

201224042A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(感覚器障害分野)

早期遺伝子診断後の臨床応用を目指した遺伝性難聴の
高効率内耳細胞治療法の開発

平成24年度 総括分担研究報告書

研究代表者 神谷 和作

平成 25(2013)年 5月

目 次

II. 総括研究報告

早期遺伝子診断後の臨床応用を目指した遺伝性難聴の高効率内耳細胞治療法の開発 -----	3
神谷和作	

II. 分担研究報告

1. 遺伝性難聴の遺伝子解析 : 先天性難聴での GJB2 の遺伝子変異解析-新たな COMMON MUTATION の確立 -----	22
林千江里 池田勝久	
2. 遺伝性難聴モデルマウスの開発 : P0-Cre マウスによる内耳特異的 Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作 製 -----	25
美野輪治 神谷和作	
4. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 1 : Connexin26 変異遺伝子の強制発現によるギャップ結合の分子イメージング -----	29
神谷和作 池田勝久	
5. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 2 : Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおけるコルチ器周囲細胞のアポ トーシスと細胞増殖における異常 -----	34
井下綾子 神谷和作 池田勝久	
6. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 3 : Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおける蝸牛コネキシン 26 タンパ ク質相互作用因子の変化 -----	37
村木美帆 神谷和作	
7. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 4 : Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスの蝸牛プロテオーム解析によるコ ルチ器および蝸牛外側壁構成タンパク質の変化 -----	41
村木美帆 神谷和作	

8. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 1 : 骨髄間葉系幹細胞および蝸牛線維細胞変性における走化性因子およびその受容体に関する遺伝子発現解析 -----	45
小川佳奈 神谷和作	
9. 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 -----	49
小川佳奈 神谷和作	
10. 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 -----	58
神谷和作 池田勝久	
11. 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 -----	63
飯塚崇 池田勝久	
12. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 5 : ウイルスベクターを用いた前庭組織への遺伝子導入法の検討 -----	65
岡田弘子 飯塚崇 池田勝久	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	69

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）
総括研究報告書

早期遺伝子診断後の臨床応用を目指した遺伝性難聴の
高効率内耳細胞治療法の開発
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

遺伝性難聴は約 1,600 出生に 1 人と高頻度に発症し聴覚と言語発育障害の極めて高度な QOL の低下をもたらす。遺伝性難聴の根本的治療法は未だ存在しないが、我々は骨髄間葉系幹細胞を使って蝸牛線維細胞損傷モデルの聴力を改善させることに成功している。本研究では我々の開発した細胞移植法を応用し、遺伝性難聴の中で最も高頻度に発生するコネキシン 26 遺伝子の欠損モデルマウス (Cx26cK0) の聴力回復実験により、新規治療法を開発することを目的とした。

内耳への移植細胞として骨髄間葉系幹細胞、人工多能性幹 (iPS) 細胞由来内耳前駆細胞、生体内耳幹細胞を用いた。移植細胞は半規管の外リンパ液還流法によって内耳に投与し、聴性脳幹反応 (ABR) によってモニタリングした。蝸牛組織への幹細胞誘導 (ホーミング) 因子を RT-PCR 法により発現遺伝子解析し、免疫染色により発現する局在を同定した。

遺伝子発現解析により蝸牛組織から分泌されるホーミングリガンド因子として MCP1 および SDF1 が同定された。これらの因子は心筋梗塞の際の幹細胞ホーミング因子としても知られており内耳でもこの機構を介した幹細胞誘導が行われることが示された。移植幹細胞においても培養上清中に MCP1、SDF1 を一定の条件で加えることによりこれらの受容体 CCR2、CXCR4 (ホーミング受容体) の発現を大きく上昇させることに成功した。

上記の方法で Cx26cK0 マウスにおけるホーミングリガンドと移植細胞のホーミング受容体を同時に惹起して内耳細胞移植を行ったところ蝸牛への細胞導入効率が約 4 倍上昇した。

近年各種臓器において幹細胞ホーミングの分子機構が明らかになっており、内耳においても今回初めて蝸牛組織への幹細胞誘導機構が明らかとなった。これを応用し生体組織におけるホーミングリガンド分子と移植細胞のホーミング受容体因子を同時に惹起することにより、遺伝性難聴モデルへの幹細胞導入効率は大幅に上昇することが示された。同方法を発展させることにより多量の多能性幹細胞を蝸牛組織内へ誘導させ、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善が更に現実化すると考えられる。

A. 研究目的

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。全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。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な特徴から、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（ニッチェ、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經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（図9）。現在はヒト疾患に近い遺伝性難聴モデル動物への

骨髄間葉系幹細胞に取り組んでいる。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積み重ねることにより、将来的には有毛細胞も標的とした多様な難聴に対する聴力回復も不可能ではないと考えられる。

B. 研究方法

マウス骨髄間葉系幹細胞調整および標識

生後8週齢のC57BL/6マウス大腿骨を摘出、細胞培養液での骨髄還流により骨髄細胞を得た。同細胞にEGFP（緑色蛍光）またはDsRed1（遠赤色蛍光）発現レトロウイルスにより標識した。

正常マウスおよび遺伝子改変マウス（Connexin26 R75W-Tg, Connexin26 KO）を麻酔後、後半規管および外側半規管に小孔を開け（図1）、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。1 X 10⁵ cells in 20μlの間葉系幹細胞細胞液を10分間の注入により還流する。移植後1週間毎に聴力を聴性脳幹反応（ABR）および歪成分耳音響放射（DP-OAE）により測定。細胞移動を観察するためHcRed1標識した間葉系幹細胞細胞液を移植2週間後に追加投与する実験群を設ける。移植4週間後に蝸牛を採取する。上記と同様の方法で移植6週間までの長期モニタリングを平行して行った。

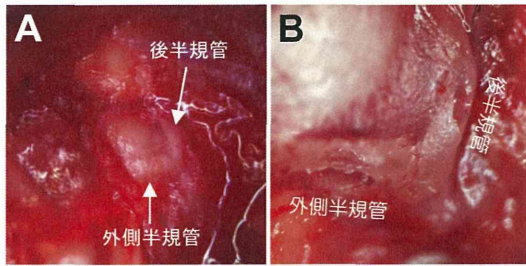


図 1 A. 経半規管細胞移植時の成熟マウス半規管。B. 後半規管および外側半規管に細胞液を還流するための小孔を開け一方に微小チューブを挿入し細胞液を注入、もう一方より外リンパ液を排出する。

