

ヒト iPS 細胞由来内耳オルガノイドを用いた薬剤性難聴の治療法開発 —高効率な培養法と、世界初の蝸牛神経節細胞様細胞による薬効評価系を確立—

東京慈恵会医科大学再生医学研究部 岡野 James 洋尚教授、耳鼻咽喉科学講座 小島博己教授、栗原 渉助教、神経科学研究部 加藤総夫教授、北里大学医学部 分子遺伝学 主任教授 藤岡正人（研究当時：慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室 専任講師）の研究グループは、ヒト iPS 細胞から内耳オルガノイド（人工臓器）を培養する新規手法を開発し、薬剤性難聴の治療候補薬の薬効評価に活用できることを示しました。本研究ではヒト iPS 細胞から内耳組織を培養するための各ステップを最適化することで高効率での分化誘導に成功しました。また、培養した蝸牛神経節細胞様細胞を世界で初めて薬物効果の評価に活用し、病態モデルとしての評価系を確立しました。

本研究の成果は、難聴の病態解明や治療法開発につながることで期待されます。

難聴の多くを占める感音難聴は内耳有毛細胞と蝸牛神経の障害に起因することが知られています。しかし、ヒトの内耳組織は患者さんから直接採取することは困難であり、このことが詳細な病態解析や治療法開発を行う上での大きなハードルになっています。こうした問題に対応するため、本研究ではヒト iPS 細胞由来の内耳組織を培養皿上で作製し研究に活用することを試みました。

- ヒト iPS 細胞から蝸牛神経節細胞様細胞と有毛細胞様細胞を含む内耳オルガノイドを高効率で培養する方法を確立しました。
- 培養した蝸牛神経節細胞様細胞は生体内の蝸牛神経節細胞と非常に良く似た分子発現・電気生理学的特性・細胞形態を有していることが分かりました。
- 世界で初めてヒト細胞由来の蝸牛神経節細胞様細胞を用いて薬物の効果を評価し、評価系を確立しました。
- シスプラチン（抗がん剤）による神経細胞障害作用が CDK2 阻害剤の投与によって緩和されることが判明し、シスプラチンの副作用による難聴の治療法につながる可能性が示唆されました。

本研究の成果は3月7日に STEM CELLS Translational Medicine 誌に掲載されました。

また、本研究は JSPS 科研費 JP20K20409、JP21H04839、東京慈恵会医科大学萌芽的共同研究推進費の助成を受けたものです。

【本研究内容についてのお問い合わせ先】

岡野 James 洋尚（おかの じょういむす ひろたか）
東京慈恵会医科大学 再生医学研究部 教授
TEL：03-3433-1111（代）

藤岡 正人（ふじおか まさと）
北里大学医学部 分子遺伝学 主任教授
慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科学教室 非常勤講師
masato@2002.jukuin.keio.ac.jp

【報道機関からのお問い合わせ窓口】

学校法人慈恵大学 経営企画部 広報課
〒105-8461 東京都港区西新橋3丁目25番8号
TEL：03-5400-1280 E-mail：koho@jikei.ac.jp

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：
山崎・飯塚・奈良
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
TEL：03-5363-3611 FAX：03-5363-3612
E-mail：med-koho@adst.keio.ac.jp

研究の詳細

1. 背景

空気の振動である“音”は内耳蝸牛の有毛細胞により神経シグナルに変換され、その神経シグナルは蝸牛神経節細胞によって中枢へと投射されます。有毛細胞や蝸牛神経節細胞は、音響外傷や遺伝性疾患、耳毒性のある薬剤などにより障害され、一度障害されると永久的な感音難聴となることが知られています。このことは、これらの細胞が一度障害されると再生しないという事象に起因しており、現在のところ根本的な治療法はありません。

