

Title	ヒトES/iPS細胞由来の内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング系の構築
Sub Title	Drug screening and development using hES/iPSC-derived otic progenitor
Author	小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 水足, 邦雄(Mizutari, Kunio)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
Abstract	<p>内耳は側頭骨の奥深くに位置しその採取は高度難聴を引き起こすため、ヒト内耳細胞を用いた研究は技術的困難からこれまで行われてこなかった。本研究では、hES/iPS細胞からの高効率的内耳細胞様細胞誘導系を用いてヒト内耳細胞(感覚上皮前駆細胞、有毛細胞、支持細胞など)をin vitroで大量調整し、創薬に直結する薬剤スクリーニング系を構築した。その結果、新規有毛細胞分化誘導剤、外らせん溝細胞誘導液性因子、蝸牛感覚上皮の幹細胞性維持因子、有毛細胞の成熟化因子、Pendred症候群蝸牛外らせん溝細胞の細胞死を保護する薬剤の推定最小薬理量算出と薬剤の量反応効果の個人差の定量を行った。</p> <p>Since the inner ear is located deep inside the temporal bone and its biopsy causes severe hearing loss, studies using human inner ear cells have not been performed so far. In this study, we developed drug screening systems using a highly efficient inner otocyst-like cell induction method from hES/iPS cells. From the study, we obtained new hair cell inducers and a humoral factor for the induction of outer sulcus cells, defined a molecular mechanism of the maintenance of stemness in the cochlear progenitors and a mechanism for the maturation of hair cells. Also, we obtained the MABEL of rapamycin on the prevention of apoptosis of the outer sulcus cells of Pendred syndrome/ DFNB4.</p>
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2014～2016 課題番号：26670748 研究分野：感音難聴
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26670748seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670748

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞由来の内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング系の構築

研究課題名(英文) Drug screening and development using hES/iPSC-derived otic progenitor

研究代表者

小川 郁(Ogawa, Kaoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：00169179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：内耳は側頭骨の奥深くに位置しその採取は高度難聴を引き起こすため、ヒト内耳細胞を用いた研究は技術的困難からこれまで行われてこなかった。本研究では、hES/iPS細胞からの高効率的内耳細胞様細胞誘導系を用いてヒト内耳細胞(感覚上皮前駆細胞、有毛細胞、支持細胞など)をin vitroで大量調整し、創薬に直結する薬剤スクリーニング系を構築した。その結果、新規有毛細胞分化誘導剤、外らせん溝細胞誘導液性因子、蝸牛感覚上皮の幹細胞性維持因子、有毛細胞の成熟化因子、Pendred症候群蝸牛外らせん溝細胞の細胞死を保護する薬剤の推定最小薬理量算出と薬剤の量反応効果の個人差の定量を行った。

研究成果の概要(英文)：Since the inner ear is located deep inside the temporal bone and its biopsy causes severe hearing loss, studies using human inner ear cells have not been performed so far. In this study, we developed drug screening systems using a highly efficient inner otocyst-like cell induction method from hES/iPS cells. From the study, we obtained new hair cell inducers and a humoral factor for the induction of outer sulcus cells, defined a molecular mechanism of the maintenance of stemness in the cochlear progenitors and a mechanism for the maturation of hair cells. Also, we obtained the MABEL of rapamycin on the prevention of apoptosis of the outer sulcus cells of Pendred syndrome/DFNB4.

研究分野：感音難聴

キーワード：感音難聴 iPS細胞 創薬研究 薬剤スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

内耳は側頭骨の奥深くに位置しその採取は重度の難聴を引き起こすため、ヒト内耳細胞を用いた研究は技術的困難からこれまで行われてこなかった。そのため試験管内でヒト内耳細胞を調製して用いる系の樹立とその応用には、過去にないさまざまなブレイクスルーをもたらすポテンシャルが期待される。

研究開始当初、ES/iPS細胞からの内耳細胞の誘導は欧米を中心に国内外の複数の研究グループがしのぎを削っていたが(Koehler KR, Nature, 2013; Chen W, Nature, 2012; Oshima K, Cell, 2010 等)、どの手法も誘導効率が非常に低く、マウス ES 細胞からの有毛細胞誘導効率は0.001%未満、ヒト iPS 細胞からの誘導は報告がなかった。また、マウス由来およびヒト由来の多能性幹細胞から誘導した内耳細胞を用いた薬剤スクリーニングの報告は存在しなかった。一方で、当研究チームにおいては、“疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究(文科省)慶應義塾大学拠点”の一環で、当大学岡野研究室との共同研究で内耳領域でのヒト ES/iPS 細胞研究を進めてきた。この研究では疾患由来内リンパ嚢細胞の作成と解析を目的とし、患者由来 iPS 細胞の樹立と、複数のヒト ES/iPS 細胞からの内耳細胞様細胞作成に成功していた。本研究では、これまでに確立したヒト ES/iPS 細胞からの高効率内耳細胞様細胞(組織幹細胞)分化系を用いて研究を開始した。