C. 研究結果

移植用幹細胞の樹立

まず C57BL/6 マウス由来 H1/A 骨髄間葉系幹細胞株に EGFP 遺伝子をレトロウイルスにて発現させ、安定的に強い緑色蛍光を持つ細胞をクローニングした。さら H1/A より遠赤色光を発する HcRed 発現細胞も同様の方法にて作成し移植用細胞を樹立した。

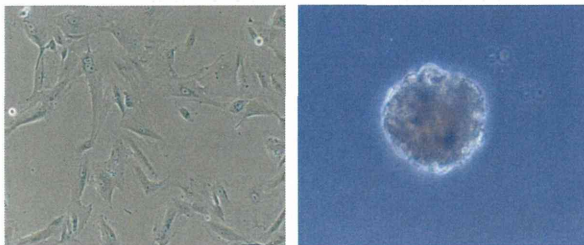


図 2 マウスへ骨髄間葉系幹細胞およびリンパ液漏出を防ぐために使用した細胞塊。

骨髄間葉系幹細胞の幹細胞の経半規管移植後半規管および外側半規管に小孔をあけ、後半規管より 2×10^5 cells を還流し、小孔の修復のために MSC の無接着培養により作成した細胞塊 (cell sphere、図 2) を小孔部に挿入することにより術後のリンパ液の漏出を抑えた。同方法により挿入された移植細胞塊は術後 2 週間においても半規管組織内において維持、さらには進展し

ていることが確認されている (図 3)。

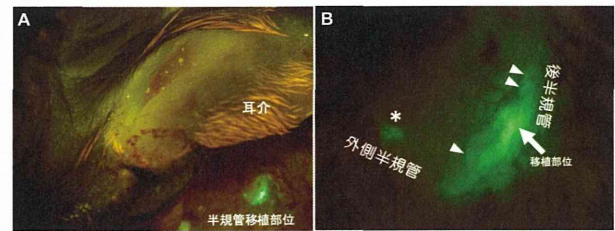


図 3 マウスへの骨髄間葉系幹細胞塊移植 2 週間後の移植部蛍光実体顕微鏡像 (A) および拡大像 (B)。耳後部切開により半規管を露出し、移植細胞塊が拒絶されずに生着していることを確認。さらに移植部位より播種性に進展し、コロニーを形成(矢頭)。後半規管から外側半規管にも移行している (*)。

移植細胞の検出

経半規管移植後の組織を抗 GFP 抗体での免疫蛍光染色により移植細胞の組織進入を解析したところ、前庭線維細胞組織内、蝸牛ラセン板縁組織内に移植細胞の生着を確認した。移植後の聴力を術後 8 週間までモニタリングしたが、手術による聴力低下は正常動物でも難聴モデルにおいても見られなかった。しかしミトコンドリアトキシンである 3NP で蝸牛に軽度損傷を与えたマウスでは導入効率が大きく上昇した (図 4 および 6)。

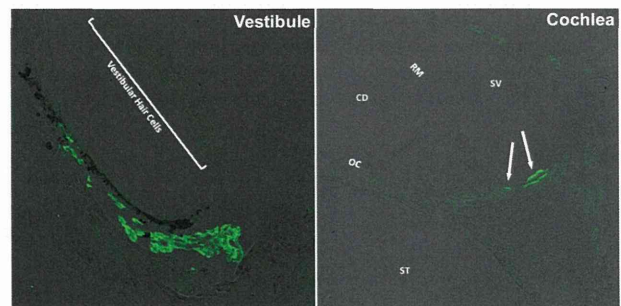


図 4 内耳有毛細胞近傍に侵入した骨髄間葉系幹細胞前庭 (Vestibule) および蝸牛 (Cochlea) の有毛細胞近傍の組織内に侵入していることが確認された。このような組織侵入率を飛躍的に高める検討を行っており、着実に導入効率が高まっている。Vestibular hair cell: 前庭有毛細胞、Cochlear hair cell: 蝸牛有毛細胞

骨髄間葉系幹細胞誘導因子の解析

蝸牛線維細胞の修復に関わる遺伝子のスクリーニングを目的として 3NP 投与後蝸牛外側壁組織の DNA マイクロアレイ解析が行われ、発現上昇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)。我々はMCP1およびその受容体であるCCR2に関し RT-PCR によりそれらの発現動態を解析した。その結果、蝸牛線維組織損傷における MCP1 の急激な発現上昇およびそれに引き続く MCP1 受容体である CCR2 の発現上昇が確認された。蝸牛組織での MCP1 の mRNA 発現は 3NP 投与後 1 日で急激に上昇し 3 日目に低下するが高発現状態を保っている。CCR2 は 1 日目よりも 3 日目に上昇することが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞においても CCR2 の mRNA 発現が確認され、同細胞が MCP1 によって誘導され得ることが示された (図 5)。

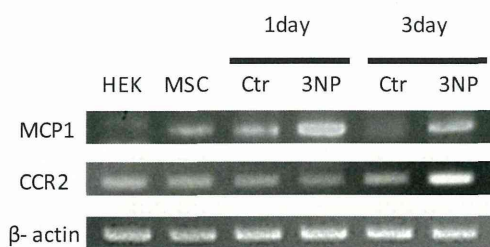


図 5 蝸牛線維細胞および骨髄間葉系幹細胞における 3NP 投与後の MCP1 とその受容体 CCR2 の mRNA 発現の変化

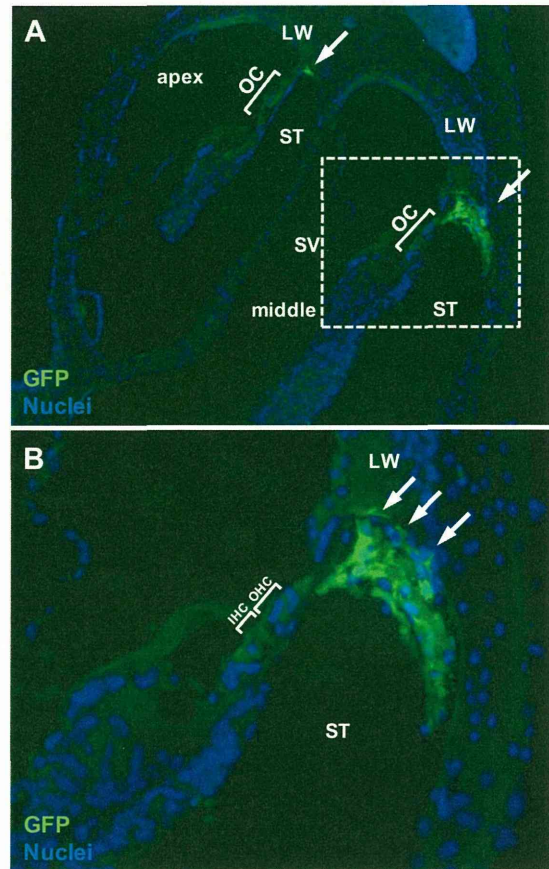


図 6 3NP で蝸牛外側壁 (Lateral Wall, LW) にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞 (GFP 標識、緑) の細胞侵入促進に成功した。3NP 投与により外側壁において走化性因子の発現が誘導されることも確認されているため、蝸牛鼓室階(Scala Tympani, ST)の外リンパ液において浮遊していた細胞が外側壁側に誘導され外側壁組織内に侵入したと考えられる。

