

201317098A

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25年度 総括分担研究報告書

研究代表者 神谷 和作

平成 26(2014)年 5 月

目 次

I. 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-----	22
美野輪治 神谷和作	

2. 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-----	27
神谷和作	

3. 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-----	32
井下綾子 神谷和作 池田勝久	

4. 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-----	36
村木美帆 神谷和作	

5. 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-----	40
村木美帆 神谷和作	

6. 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 -----	44
飯塚崇 池田勝久	

7. 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
-----46
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-----48

IV. 研究成果の刊行物、別刷り-----51

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

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方法を開発し報告している。本研究では我々の開発した内耳への幹細胞移植法を応用し、遺伝性難聴、特に同疾患で最も高頻度に発生するコネキシン 26(Cx26)遺伝子のモデル動物による治療標的解明のための分子病態解析とその結果に基づく iPS 細胞等の幹細胞治療を用いた聴力回復実験により未だ存在しない遺伝性難聴の根本的治療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

難聴モデルと移植細胞

遺伝性難聴モデルとしては我々が開発した 1.Cx26 欠損マウス、2.Cx26 優性阻害変異マウス、3.Brn4 欠損マウス（ヒト DFN3 難聴モデル）、4.Barttin 変異導入マウス（Barter 症候群モデル）を用い治療標的探索のための分子病態解析を行った。幹細胞治療では、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、免疫蛍光染色により移植細胞の発現タンパク質を同定し、分化の指標とした。

移植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。

経半規管外リンパ液還流による細胞移植

正常マウスおよび遺伝子改変マウス (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 X10⁵ 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) 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 週後までの長期モニタリングを平行して行った。

(倫理面への配慮)

本実験に必要な動物実験の実施については、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)に基づいて制定された順天堂大学動物実験等管理規則を遵守して行っている。

C. 研究結果

・遺伝性難聴の中で最も高頻度に発生する Cx26 変異難聴の根本的治療法を開発

するため、主要な二種類の遺伝形式である Cx26 欠損型および Cx26 優性阻害変異の難聴モデル動物の共通分子病態の探索を行った。その結果、胎生期からのギャップ結合プラークの巨大分子複合体の分解と過度なエンドサイトーシスが最初期の分子病態であることが解明された。(Kamiya et al., Journal of Clinical Investigation, 2014)

・遺伝性難聴 DFN3 の原因遺伝子である POU3F4 (Brn4 遺伝子) の治療標的を解析するため Brn4-欠損マウスの分子病態解析を行った。同マウスにおいてもギャップ結合プラークの崩壊によるコネキシン26およびコネキシン30タンパク質レベルの有意な低下を示すことを解明した。これにより DFN3 での遺伝性難聴とコネキシン関連遺伝性難聴との病態的相関が初めて明らかとなった。我々の過去の報告からも、内リンパ電位の低下を起因として難聴が進行することが明らかとなっており (Minowa, 1999, Science)、細胞治療の標的としてギャップ結合等、イオン輸送を担う蝸牛細胞群をターゲットとした我々の細胞治療法が DFN3 関連遺伝性難聴においても有効であることが示された。(投稿準備中)

・Bartter 症候群は血管条のイオン輸送機能の低下を病因とした難聴を示すが、我々は原因因子 Barttin のヒト型変異を導入したノックインマウスを作製した。同マウスでは Barttin の変異タンパク質が正常に細胞膜に局在せず内在化することにより機能不全、聴力低下を招くことが明らかとなった。更に分子シャペロン Hsp90 の阻害剤 17AAG の全身投与に

よりこの分子局在異常が改善し、聴力も僅かながら有意な上昇が確認され論文にて報告した (Nomura, Kamiya et al. Biochem Biophys Res Commun. 2013;441(3):544-9)。我々の最近の細胞治療の成果により骨髄間葉系幹細胞を蝸牛血管条に導入できる新規細胞治療法が開発されたため、Bartter 症候群での難聴治療においては前述の 17AAG 投与や本研究の細胞治療法が有効であることが示された。

・コネキシン26 優性阻害変異を持つ難聴モデルの生後初期の解析により、蝸牛発達過程におけるプログラム細胞死の異常が蝸牛コルチ器の成熟を遅延させ、有毛細胞が正常に振動するためのコルチ器立体構築を阻害していることが解明された。(Inoshita et al., BMC genetics, 2014)

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, MCP1 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1)。

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わることを示され、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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 指示薬 Fluo4-AM を用いた生後 5 日齢蝸牛組織での Ca^{2+} 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 2)。

・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明らかとなった。更に移植幹細胞においても、培養上清中に MCP1、SDF1 を一定の条件で添加し、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(図 6)。同方法で 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、無処置条件に比べ蝸牛への細胞導入効率が約 66 倍に上昇し (図 7)、標的とした蝸牛ラセン靭帯や血管条へも幹細胞導入が可能となった (図 8) (投稿準備中)。

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 3-5)。

・人工多能性幹細胞、iPS 細胞からの内耳前駆細胞の分化誘導を行い、骨髄間葉系幹細胞との混合細胞移植を行った。従来の細胞標識に用いてきた GFP(緑色蛍光タンパク質)に代わり、透過性の高い