2. 研究の目的

上記の背景の下、本研究では、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)/人工多能性幹細胞(hiPS細胞)から効率的に誘導した内耳細胞様細胞を用いてヒト内耳細胞(感覚上皮前駆細胞、有毛細胞、支持細胞など)を *in vitro* で大量調整し、創薬に直結する薬剤スクリーニング系の樹立をめざした。

3. 研究の方法

研究初年度(平成27年度)まで、ヒト iPS 細胞および ES 細胞から内耳細胞様細胞誘導系と各種蝸牛細胞(外有毛細胞様細胞、神経節細胞様細胞、外らせん溝細胞様細胞、血管条辺縁細胞様細胞、血管条基底細胞様細胞、1~5型蝸牛外側壁線維細胞様細胞)を効率よく得る系を樹立した(特開2015-231365)。当初の計画ではレポーター遺伝子を用いて有毛細胞特異的分化誘導法を樹立する予定だったが、詳細な検討により遺伝子導入を行わずとも十分に汎用可能な系を得た。

この実験系を用いて、分化誘導を調整する複数の因子と細胞死や細胞内の現象を調整する複数の既存の化合物を用いて検討を行っ

た。

4. 研究成果

初年度(平成27年度)の研究により強力な有毛細胞分化誘導剤として4種類の小分子化合物と、極めて強力な神経節細胞分化誘導剤として1種類の小分子化合物とを同定した。蝸牛感覚上皮の幹細胞性維持に必須の因子を同定した。また外らせん溝細胞分化誘導効率を著しく上昇させる液性因子を同定した。

この結果を元にさらに研究を進め、(1)細胞分化に影響を与える因子や薬剤の同定と、(2)各終分化細胞における機能アッセイおよび細胞死カウントを用いた薬剤スクリーニングを行った。その結果以下の成果を得た。

(1)-1 初年度の研究で得た4種類の有毛細胞分化誘導剤の効果比較をした。

(1)-2 ヒト蝸牛感覚上皮の幹細胞性維持と有毛細胞の成熟化の両方に WNT 関連シグナルの一部が必須であることを示した。

(1)-3 外らせん溝細胞分化誘導に必須の液性因子につき定量的データを得た。

(1)-4 誘導された内耳細胞に対して、種々の細胞ストレス誘導剤を投与し、細胞の生存率に与える影響およびその際の遺伝子発現パターンの変化を観察した。これをもとに数種類の既存薬を投与して内耳細胞に与える細胞保護効果を観察し、既存薬数種類に内耳細胞の保護効果があることを確認した。

以上の結果から、ヒト感音難聴の主要な原因の一つである内耳感覚上皮細胞の減少に対し、細胞保護効果のある薬剤を効率的に選択することに、本実験系は応用可能と思われる。

(2) Pendred 症候群蝸牛外らせん溝細胞の細胞死を保護する薬剤(シロリムス)について、その推定最小薬理量算出とともに、3症例における薬剤の量反応効果(図1)の個人差を定量評価した。本疾患に関しても、新規病態生理を示唆する所見を見出したのみならず、同様に2種類の有効な新規治療薬候補を同定した。本疾患は治療薬の存在しない疾患である。治療薬候補の乏しい難聴疾患に対するスクリーニング系の確立という点においても、本研究成果は有用と思われる。抽出した治療薬候補化合物の薬効メカニズムはその病態を示唆するものであり、さらなる病態解明、要因の探索が今後の検討課題である。

以上のように、(1)-1,2,3 より分化誘導療法による内耳再生医療への応用が、(1)-4,(2)より橋渡し研究において動物モデルを介さず直接患者データから非臨床 POC スタディを展開することが、今後期待される。

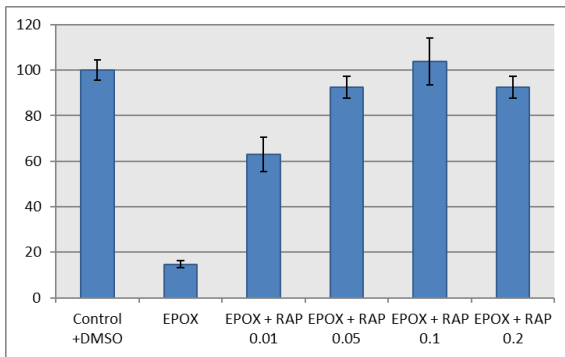


図1. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた薬剤評価の1例

縦軸 (%細胞生存率) を指標に、細胞ストレス剤 (EPOX) に対するラパマイシンの保護効果を量反应的に定量化した。

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4件)

Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S, Akamatsu W, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H.

Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Rep* 査読有 18 巻 1 号 2017 68-8 doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.020.

Fujioka M, Okano H, Edge AS. Manipulating cell fate in the cochlea: a feasible therapy for hearing loss. *Trends Neurosci.* 査読有 2015 38(3):139-44. doi: 10.1016/j.tins.2014.12.004.

Fujioka M, Okano H, Ogawa K. Inflammatory and immune responses in the cochlea: potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss. *Front Pharmacol.* 査読有 2014 23;5:287. doi: 10.3389/fphar.2014.00287

Fujioka M, Okamoto Y, Shinden S, Okano HJ, Okano H, Ogawa K, Matsunaga T. Pharmacological inhibition of cochlear mitochondrial respiratory chain induces secondary inflammation in the lateral wall: a potential therapeutic target for sensorineural hearing loss. *PLoS One.* 査読有 2014 10;9(3):e90089. doi: 10.1371/journal.pone.0090089.

[学会発表](計14件)

藤岡正人 両側進行性内耳性難聴の病態生理研究～疾患 iPS 創薬の立場から～ 第26回日本耳科学会総会・学術講演会

2016/10/5-8 ホテル国際 21(長野県長野市)

藤岡正人 Minding species gaps in the cochlea: non-human primate and patient derived- hiPSC models for the study of hereditary hearing loss IEB 2016 9/19-21 モンペリエ(イタリア)

藤岡正人 母親にのみ新規 EY44 遺伝子変異を認めた家族性難聴の1例 第78回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会 2016/6/23-24 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

Masato Fujioka, Cochlear disease modeling and drug discovery by using human iPSC-based technologies 16th japan-korea Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery1, 2016/3/29 ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区)

藤岡正人 Translating back and forth in between benchside and bedside by hiPSC based-technology and a primate model the13rd.Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery2015/12/3-4 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)

藤岡正人 再生医学的アプローチと幹細胞医学による内耳性難聴の研究(招待口演) 第25回日本耳科学会総会・学術講演会(聴覚生理学研究会)2015/10/7-10 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

藤岡正人 MYO15A 新規遺伝子変異症例からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立と解析 第38回日本神経科学大会 2015/7/28-31 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

藤岡正人 ヒト ES/iPS 細胞をソースとした高純度内耳有毛細胞誘導系と人工蝸牛感覚上皮シート作成のころみ 第36回日本炎症・再生医学会 2015/7/21-22 虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

細谷誠、小川郁 PENDRED 症候群疾患特異的 iPS 細胞由来内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング 第36回日本炎症・再生医学会 2015/7/21-22 虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

藤岡正人 蝸牛感覚上皮の再生医療と幹細胞生物学的アプローチによる内耳疾患研究 2015/3/19 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

藤岡正人 幹細胞・iPS 細胞を用いた内耳性難聴の研究～新規治療法の開発に向けて～ 第10回感覚器シンポジウム(招待講演) 2015/3/6 NHO 東京医療センター講堂(東京都港区)

藤岡正人 MYO15A 新規遺伝子変異症例からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立 日本耳科学会 2014/10/17 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

藤岡正人 PS 細胞技術を用いた内耳疾患研究～有毛細胞再生から疾患特異的 iPS 研究まで～ 東京都地方部会第41回総会・第203

回学術講演会（招待講演）2014/6/21 ホテルメトロポリタン池袋（東京都豊島区）

細谷誠、藤岡正人

患者由来 PENDING 症候群特異的 iPS 細胞を用いたヒト内耳 PENDING 陽性細胞の解析 第 13 回日本再生医療学会 2014/3/4-6 国立京都国際会館（京都府京都市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：内耳性難聴治療薬

発明者：細谷誠、藤岡正人、岡野栄之、小川郁、松永達雄

権利者：学校法人 慶應義塾

種類：用途特許

番号：PCT/JP2016/050861

（公開番号 WO2016/117431）

出願年月日：2016 年 1 月 13 日

国内外の別：外国出願/PCT

名称：内耳細胞誘導方法

発明者：細谷誠、藤岡正人、岡野栄之

権利者：学校法人 慶應義塾

種類：製法特許

番号：特願 2015-098423

（公開番号 特開 2015-231365）

出願年月日：2015 年 5 月 13 日

国内外の別：国内出願

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ <http://www.ent.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 郁 (kaoru ogawa)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00169179

(2) 研究分担者

藤岡 正人 (masato fujioka)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：70398626

水足 邦雄 (kunio mizutari)

独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・医師

研究者番号：40338140

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし