

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670741

研究課題名(和文)ミトコンドリア1555変異と薬剤性難聴の新展開：iPSとMITO-Porter

研究課題名(英文)New approach for the mechanism of ototoxic drugs against the mtDNA1555AG mutation - human iPSC and nanocarrier-

研究代表者

北尻 真一郎 (Kitajiri, Shinichiro)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：00532970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アミノグリコシド抗生剤(AG)による難聴発症のメカニズム解明を目的とし、AG高感受性ミトコンドリア1555変異疾患iPS細胞を用いた薬物障害実験系の確立をほぼ完了した。これはモデルマウス作製が不可能である以上、唯一の機能解析系といえる。有毛細胞と異なり、一般の細胞ではAGの取り込み機構がないため薬剤障害が起きない。そこでAGをiPS細胞内への移行すべくナノキャリアを検討した。まずHeLa細胞にAG搭載ナノキャリアを添加すると、濃度依存的に細胞死を起こすことが明らかとなった。また、疾患iPS細胞のキャラクタライズを行い、hiPS細胞に最適なナノキャリア組成の決定を行った。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of ototoxicity with aminoglycoside antibiotic (AG), we have established the experiment systems of ototoxicity for MtDNA1555AG iPSC. In the recent technology, it is impossible to make transgenic mouse for this mitochondrial SNP mutation. Compared with hair cells, most cells don't have any transport systems for taking AG into the cells. We therefore use nanocarrier encapsulated AG. When we use this nanocarrier for HeLa cell line, only mitochondria specific carrier showed cell death dose-dependently. We established patient driven iPSC cell lines and characterized them. We further optimized the composition of nanocarrier for iPSC, and Ag encapsulated nanocarrier are now preparing.

研究分野：耳科学

キーワード：ミトコンドリア アミノグリコシド系抗生剤 ヒトiPS細胞 ナノキャリア

11. 研究開始当初の背景

宇佐見ら(信州大)によると、日本人では感音難聴患者の約3%、そしてAGの投与歴がある難聴患者の10-30%にこの遺伝子変異が見出されている¹⁾。AGは世界的にみて最も高頻度に用いられている抗生剤であるが、これを投与する場合に患者が受けるのは家族歴による薬剤性難聴の事前確認と投与期間中の血中濃度モニタリング・聴覚検査による管理のみであり、しかもmtDNA変異では血中AG濃度が低くても難聴を発症する。AGによる内耳有毛細胞の障害機序については、リソソーム内への蓄積・酵素漏出による細胞自己消化や、ミトコンドリアでの活性酸素増加によるアポトーシスなど様々が報告されているものの、抗酸化剤による内耳保護効果が報告されるのみで、いまだAGの臨床使用に応用可能な内耳保護薬は報告されていない。

また一般にミトコンドリア疾患の研究では、mtDNA欠損Rho-0細胞株にmtDNA変異患者の細胞質を融合作製した細胞質雑種(Cybrid)株が用いられ、これまでmtDNA1555変異患者においてもCybrid株による検討がなされた。その結果、rRNA変異によるAGとの親和性の増大ならびに翻訳活性の有意な低下が報告されているが、実際にはミトコンドリア構成タンパクは、mtDNAだけでなく核ゲノムでもコードされているため、得られた結果が本来の疾患発現とは単純に結びつかず、詳細な障害機序はいまだ不明である。最近、林ら(筑波大)により世界初のmtDNA変異マウス(mito-mouse)が登場したが、大規模欠失の変異モデルに限られており、mtDNAの多様な病態と関連する一塩基変異モデルは未だ作られていない²⁾。

このような背景において、現在最も有用な解析材料はmtDNA1555変異患者から樹立されたiPS細胞といえる。このiPS細胞でのAG障害機序は患者由来と健常者由来とでどのように異なるか?そもそも患者由来のiPS細胞の代謝能は正常であるのか?AGが細胞内に取り込まれてから細胞障害を発現するまでに防ぐ対策はあるのか?等、これまで内耳組織で検討できなかった課題が一気に明らかとなり、多くの新知見が得られると考えられる。

1)RegenMed. 2012;7:769.

2)ProcNatlAcadSci USA. 2005;102:16765.