これまでに行われてきた難聴治療法開発は主に齧歯類を用いて行われており、多くの有用な知見をもたらしてきました。しかし、マウスモデルはヒトの難聴の表現型を再現できない場合があることが報告されており^{1,2}、齧歯類と哺乳類の間では内耳の構成に種差が存在することが想定されます。一方、急速に発展する幹細胞研究分野では、培養皿上に幹細胞から各種臓器の細胞を分化誘導する方法が報告されてきました。この技術により、実際の患者さんから組織を採取することが困難な脳組織や内耳組織を研究資材として利用することが可能となりました。内耳組織を誘導する培養方法はこれまでに複数報告^{3,4}されていましたが、誘導効率が低いことや、蝸牛神経節細胞様細胞の詳細な解析が行われていないことが課題でした。そこで、本研究では、蝸牛神経節細胞様細胞と有毛細胞様細胞を含むヒト iPS 細胞^{注1}由来の内耳オルガノイドを高効率に作製する方法の開発を目指しました。さらに蝸牛神経節細胞様細胞に着目し、薬効評価に活用可能かを検証しました。

2. 手法・成果

i. ヒト iPS 細胞由来内耳オルガノイドの誘導プロトコール開発

齧歯類の胚から採取した内耳前駆細胞は、培養皿上で培養を行うと自己組織化して自律的に内耳の構成細胞に分化する能力を有しています。そこで、生体内の細胞と同等の生物学的特性を有する均質な内耳前駆細胞をヒト iPS 細胞から作製することが、培養皿上にヒト内耳組織を再現するための鍵になると考えました。Hosoya らは内耳前駆細胞を経て蝸牛外らせん溝細胞を誘導する方法を報告しており⁴、同手法を改変することで、より高効率な内耳前駆細胞の誘導方法を探索しました。その結果、胎生期に内耳前駆細胞への分化に関わる事が知られている因子群、FGF2、FGF3、FGF10、FGF19、BMP4、CHIR を一過性に添加することで、高効率にヒト iPS 細胞から内耳前駆細胞が誘導されることがわかりました（内耳前駆細胞マーカーの陽性率：98.2 ± 0.7%）。

続いて、内耳前駆細胞を 3 次元浮遊培養へと移行して凝集体を形成しました。この時点では内耳前駆細胞の性質を有した細胞の塊ですが、神経栄養因子を添加しながら 30 日程度培養を継続していくと内耳オルガノイドが形成されました。内耳オルガノイドは数ヶ月の長期培養も可能で、その形態を維持しながら徐々に直径を拡大していくことが確認されました（図 1）。

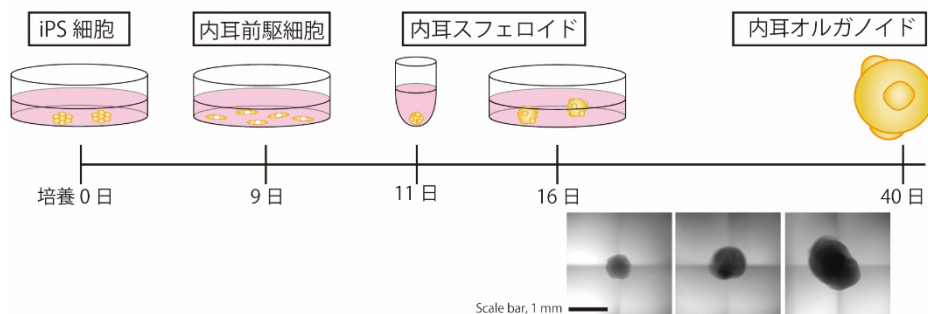


図 1 内耳オルガノイドの誘導プロトコール

ヒト iPS 細胞から内耳前駆細胞・内耳スフェロイドを経て、内耳オルガノイドを作製

ii. 内耳オルガノイドの有毛細胞様細胞領域および蝸牛神経節細胞様細胞領域^{注2}

培養 50 日目のオルガノイド内には、成熟神経マーカーである MAP2 陽性の神経細胞に囲まれた MYO6 陽性の有毛細胞様細胞が観察されました。いくつかのオルガノイドでは、散在する有毛細胞様細胞に加えて、上皮構造を形成していることも確認されました。

