羅的な遺伝子解析、特に単一細胞レベルでの解析報告は、きわめて限られており、非常に価値のあるデータリソースを獲得することができた。本研究課題で得られた知見の一部は、米国の他の研究グループの異なる実験モデルでも確認されており、信頼性の高い解析データが得られたと考える。哺乳類蝸牛での応用実験を行うためには、追加解析が必要であるが、マウス蝸牛での発生や再生誘導モデルでの解析データリソースと比較検討を進めることにより、哺乳類蝸牛有毛細胞再生に向けた新たな戦略が見いだされることが期待されるデータを獲得することができた。

研究成果の概要（英文）：In contrast to mammalian cochleae, avian auditory epithelia have the capability for spontaneous regeneration of hair cells. In this project, we performed multi-omics analyses of chick hair cell regeneration processes using an explant culture model of chick auditory epithelia to explore novel methods for inducing hair cell regeneration in mammals. Bulk and single-cell RNA sequencing demonstrated involvement of IFN/JAK/STAT and TGF beta signaling in the initial process of hair cell regeneration. A pseudotime trajectory analysis indicated that supporting cells are once reprogrammed to the progenitor state before transdifferentiation into hair cells. An integrated analysis of RNA and ATAC sequencing revealed chick-specific enhancer loci of ATOH1. These findings provide novel insights for inducing hair cell regeneration in mammalian cochleae.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：感音難聴 有毛細胞 再生 分化転換 鳥類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類とは異なり、鳥類の聴覚器官である基底乳頭では、有毛細胞再生が自発的に誘導され、聴覚機能も再生される。鳥類では、支持細胞の非対称有糸分裂と支持細胞の分化転換という2つの機構で、有毛細胞が再生される。有毛細胞傷害後の早期に誘導され、中心的な役割を果たすのは、支持細胞分化転換であることが明らかにされている。近年、哺乳類蝸牛でも *Atoh1* 遺伝子導入や Notch 情報伝達系阻害薬などにより、支持細胞の分化転換を経た有毛細胞再生誘導が示されており、臨床応用が期待されている。一方で、聴覚機能の再生という観点では、哺乳類では有効性が期待できるレベルの聴覚機能再生は報告されておらず、未だ改訂が必要との認識があった。近年、鶏に関する遺伝子情報が充実し、網羅的遺伝子解析手法の発展に伴い、これまで困難であった鳥類における有毛細胞再生の網羅的遺伝子解析の基盤が形成されつつあった。鳥類聴覚感覚上皮で自然に誘導される有毛細胞再生メカニズムを明らかにすることにより、なぜ哺乳類で有毛細胞再生が誘導できないのか、障壁となる因子は何かを明らかにしようとする研究の方向性が注目を集めつつあった。

2. 研究の目的

本課題では、鶏器官培養系での有毛細胞再生過程の網羅的ゲノムおよびエピゲノム解析を行い、鳥類での有毛細胞再生分子機構を解明することにより、哺乳類蝸牛での有毛細胞再生誘導の高効率化を図り、新規感音難聴治療薬開発に結びつけることが最終的なゴールとなる。具体的には、鳥類聴覚感覚上皮における支持細胞から有毛細胞への分化転換機構、特に、*Atoh1* 活性化誘導のメカニズムを明らかにし、哺乳類蝸牛における有毛細胞再生効率を向上させる因子を同定することを目指す。本課題では、有毛細胞再生メカニズムとして支持細胞から有毛細胞への直接分化転換に焦点を絞り、支持細胞の活性化メカニズム、活性化した支持細胞の細胞生物学的特徴、活性化支持細胞から有毛細胞への分化転換の分子機構の解明に関する研究を実施した。

3. 研究の方法

1) 鶏聴覚感覚上皮器官培養：孵化後1日目の鶏側頭骨から採取した鶏聴覚感覚上皮を24時間培養条件下においた後に器官培養を開始した。耳毒性薬物であるストレプトマイシンに48時間曝露し、有毛細胞傷害を惹起し、その後ストレプトマイシンを含まない培地で培養維持し、有毛細胞再生を誘導した。また、コントロール培養としてストレプトマイシンに曝露しない条件での器官培養を行った。