2. 研究の目的

「ミトコンドリア(mt)DNA1555変異と薬剤性難聴」という未解決のテーマに挑む。アミノ配糖体系抗生剤(AG)は世界で繁用されている抗生剤であるが、この変異を有するとAGの副作用として難聴を高頻度に発症する。そもそもAGによる細胞毒性の機序には不明な点が多く、臨床において内耳毒性

の有効な軽減策は存在しない。我々は、mtDNA1555変異患者由来細胞(疾患iPS細胞)と標的指向デバイスMITO-Porterを用い、mtDNA1555変異による有毛細胞障害の発生機序を詳細に解析する。変異を有しない患者においても、高用量AGの長期投与により難聴を発症するとされている。本研究は、AGによる内耳障害を回避しうる薬剤(遺伝子)の探索が可能となることから、薬剤性難聴の克服を目指す。

3. 研究の方法

本研究は3年間で遂行した。当初の予定では、AG送達デバイス(ラベル体AG含む)を作成し、ヒトiPS細胞(mtDNA1555変異患者由来細胞と健常者由来細胞)に添加して細胞障害を起こし、サンプルの網羅的遺伝子発現解析により、内耳保護薬の候補となる阻害剤のスクリーニングをすることになっていた。しかしながら様々な問題が生じ、以下の検討内容となった。本研究は遅れているものの、本研究目的に向けて確実に進展している。

(1) 従来型ナノキャリアの細胞内取り込み実験

野生型ヒトiPS細胞へのナノキャリアの取り込みを調べるために、NBDにてラベルした蛍光ナノキャリアを調製し、培養液に添加して取り込みを調べた。細胞種によって、ナノキャリアの取り込み効率が異なることから、ナノキャリアの組成は、北大にて繁用されているHeLa細胞に最適な比率とし、HeLa細胞との比較を行った。また、マウス内耳蝸牛器官培養においても細胞内取り込み実験を行った。

具体的には、細胞継代の翌日にナノキャリアを培地(serum free)に一定量添加し、1時間インキュベートした後、ヘパリン含有cold PBS(-)でwashして顕微鏡観察した。

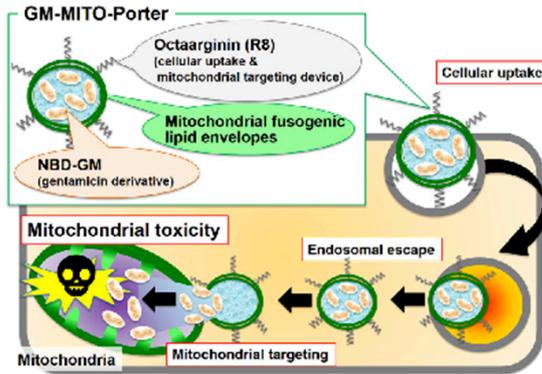
さらに、ミトコンドリア標的指向デバイスMITO-Porterも作成した。

(2) ヒトiPS細胞に最適なナノキャリアの調製および細胞内取り込み実験

(1)で調製したナノキャリアのiPS細胞への取り込みが低かったため、取り込み効率をあげるために、様々な組成のナノキャリアを調製し、その細胞内取り込みをFACS Ariaにて解析した。3種類のwild-typeヒトiPS細胞(B2、B7、G4)と1種類の疾患iPS細胞を用いた。ナノキャリア添加は(1)と同様に行い、その後トリプシン処理で細胞を単離してからFBS含有PBSで反応を停止した。再度washとDAPI染色後のwashを経てcell strainerを通したサンプルをFACSにかけた。DAPI染色による死細胞除去の後、生細胞中

の NBD 蛍光陽性細胞の比率を算出した。

(3) HeLa 細胞での AG ナノキャリアの検討



[図 1]

AG 含有蛍光ナノキャリアを調製し、HeLa 細胞での細胞毒性実験を行った (図 1)。AG としてゲンタマイシン硫酸塩を用い、細胞内移行の異なる 3 種類の組成からなる NBD ラベルナノキャリア (GM-MITO-Porter, GM-R8-EPC-LP, GM-DOPE-LP) を調製した。前者 2 つは細胞内取り込みが高く、うち MITO-Porter はミトコンドリア標的指向型である。後者は細胞内取り込みの低い組成のものである。

(4) ヒト iPS 細胞への AG の細胞内導入のための TRPA1 チャネル発現系の検討

(1) (2) にて、ヒト iPS 細胞に最適なナノキャリアの調製検討の必要があり、時間がかかることが想定されたため、内耳有毛細胞において AG の取り込みに関わると報告されているヒト TRPA1 チャネルのプラスミドを京都大学・工学部・森泰生教授から分与頂き、ヒト iPS 細胞への遺伝子導入発現を試みた。