一方で、内耳オルガノイドの表面には、培養 45 日前後で成熟した蝸牛神経節細胞様細胞が存在することがわかりました。生体の蝸牛神経節細胞は、その機能や有毛細胞との接続性によって I 型と II 型に分類されます。内耳オルガノイド上の蝸牛神経節細胞様細胞にもこのようなサブタイプが存在するのかを解析すると、多くの細胞は I 型蝸牛神経節細胞のマーカーである PROX1 と NKA α 3 に陽性であり、一部の蝸牛神経節細胞様細胞は II 型蝸牛神経節細胞のマーカーである PRPH と NEFH に陽性を示しました。これらの結果から、内耳オルガノイドには 2 種類の蝸牛神経節細胞様細胞が存在し、生体と同様に I 型が大多数を占めることが確認されました。また、細胞の形態を観察すると、生体内と同様に大多数が双極性神経細胞の形態を有していることが確認されました (図 2)。ここからは、オルガノイド表面に存在し、解析に適している蝸牛神経節細胞様細胞に着目して研究を進めました。

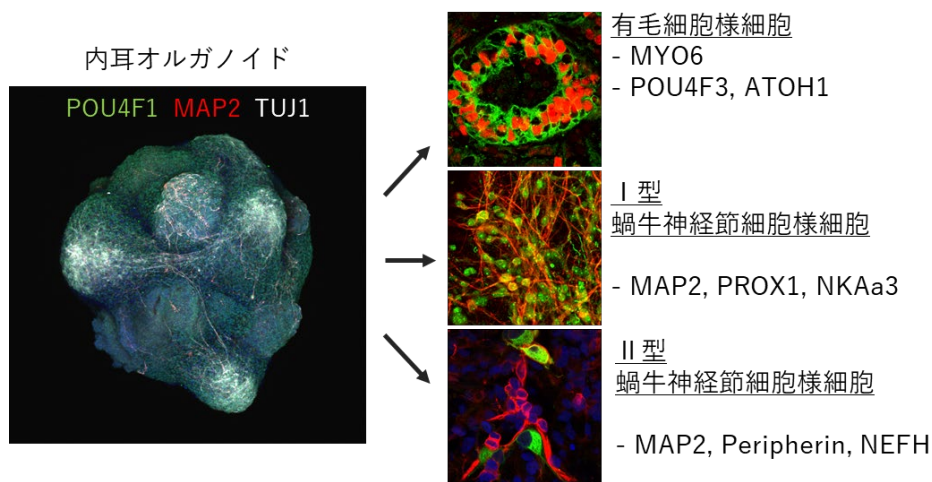


図 2 内耳オルガノイドの構成細胞

左図：内耳オルガノイドのホールマウント免疫染色像

右図：オルガノイド内部に存在する有毛細胞様細胞

オルガノイド表面に存在する蝸牛神経節細胞様細胞

iii. 蝸牛神経節細胞様細胞の電気生理学的特性

iPS 細胞から誘導された細胞や組織は、分子発現や形態的特徴だけではなく、生体内における機能を有することを示す必要があります。そこで、オルガノイド表面に存在する蝸牛神経節細胞様細胞の電気生理学的な性質を解析しました (図 3)。パッチ・クランプ法^{注3}を用いて記録したところ、これらの細胞が、成熟した神経細胞と同様の活動電位や膜電位・時間に依存して流れる膜電流、そして、その特徴的な活動電位発生パターンを示すことが明らかになりました。さらに、内耳の神経伝達物質であるグルタミン酸を介したシナプス伝達も確認され、少なくとも一部の細胞がシナプスを形成していることが示唆されました。これらの事実は、本研究プラットフォームを用いて誘導されたオルガノイドが、その機能の解析を進める上でも有用な標本であることを示しています。

