

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

## 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 2

骨髄間葉系幹細胞および蝸牛線維細胞変性組織からの走化性因子 MCP1 および走化性因子レセプターCCR2 の遺伝子クローニング

研究協力者 小川佳奈 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

### 研究要旨

骨髄間葉系幹細胞は成体細胞から作成できる多分化能を有する細胞であり、患者の骨髄より樹立することが可能なため既に他臓器において臨床での有用性が確認されており内耳への応用も非常に有効であると考えられる。研究代表者が開発した間葉系幹細胞移植法では、移植前に蝸牛線維細胞のみに軽度な可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を置換することを可能とした。

これまでの我々の骨髄間葉系細胞移植では、人為的損傷を与えた実験モデルでの聴力回復に成功しているが、次段階としてヒト遺伝性難聴の治療を目的として異常細胞から正常細胞への細胞置換療法の検討を行っている。これを成功させるためには大量の多能性幹細胞を蝸牛組織内へ導入させる必要がある。これまで行ってきた蝸牛線維細胞損傷モデルラットでの DNA マイクロアレイ解析では、蝸牛線維細胞細胞修復に関わる因子として単球走化性因子 MCP1(Monocyte Chemotactic Protein-1)がスクリーニングされた (Kamiya et al. *Am J Pathol.* 2007)。遺伝子発現動態の解析では蝸牛線維細胞の軽度損傷により走化性因子 MCP1 の発現が急激に高まり MCP1 受容体である CCR2 も引き続いて発現上昇することが明らかとなった。また骨髄間葉系幹細胞も CCR2 を発現し、同細胞が MCP1 により損傷部に誘導される能力を持つことが明らかとなった (前項)。本研究では蝸牛組織内で細胞誘導効率を高めると考えられる MCP1 と CCR2 の発現を移植幹細胞へ導入し、テトラサイクリン発現誘導システムにより両遺伝子の発現をコントロールすることにより蝸牛組織への細胞導入を飛躍的に高めるシステムを開発することを目的とし、両遺伝子をクローニングしテトラサイクリン誘導発現のためのベクターが構築された。

### A. 研究目的

我々が以前報告した繊維細胞損傷モデル

ラットではミトコンドリア機能阻害剤である 3 ニトロプロリオン酸 (3NP) の局所投

与により繊維細胞の損傷と同時に MCP1 などの走化性因子の発現が高まった結果、移植した間葉系幹細胞が損傷部に侵入したと考えられた。

本研究では、走化性因子 MCP1 と MCP1 レセプター CCR2 のクローニングを行い、テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、下図に示したように前庭階付近の組織で走化性因子 MCP1 と MCP1 レセプター CCR2 の条件付き発現が誘導可能な系の構築を目的とした。

## B. 研究方法

マウス内耳組織より RNA を抽出し、逆転写により得た cDNA を鋳型に、PCR を用いて走化性因子 MCP1 および走化性因子レセプター CCR2 の遺伝子のクローニングを行った。

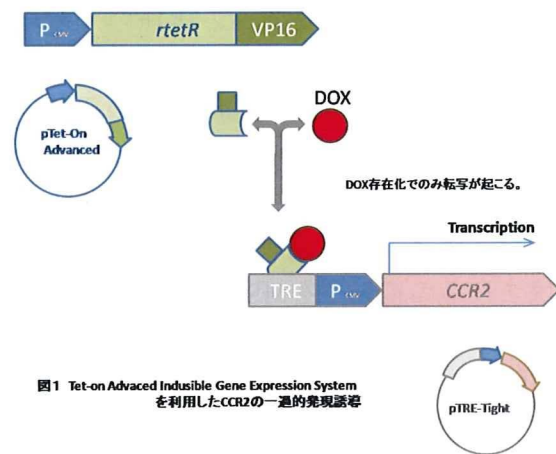
クローニングには Clontech 社の Tet-on Advanced Inducible Gene Expression System を利用したベクターを用いた (図 1)。このシステムでは、DOX の添加により一過的、局所的に遺伝子を発現することが出来る。

### 走化性因子レセプター CCR のクローニング

PCR 反応に用いたプライマーは、マウスの走化性因子レセプター CCR2 の遺伝子配列を基に、図 2 のように設計した。(青色で示した配列にはコザック配列および、クローニングベクターへ挿入するための制限酵素サイトを付加した。)

最初に cDNA を鋳型として、赤色で示したプライマーセットを用いて PCR 反応を

行い、PCR 産物を鋳型に青色で示したプライマーセットを用いて nested PCR を行った。PCR 反応物を精製し、制限酵素処理を行った後、クローニングベクターの制限酵素部位に挿入し、大腸菌に導入しクローンを得た。得られたクローンの遺伝子配列は、シーケンサー反応により確認を行った。



### 走化性因子 MCP1 のクローニング

PCR 反応に用いたプライマーは、マウスの走化性因子 MCP1 の遺伝子配列を基に、図 3 のように設計した。(青色で示した配列にはコザック配列および、クローニングベクターへ挿入するための制限酵素サイトを付加した。)

上記の走化性因子レセプター CCR と同様の方法でクローニングを行った。

## C. 研究結果

上記の方法により走化性因子レセプター CCR2 および、走化性因子 MCP1 それぞれに対して、Dox (テトラサイクリン) 存在下のみ発現誘導可能なプラスミドコンストラクトを得た。

## D. 考察

本研究ではマウス蝸牛組織内への MSC の誘導し導入効率を飛躍的に高めるためのベクターシステムが開発された。

蝸牛線維細胞損傷時にMCP1およびCCR2の発現が高まる修復反応を応用し、本研究でクローニングされたMCP1およびCCR2の発現プラスミドを移植細胞内で強発現させることにより、生体内での自然な細胞誘導反応を増強させ、蝸牛内へのMSCの導入効率を飛躍的に高める方法を確立できると考えられる。

本研究でMCP1およびCCR2の条件付き発現プラスミドが完成し、次段階としてはこれらの遺伝子をMSCへ導入・安定株を樹立し、MCP1発現MSCおよびCCR2発現MSCを段階的に蝸牛内へ投与し各遺伝子を発現制御する。これにより細胞導入率が飛躍的に高まり、遺伝性難聴での聴覚機能改善が十分期待できる。

## E. 結論

本研究では骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織内への導入効果を高めるMCP1およびCCR2の条件付き発現プラスミドを作成し、効率的移植細胞誘導のためのベクターシステムが完成した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

```

tgcacatataaaggagccatacctgttaastgocctggaagtccaagctgocctgaaagacc
agaagagggcattggatcaccacatgtgctaagaattggaacttgaatcatctgcaaaaa
caaatcaagggaatggaagacaataatattgttacctcagttcatccacggcataactatc
      M E D N N M L P Q F I H G I L S
aacatctcattctctatttacacgaagtatccaagagcttgatgaaggggccaccaccc
  T S H S L F T R S I Q E L D E G A T T F
gtatgaactacgatgagtgtagccttgcataaaaccagtgtagaajcaaatggagcttg
  Y D Y D D G E P C H K T S V K Q I G A W
gatcctgacctca // gagaagtccogaaggtatctctccatatttttcagaagca
  I L P P      E K F R R Y L S I F F R K H
cattgctaaacgtctctgcaaacagtgcccagtttctatagggagacagcagatcgagt
  I A K R L C K Q C P V F Y R E T A D R V
dgagctctacattcactccttccactcgggagcaagagctctcgggttgtaaaagtaa
  S S T F T P S T G E Q E V S V G L *
gtgacayttgcoottttttaagcaggaaggaggagcagtggtacatagcaacaagc
ctcaaaagacagtggttcttactttgggtca //ccctatgaggagcctctttgcoctgtg
dcaatatttttaccatctccacatgttttcttacttatqacatqaaagacatqg
aatthaagaaaggaggcatgagctgtcaggactgagtgagaaggaggagatattgact
gttgcctctgagtgaaaatgcaatgaaagtggagcaggtctcgaatttcttctcatt