分与されたプラスミドでは、ヒト iPS 細胞での発現効率が低く、蛍光タグがなかったため、プロモーターが CAG で mCherry タグのある別のプラスミドにサブクローニングした。この TRPA1 チャネルは温度等の刺激により物質輸送機能を示すことから、様々な条件での細胞状態を観察した。

(5) 疾患 iPS 細胞のキャラクターゼーション

ヘテロプラスミーのミトコンドリア遺伝子変異を有する疾患 iPS 細胞の場合、一般的に、細胞継代に伴い、その割合が変化するとされている。本研究において用いている疾患 iPS 細胞の由来患者 (MtDNA1555 変異) はホモプラスミーであったが、同様なヘテロ

プラスミー割合の変化が起こらないか調べた。外部委託によるインバーダー法 (BML) により行った。

4. 研究成果

(1) 従来型ナノキャリアの細胞内取り込み実験

HeLa 細胞へのナノキャリアの取り込み比率は、既報と同様、ほぼ 100% であった。一方、ヒト iPS 細胞への取り込みは 20% 程度で、しかもミトコンドリアへの移行率はごく僅かであった (表 1)。また、マウス内耳組織で NBD-MITO-Porter が有毛細胞のミトコンドリアへ局在するかについて、器官培養実験を行った結果、NBD-MITO-Porter は有毛細胞のミトコンドリアへ移行していた。

[表 1]

	HeLa細胞		hiPSCs	
	細胞内	Mt内	細胞内	Mt内
① MITO-Porter(SM)-NBD[DOPE/SM/R8 (9:2:1)] (従来型)	70%	わずか	20%	わずか
② 2xR8-MITO-Porter(SM)-NBD[DOPE/SM/R8 (9:2:2)]	100%	まだ	100%*	まだ
③ DOPE/SM-NBD	100%	わずか	20%	まだ
④ R8-EPC/SM-NBD	0%, 細胞膜のみ	まだ	0%, 細胞膜のみ	わずか

HeLa 細胞や内毛細胞と異なり、iPS 細胞への MITO-Porter の取り込みが少なかったことから、細胞種によりナノキャリアの組成の変更が必要と考えられた。

(2) ヒト iPS 細胞に最適なナノキャリアの調製および細胞内取り込み実験

(1) で調製した従来型ナノキャリアは iPS 細胞への取り込みが極端に低かったことから、本研究を進める上で、組成の異なるナノキャリアの調製が必須と考えられた。10 種類の組成の異なるナノキャリアを比較検討した。すなわち、脂質膜成分:DC-Chol/EPC/SM (3:4:3)、DOTAP/EPC/SM (3:4:3)、DDAB/EPC/SM (3:4:3)、DOTMA/EPC/SM (3:4:3)、DC-Chol/EPC/CHEMS (3:4:3)、DC-Chol/EPC/PS (3:4:3)、DC-Chol/EPC/Chol (3:4:3)、DC-Chol/EPC/PI (3:4:3)、DC-Chol/EPC/CL (3:4:3)、DC-Chol/EPC/PA (3:4:3) である。3 種類の wild-type ヒト iPS 細胞 (B2、B7、G4) でも 1 種類の疾患 iPS 細胞でも同様に以下の結果が得られた。

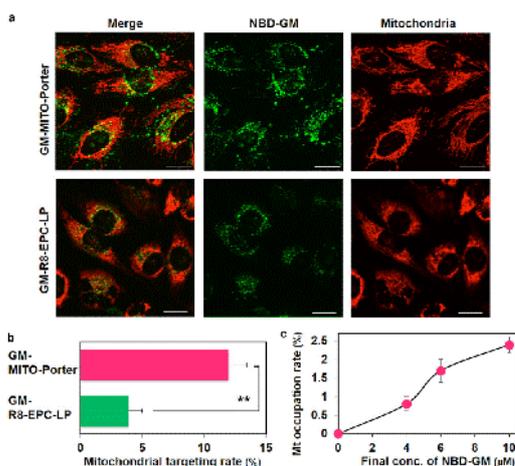
外膜を構成するアルギニン 8 分子を 2 倍量にしたところ、高いカチオン密度により細胞内取り込みが増加し、ミトコンドリアへの移行も 36% に増加した。そこでさらに組成変更を行った結果、ほぼ 100% に近い取り込み効率を示す組成が見つかった。すなわちナノキャリアの材料として、「DC-Chol/EPC/SM(3:4:3) または DC-Chol/EPC/CL(3:4:3)」が適切であること

