

用し過剰発現させることにより効率的な幹細胞の組織導入が可能となると考えられる。

2. 学会発表  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

```

caaatcaaaaggaatggagacaaataatatyttaccctcagttccatccacggcatabctatc
      H E D N N H L P Q F I H G I L S
aacatctcattctctatc//cctatctcctcgacaattgataggtactctggctatctgt
      T S H S L F I I L L T I D R Y L A I V
tcctgctgctgttctctttaaagcaggacagttacccttggggcgaatacaagtgtagt
      H A V F A L K A R T V T F G U I T S V U
cacttgggtgggtggctgtgtgcctctctaccaggaatcatabttactaaatccaaaca
      T W V V A V F A S L P G I I F T K S K Q
agatgatcaccattacacctgtggcccttattttacacaactgtggaagaatbtccaac
      D D K H Y T C G P Y F T Q L W K N F Q T
aataatgagaaatctctgagcctgatctctctacttctcagtggtcactctgctaactc
      I H R N I L S L I L P L L V H V I C Y S
aggaatctctccacacctgttctgtgtaggagaagaaggcacaggctgtgtgag
      G I L H T L F R C R H E K K R H R A V R
gctcactctctccatcat//cactggggagcaagaggtctcgggtgggtgtgtaa
      L I F A I M T G E Q E V S V G L *

```

図1 走化性因子レセプターCCR2

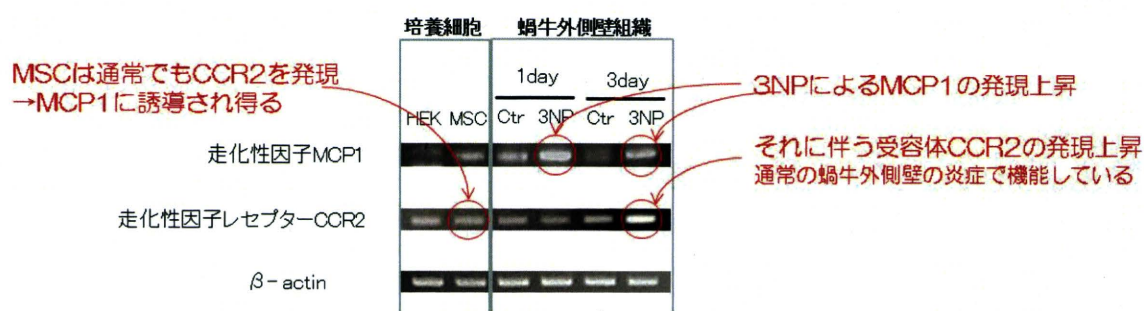
```

gccagctctctctctctccaccaccatgcaggtccctgctatgctctctgggctgctgtt
      H Q V P V H L L G L L F
cacagttccgggtggagcaccacgtgttggctcagccagatgcagttaacgcccact
      T V A G W S I H V L A Q P D A V N A P L
cacctgctgtactcattcaccagcaagatgatcccaatgagtaggcyygagagctaca
      T C C Y S F T S K H I P H S R L E S Y K
gaggatcaccagcagcaggtgtcccaagaagctgtagttttgtccaagctcaagag
      R I T S S R C P K E A V V F V T K L K R
agaggtctgtgtgaccccaagaaggaatgggtccagacatacattaaaaacctggatcg
      E V C A D P K K E W V Q T Y I K N L D R
gaaccaatgagatcagaacctacaactttatttaaaactgcactgcoctaaggtcttc
      N Q H R S E P T T L F K T A S A L R S S
agcaccttgaaatgtaggtgaccgtaaatctgaagctaatgcactccactacctttc
      A P L N V K L T R K S E A N A S T T F S
cacaaccacctcaagcactctgttaggagtgaccaggtgtgacagtgactagtygtactc
      T T T S S T S V G V T S V T V N *

```

図2 走化性因子MCP1

## MCP1、CCR2のmRNA発現の変化



- MCP1: 3NP投与後、高発現状態を保っている。
- CCR2: 3NP投与後3日で高度に発現している。
- MSCはMCP1、CCR2を発現している

図 3. 蝸牛線維細胞および骨髄間葉系幹細胞における 3NP 投与後の MCP1 とその受容体 CCR2 の mRNA 発現の変化

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および各種発現ベクターの開発

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活性因子 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 ニトロプロピオン酸 (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。更には各種幹細胞へ CCR2 遺伝子を導入し同遺伝子の安定発現株を得るためのベクターとして CCR2 発現レンチウイルスを開発し、これにより CCR2 安定発現間葉系幹細胞を作製した。