長波長蛍光を発する HcRed 標識-間葉系幹細胞を作製し内耳細胞治療用いることにより、移植幹細胞の生体内での可視化 (in vivo イメージング) にも初めて成功した (図 9)。(投稿準備中)。更に我々は Cx26 欠損モデルに対し、前述の iPS 由来内耳前駆細胞、骨髄間葉系幹細胞、Cx26 を搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)を混合治療液とした外リンパ液還流法を試みた。この遺伝子/細胞混合治療実験では、高周波数 (40kHz) において治療後 1 週間で 20db SPL 程度の聴力回復効果が確認された。機能回復が極めて困難な遺伝性難聴において、幹細胞治療により聴力回復効果が得られた初めての成果である (図 10)。

D. 考察

本研究では、蝸牛への幹細胞導入効率を飛躍的に向上させる方法を開発し、当初の目的であった遺伝性難聴への効率的細胞治療法を確立させた。また遺伝性難聴モデルの解析により新規細胞治療法がイオン輸送を担う蝸牛細胞群の再生医療のために重要であることを実証した。

これまで蝸牛における幹細胞誘導機構を解明した報告はなく、同機構を応用して幹細胞誘導効率の上昇を実証した本研究成果は、これまで困難であるとされてきた内耳への細胞治療の実現が十分可能であることを実証するものである。

人工多能性幹 (iPS) 細胞の臨床応用への期待が高まっているが、本研究においても骨髄間葉系幹細胞との混合細胞治療として内耳細胞治療研究を進めている。本研究での新規幹細胞導入法を iPS 細胞と共に発展させることにより、二次的に損傷を受けた有

毛細胞やラセン神経節細胞も標的に含めた蝸牛細胞全ての細胞群に対応する根本的治療法開発が期待できる。

E. 結論

本研究では臨床において重要度の高い遺伝性難聴のための独自の疾患モデルを用いた治療法開発を目的とした研究を行った。これらの疾患モデルは全て蝸牛イオン輸送に機能障害を有する共通点を持ち、これらの分子病態解析での標的探索により治療法開発が大きく進展した。特に近年各種臓器において明らかとなった幹細胞ホーミングの分子機構に関しては、内耳において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を大幅に (約66倍) 上昇させ、標的領域 (蝸牛ラセン靭帯、血管条) へ導入することに成功した。この方法を発展させた iPS 由来内耳前駆細胞、骨髄間葉系幹細胞、Cx26 を搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)を混合治療液とした遺伝子・細胞混合治療実験では、高周波数 (40kHz) において治療後1週間で 20db SPL 程度の聴力回復効果が確認され長期的に更なる聴力回復が期待できる。同モデルにおける我々の遺伝子治療実験では、成熟個体に関してはウイルス単独での聴力回復は不可能であったが (Iizuka et al. Nature Medicineへ投稿済)、iPS細胞等の幹細胞治療を混合することにより相乗的効果が得られたと考えられる。これまで遺伝子改変 - 遺伝性難聴モデルの聴力回復に成功した例はなく幹細胞治療での遺伝性難聴治

療の初めての成功例である。移植後の幹細胞の生体イメージングにも成功しており、同方法を発展させ多量の多能性幹細胞を蝸牛組織内へ誘導し、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善を現実化させることが大いに期待できる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kazusaku Kamiya, Vincent Michel, Fabrice Giraudet, Brigitte Riederer, Isabelle Foucher, Samantha Papal, Isabelle Perfettini, Sebastien Le Gal, Elisabeth Verpy, Weiliang Xia, Ursula Seidler, Maria-Magdalena Georgescu, Paul Avan, Aziz El-Amraouia, Christine Petit
An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to outer hair cell hair bundle defects unveiled in Nherfl^{-/-} mice
Proc Natl Acad Sci U S A. 2014, in press

Kazusaku Kamiya (corresponding author), Sabrina W. Yum, Nagomi Kurebayashi, Miho Muraki, Kana Ogawa, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Xueshui Guo, Satoru Gotoh, Yoshinobu Sugitani, Hitomi Yamanaka, Shioko Ito-Kawashima, Takashi Iizuka, Takashi Sakurai, Tetsuo Noda, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda
Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires Connexin26
Journal of Clinical Investigation
2014;124(4):1598–1607.

(日経産業新聞、時事通信、ウォールストリートジャーナル他、2014年3月4日)

Ayako Inoshita, Keiko Karasawa, Megumi Funakubo, Asuka Miwa, Katsuhisa Ikeda,

Kazusaku Kamiya (corresponding author)
Dominant negative connexin26 mutation R75W causing severe hearing loss influences normal programmed cell death in postnatal organ of Corti
BMC genetics 2014, 15(1):1-8

Nomura N, **Kamiya K**, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sakaki S, Uchida S
Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type IV caused by mutated Bsnd in mice.
Biochem Biophys Res Commun.
2013;441(3):544-9

Homma H, **Kamiya K**, Kusunoki T, Ikeda K.
Multiplex analyses of cytokine and chemokine release from the cultured fibroblast of nasal polyps: the effect of IL-17A.
Acta Otolaryngol. 2013, 133(10):1065-72.