が判明した*。

* : DC-Chol(DC-cholesterol), EPC(egg phosphatidylcholine), SM(Sphingomyelin), CL(Cardiolipin)

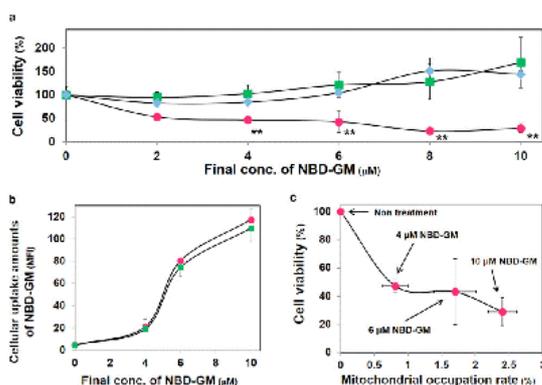
(3) HeLa 細胞での AG ナノキャリアの検討

従来型ナノキャリアでの実績を有する HeLa 細胞を用いて、ゲンタマイシン搭載 MITO-Porter での細胞障害実験を行った。その結果、MITO-Porter において、ミトコンドリアへの高い移行性が確認された (図 2)。



【図 2】

また、MITO-Porter の場合にのみ細胞死が確認され、しかもゲンタマイシンの濃度依存性も認められた (図 3)。



【図 3】

(4) ヒト iPS 細胞への AG の細胞内導入のための TRPA1 チャネル発現系の検討

CAG プロモーターを用いることで、TRPA1 チャネルをヒト iPS 細胞に効率よく発現できたが、ゲンタマイシンの取り込み上昇にはつながらなかった。一般に TRPA1 チャネルが輸送体として機能するには、細胞負荷が必要であるため、「低温および薬剤負荷による酸化ストレス」条件下で検討した。結

果、その細胞負荷による細胞死が顕著で、ゲンタマイシン傷害を評価することができなかった。

(5) 疾患 iPS 細胞のキャラクタリゼーション

疾患 hiPS 細胞について、継代に関わるヘテロプラスミーの比率変化が報告されていることから、継代 5 世代までの変異率をインベーター法で検討した。結果、今回用いている疾患 iPS 細胞は 100% がホモプラスミーであることが確認された。

聴覚障害は、主に内耳有毛細胞の障害によりおこるとされているが、その障害発症メカニズムは未だにわかっておらず、そのため臨床可能な予防薬ならびに治療薬もない。本研究は、アミノグリコシド系抗生剤に対する感受性が非常に高い患者から樹立した疾患 iPS 細胞を用いて、その薬剤障害の機序の解明を目指したものである。ヒト iPS 細胞に適したナノキャリアの選定に手間取り、道半ばではあるが、増殖旺盛なガン細胞の HeLa 細胞において、MITO-Porter によるミトコンドリア選択的なゲンタマイシン送達においてのみ、殺傷効果が得られたのは、大きな成果と考えられる。

引き続き我々は、ヒト iPS 細胞に最適なナノキャリアを用いてゲンタマイシンを送達し、内耳有毛細胞では行えなかった包括的なメタボローム解析を行うことにより、聴覚障害への予防薬・治療薬の開発に向けた挑戦的な研究を行いたい。

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 32 件)

1: Ueyama T, Ninoyu Y, Nishio SY, Miyoshi T, Torii H, Nishimura K, Sugahara K, Sakata H, Thumkeo D, Sakaguchi H, Watanabe N, Usami SI, Saito N, Kitajiri SI. Constitutive activation of DIA1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. *EMBO Mol Med.* 2016;8:1310-1324. doi:10.15252/emmm.201606609.

2: Kitajiri S, Katsuno T. Tricellular Tight Junctions in the Inner Ear. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6137541. doi: 10.1155/2016/6137541.

3: Taniguchi M, Matsuo H, Shimizu S, Nakayama A, Suzuki K, Hamajima N, Shinomiya N, Nishio S, Kosugi S, Usami S, Ito J, Kitajiri S. Carrier frequency of the GJB2 mutations that cause hereditary hearing loss in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2015;60:613-7. doi: 10.1038/jhg.2015.82.

