

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591878

研究課題名（和文）内耳疾患特異的 iPS 細胞を用いた新しい内耳病態解析モデルの確立

研究課題名（英文）A novel method for analyzing inner ear disorders using disease-specific iPS cells

研究代表者

中川 隆之（Nakagawa Takayuki）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50335270

研究成果の概要（和文）：疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析を内耳疾患の病態解明、治療法開発に応用するために、効率的な内耳細胞への分化誘導方法の検討を行った。過去の報告に比して、有毛細胞マーカー発現効率を向上させることができた。また、遺伝性難聴モデルとして TRIOBP 欠損マウスから iPS 細胞を樹立し、分化誘導実験を施行した。今後の問題点として、より質の高い感覚毛を有する細胞への分化誘導があげられる。

研究成果の概要（英文）：To utilize disease-specific iPS cells for the development of novel therapeutics for inner ear diseases, methods for otic induction of iPS cell have been developed, which have high efficiency for induction of hair cell-like cells. We also generated iPS cell lines derived from TRIOBP deficiency mice, and examined their potential for hair cell differentiation. For further progress, a method for induction of mature hair bundles should be established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：耳科学

キーワード：iPS 細胞 遺伝性難聴 内耳再生 感音難聴 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

（1）iPS 細胞の内耳研究への応用の現況  
Induced pluripotent stem cell（iPS 細胞）の樹立は、成体の体細胞に初期化因子を導入することにより多能性幹細胞がえられることを示した画期的な発見である。いしかえれば、生命現象において「時計の針を逆向きに

回す」技術の開発といえる。さらに、「個人の細胞」でこの技術は応用可能であることから、「自分自身の多能性幹細胞」をえる技術でもあり、再生医療の分野では、胚性幹細胞（ES 細胞）に変わる、倫理的問題を回避できる画期的な自己由来の移植細胞ソースの開発として、注目されている。われわれは、こ

れまで幹細胞移植、特に ES 細胞を用いた内耳細胞治療を研究開発してきた経緯から、すでに移植細胞ソースとして ES 細胞に置き換えることができるかどうかの研究を行っている (Nishimura, Nakagawa et al., 2009)。細胞治療を含めた内耳への iPS 細胞の応用について鍵を握る技術のひとつが、iPS 細胞の内耳細胞への分化誘導技術である。この点に関しては、スタンフォード大学の Heller のグループが学会発表レベルであるが、一連の報告を行っている。内耳分化誘導のマスター遺伝子は未だ不明であるが、内耳発生の段階を iPS 細胞や ES 細胞でリピートすることにより、一定数の内耳前駆細胞がえられることが分かっている。本研究では、iPS 細胞作製により「個人の細胞の時計の針を逆に回す」点に着目し、感音難聴症例で「内耳障害が固定するまでに、内耳で何が起こったのか」を調べる技術の基盤を開発することを目的とする。

## 2) 感音難聴の診断・治療の現況

感音難聴は、先天的、後天的ともに、最も頻度の高い身体障害のひとつである。しかし、その治療法はきわめて限られているのが現状であり、新たな根本的な治療法が開発が強く望まれている。感音難聴治療法開発が困難である要因のひとつに、詳細な病態解析が困難な点をあげることができる。内耳は骨に囲まれた脆弱な器官であることから、検体採取による病態解析は事実上不可能である。ヒト側頭骨病理の解析は、多くの有益な情報をもたらしてくれるが、感音難聴が発症してから時間が経過した死後になされることが多く、結果としての内耳障害解析にとどまる。一方、感音難聴研究の中で、難聴遺伝子に関する解析は最も進んだ研究分野といえる。多くの難聴遺伝子が発見され、遺伝子変異マウスの解析により内耳障害の病態が明らかにされている。実際の臨床例と遺伝子変異マウスでは、機能障害の発現に差異が認められることも少なくないが、遺伝性難聴は「最も内耳障害のメカニズム解析が進んだ感音難聴」ということができる。

本課題では、最も内耳障害のメカニズム解析が進んだ感音難聴である遺伝子変異による感音難聴モデルを用い、iPS 細胞から分化誘導した内耳細胞の細胞解析で、実際の *in vivo* での病態をどこまで解析できるか、治療法開発にどのように応用できるかを研究する。

## 2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞を用いた新しい内耳障害解析方法を開発することを目的とする。内耳は骨に囲まれた脆弱な器官であり、検体の採取は事実上不可能である。死後の側頭骨