さらに移植細胞の染色体へ目的遺伝子を容易に組換え導入することが出来る FlpIn システムをつかった遺伝子導入法も用い、幹細胞の効率的な遺伝子導入システムを行った。

## 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 CCR2 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。)

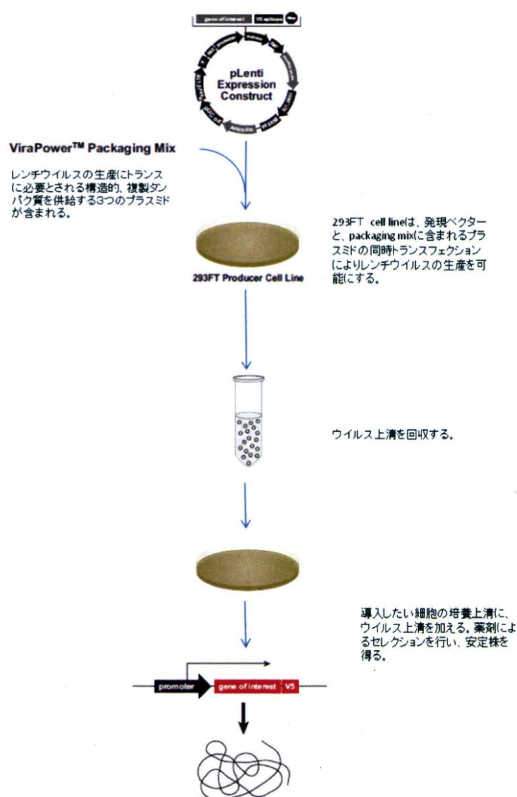
上記の走化性因子レセプター CCR と同様の方法でクローニングを行った。

### CCR2 発現レンチウイルスの開発

本研究では、走化性因子レセプター CCR2 の安定発現株を得るために、Invitrogen 社の ViraPower Lentiviral Expression Systems を用いた。このシステムでは、遺伝子発現を誘導するための薬剤濃度検討の必要がなく、簡便に走化性因子レセプター CCR2 の恒常発現が可能となる。

### ViraPower Lentiviral Expression

Systems では、ヒト HIV-1 由来のレンチウイルスのゲノムの 3' LTR を欠損させ、ターゲットの細胞に侵入し細胞のゲノムに組み込まれるとパッケージング可能なゲノムを作れなくなる“自己不活化”などの改変を加え、安全に哺乳類細胞への目的遺伝子の導入と細胞内での高い発現を可能にしている。以下に概要を示す。



ウイルス作製システムの概要 (Invitrogen 社より)

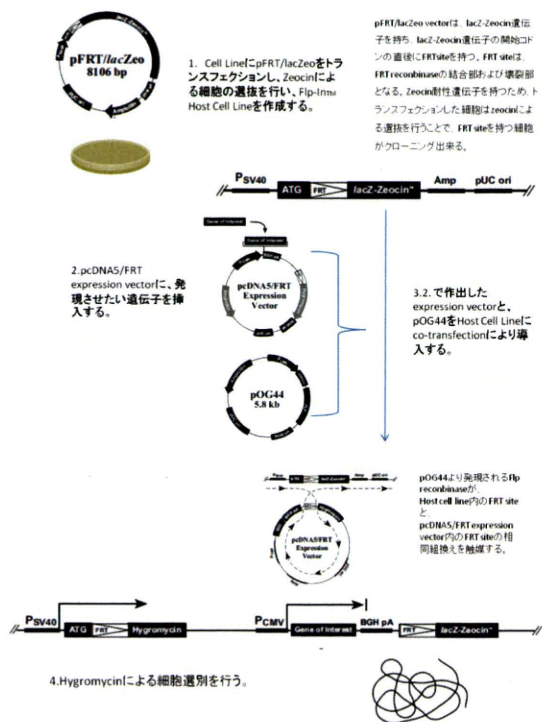
本研究では、発現ベクターとして pLenti6/V5 Directional TOPO vector を用いた。このベクターでは、方向性を持った目的遺伝子の導入が短時間で効率的に行うことが可能であり、また、目的遺伝子の下流に V5 epitope を持たせることが出来るため、目的遺伝子の発現を容易に調べることが出来る。図 5 のようにしてプラスミドベ