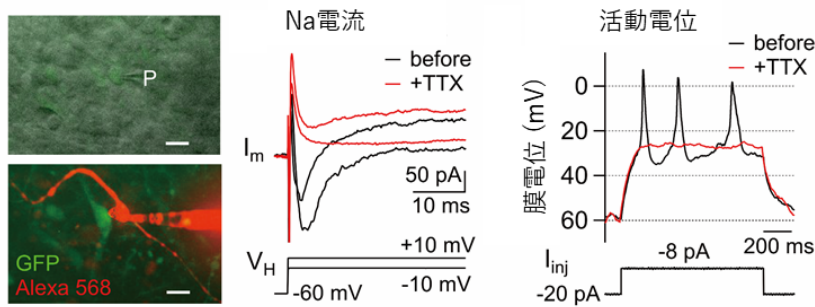


図3 蝸牛神経節細胞様細胞のパッチ・クランプによる機能解析 (or 評価)
 左図：誘導された神経細胞にガラス電極をあて電気活動を記録
 中央、右図：誘導された神経細胞の活動電位

iv. 神経細胞特異的の標識を含むオルガノイドのライブセルイメージング

内耳オルガノイドを用いて薬効評価などの解析を行う際には、ライブセルイメージング（生きたままの細胞を観察する）が可能になると大きく解析の幅が広がります。細胞の挙動・反応をリアルタイムに計測出来ることに加え、ハイスループット化に寄与するからです。

内耳オルガノイド凍結切片の免疫染色結果から、蝸牛神経節細胞様細胞は主に組織表面から $40 \mu\text{m}$ 以内に神経細胞が存在することが分かっていたため、蝸牛神経節細胞様細胞はライブセルイメージングに適していると考えられました。そこで、アデノ随伴ウイルス (AAV-syn-EGFP)^{注4}を用いて、神経細胞特異的のプロモーターである hSynapsin1 プロモーターの制御下で EGFP（緑色蛍光タンパク）を誘導する遺伝子カセットをオルガノイド上の細胞に導入しました。すると、ウイルス投与2週間が経過した内耳オルガノイドには神経細胞特異的に EGFP の発現が確認され、ライブセルイメージングが長期間にわたって可能となりました。

v. CDK2 阻害剤はシスプラチン起因性蝸牛神経節細胞様細胞障害を抑制した

シスプラチンは消化器がん、肺がん、卵巣がん、頭頸部がんなど、多くの悪性腫瘍の治療に用いられていますが、報告によっては約 60% の患者さんに難聴を引き起こすと言われていています⁵。シスプラチンによる難聴には、内耳細胞における過剰な活性酸素種の産生が関わっていると考えられています。決定的なメカニズムはまだ解明されていません。そこで、内耳オルガノイドを用いて蝸牛神経節細胞様細胞に対するシスプラチンの作用を解析しました。

まず、シスプラチンが蝸牛神経節細胞様細胞に対して障害作用を有するかを評価するために、神経細胞を蛍光タンパク標識した内耳オルガノイドにシスプラチンを投与する実験を行いました。すると、蛍光輝度は低下し、シスプラチンが蝸牛神経節細胞様細胞に対して障害作用を有することが確認されました。個々の細胞レベルでの反応を解析するために強拡大で1時間毎にタイムラプス撮影を行ってみると、細胞面積の様な減少と、神経突起の断片化が観察されました。さらに、アポトーシス（細胞死の一形態）マーカーである cleaved-Caspase 3 の発現上昇をみとめ、シスプラチンにより蝸牛神経節細胞様細胞はアポトーシスを起こしていることが示されました。また、蝸牛神経節細胞様細胞のミトコンドリアにおける活性酸素種の産生量を計測すると、シスプラチン投与により増加することがわかりました。続いて、マウス有毛細胞においてシスプラチンの障害効果を減弱することが報告されている CDK2 阻害剤が⁶、ヒト蝸牛神経節細胞様細胞においても効果を示すかを検証しました。内耳オルガノイドにあらかじめ CDK2 阻害剤を投与した後にシスプラチンを投与したところ、CDK2 阻害剤を投与しなかった場合と比べてミトコンドリアにおける活性酸素種の過剰産生が有意に抑制されました。さらに、シスプラチンのみ投与した内耳オルガノイドと、シスプラチンに加えて CDK2 阻害剤を投与した内耳オルガノイドを1週間観察してみると、蝸牛神経節細胞様細胞の細胞死までは防ぐことは出来なかったものの、シスプラチンの神経毒性作用を短期的には抑制することが示されました。本研究で確認された神経保護作用のメカニズムに関してはさらなる検討を要しますが、シスプラチン起因性難聴の治療法開発につながる成果が得られたと考えられます。