病理から分かる所見は「結果」であり、臨床的にヒト内耳で進行している病態を知ることにはできない。しかし、iPS 細胞技術を応用して、時間経過をさかのぼれば、内耳障害が固定するまでに内耳で何が起こったのかを推察することが可能となる。本研究では、難聴遺伝子変異マウスをモデルとして用い、難聴遺伝子変異マウス由来 iPS 細胞から種々の内耳細胞を分化誘導し、実際の内耳で生じた病的変化を推察する方法を開発する。

iPS 細胞由来の内耳細胞による内耳障害病態解析方法を開発するためには、いくつかの解決すべき問題がある。iPS 細胞および ES 細胞から Pax2 陽性の内耳前駆細胞含む細胞群を誘導することは可能であり、われわれも Heller グループとの共同研究の一環として、すでに誘導効率を含め、再現性を確認している。しかし、Pax2 陽性の細胞がすべて内耳分化する細胞ではなく、その一部にとどまる。また、この内耳前駆細胞群から有毛細胞を分化誘導することが可能であるが、効率は低い。さらに、ラセン靭帯、血管条やラセン神経節の細胞がどれぐらいえられるかは分かっていない。これら iPS 細胞由来内耳細胞の細胞機能解析を行うためには、iPS 細胞からできるだけ多くの Pax2 陽性細胞がえられる方法を開発し、そこからえられる各種内耳細胞の数を増やす必要がある。また、同じ iPS 細胞でも iPS 細胞作製に用いた細胞ソース、作製方法の違いにより、えられる iPS 細胞の分化能力に違いが認められることも分かりつつある。したがって、本研究課題では、以下の項目を明らかにする。効率のよい iPS 細胞から内耳前駆細胞分化誘導方法の確立、内耳への分化誘導に最適な iPS 細胞のソース、作製方法の選別、ラセン神経節、血管条、ラセン靭帯への分化誘導方法の確立についての開発を行う。

また、難聴遺伝子により解析すべき細胞機能が異なるため、細胞レベルでの機能解析方法を検討し、その有効性を検証するために、各難聴遺伝子変異マウスの内耳障害の経時的変化を明確にし、さらに難聴遺伝子変異マウス由来 iPS 細胞を樹立する必要がある。これらに立脚し、難聴遺伝子変異マウス由来細胞と正常マウス由来細胞の細胞機能の差異を明らかに出来る細胞機能解析方法の確立することが本課題の目的となる。

## 3. 研究の方法

(1) iPS 細胞から効率よく内耳細胞を分化誘導する技術開発

iPS 細胞から内耳の種々の細胞への分化誘導方法開発にあたり、2 つの段階に分けて検討した。第一段階は、多能性幹細胞から Pax2 陽性細胞までの分化誘導ステップとした。

Pax2 は、内耳発生初期に発現する分子であり、これまでの過去の報告でも内耳への分化誘導の標識として用いられている。多能性幹細胞として、マウス ES あるいは iPS 細胞およびヒト iPS 細胞を用い、Pax2 陽性細胞の誘導効率の最適化決定のための培養実験を施行した。2010 年の Oshima et al. の報告で用いられている方法を基本とし、適宜改変を加えた。この培養方法は、2 つの段階から構成されており、第一段階は、Wnt 阻害薬、Smad3 阻害薬、IGF-1 存在下に浮遊培養を行い、その後 bFGF 存在下に接着培養を行い、Pax2 陽性細胞を誘導し、第 2 段階では、鶏卵形囊間葉系細胞上で分化誘導を進めるという方法である。第 1 段階では、Pax2 陽性細胞誘導効率改善と Pax2 陽性細胞純化を目標とした。また、第 2 段階では、有毛細胞誘導効率の向上を目標とした。第 2 段階の実験では、有毛細胞への分化誘導への効果を効率的に調べるために、胎生 10 日目のマウスの耳胞を用いた解析も行った。また、2012 年の Chen et al. の方向に用いられた方法についても検討した。

#### (2) 難聴遺伝子変異マウス由来 iPS 細胞樹立

有毛細胞の根に相当する部分でアクチンを束ねる役割を担う TRIOBP 遺伝子欠損マウスを用い、皮膚線維芽細胞を採取し、iPS 細胞作製実験を行った。iPS 細胞誘導は、4 因子導入により施行した。培養細胞の形態学的観察、分子生物学的な未分化細胞マーカーの発現検索、in vitro での分化誘導実験を行い、iPS 細胞としての性質検証を行った。

#### (3) 難聴遺伝子変異マウス由来 iPS 細胞由来内耳細胞の解析

(2) にて作製した TRIOBP 遺伝子欠損マウス由来 iPS 細胞の内耳への分化誘導実験を行い、Pax2 陽性細胞への分化、有毛細胞への分化を検討し、形態学的な解析により感覚毛の脆弱性について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) iPS 細胞から効率よく内耳細胞を分化誘導する技術開発