```

図2 走化性因子レセプターCCR2

```

gcagagagccagacyggaaggcagccagcaaccagcccaactctcaatgaa
gacagctctctctctccaccaccctgaggctccctgtcatgctctgggcoctgctgtt
      M Q V P V M L I G L L F
cacagtggccggtggagatccaagctgtggctcagccagatgcaagttaacgcccact
  T V A G W S I H V L A Q P D A V N A P L
cacctgctgctactcatccacagcaagatgataccaatgagtaggctggagagctaca
  T C C Y S F T S E M I P M S R L E S Y K
gaggatccaagcagcaggtgtcccaagagagctgtagttttgtccaccagctcaagag
  R I T S S R C P K E A V V F V T K L K R
agaggtctgtgtagcccaagaaggaatgggtccagacatcatataaaacctggatcg
  E V C A D P K K E W V Q T Y I K N L D R
gaacaaatgagatcagaacctaaacttttataaaactgcatgcooctaaggtctt
  N Q M R S E P I I L F K I A S A L R S S
agcacccttgaatgtgaagtggacccgttaactggaagctaatgcatccactaccctttc
  A P L N V K L T R K S E A N A S I T F S
cacaacacctcaagcactctgttaggagtgaccaygtgacagtaactagtgtaact
  I T I S S I S V G V T S V T V N *
ggactgtgatgcocttaataataataaacttatttaacttattgagttatggtattccc
ttcattgaatactaaatttcttaaatgcaaggtggatccatttttccctctctgtag
atccagattcaaaccttccatgtatgagagatgattttgttaagatgaaatgggtahac

```

図3 走化性因子MCP1

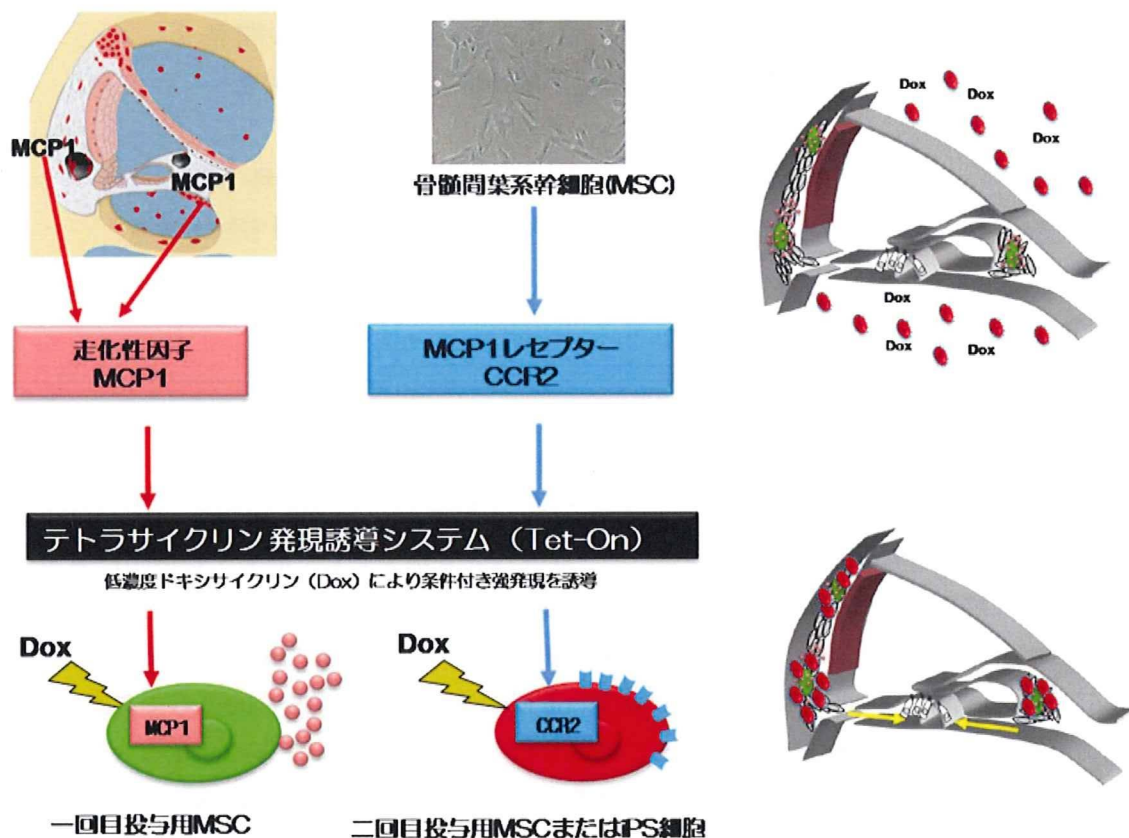


図4 移植細胞の導入効率を飛躍的に向上させるためのMCP1、CCR2によるテトラサイクリン発現誘導システムの概要  
 第一次移植細胞としてMCP1発現MSC（緑色蛍光標識）を蝸牛外リンパ液内へ還流投与。その後第二次移植細胞としてCCR2発現MSCの還流投与を行う。第二次移植細胞の還流液には低濃度ドキシサイクリン（テトラサイクリン）を含有させ、両遺伝子の強発現を開始させる。これにより第一次移植後に細胞侵入した少量のMSCはMCP1を強発現し、その受容体であるCCR2を強発現する第二次移植細胞が大量に蝸牛組織に誘導される。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

### 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 3

骨髄間葉系幹細胞の効率的蝸牛組織導入法の開発

研究協力者 笠木寛美 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

#### 研究要旨

骨髄間葉系幹細胞は成体細胞から作成できる多分化能を有する細胞であり、患者の骨髄より樹立することが可能なため既に他臓器において臨床での有用性が確認されており内耳への応用も非常に有効であると考えられる。研究代表者が開発した間葉系幹細胞移植法では、移植前に蝸牛線維細胞のみに軽度な可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を置換することを可能とした。我々はこれまで骨髄間葉系細胞移植により人為的損傷を与えた実験モデルでの聴力回復に成功しているが、今後はヒト遺伝性難聴の治療を目的として異常細胞から正常細胞への細胞置換療法を目指して検討を行っている。これを成功させるためには大量の多能性幹細胞を蝸牛組織内へ導入させる必要がある。本研究では細胞導入効率を高めるためのいくつかの方法を比較し検討を行った。その結果、ミトコンドリアトキシン 3NP で蝸牛外側壁にごく軽微な損傷を与えることで骨髄間葉系幹細胞の細胞侵入能を増強させることに成功した。この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。