(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(内毛細胞), OHC: Outer Hair Cell(外毛細胞), 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。

Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作製

これまで作製された Connexin26 floxed マウスと P0-Cre トランスジェニックマウスとの選抜・交配により内耳特異的に Connexin26 が欠損するコンディショナルノックアウトマウスが完成した。これまでの欠損マウスは全身で Cx26 が欠損するため胎生致死であったが、今回開発されたマウスは聴力以外は正常な表現型をもつ。高度に聴力低下を有するが平衡感覚や他の生体機能はほぼ正常であり、Cx26 変異を持つヒト遺伝性難聴モデルとして理想的なモデル動物であることが示された。

Connexin26 コンディショナルノックアウトマウス、および Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスへの骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 移植

上記二種類の遺伝性難聴モデルに対し、前述した MSC 移植が行われた。前述したように手術によるさらなる聴力低下は見られなかったが、現在のところ、無処置の移植では聴力が改善した例は見られていない。前述した 3NP 投与後の移植や、MCP1、MCP 1 受容体遺伝子の導入移植細胞を用いることにより導入細胞数の飛躍的な上昇が期待でき、これにより聴力改善も期待できると考えられる (図 10)。

Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおける新たな難聴分子病態の発見

我々は遺伝性難聴モデル Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスの詳細な分子病態解析を行った結果、まった

く新しい分子病態変化を発見した。

Connexin26 は蝸牛のギャップジャンクションを形成し蝸牛内のイオン輸送で重要な機能を担うと考えられてきたが、これまでは同遺伝子変異での難聴はイオン輸送の機能低下によるものという認識しか持たれていなかった。しかし蝸牛にはイオン輸送を担うタンパク質は Cx26 以外にも Cx30 や Cx43 などほぼ同一箇所にも局在しタンパク質発現の代償機能などを考慮すると、Cx26 のみの異常によりギャップジャンクション機能が

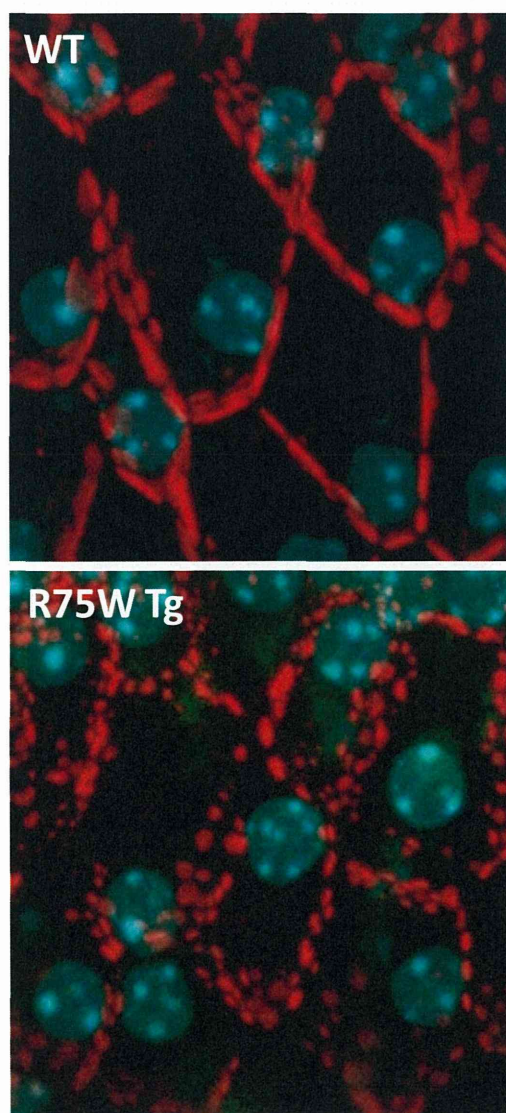


図 7 遺伝性難聴の新たな分子病態の発見
ギャップジャンクションブランクの崩壊・断片化

低下することを説明することは困難であった。しかし本研究で我々は新たな病態として、Connexin26の変異により、ギャップジャンクションの複合体ユニットであるギャップジャンクションプラークの形成に生後初期から異常が発生することを発見した。通常は図にあるように線上の長いプラークによって五角形または六角形の細胞構造を形成するが R75W 変異を持つトランスジェニックマウスの蝸牛ではギャップジャンクションプラークが分裂し円形または楕円形の多数の小プラークが散在していることが確認された(図7)。同現象は我々が作製した Connexin26 コンディショナル KO マウスのギャップジャンクションプラークにおいても確認された。これは全く新しい難聴分子病態であり、初代培養や *in vitro* 分子イメージングによって詳細なメカニズムを解析している(分担研究報告書にて報告)。

カニクイザル内耳における細胞投与アプローチの検討

マウス内耳への細胞移植研究によって得られた技術をヒトへ応用するため、現在カニクイザルを用いた細胞投与アプローチの検討を行っている。ホルマリン固定された成熟カニクイザル頭部および安楽殺直後のカニクイザルを用い、ヒト鑑骨手術の手技と同様、耳後部より削開し半規管を露出させ、マウスと同様に移植用の小孔を開けることが可能であった。図7には我々が検討したカニクイザルの解剖像を示しており、ヒトと極めて類似した構造であることがわかる。

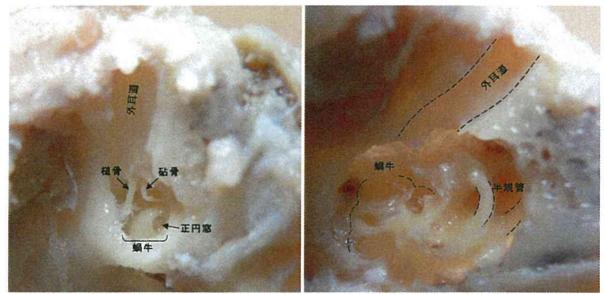


図8 成熟カニクイザルの内耳 A, 上顎側より削開し外耳道、耳小骨、蝸牛を露出した。B, さらに内耳周囲を削開し蝸牛内部および半規管を露出した。ヒトとほぼ同様の内耳構造およびその周囲構造を示す。(神谷和作、池田勝久 耳鼻咽喉科臨床 2010 補126, 1-5)

