

令和 2 年 4 月 1 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860176

氏名

又保田万理恵

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： スタンフォード大学 （国名： 米国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

一細胞解析を用いたコルチ器支持細胞の増殖メカニズムの解明

3. 派遣期間： 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Stanford University School of Medicine Otolaryngology- Head&Neck Surgery Divisions

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 研究背景

聴覚をつかさどる感覚器官である内耳のコルチ器は、内・外有毛細胞とそれを取り囲む複数の支持細胞 (Inner border cells, inner phalangeal cell, inner pillar cell, outer pillar cell, Deiters' cell, Hensen cell), greater epithelial ridge (GER)を持つ。内・外有毛細胞は薬剤や音響外傷、感染、加齢など種々の要因で損傷を受けるが、成体哺乳類では一旦受けた損傷は修復しない。このような有毛細胞の損傷が難聴を引き起こす一般的なメカニズムの一つとして知られている。従って、損傷を受けた有毛細胞を再生させることができれば難聴の究極的な解決策となりうる。一方で、生後間もない時期では、有毛細胞を取り囲む支持細胞が極めて低効率ながらも増殖能を持ち、有毛細胞へと分化しうることが知られている。

## 研究目的

本研究は、増殖・分化能のある生後間もない時期のコルチ器支持細胞に着目し、静止状態にあるこれらの細胞が増殖・有毛細胞への分化を開始する分子機構を明らかにすることを課題とした。有毛細胞を効率的に誘導するための鍵となる生体内の反応を明らかにすることによって、将来的な難聴治療法の確立のための基盤となる知見を得る意義をもつ。

## 研究遂行状況・成果

### 課題1. コルチ器細胞を元にしたオルガノイドの培養条件最適化

細胞増殖の評価：まず、生後2日のマウスからコルチ器を取り出したのち個々の細胞に分離した。コルチ器の細胞からオルガノイドを作成する手法は過去の複数の文献で提案されてきたが、培養条件や効率は様々であることから、まず本研究に最適な培養条件を探索することとした。過去の文献をもとに細胞増殖を促進すると予想される薬剤を選択し、培養液中に約15種類の組み合わせで添加した。それぞれの条件下で7日間の浮遊培養を行ったのち、オルガノイドの数、大きさを定量することによって細胞増殖効率を比較した。その結果、薬剤セット1もしくはセット2の存在下で効率的にオルガノイドが作成できることを確認した(図1)。

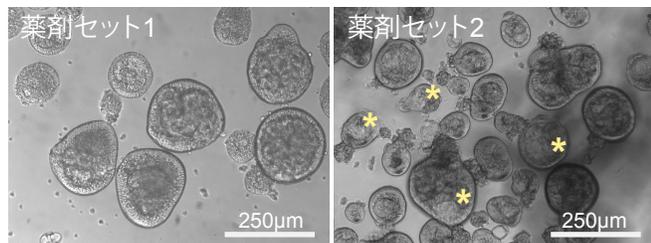


図1. 支持細胞から作成したオルガノイド

ほとんどのオルガノイドの内部は細胞で充填されている(Solid type)が、薬剤セット2の存在下では一部のオルガノイドで内部に空洞形成がみられる(\* Transitional type)。

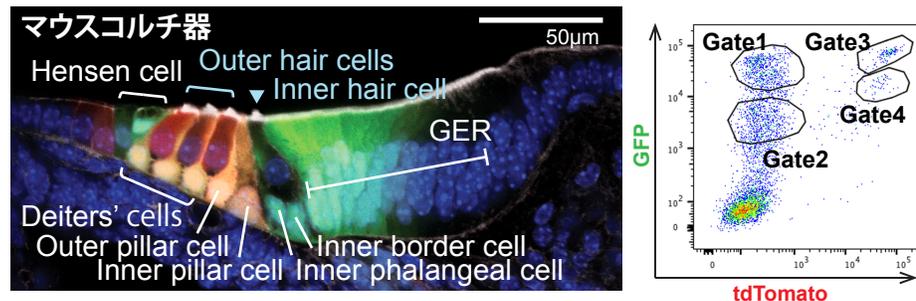
有毛細胞への分化の評価：いずれの培養条件でも形態の異なる3種類のオルガノイド(内部が細胞で充填された Solid type、内部が空洞化した Hollow type、その中間の Transitional type)が観察された。3種の形態のオルガノイドをそれぞれ個別に取り出し、14日間接着培養を行った。オルガノイドはディッシュの底面に沿ってさらに増殖