#### A. 研究目的

これまで我々は蝸牛線維細胞のみに実験的に可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を添加する方法を新規開発した (*Am J Pathol* 171:214-226, 2007)。同方法を応用することにより、単に細胞を補うだけでなく遺伝子変異を持つ細胞を正常細胞に置換

するという全く新しい観点での方法論の発展が期待できる。この方法論を発展させていくことにより、将来的には多様な遺伝性難聴患者に対し、薬物治療、遺伝子治療、組織移植とは異なり、組織損傷の種類と度合いに対応した低リスクで高い効果を持つ治療法の開発が期待できる。



本研究ではこれまで我々が開発してきた内耳への骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 移植法をさらに発展させ、蝸牛組織への MSC 導入効率を飛躍的に高める方法を開発することを目的とした。

## B. 研究方法

### 骨髄間葉系幹細胞移植法の検討および聴力モニタリング

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を用いた内耳細胞移植の検討を行った。正常マウス (生後 10 日、8-10 週、5 カ月以上の 3 群) に対して、麻酔を行なった後、後半規管および外側半規管に小孔を開け、外側半規管より半規管膨大部へ向けて微小チューブを挿入。2 X 10<sup>5</sup> cells in 20μl の MSC 細胞細胞液 (EGFP 標識) を 10 分間の注入により還流した。投与前、投与 4 日後、7 日後に聴力を測定した。また内耳の形態、移植した MSC の観察は GFP の免疫染色により行った。

今後は上記の方法を iPS 細胞を用いて施行予定である。移植後 1 週間毎に聴力を聴性脳幹反応 (ABR) により測定。細胞移動を観察するため遠赤色蛍光遺伝子 (HcRed) で標識した iPS 細胞細胞液を移植 2 週間後に追加投与する実験群を設ける。移植 4 週間後に蝸牛内電位 (EP) を測定し蝸牛を採取する。上記と同様の方法で移植 16 週後までの長期モニタリングを平行して行う。

### ・移植細胞の浸潤効率の検討

細胞液にリゾホスファチジン酸 (LPA) 等、細胞浸潤を促進する物質を加えて投与した。細胞のみ投与した群と、細胞 + LPA を投与した群とで聴力の変化、組織侵入率の評価を行った。

蝸牛組織に軽度の炎症を与えるため、ミトコンドリアトキシシン (3-nitropropionic acid, 3-NP) を投与した翌日に MSC を投与した。投与方法としては、中耳骨胞に小孔をあけ、正円窓より 1μl の 300mM の 3-NP を投与した。

## C. 研究結果

MSC 投与前、投与 4 日後、7 日後に聴力を測定し、明らかな聴力の低下は認めなかった。

内耳の形態、移植した MSC の観察は GFP の免疫染色により行い、移植された細胞の一部は、蝸牛や前庭組織への侵入が確認された。移植細胞の異常増殖は認められなかった。

また、MSC 細胞液に LPA を加えて投与した群でも術後聴力の明らかな変化は認められなかった。組織への細胞侵入率は MSC 細胞単独で投与した群と明らかな変化は認められなかった。

MSC 投与前に 3-NP 投与した群では、細胞のみ投与した群よりも細胞の生着率は良好であった。

## D. 考察

本実験では安全かつ有効にマウス蝸牛組織内に MSC を誘導する方法が検討された。3NP 投与後の MSC 移植では組織内に軽度の炎症を起こすことでケモカインの誘導を促し、MSC の組織内への透過性が高まるため、組織への生着率が高まると考えられた。この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。今後は MSC に MCP1 および CCR2 の発現プ

ラスミドを導入し各遺伝子を強発現させることにより、生体内での自然な細胞誘導反応を増強させ、蝸牛内へのMSCの導入効率を飛躍的に高める方法を確立する。

#### E. 結論

本研究では蝸牛組織にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織への導入効率を高めることに成功した。

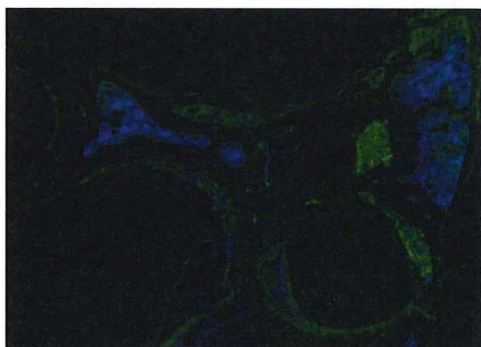
#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

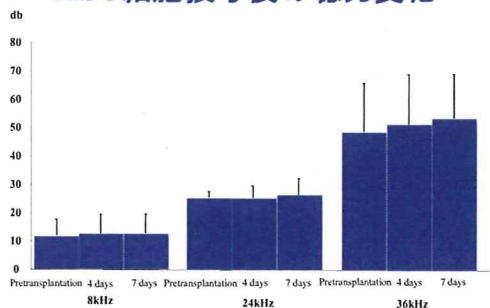
##### 2. 学会発表

Hiromi Kasagi et al. Transplantation of bone marrow Mesenchymal stem cell into neonatal,



前庭組織では多くのMSC（緑）の組織定着が確認された。

#### MSC細胞投与後の聴力変化



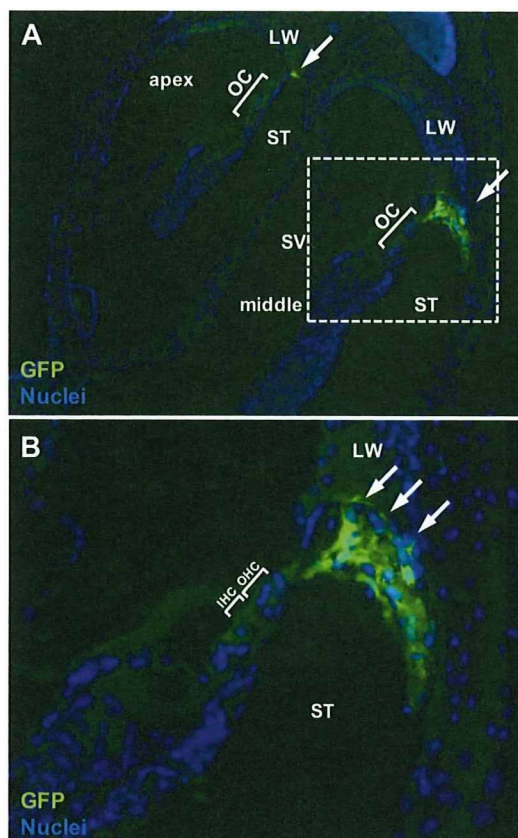
#### 細胞移植後のABR閾値の変化

前庭組織では多くのMSC（緑）の組織侵入が確認された。移植手術による聴力の低下は見られず、骨髄間葉系幹細胞内耳移植の安全性が確認された。

adult and aged mouse cochlea. 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2010年2月 米国 アナハイム

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



3NPで蝸牛外側壁（Lateral Wall, LW）にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞（GFP 標識、緑）の細胞侵入促進に成功した。3NP 投与により外側壁において走化性因子の発現が誘導されることも確認されているため、蝸牛鼓室階(Scala Timpani, ST)の外リンパ液において浮遊していた細胞が外側壁側に誘導され外側壁組織内に侵入したと考えられる。

(A) 蝸牛頂回転（apex）および中回転（middle）の鼓室階側から外側壁へ細胞が接着し侵入している（矢印）。

(B) A点線枠の拡大像。複数の細胞が外側壁組織内へ浸潤している（矢印）。OC: Organ of Corti(コルチ器), IHC: Inner Hair Cell(内有毛細胞), OHC: Outer Hair Cell(外有毛細胞), SV: Scala Vestibuli(前庭階)。この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

#### 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 4

Connexin26 欠損マウス蝸牛組織へのウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の検討

研究分担者 飯塚崇 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室助教

研究分担者 池田勝久 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

##### 研究要旨

先天性難聴は1000出生に一人と高頻度に発生しその半数は遺伝性であると考えられている。コネキシン26をコードする*Gjb2*遺伝子は遺伝性難聴の中で最も高頻度に発生する遺伝性難聴原因遺伝子として知られている。本研究では遺伝性難聴の治療法確立を目的とし*Gjb2*遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（AAV）を作成した。同ウイルスベクターの*Gjb2*ノックアウトマウスへの導入を検討し、これにより同マウスの蝸牛組織内に*Gjb2*遺伝子がコードするコネキシン26を発現させることに成功した。

##### A. 研究目的

出生1000人に1人の割合で生まれてくる高度難聴児のうち少なくとも半数は遺伝子の関与によると推測されている。この中でも *GJB2* 変異による遺伝性難聴が最も頻度が高いことが知られているが、現在根本的な治療はない。*GJB2* 遺伝子はギャップジャンクション蛋白である Connexin 26 (Cx26) をコードする遺伝子である。細胞間の結合様式の1つであるギャップジャンクションは内耳蝸牛では主に支持細胞に局在しており、水やカリウムイオンなど低分子物質を自由に細胞間の移動をさせて、内リンパ液中のカリウムイオンサイクルや、

コルチリンパの形成にも関与しているとされ、聴力に不可欠である。また、遺伝性難聴モデルにはマウスが使われることが多いが、成熟したマウスでは非侵襲的に蝸牛支持細胞に遺伝子導入できた報告はない。一方、*GJB2* 遺伝子変異モデルマウスの検討により出生後の蝸牛コルチ器の発育が傷害されていることが判った。そこで我々は遺伝性難聴モデルである *Gjb2* コンディショナルノックアウトマウスを用いて発育不全のコルチ器を遺伝子治療で回復させるのを目標にマウス蝸牛支持細胞へのウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。



## B. 研究方法

内耳への遺伝子導入の方法として蝸牛壁に小孔を開けての投与、正円窓からの投与、半規管からの投与があるが、半規管からの投与は導入効率が低いため今回は検討しなかった。ウイルスベクターはアデノウイルスベクター (AdV) とアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた。また、投与前後に聴性脳幹反応を行い、聴力を比較した。

## C. 研究結果

過去に当研究室で所有する *Gjb2* ノックアウトマウスを用いた我々の結果では、過去の報告と同様に外リンパ腔への導入ではコルチ器や内リンパ腔への発現はみられず、内リンパ腔への投与では高度難聴を認めた。

我々はマウス *Gjb2* 遺伝子を組み込んだ AAV を作成し、*Gjb2* ノックアウトマウスの蝸牛に導入した。凍結切片を作成し免疫染色にて検討したところらせん板縁とらせん靭帯に Cx26 の発現を認めた。比較としてベクターを導入していない *Gjb2* ノックアウトマウスを用いたものは発現を認めなかった。

## D. 考察

我々は正円窓経路で AAV を出生直後のマウスに投与することにより聴力の損失なく蝸牛支持細胞に遺伝子を導入することを報告した (T. iizuka et al. 2008)。今後この導入方法で *Gjb2* ノックアウトマウスに *Gjb2*

遺伝子を組み込んだ AAV の導入を行っていく予定である。

## E. 結論

本研究では遺伝性難聴の治療法確立を目的とし *Gjb2* 遺伝子を組み込んだ AAV を作成した。同ウイルスベクターを *Gjb2* ノックアウトマウスへの導入を検討し、これにより同マウスの蝸牛組織内に *Gjb2* 遺伝子がコードするコネキシン26を発現させることに成功した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Noninvasive In Vivo Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea. Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K. Human Gene Therapy 19(4):384-90. 2008.

### 2. 学会発表

Intracochlear Injection of Adeno-Associate Virus. Vector to a Mouse Model Created by a Conditional. Knockout of *Gjb2* Gene. Takashi Iizuka et al. ARO midwinter meeting 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 5

Connexin26 欠損マウス蝸牛組織へのウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の検討

研究協力者 岡田弘子 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

研究分担者 飯塚崇 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室助教

研究分担者 池田勝久 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

研究要旨

先天性高度難聴児は幼少児期に末梢平衡器官にも障害を伴う頻度が極めて高いことが知られている。近年、内耳への遺伝子導入に関して多くの報告が有る。我々は現在まで難聴の治療を目的として内耳への遺伝子導入に関する研究を行ってきており、この経験を基にマウス前庭組織へのウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。

A. 研究目的

近年、内耳の遺伝子治療を目的として実験動物内耳への遺伝子導入法の検討は以前よりも多く報告されているが、前庭障害を標的とした内耳遺伝子治療法の検討は非常に少ない。我々はこれまで難聴の治療を目的として内耳への遺伝子導入に関する研究を行ってきており、主に蝸牛への遺伝子導入に焦点を当ててきた、本研究ではこの基礎データを基にマウス前庭組織へのウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。

B. 研究方法

前庭への遺伝子導入を目的として、アデノウイルスベクター（AdV）とアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を、微細ガラス管を用い、正円窓と半規管を通じて生後 2

週の野生型マウス内耳に注入した。AdV および AAV は緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を組み込まれたものを使用した。聴覚機能と平衡機能への侵襲を評価するため、聴性脳幹反応（ABR）とバランステストを術前および術後 2 週間で行った。その後内耳を摘出し、凍結切片を作成し、免疫染色を施行して導入遺伝子の発現を観察した。

C. 研究結果

いずれの群においても、膨大部および卵形囊において、有毛細胞および前庭支持細胞への GFP の発現が認められた。また、AAV 注入群においては、線維細胞にも GFP の発現が多数みられたが、AdV 注入群においてはみられなかった。ABR 測定の結果では、正円窓經由に AdV を注入した群で軽度の聴

力閾値上昇がみられたが、半規管経由に AAV を注入した群では聴力閾値の変化が見られなかった。術後2週間のバランステストにおいて、いずれの群でも異常はみられなかった。

#### D. 考察

今回の実験では半規管経由で AAV を注入する方法が、安全かつ有用であることが示唆された。遺伝子導入を最適化するため、各手法・各ベクターによる導入効率を評価する必要があると考えられる。この低侵襲の前庭への遺伝子導入法は、今後ヒトの平衡異常の治療の開発に繋がる可能性がある。