4: Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S,

- Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Nakagawa T. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci Lett*. 2015;599:49-54. doi:10.1016/j.neulet.2015.05.032.
- 5: Higashi T, Katsuno T, Kitajiri S, Furuse M. Deficiency of angulin-2/ILDR1, a tricellular tight junction-associated membrane protein, causes deafness with cochlear hair cell degeneration in mice. *PLoS One*. 2015;10:e0120674. doi:10.1371/journal.pone.0120674.
- 6: Miyagawa M, Nishio SY, Ichinose A, Iwasaki S, Murata T, Kitajiri S, Usami S. Mutational spectrum and clinical features of patients with ACTG1 mutations identified by massively parallel DNA sequencing. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:84S-93S. doi:10.1177/0003489415575057.
- 7: Tsukada K, Ichinose A, Miyagawa M, Mori K, Hattori M, Nishio SY, Naito Y, Kitajiri S, Usami S. Detailed hearing and vestibular profiles in the patients with COCH mutations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:100S-10S. doi:10.1177/0003489415573074.
- 8: Kim NK, Higashi T, Lee KY, Kim AR, Kitajiri S, Kim MY, Chang MY, Kim V, Oh SH, Kim D, Furuse M, Park WY, Choi BY. Downsloping high-frequency hearing loss due to inner ear tricellular tight junction disruption by a novel ILDR1 mutation in the Ig-like domain. *PLoS One*. 2015;10:e0116931. doi:10.1371/journal.pone.0116931.
- 9: Bao J, Wang S, Gunther LK, Kitajiri S, Li C, Sakamoto T. The actin-bundling protein TRIOBP-4 and -5 promotes the motility of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*. 2015;356:367-73. doi:10.1016/j.canlet.2014.08.005.
- 10: Kitajiri S, Katsuno T, Sasaki H, Ito J, Furuse M, Tsukita S. Deafness in occludin-deficient mice with dislocation of tricellulin and progressive apoptosis of the hair cells. *Biol Open*. 2014;3:759-66. doi:10.1242/bio.20147799.
- 11: Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Innovative Technologies in Nanomedicines: From Passive Targeting to Active Targeting/From Controlled Pharmacokinetics to Controlled Intracellular Pharmacokinetics. *Macromol Biosci*. 2017;17. doi:10.1002/mabi.201600179.
- 12: Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H. Development of a multifunctional envelope-type nano device and its application to nanomedicine. *J Control Release*. 2016;244:194-204. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.042.
- 13: Yamada Y, Furukawa R, Harashima H. A Dual-Ligand Liposomal System Composed of a Cell-Penetrating Peptide and a Mitochondrial RNA Aptamer Synergistically Facilitates Cellular Uptake and Mitochondrial Targeting. *J Pharm Sci*. 2016;105:1705-13. doi:10.1016/j.xphs.2016.03.002.
- 14: Abe J, Yamada Y, Harashima H. Validation of a Strategy for Cancer Therapy: Delivering Aminoglycoside Drugs to Mitochondria in HeLa Cells. *J Pharm Sci*. 2016 ;105:734-40. doi:10.1002/jps.24686.
- 15: Yamada Y, Fukuda Y, Harashima H. An analysis of membrane fusion between mitochondrial double membranes and MITO-Porter, mitochondrial fusogenic vesicles. *Mitochondrion*. 2015;24:50-5. doi:10.1016/j.mito.2015.07.003.
- 16: Yamada Y, Nakamura K, Abe J, Hyodo M, Haga S, Ozaki M, Harashima H. Mitochondrial delivery of Coenzyme Q10 via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver. *J Control Release*. 2015;213:86-95. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.037.
- 17: Furukawa R, Yamada Y, Kawamura E, Harashima H. Mitochondrial delivery of antisense RNA by MITO-Porter results in mitochondrial RNA knockdown, and has a functional impact on mitochondria. *Biomaterials*. 2015;57:107-15. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.022.
- 18: Yamada Y, Harashima H. Targeting the mitochondrial genome via a dual function MITO-Porter: evaluation of mtDNA levels and mitochondrial function. *Methods Mol Biol*. 2015;1265:123-33. doi:10.1007/978-1-4939-2288-8_10.
- 19: Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Multifunctional enveloped nanodevices (MENDs). *Adv Genet*. 2014;88:139-204. doi:10.1016/B978-0-12-800148-6.00006-7.
- 20: Yamada Y, Tabata M, Yasuzaki Y, Nomura M, Shibata A, Ibayashi Y, Taniguchi Y, Sasaki S, Harashima H. A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to a pancreatic beta cell line. *Biomaterials*. 2014;35:6430-8. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.017.
- 21: Kajimoto K, Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device for controlled intracellular trafficking and selective targeting in vivo. *J Control Release*. 2014;190:593-606. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.058.
- 22: Yamada Y, Harashima H. A method for screening mitochondrial fusogenic envelopes for use in mitochondrial drug delivery. *Methods Mol Biol*. 2014;1141:57-66. doi:10.1007/978-1-4939-0363-4_2.
- 23: Ohta R, Niwa A, Taniguchi Y, Suzuki NM, Toga J, Yagi E, Saiki N, Nishinaka-Arai Y, Okada C, Watanabe A, Nakahata T, Sekiguchi K, Saito MK. Laminin-guided highly efficient endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2016;6:35680. doi:10.1038/srep35680.
- 24: Kawasaki Y, Oda H, Ito J, Niwa A, Tanaka T, Hijikata A, Seki R, Nagahashi A, Osawa M, Asaka I, Watanabe A, Nishimata S, Shirai T, Kawashima H, Ohara O, Nakahata T, Nishikomori R, Heike T, Saito MK. Identification of a High-Frequency