Oshima et al. 2010、Chen et al. 2012 の分化誘導方法の再現性について解析した。まず、マウス ES 細胞を用いて解析したところ、それぞれの方法の再現性が確認できた。しかしながら、最終産物となる有毛細胞への分化誘導効率は低く、形態学的に細胞頂部に感覚毛様の構造は確認できるものの、有毛細胞感覚毛に特徴的な形態を有する有毛細胞様細胞への分化誘導は再現できなかった。すなわち、各種有毛細胞のマーカータンパクの発現

は認めるものの、形態学的に内耳有毛細胞と断定できる感覚毛構造を有する細胞は得られなかったこととなる。次に、マウス iPS 細胞株を胎仔線維芽細胞由来 3 株、成獣尾部線維芽細胞由来 1 株を用いて、同様の解析を行った。ES 細胞に比べて、Pax2 陽性細胞の誘導効率は低下し、有毛細胞様細胞の分化誘導効率も低下した。これらの結果から、Pax2 誘導、有毛細胞誘導のそれぞれの段階で、誘導効率を高める工夫が必要と考えた。

有毛細胞誘導効率改善を目的として、確実に有毛細胞誘導が可能な胎生 10 日目の耳胞組織器官培養を用い、Oshima et al. 2010 の再現性検討としてフィーダー細胞である鶏卵形囊間葉系細胞の影響、新たに Wnt 作動薬添加の効果の 3 点の検討を行った。結果、フィーダー細胞は有毛細胞分化誘導を高める効果があるが、フィーダー細胞の継代により効果は減弱し、一定以上継代を行った細胞では逆に、誘導効率を低下させることが分かった。ある種の Wnt 作動薬は、フィーダー細胞と同等の効果をもつことも分かった。しかし、これらの相加効果は認められなかった。この結果に基づき、新規分化誘導方法として、IGF1、EGF による分化誘導に Wnt 作動薬を加える方法をマウス ES および iPS 細胞を用いて検討し、有毛細胞マーカー発現の向上が認められたが、形態学的に良好な感覚毛構造を持つ細胞の誘導はできなかった。

また、第一段階の Pax2 陽性細胞群を選別し、凍結保存する方法を開発した。

#### (2) 難聴遺伝子変異マウス由来 iPS 細胞樹立

TRIOBP 遺伝子欠損マウス胎仔皮膚線維芽細胞に 4 因子導入を行い、iPS 細胞様のコロニーを誘導することができた。これらのコロニーを回収し、パッセージを数回行った後に発現マーカー解析と in vitro での分化誘導解析を行った。結果、多能性幹細胞のマーカーの発現、3 胚葉系への分化が確認できた。

#### (3) 難聴遺伝子変異マウス由来 iPS 細胞由来内耳細胞の解析

TRIOBP 遺伝子欠損マウス由来 iPS 細胞をこれまでに開発した方法の中で最も有毛細胞マーカー発現効率が良好であった方法で分化誘導実験を行った。結果、他の iPS 細胞と同様に Pax2 誘導、有毛細胞マーカー誘導を行うことができた。しかしながら、感覚毛の脆弱性を示唆する形態学的所見を得ることはできなかった。今後、培養期間の延長、より詳細な組織学的解析を行う予定である。

## 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 8 件)

(1)Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J. Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. *Laryngoscope* 120: 576-581, 2010.

(2)Okano T, Nakagawa T, Ito J. Distribution of bone marrow-derived cells in the vestibular end organs and the endolymphatic sac. *Acta otolaryngol* 130: 88-94, 2010.

(3)Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, Ishihara T, Higaki M, Ito J. Stealth-nanoparticle strategy for enhancing the efficacy of steroids in mice with noise-induced hearing loss. *Nanomedicine (London)* 5:1331-1340, 2010.

(4)Angunsri N, Taura A, Nakagawa T, Hayashi Y, Kitajiri S, Omi E, Ishikawa K, Ito J. Insulin-like growth factor 1 protects vestibular hair cells from aminoglycosides. *Neuroreport* 22:38-43, 2011.

(5)Yoshida A, Kitajiri S, Nakagawa T, Hashido K, Inaoka T, Ito J. Adipose tissue-derived stromal cells protect hair cells from aminoglycoside. *Laryngoscope* 121:1281-1286, 2011.

(6)Nishimura K, Nakagawa T, Sakamoto T, Ito J. Fates of murine pluripotent stem cell-derived neural progenitors following transplantation into mouse cochleae. *Cell Transplant* 21:763-771, 2012.