#### E. 結論

半規管経由で AAV の投与方法により、聴力の低下を伴わずに前庭の有毛細胞、支持細胞、線維細胞への遺伝子導入に成功し、安全かつ効率的な前庭遺伝子治療法が開発された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

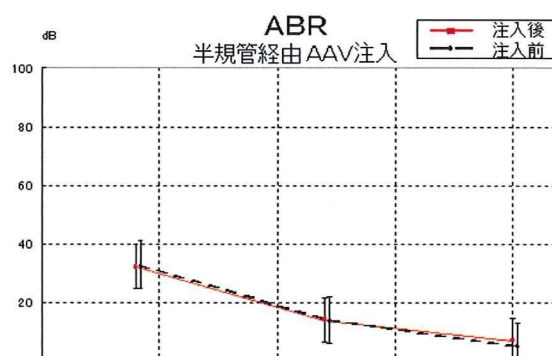
なし

##### 2. 学会発表

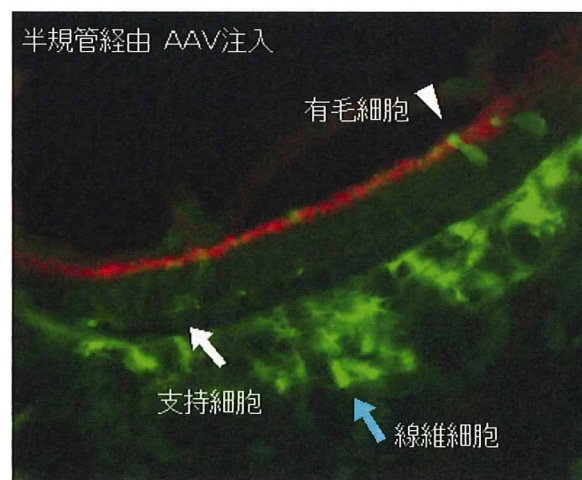
Hiroko Okada et al. Injection of virus vector targeting vestibule in mice

, 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2010年2月 米国 アナハイム

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし



経半規管 AAV 投与による遺伝子導入後の ABR 閾値の変化  
AAV 投与による聴力の低下は見られず、AAV の経半規管投与方法の安全性が確認された。



AAV による半規管経由遺伝子導入後の前庭組織  
多くの有毛細胞 (矢頭)、支持細胞 (白矢印)、および線維細胞への遺伝子導入に成功した。

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版
Kasai M, Hayashi C, Iizuka T, Inoshita A, Kamiya K, Okada H, Nakajima Y, Kaga K, Ikeda K	Vestibular function of patients with profound deafness related to GJB2 mutation	Acta Oto-Laryngologica	Early Online	1-6	2010
神谷和作 池田勝久	実験動物を用いた内耳細胞治療研究へのアプローチ	耳鼻咽喉科臨床 Practica Oto-Rhino-Laryngologica	補126	1-5	2010
神谷和作	難聴に対する内耳細胞治療法の開発	医学のあゆみ	229(9)	863-867	2009
Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura H.-O, Shinkawa H, Ikeda K	Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission	Neuroscience	164		2009
Kamiya K	Cell therapy targeting cochlear fibrocytes	Otology Japan	19(3)	214-218	2009
Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, Ikeda K	Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice	International Journal of Audiology		1-6	2009
Inoshita A, Iizuka T, Okamura H.-O, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K	Postnatal development of the organ of corti in dominant-negative GJB2 transgenic mice	Neuroscience		1039-1047	2008

Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K	Noninvasive <i>In Vivo</i> Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea	HUMAN GENE THERAPY		384-390	2008
Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, Okamoto Y, Kouike H, Komatsuzaki R, Kusano R, Nakagawa S, Satoh H, Fujii M, Matsunaga T	Mesenchymal Stem Cell Transplantation Accelerates Hearing Recovery through the Repair of Injured Cochlear Fibrocytes	The American Journal of Pathology		214-226	2007



ORIGINAL ARTICLE

## Vestibular function of patients with profound deafness related to *GJB2* mutation

MISATO KASAI<sup>1</sup>, CHERI HAYASHI<sup>1</sup>, TAKASHI IIZUKA<sup>1</sup>, AYAKO INOSHITA<sup>1</sup>, KAZUSAKU KAMIYA<sup>1</sup>, HIROKO OKADA<sup>1</sup>, YUKINORI NAKAJIMA<sup>1</sup>, KIMITAKA KAGA<sup>2</sup> AND KATSUHISA IKEDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo and <sup>2</sup>National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan

### Abstract

**Conclusion:** *GJB2* mutations are responsible not only for deafness but also for the occurrence of vestibular dysfunction. However, vestibular dysfunction tends to be unilateral and less severe in comparison with that of bilateral deafness. **Objectives:** The correlation between the cochlear and vestibular end-organs suggests that some children with congenital deafness may have vestibular impairments. On the other hand, *GJB2* gene mutations are the most common cause of nonsyndromic deafness. The vestibular function of patients with congenital deafness (CD), which is related to *GJB2* gene mutation, remains to be elucidated. The purpose of this study was to analyze the relationship between *GJB2* gene mutation and vestibular dysfunction in adults with CD. **Methods:** A total of 31 subjects, including 10 healthy volunteers and 21 patients with CD, were enrolled in the study. A hearing test and genetic analysis were performed. The vestibular evoked myogenic potentials (VEMPs) were measured and a caloric test was performed to assess the vestibular function. The percentage of vestibular dysfunction was then statistically analyzed. **Results:** The hearing level of all CD patients demonstrated a severe to profound impairment. In seven CD patients, their hearing impairment was related to *GJB2* mutation. Five of the seven patients with CD related to *GJB2* mutation demonstrated abnormalities in one or both of the two tests. The percentage of vestibular dysfunction of the patients with CD related to *GJB2* mutation was statistically higher than in patients with CD unrelated to *GJB2* mutation and in healthy controls.

**Keywords:** Vestibular evoked myogenic potentials, caloric test

### Introduction

Since a correlation between the peripheral auditory and vestibular systems has been identified both anatomically and phylogenetically, a subgroup of children with congenital deafness (CD) may be associated with vestibular and balance impairments [1–3]. Interestingly, the vestibular disturbance in these children gradually disappears as they grow up, probably because of a compensatory mechanism of the central nervous system. However, there have been only a few reports that conducted a detailed analysis of the vestibular function in adults with CD.

CD has been reported in approximately one child per 1000 births [1]. In more than half of these cases,

the disease is caused by gene mutation. In particular, mutation in the *GJB2* gene, which encodes Cx26 in the gap junction, is known to be a most common cause (up to 50% of such cases) [2,3]. Gap junction channels enable the neighboring cells to exchange small signaling molecules. Immunohistochemical studies have revealed that Cx26 exists not only in the cochlea but also in the vestibular organs [4]. K<sup>+</sup> cycling involving gap junction protein Cx26 in the vestibular labyrinth, which is similar to that in the cochlea, is thought to play a fundamental role in the endolymph homeostasis and sensory transduction [5]. These findings suggest that mutations in the *GJB2* gene may thus cause vestibular dysfunction.