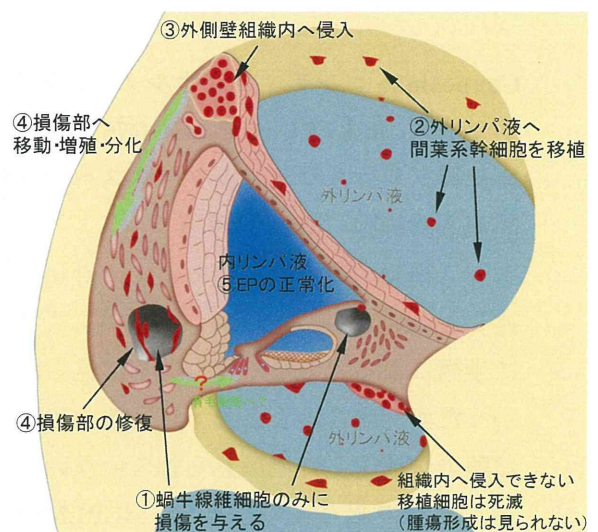


図9 蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞移植での損傷部の修復および推測された移植細胞の移動経路。(Kamiya et al. *Am J Pathology* 2007, 神谷和作 医学のあゆみ 特集・細胞治療 update 2009)

Ca²⁺イメージングシステムを用いた遺伝性難聴モデルマウス蝸牛の生理的解析

近年、ギャップ結合プラークはエネルギー不全ストレスにより細胞内リソソーム/プロテアソームによるタンパク質分解経路の活性化により構造分解が亢進することが話題となっている。我々の研究により遺伝性難聴にもこの分解経路が大きく関与することが示され、膜タンパク質の取り込み分解に関わる Caveolin1 および 2 による新たな分子経路が特定できた。本研究ではギャップ結合の機能変化を Ca²⁺イメージングシステムを用いた生理的解析と分子生物学的解析によりその発症機構を解明し、薬物的制御による新規治療法の可能性を見出すことを目的とした。遺伝性難聴モデルとして遺伝子改変マウス Cx26R75W 優性阻害変異導入マウスおよび Cx26 コンディショナル KO マウスを用いて蝸牛組織におけるギャップジャンクションの巨大分子複合体の構築を解析した。共焦点顕微鏡の断層像より三次元解析ソフト IMARIS をもちいてギャップジャンクションプラークの構築を行った。組織の機能解析として Ca²⁺指示薬 Fluo4-AM を用いた生後 5 日齢蝸牛組織での Ca²⁺イメージングの方法を検討した。生後 5 日齢の蝸牛組織内でのカルシウムシグナルの測定の条件検討を行い、安定的にギャップジャンクションを介したカルシウムシグナルの伝搬を解析することが可能となった。同時期での分析は蝸牛ギャップジャンクションの機能として最初期の生理的変化を解析することが出来、今後非常に有用であると考えられる。この手法を用いて新規開発し

た Cx26 欠損マウスの生後 5 日目での蝸牛ギャップジャンクション機能を解析した結果、同時期での有意なカルシウムシグナル伝搬の減少が見られた。同変化は、Cx26 変異難聴における最初期の生理学的変化であることが示唆された(図 1 1)。

さらに本研究では遺伝子発現解析により蝸牛組織から分泌されるホーミングリガンド因子として MCP1 および SDF1 が同定された。これらの因子は心筋梗塞の際の幹細胞ホーミング因子としても知られており内耳でもこの機構を介した幹細胞誘導が行われることが示された。移植幹細胞においても培養上清中に MCP1、SDF1 を一定の条件で加えることによりこれらの受容体 CCR2、CXCR4 (ホーミング受容体)の発現を大きく上昇させることに成功した。上記の方法で Cx26cKO マウスにおけるホーミングリガンドと移植細胞のホーミング受容体を同時に惹起して内耳細胞移植を行ったところ蝸牛への細胞導入効率が約 4 倍上昇した (図 1 5 - 1 7)。

考察

本研究において骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織導入効率の大きな上昇が確認されたが、走化性因子の遺伝子発現解析のデータと総合すると、以下のような細胞誘導メカニズムが必要であると考えられる (図)。

1.蝸牛外側壁に軽度な損傷を与える。2.1 日後より走化性因子MCP1のmRNA発現は3NP投与後1日に急激に上昇。その後外リンパ液へ投与されたMSCも細胞表面にMCP1受容体であるCCR2を発現している

ため、3.外側壁側へ誘導され、侵入を始める。4.損傷を修復するため移動・増殖・分化により外側壁組織内部において生着。

このメカニズムを応用しMSCに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。

既にMCP1およびCCR2の条件付き発現プラスミドが完成しており、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とにより細胞導入率が飛躍的に高まり、正常細胞の導入により聴覚機能が改善させることが十分期待できる。

また、我々はヒト遺伝性難聴で最も高頻度に発生する難聴原因遺伝子であるGjb2(コネキシン 26 遺伝子)の内耳特異的欠損マウスを完成させ、ヒト遺伝性難聴と病態がほぼ一致した遺伝性難聴モデルであることを機能および病理解析により確認している。同マウスは現存する遺伝性難聴モデルの中で最もヒト遺伝性難聴と病態が近似していると考えられ、我々の新規治療法開発の研究に最適であると考えられた。同マウスに上記の細胞導入システムの効果を増強させて用いることにより、遺伝性難聴における正常細胞への細胞置換法が確立し、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善が徐々に現実化すると考えられる。

本研究において新たに開発した内耳ホーミング機構を人為的に制御した細胞治療法は多能性幹細胞の内耳導入効率を高

める新たな方法として有望である。同方法を発展させることにより、コネキシン 26 変異難聴に対し、細胞治療により聴力を改善させる可能性が高まると考えられる。

E. 結論

本研究では臨床的に安全性が認められている骨髄間葉系幹細胞の遺伝性難聴における有効性およびiPS細胞の実用化への可能性が示された。主な成果を以下に記す。

1. ヒト遺伝性難聴の新規治療法開発のための最適な遺伝子改変モデルマウスを開発した。
2. 同コネキシン26欠損マウスへのCCR2遺伝子導入間葉系幹細胞(MSC-CCR2)の導入。移植したMSC-CCR2は内耳組織を生着し細胞間に欠損していたCx26が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した(図10)。
3. 蝸牛組織へ効率的に多能性幹細胞を誘導(ホーミング)する分子機構を解明した(図5および15)。
4. 内耳ホーミング分子リガンド(MCP1, SDF1)を蝸牛で人為的に活性化させることに成功した(図15)。
5. 上記ホーミング分子リガンドが蝸牛外側壁中心部に高発現しているこ