2) RNA and ATAC sequencing: bulk-RNA sequencing による有毛細胞初期過程解析では、ストレプトマイシン曝露前、曝露24、48時間後、曝露終了6時間後にサンプリングを行い、感覚上皮のみを採取し、RNAを抽出した。単一細胞でのRNA sequencing による有毛細胞再生過程の解析では、ストレプトマイシン曝露前、曝露48時間後、曝露終了96時間後および同様の培養時間のコントロール培養組織を使用した。酵素処理により単一細胞に分離し、C1 Single-Cell mRNA seq HT IFC を用いて単一細胞を回収した。bulk-RNA sequencing と ATAC sequencing の統合解析では、ストレプトマイシン曝露前、曝露24、48時間後のサンプルを用いた。

3) 組織解析および機能解析：組織解析は、免疫染色および RNAscope を用いた in situ hybridization にて行い、標的分子の機能解析は、阻害薬を用いた抑制実験で評価した。

4. 研究成果

鶏聴覚感覚上皮培養モデルを用いた鶏聴覚感覚上皮における有毛細胞再生の初期過程における bulk-RNA sequencing による遺伝子発現解析を実施した。この培養モデルでは、耳毒性薬物であるストレプトマイシンの48時間曝露により有毛細胞が完全に喪失され、曝露終了48時間後から再生有毛細胞が認められる(Matsunaga et al., 2020)。ストレプトマイシン曝露24時間後に発現上昇する遺伝子群を同定し、この中でストレプトマイシン曝露48時間後に既に低下傾向を示す遺伝子として *IF16* が同定された。JAK/STAT 経路阻害薬を用いた抑制実験にて *IF16* 発現が有意に抑制されたが、*ATOH1* 発現抑制は傾向が認められるにとどまった(Matsunaga et al., 2020)。これらの結果は、有毛細胞再生の初期過程に IFN JAK/STAT 経路が関与することを示唆するものであり、後発の *in vivo* 実験系を用いた解析でも同様の結果が呈示されている(Janesick et al., 2022)。

同じ鶏聴覚感覚上皮培養モデルを用い、有毛細胞再生過程を単一細胞レベルでのRNA sequencing 解析を行った(Matsunaga et al., 2023)。支持細胞のみを抽出した擬時間解析による分化経路推定から、支持細胞から有毛細胞への分化転換メカニズムとして、支持細胞マーカー遺伝子消失過程と有毛細胞マーカー遺伝子発現過程の間に前駆細胞的な性質を獲得する段階があることが示された。すなわち、支持細胞から有毛細胞に直接的に分化転換するのではなく、一旦前駆細胞的な状態を経て、有毛細胞への分化が開始することが明らかとなった(Matsunaga et al., 2023)。また、前駆細胞期のみに特異的に発現上昇する遺伝子として *EDNRB2* が見いだされた。経時的発現変動のクラスタリング解析から、6つの変動パターンに遺伝子群を分類し、最も初期に発現ピ

ークを迎える遺伝子群に上皮間葉転換および TGF beta 情報伝達系に関連する遺伝子が上位に認められた(Matsunaga et al., 2023)。この結果に基づき、TGF beta 情報伝達系阻害薬による解析を実施したところ、*ATOH1* および *EDNRB2* の発現抑制が確認され、有毛細胞再生が抑制されることが明らかとなった(Matsunaga et al., 2023)。以上の結果から、支持細胞から有毛細胞への分化転換の初期過程に TGF beta 情報伝達系が関与することが示唆された。

これらの一連の研究成果に基づき、実験群をストレプトマイシン曝露前、曝露 24 時間後、48 時間後の 3 群に設定し、ATAC sequencing および RNA sequencing の同時解析を実施した。RNA sequencing の結果は、過去の報告(Matsunaga et al., 2020)と一致し、再現性が確認された。オープンクロマチン領域として、80366 ピークを検出し、発現変動遺伝子変動との相関性から絞り込みを行い、各変動遺伝子に対応するエンハンサー候補領域を決定した。ストレプトマイシン曝露 24 時間後に発現上昇する遺伝子群のエンハンサー候補領域から推定される上流転写因子として既知の有毛細胞発生および再生に関連する転写因子が認められ、解析アルゴリズムの妥当性が確認された。*ATOH1* エンハンサー候補領域のピークについて、Luo et al., 2022 のマウス発生段階における有毛細胞発生におけるデータとの比較解析を行った。結果、領域内に *Atoh1* 結合配列を有する鶏聴覚感覚上皮特異的なエンハンサー領域を同定することができた。このエンハンサー領域が鶏聴覚感覚上皮再生過程における自動的な *ATOH1* 発現上昇のメカニズムの一旦を担うことが推定された。

引用文献

Janesick et al., Avian auditory hair cell regeneration is accompanied by JAK/STAT-dependent expression of immune-related genes in supporting cells. *Development*. 2022 Apr 15;149(8):dev200113. doi: 10.1242/dev.200113.