Correspondence: Katsuhisa Ikeda MD PhD, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan. E-mail: ike@juntendo.ac.jp

(Received 18 October 2009; accepted 30 November 2009)

ISSN 0001-6489 print/ISSN 1651-2251 online © 2010 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)

DOI: 10.3109/00016481003596508

In this study, the relationship between *GJB2* gene mutation and vestibular dysfunction in adults with CD was investigated to confirm whether or not there are any abnormalities associated with the vestibular function.

## Material and methods

### Subjects

The subjects in this prospective study included 21 patients with CD and 10 healthy volunteers. The patients were excluded from the study if they were being treated with ototoxic drugs or if they had a cytomegalovirus infection, bacterial meningitis, external and middle ear pathological findings, or other risk factors for inner ear damage. No participants had syndromic deafness due to pigmentary retinopathy, nephropathy, goiter, or any other diseases. Patients with vestibular dysfunction due to head trauma, brain tumor, Meniere's disease, or other conditions were also excluded from the study. All subjects underwent an otoscopic examination and were found to have a normal tympanic membrane. Audiometric testing was performed in a double-walled, sound-treated booth. All patients gave their informed consent in writing and the study was approved by the Ethics Committee of Juntendo University School of Medicine.

### Genetic analysis

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of the subjects. The coding region of *GJB2* was amplified by PCR using the primers *GJB2*-2F 5'-GTGTGCATTCGTCTTTTCCAG-3' and *GJB2*-2R 5'-GCGACTGAGCCTTGACA-3'. The PCR products were sequenced using the PCR primers and sequence primers *GJB2*-A 5'-CCACGC-CAGCGCTCCTAGTG-3' and *GJB2*-B 5'-GAA-GATGCTGCTGCTTGTGTAGG-3'. These were visualized using an ABI Prism 310 Analyzer (PE Applied Biosystems, Tokyo, Japan).

### Vestibular evoked myogenic potentials

The vestibular evoked myogenic potentials (VEMPs) were measured as described in a previous report [6]. Both sound stimuli of clicks (0.1 ms, 95 dBnHL) and short tone burst (500 Hz; rise/fall time, 1 ms, 95 dBnHL) were presented to each side of the ear through the headphones using a Neuropack evoked-potential recorder (Nihon Kohden Co. Ltd,

Tokyo, Japan). The surface electromyographic activity was recorded with the patient in the supine position from symmetrical sites over the upper half of each sternocleidomastoid (SCM) muscle with a reference electrode on the lateral end of the upper sternum. During recording, the subjects were instructed to lift their head up or to turn the contralateral side to induce hypertonicity of the SCM. Thereafter, the electromyographic signals from the stimulated side of the SCM muscle were amplified.

### Caloric test

The caloric test in the current study was performed as described elsewhere [7]. Briefly, 2 ml of ice-water (at 4°C) was irrigated in the external auditory meatus to induce a thermal gradient across the horizontal semi-circular canal of one ear. The duration of horizontal and vertical nystagmus was recorded. The results were compared between the right and left ears.

### Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Statistical analyses were conducted using a non-repeated measures analysis of variance (ANOVA). Significant effects were further analyzed by post hoc multiple comparison tests using the Student-Newman-Keuls test. A value of  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## Results

### Hearing test

The pure-tone averages of 0.5, 1.0, and 2.0 kHz are shown in Table I. The hearing impairments of CD patients ranged from severe (71–95 dB) to profound (>95 dB). The hearing levels of all controls were at the normal level (<30 dB; data not shown).

### Genetic analysis

*GJB2* mutations were found in nine CD patients (Table I). All three mutations have been described previously in association with deafness. Among these mutations, 235delC mutation was found in eight patients. One nonsense mutation (Y136X) and one frameshift mutation (176-191del) were also identified. In six patients with a homozygous *GJB2* mutation and one patient with a compound heterozygous



Table I. Results of hearing level, genetic analysis, and vestibular function of subjects with congenital deafness (CD)

Case no.	Hearing level (dB)		Sex	Age (years)	Mutation in <i>GJB2</i>	VEMPs	Caloric test
	Left	Right					
Patients with <i>GJB2</i> -related CD							
1	86	98	M	26	Homo 235delC	Right decreased	Left CP
2	106	108	M	25	Homo 235delC	Right decreased	Normal
3	108	106	M	28	Homo 235delC	Right decreased	Normal
4	108	106	M	37	Homo 235delC	Normal	Right CP
5	100	106	M	32	Homo 235delC	Normal	Right poor/left CP
6	80	91	M	25	Homo 235delC	Normal	Normal
7	115	108	M	25	Y136X/235delC	Normal	Normal
Patients without <i>GJB2</i> -related CD							
8	98	98	F	24		Left decreased	Bilateral CP
9	98	115	M	26		Normal	Bilateral CP
10	97	97	M	20		Normal	Normal
11	111	108	M	31		Normal	Normal
12	100	104	F	34		Normal	Normal
13	98	95	M	21		Normal	Normal
14	91	91	M	24		Normal	Normal
15	99	101	F	26		Normal	Normal
16	99	95	F	23		Normal	Normal
17	80	68	M	27		Normal	Normal
18	96	95	M	27		Normal	Normal
19	85	73	M	23		Normal	Normal
Patients with heterozygous <i>GJB2</i> mutation							
20	73	100	M	25	Hetero 235delC	Normal	Normal
21	97	98	M	25	Hetero 176-191del16	Normal	Normal

CP, canal paresis; Poor, nystagmus was obviously weak.

mutation (case nos 1–7); their profound deafness was thought to be caused by a *GJB2* mutation. No *GJB2* mutation was identified in any of the controls.

#### Vestibular function

No patients or controls had any subjective symptoms of vertigo. Table I shows the results of the vestibular function in all CD patients. Abnormal responses of VEMPs and the caloric test in CD with a *GJB2*-related mutation were observed in three patients each (case nos 1–5). Three patients with a homozygous *GJB2* mutation showed asymmetrical responses in VEMPs (case nos 1–3). Three patients with a homozygous *GJB2* mutation showed asymmetrical responses in the caloric test (case nos 1, 4, and 5). One of them showed both VEMPs and the caloric test

asymmetrical responses (case no. 1). One patient with a homozygous *GJB2* mutation and one patient with compound heterozygous *GJB2* mutation showed normal responses in both VEMPs and the caloric test (case nos 6 and 7). It is notable that five of the six patients with a homozygous 235delC mutation showed no abnormalities in either test. Two heterozygous patients (case nos 20 and 21) showed normal responses in both tests.

Two CD patients with no *GJB2* mutation exhibited abnormal findings for the vestibular tests (case nos. 8 and 9). One patient showed a unilateral reduction in VEMPs and bilateral canal paresis (case no. 8). Bilateral canal paresis was also observed in another patient (case no. 9).

All the controls with normal hearing showed normal responses in both the VEMPs and the caloric test (data not shown).

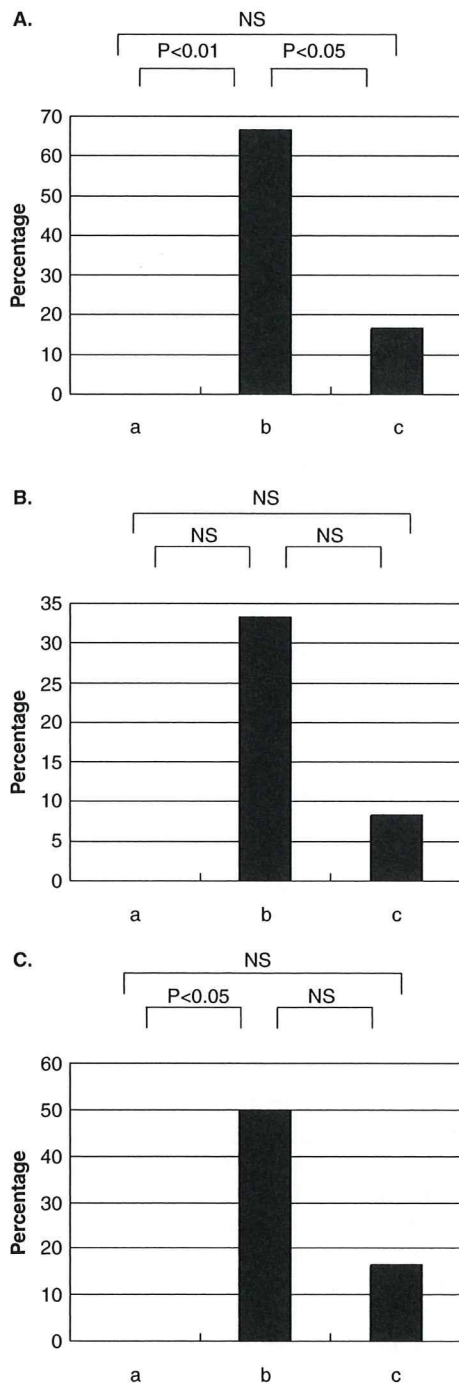


Figure 1. Comparison of the incidence of abnormality in the vestibular tests among the three groups. (A) Percentage showing abnormality in VEMPs and/or caloric test. (B) Percentage showing abnormality in VEMPs. (C) Percentage showing abnormality in the caloric test. a, Controls; b, *GJB2*-related CD subjects; c, CD subjects without *GJB2* mutations.

#### Statistical analysis of vestibular function in the three groups

Figure 1 shows a comparison of the controls, patients with CD related to a *GJB2* mutation, and those with CD without a *GJB2* mutation. The CD patients with *GJB2* heterozygous mutation were excluded from this statistical analysis, since their symptoms of hearing impairment are not necessarily caused by the *GJB2* mutation alone. Vestibular dysfunction showing an abnormality in VEMP and/or the caloric test significantly increased in patients with *GJB2*-related CD in comparison with those with CD without *GJB2* mutation ( $p < 0.05$ ) and the controls ( $p < 0.01$ ), whereas no difference was observed between CD without a *GJB2* mutation and the controls (Fig. 1A). No differences in the incidence of abnormality in VEMPs were observed among the three groups (Fig. 1B). The incidence of abnormalities in the caloric test in patients with *GJB2*-related CD differed significantly from that in the controls, but the other two comparisons were not significant (Fig. 1C).

#### Discussion

In this study, vestibular tests were performed in CD patients with or without a *GJB2* mutation by measuring the VEMPs and using the caloric test. Only one report has previously investigated the vestibular function of patients with *GJB2*-related CD [8]. The authors noted that five of the seven patients showed no VEMP responses bilaterally and that only one case had a unilateral pathological response in the caloric test, which led to the conclusion that CD with a *GJB2* mutation is associated with severe saccular dysfunction. However, in the present study, there were no patients showing the absence of both VEMP and a caloric response. Todt et al. [8] showed the existence of *GJB2* mutations that do not cause CD (polymorphisms), thus suggesting a considerable bias. Furthermore, patients with low-grade hearing loss were included in their study. In contrast, all of the *GJB2* mutations detected in the present study are known to cause CD in the Asian population [9]. In addition, the present study included only patients with severe to profound hearing loss, which would therefore clarify the correlation between CD and *GJB2* mutations. Among the seven patients with *GJB2*-related CD, five (71.4%) showed abnormal responses in either or both tests. The incidence was apparently and significantly higher than that in patients with CD without a *GJB2* mutation (2/13: 15.4%). Moreover, the incidence in the controls significantly differed from that in patients with CD related to a *GJB2*



mutation but not in those with CD without *GJB2* mutation. Therefore, these findings support the hypothesis that *GJB2* mutations play a critical role in the disturbance of the vestibular function.

*GJB2* mutations cause profound deafness and the associated mechanism has been discussed in several studies [10,11]. A recent study showed that *GJB2* is indispensable in the normal development of the organ of Corti and normal hearing on the basis of the study in *Gjb2* dominant-negative mutant mice [12]. Despite the widespread expression of Cx26 in both the cochlear and vestibular organs [4], the vestibular function impairment of the patients with a *GJB2* mutation is not as severe as the hearing dysfunction observed in the present study. Two hypotheses have been proposed to explain this inconsistency between hearing and balance function. One hypothesis is based on the fact that two temporal bone studies performed in patients with *GJB2*-related hearing impairment in the previous study revealed that one patient had mild vestibular hydrops and saccular degeneration, while another patient had a dysplastic neuroepithelium of the saccule [13,14]. This suggests that a *GJB2* mutation can cause morphological dysplasia in not an entire organ, but in part of the vestibular organs. This is contrast to the cochlea of these patients, which showed nearly total dysplasia of the organ of Corti. These histopathological studies support the results of the vestibular dysfunction of patients with *GJB2*-related CD in the present study. The other hypothesis is based on the presence of several connexins such as Cx26, Cx30 (encoded by *GJB6*), Cx31 (encoded by *GJB3*), and Cx32 (encoded by *GJB1*) in the inner ear. A previous study showed all of these connexins to be distributed in the vestibular organs [15]. Cx30 gene knockout mice had hair cell loss in the saccule, which was restored by the over-expression of the Cx26 gene [16]. Therefore, the specific loss of Cx30 causes vestibular dysfunction, which can be compensated by other types of connexins. The present clinical study in which a complete defect of Cx26 resulted in a definitive but partial dysfunction of vestibular end organs can be explained by the compensation of other connexins normally expressed in the vestibule. Further studies are required to clarify the relationship between connexins and the vestibular function.

Although there was a statistically significant difference in the objective examination of the vestibular function among patients with *GJB2*-related CD, those with CD without a *GJB2* mutation, and healthy controls, none of these subjects had any vestibular symptoms regardless of the presence or absence of a *GJB2* mutation. The peripheral

vestibular dysfunction predicted in individuals with the *GJB2* mutation may be compensated by the central vestibular system in young patients with deafness, as shown in the present study. However, aging is known to affect both the peripheral and central vestibular system [17]. In patients with a *GJB2* mutation, the vestibular symptoms may progress with aging. Another problematic point regarding patients with CD related to *GJB2* mutations is cochlear implantation, which has been reported to cause vestibular dysfunction, such as a reduction of the caloric responses [18] and a decrease in the VEMP responses [19]. It is thought that the mechanical damage caused by the insertion of the electrode may induce vestibular dysfunction [20]. In the present study, four patients with *GJB2*-related deafness showed unilateral vestibular dysfunction, while only one of them had bilateral dysfunction. Therefore, it should be emphasized that the assessment of the vestibular function in patients with *GJB2*-related CD is important to determine which side of the ear should be selected to insert the cochlear implant.