とが示された (図 1 5)。

6. 上記リガンドに対する受容体 (CCR2, CXCR4) を人為的に骨髄間葉系幹細胞におよび iPS 由来内耳前駆細胞へ高発現させることに成功した (図 1 5)。
7. 上記ホーミング分子機構を利用した内耳細胞治療により Cx26 欠損内耳への細胞誘導効率が約 4 倍上昇した (図 1 6)。
8. 蝸牛組織由来生体内耳幹細胞と iPS 由来細胞を共培養する条件検討により移植用内耳前駆細胞を樹立した (図 1 2 - 1 4)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

神谷和作 遺伝性難聴への内耳細胞治療法開発: 幹細胞ホーミング機構を応用した遺伝性難聴に対する内耳細胞治療法の開発
日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) (2013) 141(4):191-4

Gianluca Esposito, Sachine Yoshida, Ryuko Ohnishi, Yousuke Tsuneoka, Maria del Carmen Rostagno, Susumu Yokota, Shota Okabe, Kazusaku Kamiya, Mikio Hoshino, Masaki Shimizu, Paola Venuti, Takefumi Kikusui,

Tadafumi Kato, Kumi O. Kuroda
Infant Calming Responses During Maternal Carrying In Humans and Mice
Current Biology (2013)23(9):739-45

Hiroko Okada, Takashi Iizuka, Hideki Mochizuki, Tomoko Nihira, Kazusaku Kamiya, Ayako Inoshita, Hiromi Kasagi, Misato Kasai, Katsuhisa Ikeda,
Gene transfer targeting mouse vestibule using adenovirus and adeno-associated virus vectors
Otology & Neurotology, 2012.33(4):655-9

神谷和作 池田勝久

多能性幹細胞を用いた遺伝性難聴に対する内耳細胞治療法の開発

Inner ear cell therapy for hereditary deafness with multipotent stem cells
日本臨床 特集・幹細胞治療 2011 69(12):2215-2219

Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kamiya K, Kawano A, Suzuki M, Hattori N, Ikeda K.
Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2011 Feb;75(2):211-4.

Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children.

Yan D, Kamiya K (Co-first), Ouyang XM, Liu XZ.

Analysis of subcellular localization of Myo7a, Pcdh15 and Sans in Ush1c knockout mice.
Int J Exp Pathol. 2011 Feb;92(1):66-71.

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(2010)補 126:1-5

Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutari K, Fujii M, Matsunaga T.

Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid.

Neurochem Int. 2010 56(3):487-94.

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 2010 130(9):990-5

Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura HO, 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. 2009;164(3):1312-9

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 2010 補 126, 1-5

神谷和作 難聴に対する細胞治療法の開発

医学のあゆみ 特集号・細胞治療 Update, 2009 Vol229, No.9, 863-867

Kazusaku KAMIYA, Cell therapy targeting cochlear fibrocytes,

Otology Japan 2009, 19(3):214-218

Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, Ikeda K, Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice.

Int J Audiol. 2009;48(8):576-81.

A. INOSHITA, T. IIZUKA, H. OKAMURA, A. MINEKAWA, K. KOJIMA, M. FURUKAWA, T. KUSUNOKI, K. IKEDA, Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *GJB2* transgenic mice, Neuroscience 156 (2008) 1039–1047.

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.

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.

American Journal of Pathology 2007, 171(1):214-26

2. 学会発表

招待講演

第 22 回日本耳科学会シンポジウム 2012
年 10 月 5 日 名古屋

遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞
治療法の開発

神谷和作 美野輪治 池田勝久

第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会シンポジウム
2012 年 7 月 6 日 東京

遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞
治療法の開発

神谷和作 池田勝久

第 85 回日本薬理学会 シンポジウム講演
2012 年 3 月 16 日 京都

Cell therapy for hereditary hearing loss with
stem cell homing factors

Kazusaku Kamiya, Miho Muraki, Kana Ogawa,
Katsuhisa Ikeda

国際学会

Kamiya K, Karasawa K, Osamu
Minowa, Ikeda K

Connexin26 mutations that cause
hereditary deafness lead to
macromolecular complex degradation
of cochlear gap junction plaques

Association for Research in
Otolaryngology (ARO), 36th
MidWinter Meeting,

2013 年 2 月 米国 ボルチモア

Kamiya K, Muraki M, Ogawa K,
IKEDA K

Cochlear Gap Junction Plaque is
Disrupted by connexin26 Mutation

48th Inner Ear Biology Workshop2011

2011 年 9 月 ポルトガル リスボン

Kamiya K, Muraki M, Ogawa K,
IKEDA K

Cochlear Gap Junction Plaque is
Disrupted by connexin26 Mutation

EMBO meeting2011 2011 年 9 月 オー
ストリア ウイーン

Kazusaku KAMIYA, Katsuhisa IKEDA

Cochlear Gap-Junction plaque is disrupted by
dominant-negative Connexin26 mutation.

EMBO meeting, 2010年9月 バルセロナ

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

コネクシン26欠損内耳への細胞治療
骨髄間葉系幹細胞の大量導入およびギャップ結合の再構築に成功

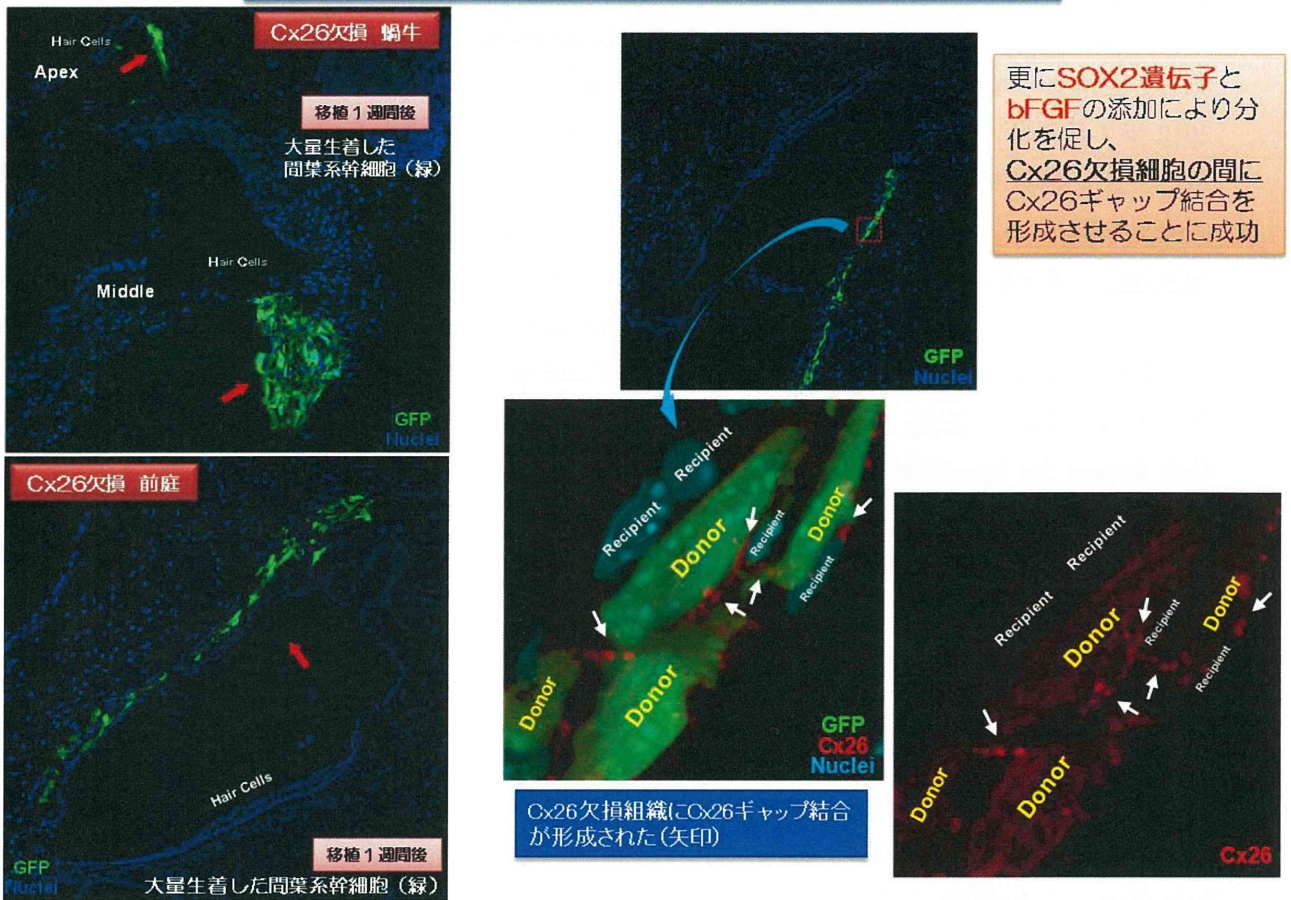


図 10 新規開発したコネクシン 26 欠損マウスへの CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) の導入。移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

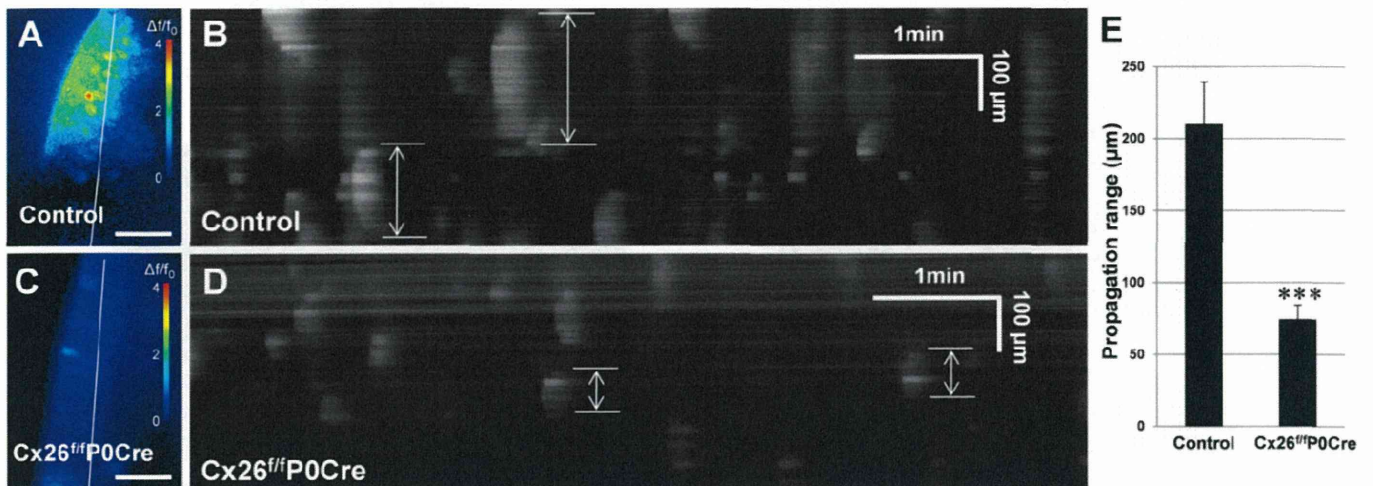


図 11 Ca^{2+} 指示薬 Fluo-4 による蝸牛細胞のカルシウムイオン濃度変化の解析
コネキシン 26 欠損マウス (Cx26^{f/f}P0Cre) の生後 5 日齢では正常マウス (Control) に
おいて広範囲にみられるカルシウムイオン伝達が障害され、その伝搬範囲 (Propagation
range) は有意に減少していた。これにより同マウスでは生後の音刺激入力開始期 (生後 1
2 日齢) 以前からのギャップジャンクション機能の異常が示された。

成体内耳からの多能性幹細胞

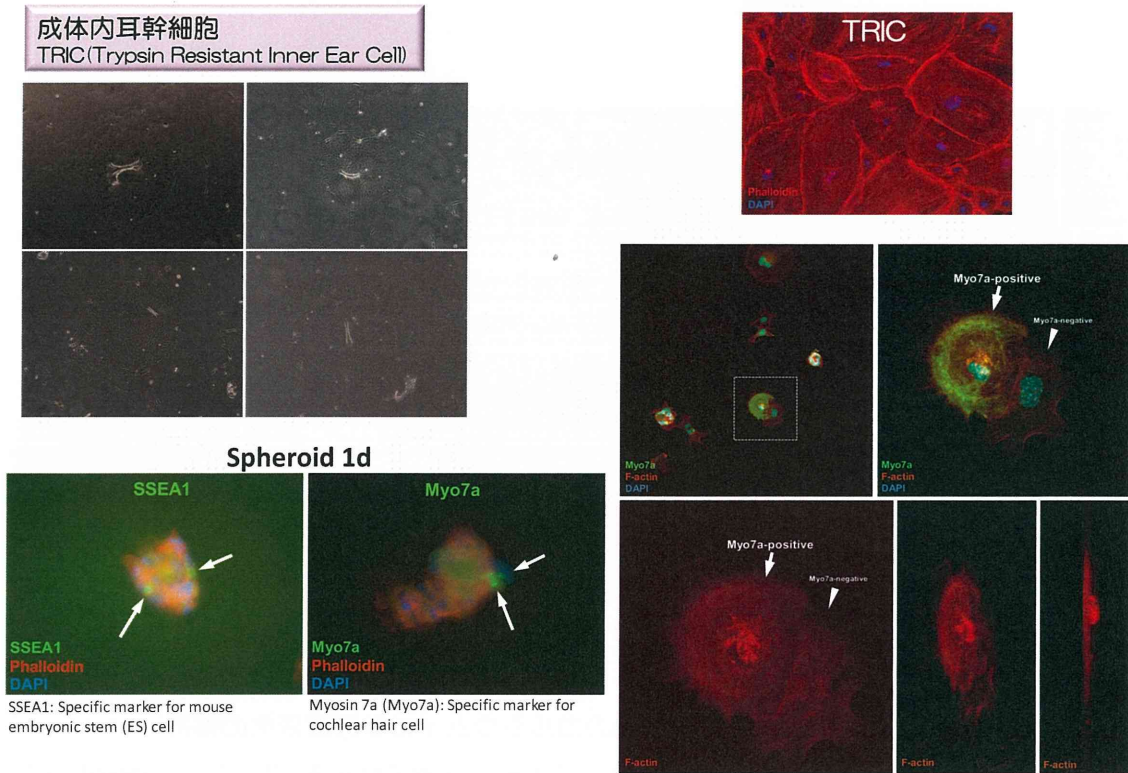


図 12 成体由来内耳幹細胞(TRIC)の樹立

(左上) 成熟マウス蝸牛の過剰トリプシン処理により得られた細胞コロニー。(右上) これらは継代および安定増殖が可能であり Tripsin Resistant Inner ear Cell (TRIC) と名付けた。(左下) TRIC の胚葉体培養一日後、未分化細胞マーカー-SSEA1 および有毛細胞マーカー Myosin 7a 陽性細胞が検出された。(右下) その後の接着培養により Myosin 7a 陽性細胞のみに頂部にアクチン凝集による構造体を形成した。

iPS(人工多能性幹)細胞から内耳前駆細胞への分化誘導

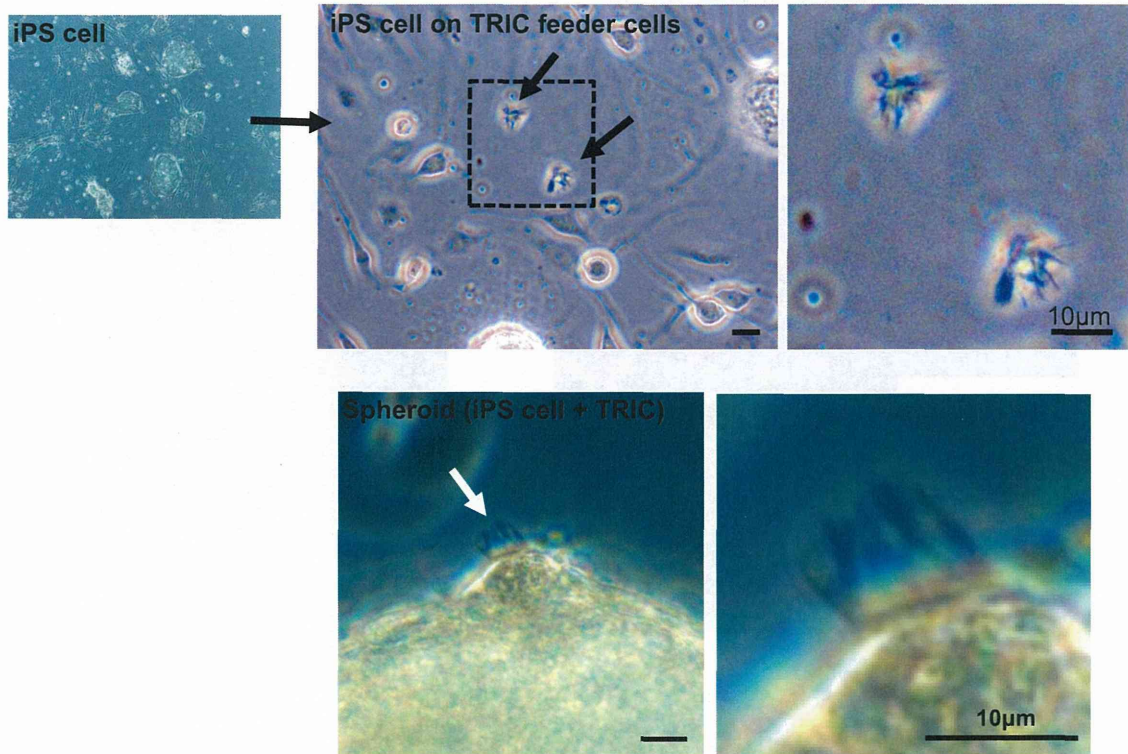


図 13 TRIC をフィーダー細胞（未分化細胞の増殖や分化を促進する細胞）とした人工多能性幹（iPS）細胞の内耳細胞への分化誘導
iPS 細胞をマイトマイシン処理により増殖活性を失った TRIC 上に播種すると頂部に繊毛を持つ細胞が多数検出された。胚葉体（spheroid）培養においても繊毛様構造の形成が見られた。

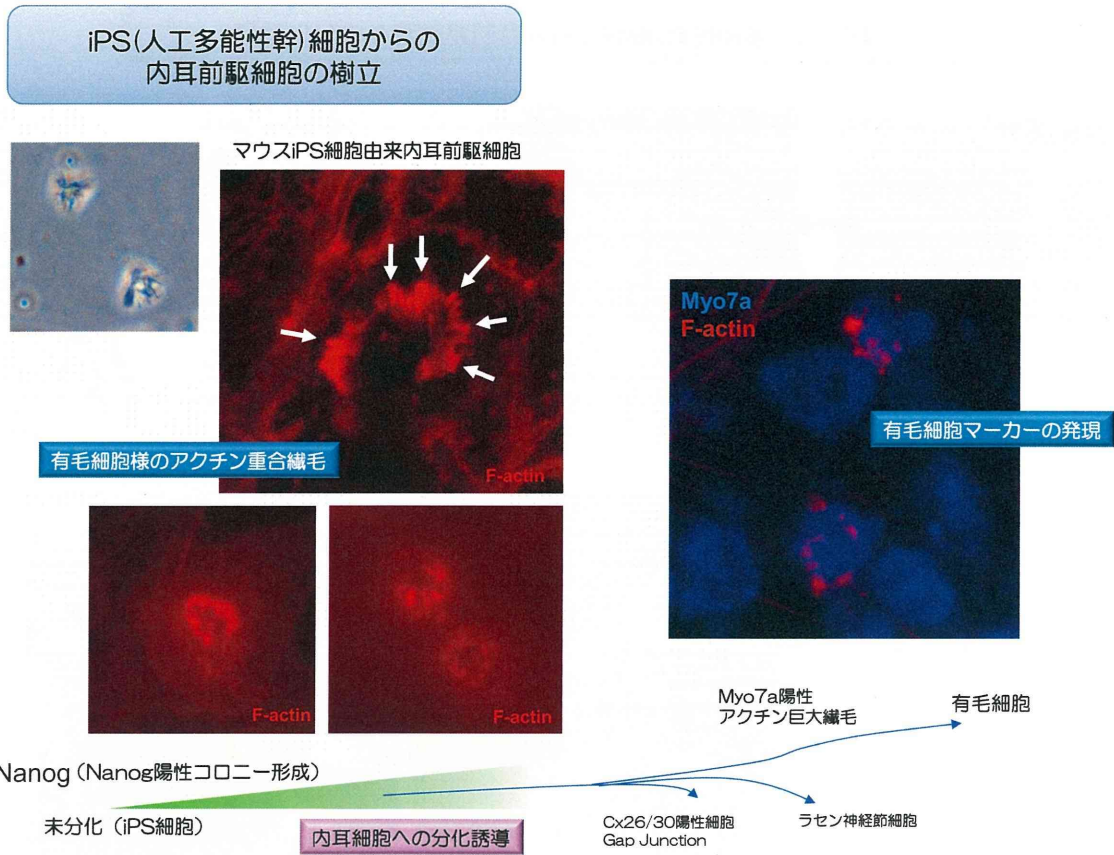


図 14 TRIC フィーダー細胞により分化誘導した iPS 細胞のアクチンフィラメントおよび Myo7a 発現
 分化誘導させた iPS 細胞はファロイジンによるアクチン重合染色によって有毛細胞様の構造体（中央上 矢印）を示した。（右上）このアクチン重合繊維構造は Myosin7a 陽性細胞に多く見られた。
 本実験では未分化マーカーNanog の発現に一致して GFP(緑色蛍光)を発現する iPS 細胞を使用することにより未分化細胞の混入を除去する培養法を確立した。これにより様々な分化方向性を示す内耳前駆細胞の安定した産生が可能となった（下模式図）。

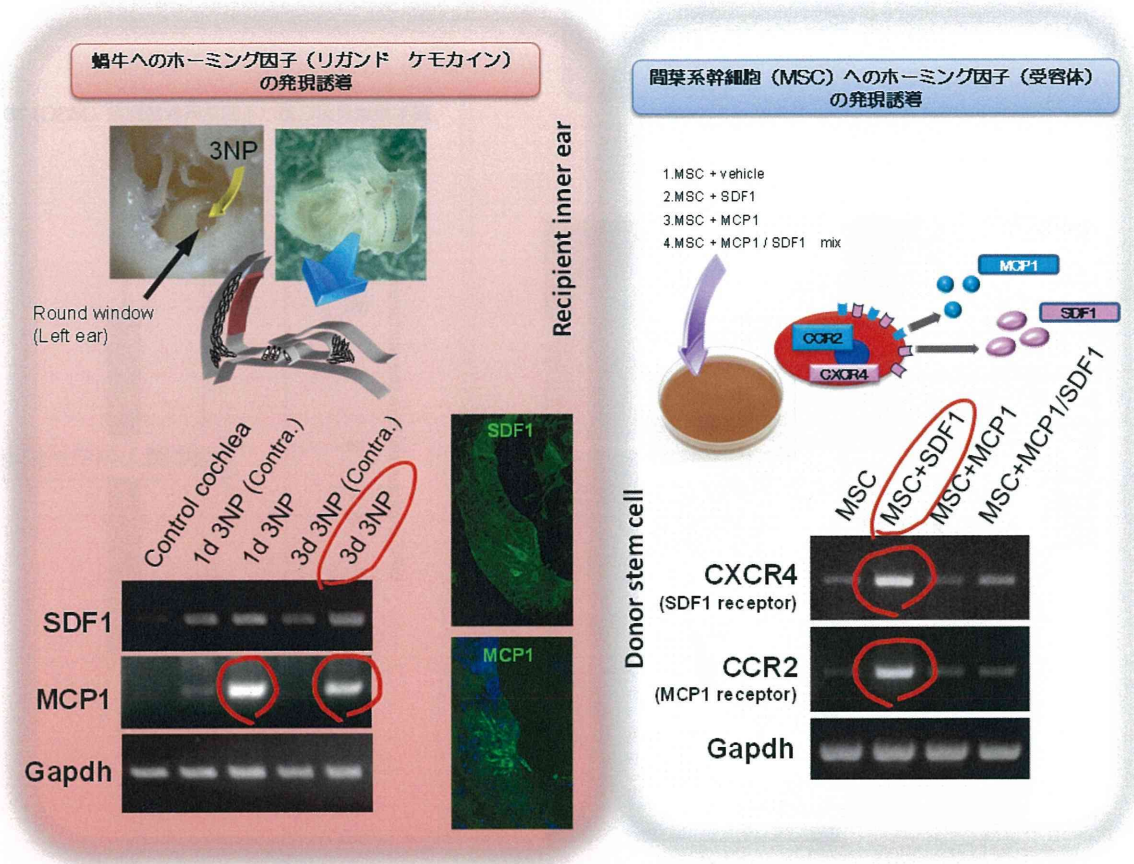


図 15 蝸牛における幹細胞ホーミング機構を応用した高効率幹細胞導入法の開発

(左) コネキシン 26 欠損マウスでの幹細胞ホーミング（幹細胞が組織に誘導され生着する）因子の発現増強。ミトコンドリア機能阻害薬 3NP の局所投与によりホーミング分子であるケモカイン MCP1 および SDF1 の発現を蝸牛において効率的に上昇させる条件を確立した。さらにそれらの分子が外側壁中心部の蝸牛線維細胞に特異的に発現させることに成功。

(右) さらに上記 MCP1 および SDF1 の受容体である CCR2 および CXCR4 を間葉系幹細胞に強発現させることに成功した。

これによりレシピエント組織からのリガンド分子（MCP1・SDF1）と移植幹細胞からの発現させることが可能となった。経半規管幹細胞移植からの蝸牛への細胞導入および生着効率を高めることが期待できる。