Luo et al., Three distinct *Atoh1* enhancers cooperate for sound receptor hair cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Aug 9;119(32):e2119850119. doi: 10.1073/pnas.2119850119.

Matsunaga et al., 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.

Matsunaga et al., 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 4件）

1. 著者名 Matsunaga Mami, Nakagawa Takayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Future Pharmacotherapy for Sensorineural Hearing Loss by Protection and Regeneration of Auditory Hair Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 777 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15030777	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 Matsunaga Mami, Yamamoto Ryosuke, Kita Tomoko, Ohnishi Hiroe, Yamamoto Norio, Okano Takayuki, Omori Koichi, Nakagawa Takayuki	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 ~ 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamahara K, Yamamoto N, Kuwata F, Nakagawa T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Neuroprotective role of insulin-like growth factor 1 in auditory and other nervous systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 609-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-437	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 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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 中川 隆之、松永 麻美、山本 典生、大森 孝一
2. 発表標題 鳥類蝸牛有毛細胞再生モデルの単一細胞遺伝子発現解析1：支持細胞分化転換過程における遺伝子発現変化
3. 学会等名 第32回日本耳科学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 松永 麻美、中川 隆之、山本 典生、大森 孝一
2. 発表標題 鳥類蝸牛有毛細胞再生モデルの単一細胞遺伝子発現解析2：擬似的時間変動解析による細胞運命決定機構解析
3. 学会等名 第32回日本耳科学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Hiroki Kagoshima, Hiroe Ohnishi, Takayuki Nakagawa, Koichi Omori, Norio Yamamoto
2. 発表標題 Ebf1 Suppresses the Proliferation of the Cochlear Prosensory Domain and Forms the Scala Tympani and Spiral Limbus during the Development of the Inner Ear
3. 学会等名 46th Annual MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 松永 麻美、喜多 知子、山本 亮介、岡野 高之、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 第31回日本耳科学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Mami Matsunaga, Tomoko Kita, Ryosuke Yamamoto, Norio Yamamoto, Takayuki Okano, Koichi Omori, Takayuki Nakagawa
2. 発表標題 High-resolution transcriptional analysis of avian auditory epithelia in an explant culture model for hair cell regeneration
3. 学会等名 45th Annual MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 中川隆之
2. 発表標題 内耳再生研究はどこまできたのか：30年間の潮流の変化
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松永麻美、竹内万理恵、中川隆之、大森孝一
2. 発表標題 EDNRB 2：支持細胞から有毛細胞への再生過程における前駆細胞マーカー分子としての役割の探索
3. 学会等名 第33回日本耳科学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 竹内万理恵、松永麻美、中川隆之、大森孝一
2. 発表標題 鳥類蝸牛における幹細胞集団の探索と有毛細胞再生過程における役割
3. 学会等名 第33回日本耳科学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Takayuki Nakagawa, Marie Takeuchi, Mami Matsunaga, Ryosuke Yamamoto, Tomoko Kita, Koichi Omori
2. 発表標題 Discovering a stem cell pool in the chick auditory epithelium and its role in hair cell regeneration
3. 学会等名 58th Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Mami Matsunaga, Ryosuke Yamamoto, Marie Tekeuchi, Tomoko Kita, Hiroe Ohnishi, Norio Yamamoto, Takayuki Okano, Koichi Omori, Takayuki Nakagawa
2. 発表標題 EDNRB2: a marker gene for the intermediate cells during supporting cell-to-hair cell conversion in chick basilar papillae
3. 学会等名 58th Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Marie Takeuchi, Mami Matsunaga, Ryosuke Yamamoto, Tomoko Kita, Koichi Omori, Takayuki Nakagawa
2. 発表標題 Progenitor Cell Pools in The Chick Auditory Epithelium and Their Response to Hair Cell Loss
3. 学会等名 47th Annual Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024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	飯田 慶 (Iida Kei) (00387961)	近畿大学・理工学部・講師 (34419)	

6. 研究組織（つづき）

	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	喜多 知子 (Kita Tomoko) (20362519)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	
研究分担者	西村 幸司 (Nishimura Koiji) (20405765)	滋賀県立総合病院（臨床研究センター）・その他部局等・嘱託研究員 (84203)	
研究分担者	大西 弘恵 (Onishi Hiroe) (50397634)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	
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)	

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