## Conclusions

A *GJB2* mutation is responsible not only for deafness but also for vestibular dysfunction. However, such vestibular dysfunction is likely to be unilateral and less severe in patients with a *GJB2* mutation than in those with bilateral deafness.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- [1] Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16–31.
- [2] Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999;353:1298–303.
- [3] Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, et al. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 1999;36:829–32.
- [4] Masuda M, Usami S, Yamazaki K, Takumi Y, Shinkawa H, Kurashima K, et al. Connexin 26 distribution in gap junctions between melanocytes in the human vestibular dark cell area. *Anat Rec* 2001;262:137–46.
- [5] Wangemann P. K(+) cycling and its regulation in the cochlea and the vestibular labyrinth. *Audiol Neurootol* 2002;7:199–205.
- [6] Jin Y, Nakamura M, Shinjo Y, Kaga K. Vestibular-evoked myogenic potentials in cochlear implant children. *Acta Otolaryngol* 2006;126:164–9.



- [7] Yukiko S, Yulian J, Kimitaka K. Assessment of vestibular function of infants and children with congenital and acquired deafness using the ice-water caloric test, rotational chair test and vestibular-evoked myogenic potential recording. *Acta Otolaryngol* 2007;127:736–47.
- [8] Todt I, Hennies HC, Basta D, Ernst A. Vestibular dysfunction of patients with mutations of Connexin 26. *Neuroreport* 2005;16:1179–81.
- [9] Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Later L, V, et al. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003;112:329–33.
- [10] Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, et al. Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet* 2003;12:995–1004.
- [11] Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, et al. Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 2002;12: 1106–11.
- [12] Inoshita A, Iizuka T, Okamura HO, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, et al. Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative Gjb2 transgenic mice. *Neuroscience* 2008;156:1039–47.
- [13] Griffith AJ, Yang Y, Pryor SP, Park HJ, Jabs EW, Nadol JB Jr, et al. Cochleosaccular dysplasia associated with a connexin 26 mutation in keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Laryngoscope* 2006;116:1404–8.
- [14] Jun AI, McGuirt WT, Hinojosa R, Green GE, Fischel-Ghodsian N, Smith RJ. Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 2000;110:269–75.
- [15] Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *J Comp Neurol* 2003;467:207–31.
- [16] Qu Y, Tang W, Dahlke I, Ding D, Salvi R, Sohl G, et al. Analysis of connexin subunits required for the survival of vestibular hair cells. *J Comp Neurol* 2007;504: 499–507.
- [17] Gazzola JM, Perracini MR, Gananca MM, Gananca FF. Functional balance associated factors in the elderly with chronic vestibular disorder. *Braz J Otorhinolaryngol* 2006;72:683–90.
- [18] Buchman CA, Joy J, Hodges A, Telischi FF, Balkany TJ. Vestibular effects of cochlear implantation. *Laryngoscope* 2004;114:1–22.
- [19] Ernst A, Todt I, Seidl RO, Eisenschenk A, Blodow A, Basta D. The application of vestibular-evoked myogenic potentials in otoneurosurgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;135:286–90.
- [20] Jin Y, Shinjo Y, Akamatsu Y, Ogata E, Nakamura M, Kianoush S, et al. Vestibular evoked myogenic potentials evoked by multichannel cochlear implant – influence of C levels. *Acta Otolaryngol* 2008;128:284–90.

## 実験動物を用いた内耳細胞治療研究へのアプローチ

神谷 和作・池田 勝久

## Experimental Approaches to Inner Ear Cell Therapy Using Laboratory Animals

Kazusaku Kamiya and Katsuhisa Ikeda

(Juntendo University School of Medicine)

Recently, a number of clinical studies on cell therapy have been reported and used in clinical practice for several intractable diseases. Inner ear cell therapy for sensorineural hearing loss also has been studied using some laboratory animals, although to date reports on successful hearing recovery have been few.

Previously, we developed a novel rat model of acute sensorineural hearing loss due to fibrocyte dysfunction induced by a mitochondrial toxin and performed cell therapy with bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). In this study, we injected MSCs into the lateral semicircular canal; a number of these stem cells were then detected in the injured area in the lateral wall. Rats with transplanted MSCs in the lateral wall demonstrated a significantly higher hearing recovery ratio than the untreated controls. These results suggested that mesenchymal stem cell transplantation into the inner ear may be a promising therapy for patients with sensorineural hearing loss due to degeneration of cochlear fibrocytes.

In this article, we review studies on inner ear cell therapy using some laboratory animals including rodents such as mice and rats, and primates such as cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*).

**Key words :** inner ear, cell therapy, sensoryneural hearing loss, stem cell

## はじめに

感音性難聴の原因は多岐にわたるが、近年の遺伝子改変動物開発技術の向上や多種のモデル動物の開発により多くの病態メカニズムが解明に近づいている。すべての先天性疾患の中でも頻度の高い遺伝性難聴においては、難聴家系や突然変異難聴マウスの遺伝子解析によって多くの遺伝性難聴原因遺伝子が同定されている。初期に発見された遺伝性難聴の原因の多くは内耳有毛細胞の変性または機能的・形態的異常であったため、多くの研究者が有毛細胞を中心に難聴の病態メカニズム解明に取り組んできた。哺乳類の有毛細胞は再生能力を持たないため遺伝子導入などによる有毛細胞再生の誘導も盛んに研究されてきた<sup>1)2)</sup>。その一方で内耳への細胞移植による有毛細胞の修復の試みも行われているが、特殊なリンパ液で満たされた内耳の構造的特徴から、聴力を保持しつつ標的部位に移植細胞を到達させ分化させることは容易では

ない。そのため有毛細胞の修復には多種のモデル動物を用いた多くの検討実験が必要と考えられる。近年有毛細胞以外にも蝸牛線維細胞などの機能異常が単独で難聴病態の引き金となることも明らかとなっており、多様な治療戦略が求められている。幹細胞の損傷部への移動能力や組織環境（ニッチ、niche）による分化誘導を十分に検討すれば細胞治療は内耳組織変性に対する治療にも応用可能と考えられる。著者らの報告では実験的に蝸牛線維細胞のみに傷害を与えたラットへ半規管外リンパ液を経由した細胞液還流法を用いることにより、損傷部の修復と聴力回復率を高めることに成功した<sup>3)</sup>。現在はヒト疾患に近い遺伝性難聴モデル動物への各種の幹細胞移植に取り組んでいる。また、サル類を用いた細胞移植アプローチの検討も今後応用性を高めるためには非常に重要であるため現在、カニクイザルによる検討を行っている。各種のモデル動物の特徴を考慮した細胞移植実験検討を