(7)Lou X, Nakagawa T, Ohnishi H, Nishimura K, Ito J. Otospheres derived from neonatal mouse cochleae retain the progenitor cell phenotype after *ex vivo* expansions. *Neurosci Lett* 534:18-23, 2013.

(8)中川隆之 内耳再生へのストラテジー 内耳障害の病態に応じた治療法の開発戦略 日薬理誌 141:184-187, 2013.

[学会発表] (計 15 件)

(1)Nakagawa T, Sakamoto T, Kikkawa YS, Hiraumi H, Yamamoto N, Tabata Y, Teramukai S, Inui K, Ito J. Topical application of

IGF1 for the treatment of inner ear disorders. The 26th Barany Society Meeting. August 16-17, 2010, Reykjavik, Iceland

(2)中川隆之 鼓室内注入療法で感音難聴は治るか? 内耳 DDS を用いた IGF1 投与による突発性難聴治療第 20 回日本耳科学会総会・学術講演会平成 22 年 10 月 7 日-9 日松山

(3)Taura A, Nakagawa T, Ryan A, Ito J. Espin gene transduction into damaged inner ear sensory epithelia. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders Nov 14-17, 2010 Kyoto, Japan

(4)Nishimura K, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Comprehensive analysis of gene expression patterns in mouse cochlear lateral walls. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders Nov 14-17, 2010 Kyoto, Japan

(5)Yamamoto N, Yoshida A, Nakagawa T, Ito J. Expression Pattern of Olig Gene Family in the Developing Inner Ears. 47th Inner Ear Biology Workshop Aug 29-Sep 1, 2010 Prague, Czech Republic

(6)山本典生, 吉田充裕, 中川隆之, 伊藤壽一 マウス蝸牛における Sept4 タンパク質発現および機能の解析 第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会平成 22 年 5 月 18 日-22 日仙台

(7)中川隆之 内耳再生医療開発の現況と課題 第 62 回東北臨床超微形態懇話会 2011/12/8 仙台

(8)Nakagawa T. Defining clinical needs for regenerative medicine in hearing. Leopoldina Symposium 'Regenerative Medicine' July 25., 2011 Tübingen, Germany

(9)戎富美, 中川隆之, 坂本達則, 伊藤壽一 マウス機能的有毛細胞への分化誘導の高効率化 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会 平成 23 年 11 月 24 日~26 日 宜野湾

(10)西村幸司, 中川隆之, 浜口清海, 伊藤壽一. ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞によるラセン神経節細胞再生 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会 平成 23 年 11 月 24 日~26 日 宜野湾

(11)Lou X, Nakagawa T, Nishimura K, Ito J.

Retention of stem cell phenotypes in long-term culture neonatal mouse otospheres. 48th Inner Ear Biology Workshop. Sep 18-21, 2011 Lisboa, Portugal

(12) 西村幸司, 山本典生, 中川隆之, 伊藤壽一 蝸牛外側壁発現遺伝子の網羅的解析 第112回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 平成23年5月19~21日 京都

(13) Lou X, Nakagawa T, Nishimura K, Ito J. Reprogramming of mouse cochlear cells by retroviral transduction of ips factors. 35th annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Feb 25-29, 2012, San Diego, CA, USA

(14) Nishimura K, Nakagawa T, Hamaguchi K, Ito J. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors for regeneration of spiral ganglion neurons. 35th annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Feb 25-29, 2012, San Diego, CA, USA

(15) 中川隆之 内耳再生医療開発と未来の難聴治療 第68回山形県耳鼻咽喉科疾患研究会 山形 2013年3月24日

[図書] (計4件)

(1) 中川隆之 蝸牛への薬物直接投与方法 pp353-356 よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて 小川 郁編 永井書店 東京 2010.5.15.

(2) Nakagawa T. Inner ear drug delivery. pp233-243 Current Opinion on Sensorineural Hearing Loss. Koonja Publishing, Seoul, Korea, 2010.

(3) Nishimura K, Nakagawa T, Ito J. Potential of pluripotent stem cells for the replacement of inner ears in Embryonic Stem Cells - Recent Advances in Pluripotent Stem Cell-Based Regenerative Medicine. InTech, p203-210, 2011.

(4) 中川隆之 内耳の幹細胞再生医療叢書 第4巻 上皮、感覚器 西田幸二、高橋雅代編集 pp125-133, 朝倉書店、東京 2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 隆之 (Nakagawa Takayuki)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：50335270

### (2) 研究分担者

北尻 真一郎 (Kitajiri Shin-ichiro)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00532970

坂本 達則 (Sakamoto Tatsunori)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60425626

山本 典生 (Yamamoto Norio)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70378644