

## 内耳発生メカニズムの解明と再生医療への応用

Elucidation of inner ear development mechanisms and its application to regenerative medicine

伊藤 壽一 (ITO JUICHI)

京都大学・医学研究科・教授



### 研究の概要

1. 発生過程のさまざまな段階の内耳感覚上皮の網羅的な遺伝子発現解析および内耳奇形を伴う先天性難聴症例の遺伝子解析を行うことにより、内耳感覚上皮の発生過程を解明する。
2. 1で同定した発生過程に必要な遺伝子群を操作することにより、内耳感覚上皮再生手法を確立し、哺乳類の内耳感覚上皮の再生を実現し、感音難聴の新規治療方法を開発する。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学、再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

現在日本で600万人が苦しむ難聴のうち、感音難聴（老人性難聴、突発性難聴、先天性難聴など）の多くは音の受容を司る内耳感覚上皮の傷害で起こる。哺乳類内耳感覚上皮細胞は発生後半に細胞分裂を停止し、生後は再生しないため、年間3万5千人が罹患する突発性難聴や高齢者の半数が苦しむ老人性難聴などの感音難聴の根本的治療法はない。

### 2. 研究の目的

感音難聴の根本的な治療方法として、内耳感覚上皮の発生過程再現による再生が考えられるが、発生過程が詳細にわかっている網膜などと異なり内耳感覚上皮発生の知見はわずかである。本研究では、内耳感覚上皮の発生過程を分子レベルで解明し、これまで困難であった内耳感覚上皮再生を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず2つの戦略を用いて内耳発生過程を分子レベルで明らかにする。1つは、マウスの内耳発生各段階の単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現プロファイル作成である。異なったプロファイルの細胞種間での遺伝子発現を比較し、各細胞種で作動する遺伝子を同定する。また、特定の遺伝子の発現レベルの変動を時間軸に沿って解析することにより、内耳発生に重要な遺伝子を同定する。もう1つは、内耳の発生異常をきたしている内耳奇形を有する先天性高度難聴患者のDNAを採取し未知の原因遺伝子を同定する。

次に同定した遺伝子の発現部位、時期、機

能を確認し、その遺伝子の操作による新たな内耳感覚上皮再生手法を確立する。

### 4. これまでの成果

#### 1) 単一細胞の網羅的遺伝子発現プロファイル解析

生後1日齢のAtoh1-GFPマウス（有毛細胞で緑色蛍光物質GFPを特異的に発現する）の蝸牛を摘出し、緑色蛍光を利用した細胞のソートを行い、GFP陽性細胞（つまり有毛細胞）とGFP陰性細胞（蝸牛内の有毛細胞以外の細胞）を回収した。セルソーターにてGFP陽性細胞と陰性細胞とを単細胞に分離しRNAを調整、cDNAの合成を行った。次に、次世代シーケンサーを用いてサンプルをシーケンスし(RNA-seq)、GFP陽性細胞、GFP陰性細胞、対照の線維芽細胞のそれぞれの発現遺伝子の発現量を検討した。おおむねGFP+、GFP-、線維芽細胞でそれぞれ特徴的な発現プロファイルが得られた。3群間で異なった発現量をしめす遺伝子は315あり、このうち、GFP陽性細胞でGFP陰性細胞より多く発現する遺伝子が、有毛細胞の性質を規定する遺伝子とすることができる。このような、内耳での単一細胞レベルでの内耳感覚上皮の網羅的遺伝子発現プロファイル解析は世界の中でも試みられていない画期的な実験である。

#### 2) 先天性高度感音難聴患者の遺伝子解析

現在人工内耳手術を行った先天性高度感音難聴患者のうち、内耳・内耳道奇形を持つ患者10人とその家族に対して本研究の説明を行い、採血の同意を得てサンプルを入手し

た。一部については次世代シーケンサーを用いて解析を開始している。さらにサンプル数を増やすことにより、難聴の未知の原因遺伝子を探り、内耳の発生過程を明らかにできると考えている。

3) 内耳発生に重要な遺伝子による内耳有毛細胞再生の試み

1)、2)の結果が出る前に、他の臓器で重要といわれている遺伝子が内耳で発現し機能しているかの検討、既報の研究により内耳発生に重要といわれる遺伝子の産物を用いた内耳有毛細胞再生の試み、内耳再生に重要な役割を果たす内耳幹細胞の存在場所の同定、ヒト iPS 細胞からの内耳前駆細胞の誘導の検討などを行った。