- 1 Plum A, Winterhager E, Pesch J et al. Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev Biol* 2001;231(2):334-347.
- 2 Suzuki S, Suzuki N, Mori J et al. micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo. *Mol Endocrinol* 2007;21(4):885-894.
- 3 Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E et al. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2017;35(6):583-589.
- 4 Hosoya M, Fujioka M, Sone T et al. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Rep* 2017;18(1):68-81.
- 5 Karasawa T, Steyger PS. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol Lett* 2015;237(3):219-227.
- 6 Teitz T, Fang J, Goktug AN et al. CDK2 inhibitors as candidate therapeutics for cisplatin- and noise-induced hearing loss. *J Exp Med* 2018;215(4):1187-1203.

3. 今後の応用、展開

本研究ではヒト iPS 細胞から内耳オルガノイドを作製するための新しいプロトコルを開発し、内耳オルガノイドの表面に存在する蝸牛神経節細胞様細胞を用いた薬効評価系を確立しました。これまでに内耳細胞を用いる薬物スクリーニングとして、マウス由来の不死化細胞を用いる方法や、マウス生体から単離した蝸牛神経節細胞を用いる方法が報告されていますが、ヒトの蝸牛神経節細胞様細胞を用いて薬物の効果を評価した研究は本研究が初めてです。内耳オルガノイド内のヒト iPS 細胞由来蝸牛神経節細胞様細胞を用いた研究プラットフォームは、スケールアップが比較的容易であり、ライブセルイメージング手法も確立していることから、新しい薬剤スクリーニングシステムとなり得るものです。また、遺伝子編集技術の進歩により、iPS 細胞に遺伝性難聴を引き起こす変異を導入することも容易になっています。患者さん由来の iPS 細胞を使用する方法とあわせて、遺伝性疾患の解析にも活用可能であると考えられます。

今回の研究成果をもとに、シスプラチン起因性難聴の新規治療法開発を進めています。また、遺伝性難聴に対する治療法開発を目的としたプロジェクトも計画中であり、北里大学も共同研究に加わり発展させていく予定です。

4. 脚注、用語説明

注1 iPS 細胞：皮膚や血液の細胞を用いて人工的に作られた多能性幹細胞。様々な臓器の細胞に分化する能力を持ち、増殖能力も非常に高い。

注2 ~細胞様細胞：幹細胞などから培養皿上で分化させた細胞は、どれだけ生体臓器の細胞に近い特徴を有していても、全く等しい細胞として扱うことは出来ない。そのために、~様細胞という呼称を使用することが多い。

注3 パッチ・クランプ法：細胞のイオンチャネルやトランスポーターを介したイオンの挙動を観察することで、目的の細胞の有する電気生理学的特性を明らかにすることが出来る。

注4 アデノ随伴ウイルス：遺伝子導入を目的としたウイルスベクターとして頻用されるウイルス。細胞に感染させることで、任意の遺伝子を導入することが出来る。

5. 論文タイトル、著者

掲載誌名 | STEM CELLS Translational Medicine

論文タイトル | Otic Organoids Containing Spiral Ganglion Neuron-Like Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Model of Drug-Induced Neuropathy

著者 | Sho Kurihara, Masato Fujioka, Motoki Hirabayashi, Tomohiko Yoshida, Makoto Hosoya, Masashi Nagase, Fusao Kato, Kaoru Ogawa, Hideyuki Okano, Hiromi Kojima, Hirotaka James Okano

著者（日本語表記）栗原 渉、藤岡正人、平林源希、吉田知彦、細谷 誠、永瀬将志、加藤総夫、小川 郁、岡野栄之、小島博己、岡野 James 洋尚（責任著者）

以上