クターへ走化性因子レセプター CCR2 を導入した。

同プラスミドをウイルスパッケージングミックスとともに 293T 細胞へ遺伝子導入することにより培養上清中にレンチウイルス Lenti-CCR2-V5 を得た。

### Flp-In システムによる幹細胞への効率的遺伝子導入システムの開発

本研究では走化性因子レセプター CCR2 の一過的、局所的発現を可能とするため、Clontech 社の Tet-on Advanced Inducible Gene Expression System を用いた。より確実に細胞内で走化性因子レセプター CCR2 を発現させるために、Invitrogen 社の Flp-In System を利用した。このシステムでは任意の哺乳類 cell line の細胞内で、特定のゲノム領域に目的遺伝子を挿入し発現させることが出来るため、安定した発現株を得ることが可能となる。選択した細胞種のゲノムに Flp Recognition Target (FRT) site を導入する。発現ベクターに目的遺伝子を導入すると、FRT site における Flp recombinase に媒介される DNA の相同組換えによりゲノムへ挿入される。以下に、Flp-In System の概要を示す。



FlpIn システムによる遺伝子組換えの概要 (Invitrogen 社 説明書より)

本研究では、pcDNA5/FRT expression vector と し て 、 pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO vector を利用した。このベクターは、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)/TetO2 プロモーターを持ち、広い哺乳類の細胞種での目的遺伝子のテトラサイクリン制御による高発現が可能となっている。更に、TOPO cloning site は迅速で、効率的なクローニングを可能としている。pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO vector への CCR2 遺伝子の導入は以下のようにして行った。

マウス内耳組織より抽出したクローニングした走化性因子レセプターCCR2 の 3' 末端に TOYOBO 社の A-attachment mix を用いてデオキシアデニン(A)の付加を行った。pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO vector の末端に付加している TOPO isomerase

I の働きにより、CCR2 の 3' 末端に付加されたデオキシアデニン(A)と、pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO vector 3' 末端のデオキシチミジン(T)との結合されることにより、走化性因子レセプターCCR2 遺伝子を pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO vector に導入した。図 6 に、概要を示す。

### 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。

また前述の方法で得られた CCR2 発現レンチウイルスは MSC への感染が認められ、薬剤選抜により CCR2-V5 を安定発現する MSC が樹立された。

更に間葉系幹細胞において今後の遺伝子組み換えを容易にする FRT 組換えサイトを染色体上に挿入することに成功しており、今後前述した FlpIn システムを用いた組み換えにより多くの遺伝子が効率的に染色体へ導入するシステムを開発した。

### 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。

またCCR2発現レンチウイルスの開発によりCCR2安定発現間葉系幹細胞が開発された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

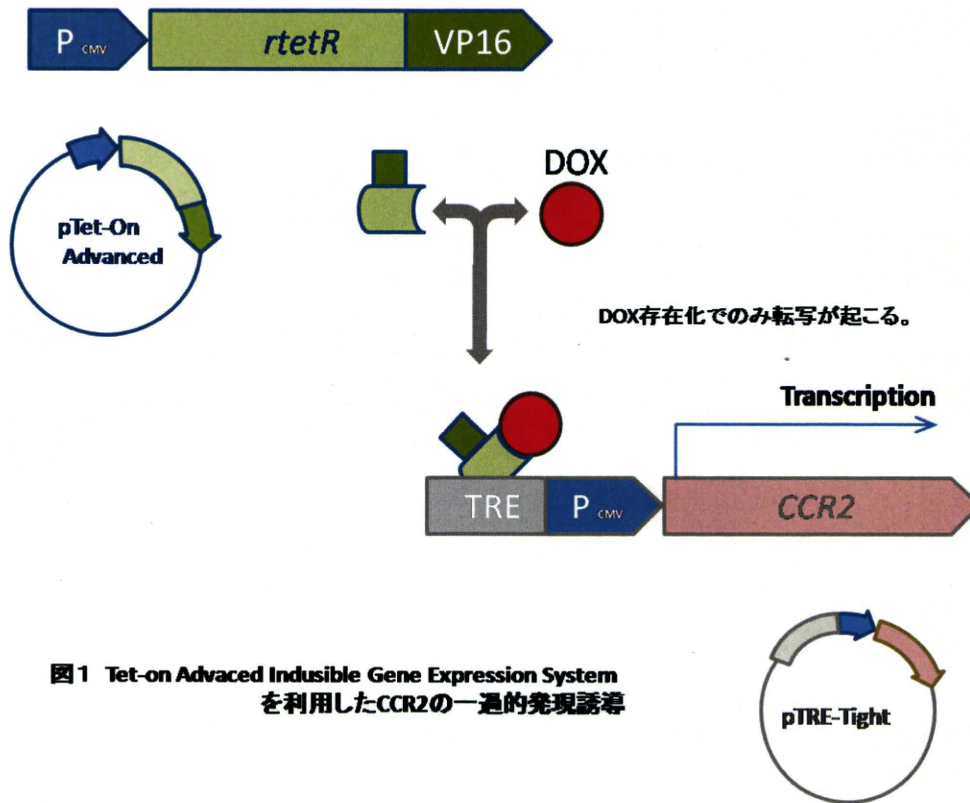
なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



```

tgcacatcataaaggagccatcacctgtaaagccatgcaagttcagctgctgcaaaagcc
agaagagggcatggabtccaaccacatgtgctaagaattgaacttgaatcatctgcaaaaa
caaatcaaaaggactcgaagacaataatctgttaacctcagttcatccacggcatactatc
      M E D N N M L P Q F I H G I L S
aacatctcattctctatttacaagaaagtatccaagagcttgatgaagggccaccacacc
  I S H S L F T R S I Q E L D E G A T T P
gtatgactacgatgatggtgagccttgtcataaaaaccagttgaaagcaaatggagcttg
  Y D Y D D G E P C H K T S V K Q I G A W
gatcctgcctcca // gagaagttcogaaggtatctctccatatttttcagaagca :
  I L P P      E K F R R Y L S I F F R K H
cattgctaaccgtctctgcaaacagtgccacgtttcttatagggagacagcagatcgagt
  I A K R L C K Q C P V F Y R E T A D R V
gagctctacattcactcctccactggggagcaagaggctctcgggtgggttgtaagtaa
  S S I F T P S T G E Q E V S V G L *
gtgacagtttgcttttttaagcagggaggaggagcagtggtgacatagcaacaagc
ctcaaaagacagtggttcttactttgggtca //ccctatgaggagcctcttggctgtg
gcaatattattttaccaattctcaccatgtttttcttacttatgacatgaaagacatgg
aatttaagaaaaggggcatgaggtctcaggactgagtgagaaggaggagatatgact
gttgctcctgagtgaaaatggaatgaaagtgagcagggtctcaaatctctctctcaatt

```

図2 走化性因子レセプターCCR2

```

gcagagagccagacgggaggaagggccagcccagcaccagcaccagccaactctcaatgaa
gccagctctctctctcctccaaccctgcaggctcctctgcatgctctctggcctgctgtt
      M Q V P V M L L G L L F
cacagttgctggctggagcatccactgtgtggctcagccagatgcagttaaagccaccct
  T V A G W S I H V L A Q P D A V N A P L
caactgctgctactcattcaccagcaagatgatcccaatgagtaggctggagagctcaa
  T C C Y S F T S K M I P M S R L E S Y K
gaggaaccaccagcagcaggtgtccaaagaagctgtagtttttggccaccaagctcaagag
  R I T S S R C P K E A V V F V T K L K R
agagytctgtgctgaccccagaaggaatgggtccagacatacatataaaacctggatog
  E V C A D P K K E W V Q T Y I K N L D R
gaaccaaagagatcagaacctacaactttatttaaaactgcatctgccctaaggtcttc
  N Q M R S E P T T L F K T A S A L R S S
agcacctttgaaatggaagtgaaccgtaaatcgaagctaaatgcacactaccctttc
  A P L N V K L T R K S E A N A S T T F S
caacaaccctcaagcactctctgtaggagtgacccagttgacagtgaactagttgtgactc
  T I T S S I S V G V I S V I V N *
ggactgtgatgcttaataataataaacttatttaactatttgatgtatggattatcc
tttcaatgaatacctaaatctttaaagtgaaggtgtggatcatcttctcctctctggga
atccagattcaacactttcaatgtatgagagatgaattttgtaaaatgaatgggtaaac

```

図3 走化性因子MCP1



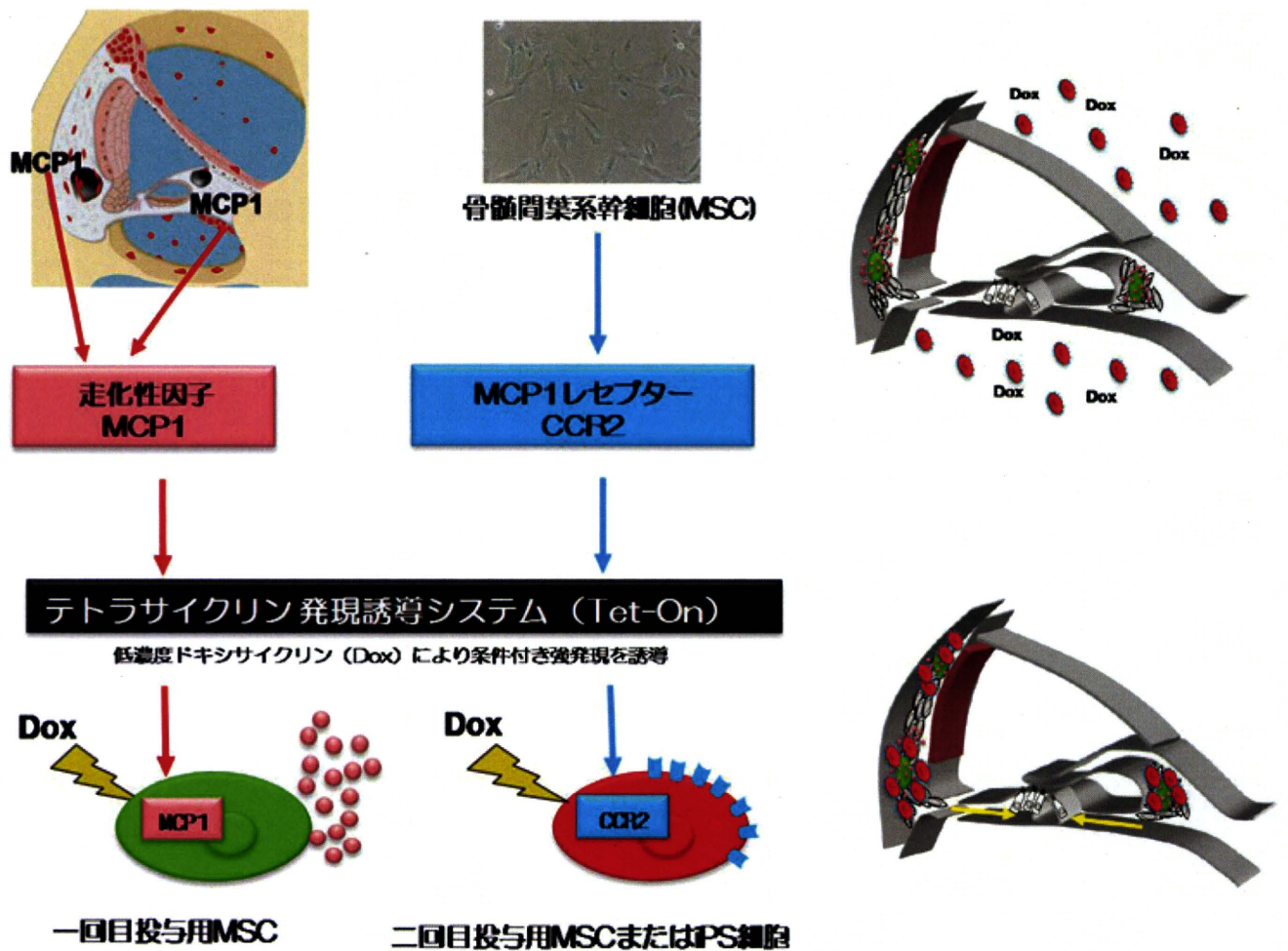
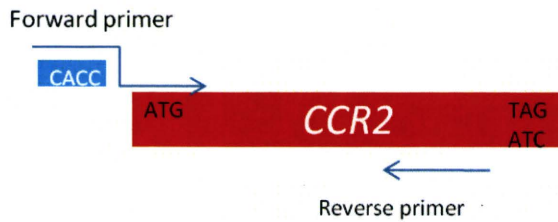


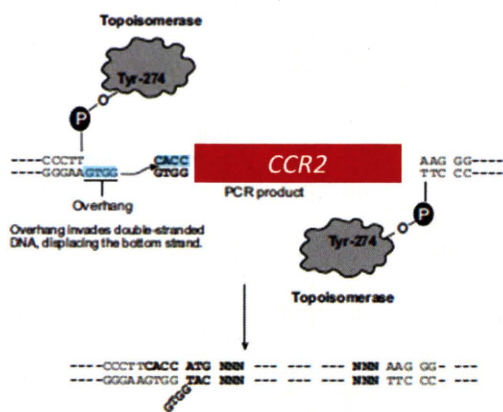
図 4 移植細胞の導入効率を飛躍的に向上させるための MCP1、CCR2 によるテトラサイクリン発現誘導システムの概要  
 第一次移植細胞として MCP1 発現 MSC（緑色蛍光標識）を蝸牛外リンパ液内へ還流投与。その後第二次移植細胞として CCR2 発現 MSC の還流投与を行う。第二次移植細胞の還流液には低濃度ドキシサイクリン（テトラサイクリン）を含有させ、両遺伝子の強発現を開始させる。これにより第一次移植後に細胞侵入した少量の MSC は MCP1 を強発現し、その受容体である CCR2 を強発現する第二次移植細胞が大量に蝸牛組織に誘導される。



CCR2遺伝子の開始コドンの直前にCACCを付加したForward primerと、終始コドンの直前の配列から増幅させるようなReverse primerを組み合わせてPCRを行った。



開始コドンの直前にCACCの配列を持ち、終始コドンを持たないPCR産物を得た。



pLenti6/V5-D-TOPO vectorは、クローニングサイトにGTGG残基を持った直鎖上のベクターで、Topoisomeraseが付加されている。

CACCを付加したPCR産物がGTGG残基に相同的に結合すること、Topoisomeraseによる触媒反応により、高効率な方向性を持ったクローニングが可能となっている。また、CCR2遺伝子本来の終始コドンを欠損させているため、V5 epitopeまで連続した転写が起こることによってCCR2とV5 epitopeのキメラのタンパク質が生産される。

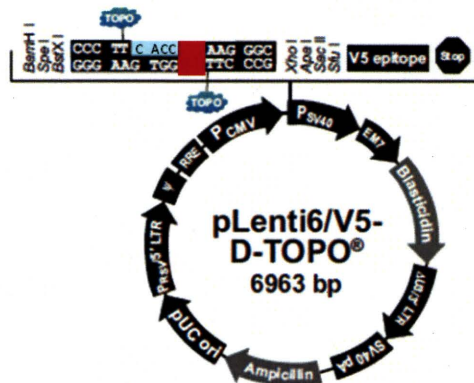


図5 CCR2-V5 発現レンチウイルス作製用プラスミドベクターの開発

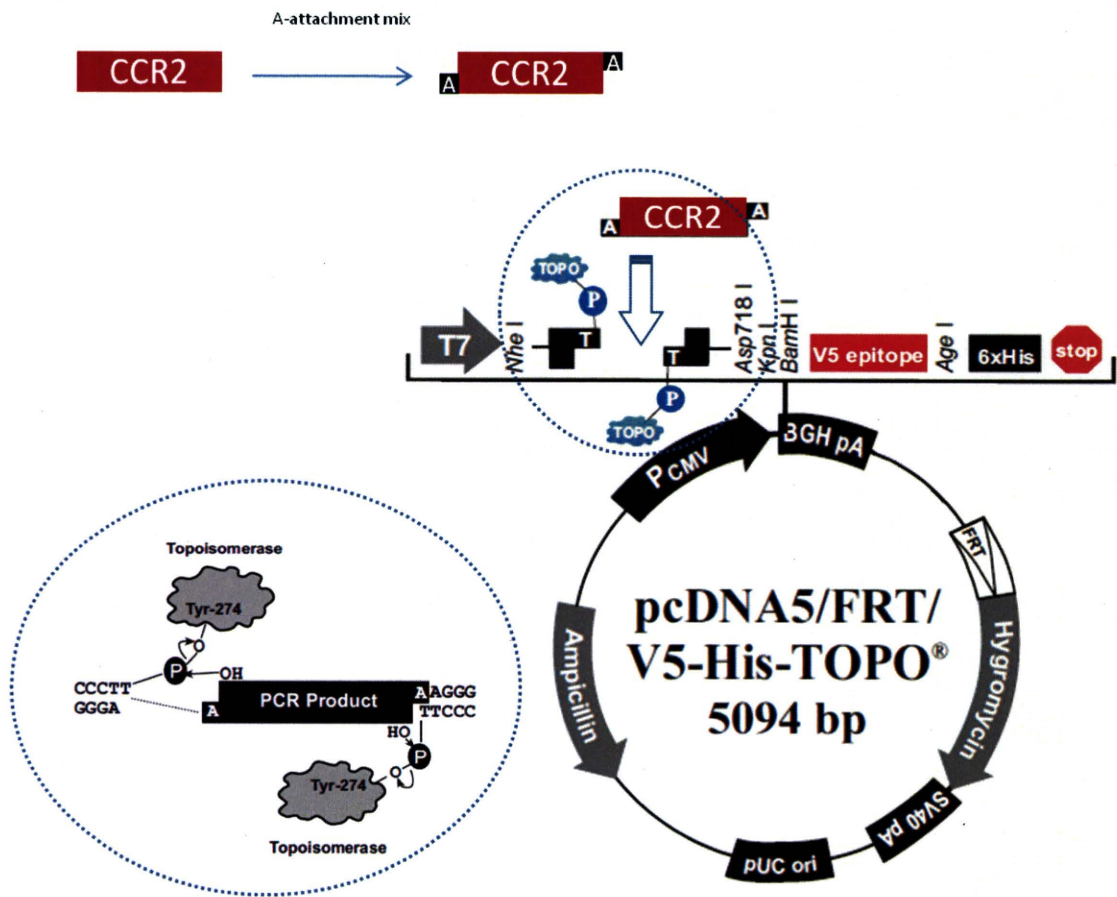


図6 FlpIn 遺伝子組換えシステムのための CCR2-V5 組換え用プラスミドベクターの作製

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移植する系を確立した。我々はこれまで骨髄間葉系幹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たに確立した (*Am J Pathol* 171:214-226, 2007)。同方法を応用することにより、単に細胞を移植するだけでなく遺伝子変異を持つ細胞を正常細胞に

分化誘導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 X10<sup>5</sup> cells in 20 $\mu$ l 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。

### 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 1 $\mu$ l の 300mM の 3-NP を投与した。

また、細胞移植効率の向上を目的とし、3NP 投与後の炎症反応を利用して生着効率を高める方法を検討した。3NP 投与後、蝸牛外側壁では炎症反応が生じるとともにケ

モカインである MCP1 が発現する。そこへ MCP1 のレセプター、CCR2 を持つ MSC が引き寄せられて、外側壁に引き込まれて修復反応がおこると考えられる。この反応を応用し、CCR2 を過剰発現する細胞を作成した。マウス内耳より得た CCR2 遺伝子をクローニングし、プラスミドベクターへ挿入し、V5 tag を付加した CCR2 の発現クローンを作製した。この細胞を同様の方法で 3NP 投与後にマウス内耳へ投与を行った。

## 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。

CCR2 を過剰発現した細胞を投与した群では、生着率の更なる向上を認めたが、軽度の改善であり、今後は CCR2 を安定発現する細胞を作成予定である。

## D. 考察

MSC は多分化能を持ち、骨・軟骨や心血管系への分化をし得ることが報告されている。

骨関節疾患の再生医療においてすでに臨床応用されており、最近ではMSCを用いた心疾患患者への細胞移植も行われている。

MSCは自己の体内にある細胞であること、また他の幹細胞と比較し腫瘍化が少ないため、安全性が高いと考えられている。

同じ様な方法論を用いて、本実験では安全かつ有効にマウス蝸牛組織内にMSCを誘導する実験方法の確立を検討した。

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であるMCP1の誘導が促進され、それに伴いCCR2のレセプターであるCCR2が過剰発現する。このことにより、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高めることができると考えられる。そこで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細胞を作成した。この細胞の投与にしたところ、細胞の導入効率は向上を認めている。今後は細胞のCCR2発現率を更に高め、移植する予定である。

なし

また、実験系の確立により内耳疾患モデルマウスに同実験を行いMSC誘導に伴う治療結果の評価を検討する方針である。

#### 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。

また、炎症反応を応用し作成した細胞を投与することで更に移植効率の向上を認めた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

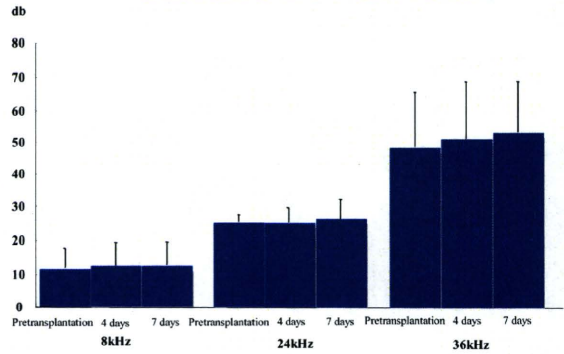
Hiromi Kasagi et al. Transplantation of bone marrow Mesenchymal stem cell into neonatal, adult and aged mouse cochlea. 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2010年2月 米国 アナハイム

#### H. 知的財産権の出願・登録状況



幼若マウスの前庭組織では多くのMSC（緑）の組織定着が確認された。

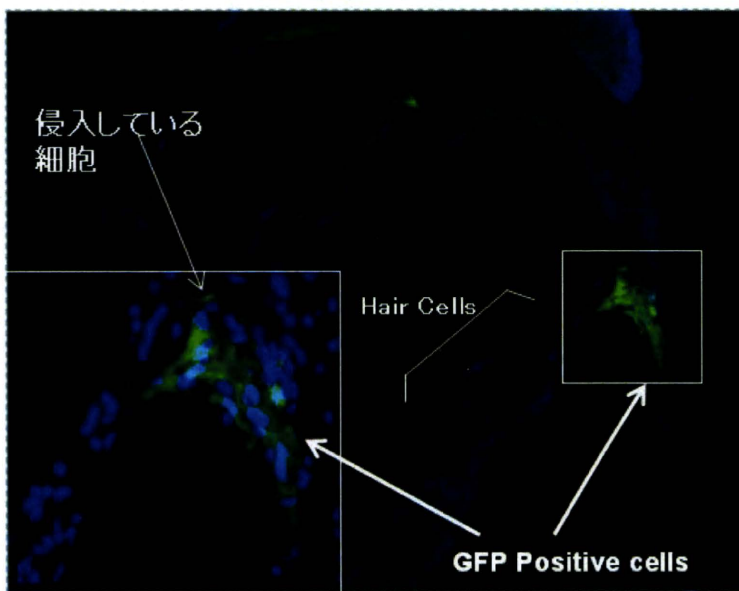
### MSC細胞投与後の聴力変化



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。

### MSC+3NP投与後の成熟マウス内耳



**3NP+MSC投与（MSC投与後1週間）**  
 MSC細胞が移植され、蝸牛外側壁内への生着が認められた。一部ラセン靭帯内への侵入を認める。

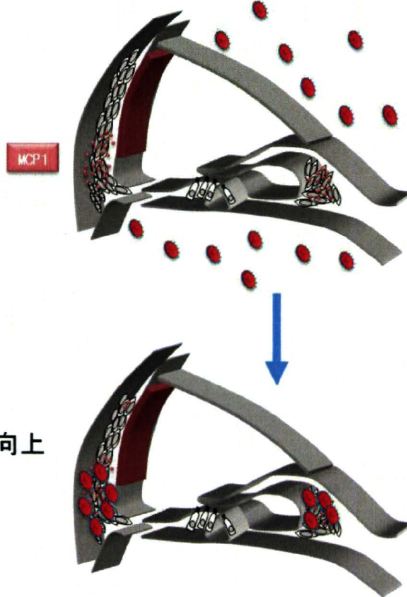
## 幹細胞導入効率向上の検討

3NP投与後、MCP-1が発現

CCR2を過剰発現させたMSCを投与



MSCの蝸牛組織内への細胞侵入率の向上が期待出来る。



3NPにより蝸牛外側壁に軽度の炎症を起こした後、CCR2 過剰発現細胞を投与。

蝸牛外側壁に多くの細胞の生着を認めた。



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Connexin26（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

我々は正円窓経由で 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クシン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、膨大部および卵形嚢において、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、正円窓経由に 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

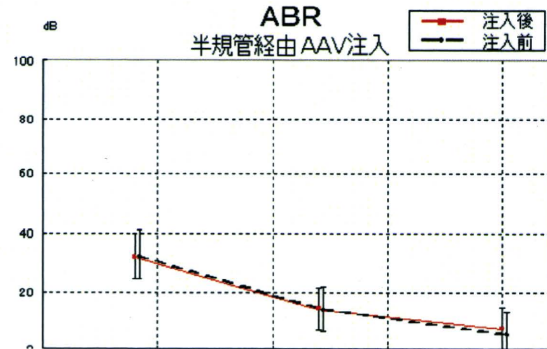
##### 2. 学会発表

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

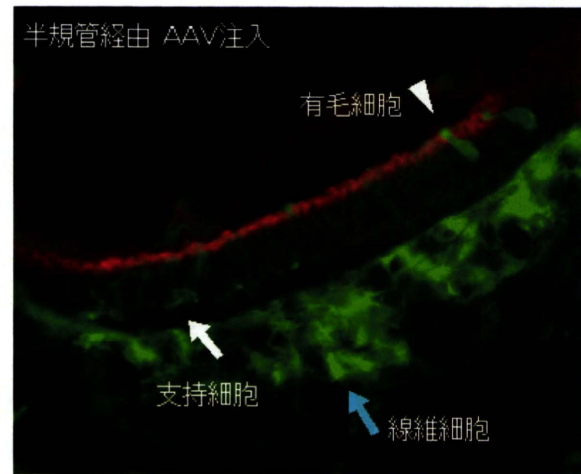
, 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2010年2月 米国 アナハイム

#### 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。