しコロニーを形成した。有毛細胞への分化を評価したところ、**Solid type** のオルガノイドから生じたコロニーでのみ、有毛細胞マーカーを発現する細胞が観察され、効率的な分化が起こっていることが示された。従って、**Solid type** のオルガノイドをより効率的に作成できる培養条件が本研究に最適な方法と考えられた。

**結論：** **Solid type** のオルガノイドの出現効率を薬剤セット 1、2 各条件下で定量し比較したところ前者で優位に高かったため、本研究の浮遊培養、接着培養実験では、薬剤セット 1 を加えた培地を常に用いることとした (図 1)。

## 課題 2. コルチ器支持細胞型間の増殖能の比較

蛍光蛋白レポーター (EGFP, tdTomato) の発現強度を指標に、フローサイトメトリー (FACS) を用いて支持細胞を細胞型別にソートした。まず、異なるプロモーター、蛍光蛋白レポーターを持つトランスジェニックマウス同士を掛け合わせ、ソートに最適なマウスを作成した (図 2



**図 2. 支持細胞のソート**

(左) 実験に用いたトランスジェニックマウスのコルチ器切片の一つ。蛍光レポーター遺伝子 (GFP, tdTomato) が発現している。

(右) フローサイトメトリーによる支持細胞のソート。このトランスジェニックマウスでは、設定した Gate 1-4 に含まれる細胞型は以下のように推測された。

**Gate 1:** GER; **Gate 2:** GER, inner border cell, inner phalangeal cell, Hensen cell; **Gate 3:** Deiters' cell, outer pillar cell; **Gate 4:** Inner pillar cell.

左)。次に、生後 2 日の時点でコルチ器を取り出し組織を一細胞レベルに砕いたのち、ソートを行った (図 2 右)。

各 Gate からソートした細胞をそれぞれ課題 1 で設定した条件下で 7 日間浮遊培養した。形成されたオルガノイドの数と細胞増殖の定量化を行った結果、支持細胞の挙動は細胞型によって以下のように分類された。

細胞型分類 A：この分類に含まれる細胞型は増殖能が低く、数個～数十個の細胞からなる小さなオルガノイドを形成した。

細胞型分類 B：この分類に含まれる細胞型は増殖能が高く、巨大なオルガノイドを形成した。しかし、培養時の細胞密度がある一定の濃度に達した時点でのみ高い増殖能を発揮することから、細胞間の直接接触または間接的なシグナリングが細胞増殖機構に深く関わっていることが示唆された。

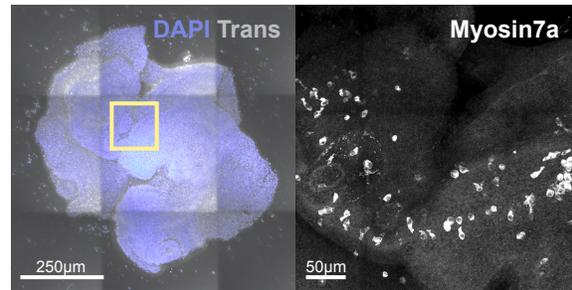
## 課題 3. コルチ器支持細胞型間の有毛細胞への分化能の比較

次に、課題2でソートした各細胞型から作成したオルガノイドを14日間接着培養し、コロニーを作成した。有毛細胞への分化を評価したところ、以下の特徴が明らかになった。

**細胞型分類 A:** この細胞型分類由来のオルガノイドから作成したコロニーはほとんど増殖を示さず数個~数十個の細胞から構成されたが、コロニー中の細胞は高効率に有毛細胞マーカーを発現した。この細胞型は比較的高分化の状態にあるものの分化能は残存しており、有糸分裂を経ない直接分化の分化形式をとることが示唆された。

**細胞型分類 B:** この細胞型分類由来のオルガノイドから作成したコロニーは巨大で、活発な細胞分裂と増殖が起きていることが示された。コロニー中には、有毛細胞マーカーを発現する細胞がクラスターを形成しながら散在した(図3)。さらに、有毛細胞マーカー発現細胞は、元々の支持細胞の特徴とは異なる新たな支持細胞様細胞に囲まれており、コロニー中で内耳感覚上皮様の構造が形成されていることが明らかになった。これらの結果から、この分類に含まれる細胞型は比較的分化未分化な状態にあるか、未分化な性質を獲得しやすいものと考えられた。