A. 細胞運命決定に重要な遺伝子 RBP-J の内耳発生における役割の解明

B. 神経伸長に重要な役割を果たす Septin ファミリーの内耳における発現と役割の解明

C. 内耳発生に重要な成長因子 IGF-1 を用いた内耳有毛細胞再生メカニズムの検討

IGF-1 (インスリン様成長因子 1) は内耳発生期において有毛細胞や支持細胞の増殖と細胞死をコントロールしていることが知られているが、我々は生後マウス内耳器官培養において、薬剤による障害を加えた場合、IGF-1 が有毛細胞の保護を行うこと、そのメカニズムは有毛細胞の細胞死の阻害と支持細胞の増殖を誘導することによること、その下流分子が Netrin1 と Gap43 であることを示した。生後哺乳類内耳支持細胞の増殖を促し、細胞死を阻害する薬剤は今まで報告されておらず、今後の内耳再生医療に大きなインパクトを与えると考えられる。また、IGF-1 を用いた急性感音難聴治療の臨床試験も施行した。

D. 蝸牛幹細胞存在部位の候補の同定

幹細胞の特徴の一つである slow-cycling な細胞を蝸牛内の Tympanic border cell という細胞集団内に同定した。内耳再生を目指す際に、この細胞集団を操作の対象とすれば効率よい再生を行えることが示唆された。

E. ヒト iPS 細胞由来内耳前駆細胞誘導法

ヒト iPS 細胞 (201B7 株) を無血清培地で培養し、さらにこれらの細胞群を一定期間 bFGF で処理した結果 preplacodal 様細胞へ分化し、Pax2 陽性、p63 陰性の内耳前駆細胞様細胞の存在が世界で初めて確認された。

5. 今後の計画

ア. 網羅的遺伝子発現解析の継続

同種細胞を発現プロファイルを元に分類し細胞間の違いを遺伝子発現の観点から検証する。また、発生の各期の蝸牛を用い、遺伝子発現の観点で内耳発生を明らかにする

イ. 先天性高度感音難聴患者の遺伝子検査

患者のサンプルの集積・データ解析を継続。

ウ. 遺伝子の発現パターン、機能の確認

同定された遺伝子の発現部位、時期を免疫組織化学や in situ hybridization で観察。ノックアウトマウスを用いた遺伝子の機能を確定する。

エ. 内耳感覚上皮再生手法の確立

A. 多能性幹細胞に対し発見した誘導法と遺伝子操作を行い感覚上皮へ誘導する。

B. 哺乳類生後蝸牛器官培養に対し IGF-1 投与と遺伝子操作で感覚上皮再生を目指す。

C. 同定した遺伝子を用いた内耳感覚上皮への Direct conversion の有無を検定。

D. 哺乳類成体蝸牛に対し A, B, C で確立した方法を行い感覚上皮再生の有無を確認。ヒトへの臨床応用も目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, and Ito J: Insulin-like growth factor 1 induces the transcription of Gap43 and Ntn1 during hair cell protection in the neonatal murine cochlea. *Neuroscience letters* 560: 7-11, 2014.

2. Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, and Ito J: Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after pharmacological hair cell injury in neonatal mice. *Molecular and cellular neurosciences* 56: 29-38, 2013.

3. Lou XX, Nakagawa T, Ohnishi H, Nishimura K, and Ito J: Otospheres derived from neonatal mouse cochlea retain the progenitor cell phenotype after ex vivo expansions. *Neuroscience letters* 534: 18-23, 2013.

4. Yoshida A, \*Yamamoto N, Kinoshita M, Hiroi N, Hiramoto T, Kang G, Trimble WS, Tanigaki K, Nakagawa T, and Ito J: Localization of septin proteins in the mouse cochlea. *Hearing research* 289: 40-51, 2012.

5. Taniguchi M, \*Yamamoto N, Nakagawa T, Ogino E, and Ito J: Identification of tympanic border cells as slow-cycling cells in the cochlea. *PloS one* 7: e48544, 2012.

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/InnerEarRegeneration/InnerEarRegenerationTop.html>