Somatic NLRC4 Mutation as a Cause of Autoinflammation by Pluripotent Cell-Based Phenotype Dissection. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69:447-459. doi:10.1002/art.39960.

25: Sugimine Y, Niwa A, Matsubara H, Kobayashi K, Tabata Y, Heike T, Nakahata T, Saito MK. A portable platform for stepwise hematopoiesis from human pluripotent stem cells within PET-reinforced collagen sponges. *Int J Hematol.* 2016;104:647-660. DOI: 10.1007/s12185-016-2088-x

26: Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Morimoto M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Mislocalization of syntaxin-1 and impaired neurite growth observed in a human iPSC model for STXBPI-related epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2016;57:e81-6. doi: 10.1111/epi.13338.

27: Maeda H, Chiyonobu T, Yoshida M, Yamashita S, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Yamakawa K, Morimoto M, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Establishment of isogenic iPSCs from an individual with SCN1A mutation mosaicism as a model for investigating neurocognitive impairment in Dravet syndrome. *J Hum Genet.* 2016;61:565-9. doi: 10.1038/jhg.2016.5.

28: Yoshida M, Kitaoka S, Egawa N, Yamane M, Ikeda R, Tsukita K, Amano N, Watanabe A, Morimoto M, Takahashi J, Hosoi H, Nakahata T, Inoue H, Saito MK. Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015;4:561-8. doi:10.1016/j.stemcr.2015.02.010.

29: Suzuki NM, Niwa A, Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe K, Heike T, Takata M, Nakahata T, Saito MK. Pluripotent cell models of fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4:333-8. doi:10.5966/sctm.2013-0172.

30: Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. *PLoS One.* 2014;9:e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291.

31: Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of induced pluripotent stem cells from patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase 1-independent cAMP/protein kinase A/CREB pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:302-14. doi: 10.1002/art.38912.

32: Ono K, Kita T, Sato S, O'Neill P, Mak SS, Paschaki M, Ito M, Gotoh N, Kawakami K, Sasai Y, Ladher RK. FGFR1-Frs2/3 signalling maintains sensory progenitors during inner ear hair cell formation. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004118. doi: 10.1371/journal.pgen.1004118.

[学会発表] (計 14 件)

Kitajiri S. Human Hereditary Deafness: an insight into pathophysiology. 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Symposium "Genetics in Otolaryngology"; Mar 28-30, 2016; Tokyo

[図書] (計 1 件)

1: Yamada Y, Harashima H. MITO-Porter for Mitochondrial Delivery and Mitochondrial Functional Analysis. Springer. *Handb Exp Pharmacol.* 2016. p1-16.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○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
北尻 真一郎 (KITAJIRI, Shinichiro)
京都大学・医学研究科・特定研究員
研究者番号 : 00532970

(2) 研究分担者
山田 勇麿 (YAMADA Yuma)
北海道大学・薬学研究科・准教授
研究者番号 : 60451431

(3) 研究分担者
斉藤 潤 (SAITO Megumu)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 90535486

(4) 連携研究者
喜多 知子 (KITA Tomoko)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号 : 20362519

(5) 研究協力者
伊木 健浩 (IKI Takehiro)
水越 彬文 (MIZUKOSHI Akifumi)