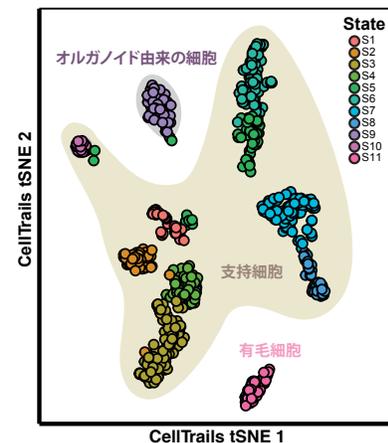
**課題2、3の結論:** 比較的高分化な性質をもち増殖能は低い但有毛細胞へと直接分化しうる支持細胞型、活発な増殖ののちに感覚上皮の形成を伴いながら有毛細胞へと分化する能力を持つ支持細胞型を同定した。



**図3. ソート後の支持細胞由来のコロニー**  
 (左) 細胞型分類 B 由来のオルガノイドから作成したコロニー。  
 (右) (左)の枠内の拡大図。有毛細胞マーカー(Myosin7a)を発現する細胞が観察された。

#### 課題4. 有毛細胞再生を誘導する生体内反応の探索

上記の分類 A、B それぞれの支持細胞型に対して、支持細胞が増殖を開始し分化へと向かう過程での遺伝子発現の変化を捉えることを課題とした。まず、分類 A に含まれる細胞型について検討を行った。課題2の方法で支持細胞のソートとオルガノイド作成を行い、オルガノイドから細胞を分離して一細胞 RNA シークエンスを行った。同時に、生後2日のマウスコルチ器から支持細胞を分離しソートしたのち、培養を経ずにシークエンスを行った。得られた遺伝子発現データを細胞序列化アルゴリズム(CellTrails)を用いて解析したところ、オルガノイド由来の細胞群(増殖中の細胞)は直接コルチ器から採取した細胞群(静止状態の細胞)とは異



**図4. マウスコルチ器細胞の一細胞 RNA シークエンス解析**  
 オルガノイド由来の細胞群は直接コルチ器から採取した支持細胞・有毛細胞とは異なる集団として識別された。

なる集団として識別された（図 4）。そこで、培養を経ない細胞集団に比べて、オルガノイド由来の細胞集団で有意に発現増加がみられた遺伝子群を抽出し、解析した。その結果、分類 A の支持細胞型が増殖・分化を開始する過程においていくつかの生体内反応が密接に関わっている可能性が示唆された。現在、これらの生体内反応に着目してさらに研究を行うとともに、分類 B に含まれる支持細胞型についても同様の実験操作を行っているところである。

ところで、コルチ器を構成する各細胞型の相互の遺伝的関連性を調べるために、直接コルチ器から採取しシークエンスした細胞群を同アルゴリズムの時空間軌跡構築機能を用いて二次元的に配列した。その結果、有毛細胞と支持細胞の中間に整列し、分化の途上であることを示す遺伝子群を高発現する細胞集団が存在することを見出した。この細胞集団は有毛細胞への分化過程にある細胞と考えられ、生後 2 日のコルチ器細胞では増殖能・分化能が低効率ながらも残存していることと矛盾しない所見であると考えられた。現在、この細胞集団にも着目し、増殖・分化に関わる生体内反応を探索している。

### まとめと今後の方針

本研究では、内耳コルチ器を構成する支持細胞の増殖能と有毛細胞への分化能を細胞型別に評価した。さらに、一細胞 RNA シークエンスを用いて支持細胞の増殖・分化の際に起こる遺伝子発現変化をスクリーニングした。今後、シークエンス結果から捉えた反応に着目し、実際のマウスコルチ器組織・細胞を用いてその生体内での役割について検証を行う。

### 学会発表

Marie Kubota; Mirko Scheibinger; Stefan Heller “Comparison of the Proliferative Capacity of Neonatal Supporting Cell Subtypes” 43th Annual Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, San Jose, USA, Jan 2020.

Marie Kubota; Byron Hartman; Stefan Heller “Distinctive Proliferative Features of Neonatal Mouse Organ of Corti Supporting Cells” 42th Annual Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, USA, Feb 2019.

Marie Kubota; Byron Hartman; Stefan Heller “The Regenerative Ability of Neonatal Mouse Organ of Corti” The 3rd Japan-US Science Forum in Boston, Boston (JSPS), USA, Nov 2018.