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

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.

Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K. noninvasive In Vivo Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea. *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

Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Osamu Minowa, Megumi Funakubo¹, Katsuhisa Ikeda
The activation of stem cell homing factors highly induce the cochlear invasion of bone marrow mesenchymal stem cells. **Association for Research in Otolaryngology (ARO), 37th MidWinter Meeting**, 2014 年 2 月・サンディエゴ、米国

Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Takashi Anzai, Kana Harada, Kazuma Kobayashi, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda
Cell therapy for hereditary deafness with bone marrow mesenchymal stem cell and the activation of stem cell homing.
国際幹細胞学会 (ISSCR) 2013 年 9 月・フィレンツェ、イタリア

Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Takashi Anzai, Kana Harada, Kazuma Kobayashi, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda
Cell therapy for hereditary deafness with bone marrow mesenchymal stem cell and the activation of stem cell homing.
50th Inner Ear Biology Workshop 2013 年 9 月・マドリード、スペイン

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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

国内学会

神谷和作 美野輪治 池田勝久
幹細胞ホーミング分子機構を応用した効率
的内耳細胞治療法の開発

第23回 日本耳科学会学術集会 2013年11
月・宮崎市

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

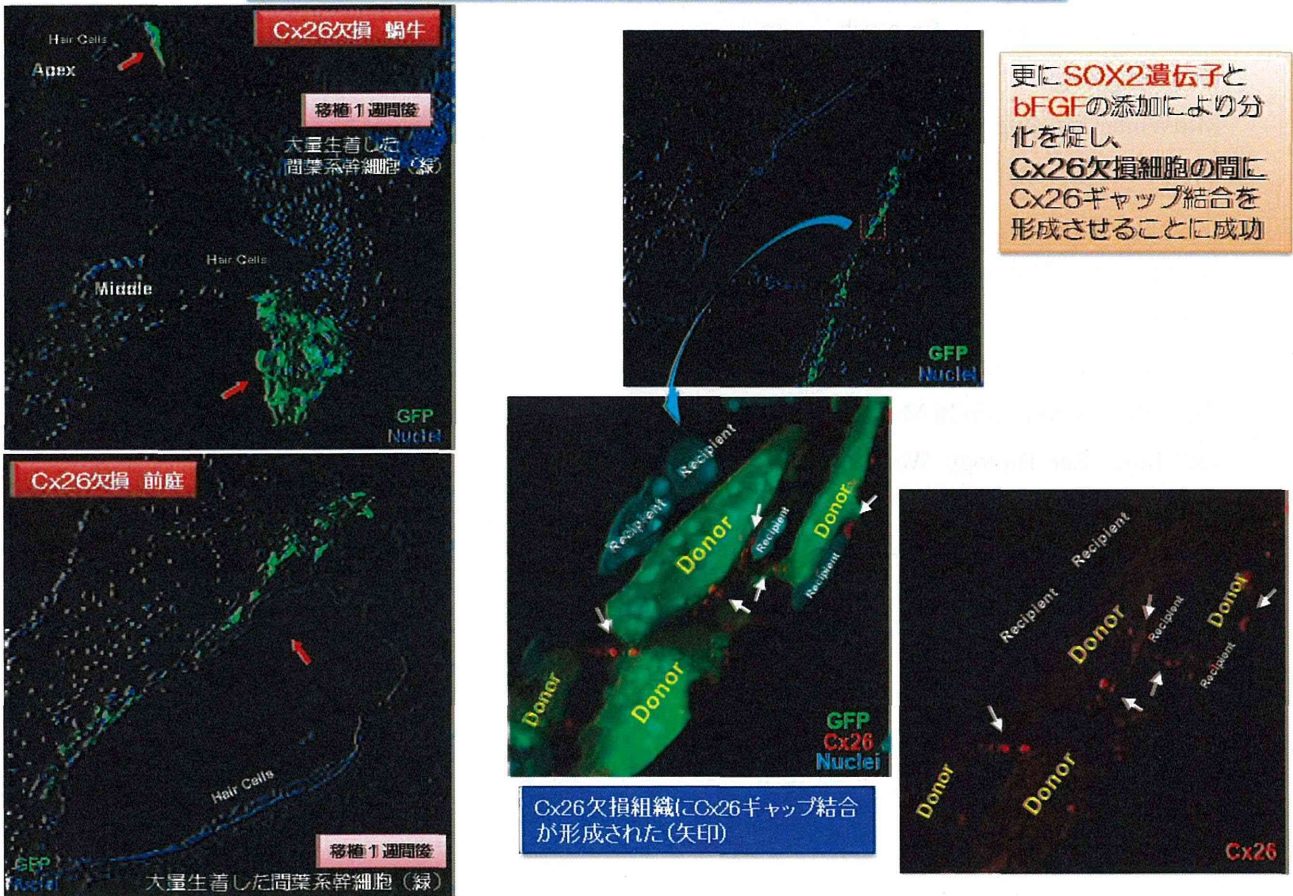


図 1 新規開発したコネクシン 26 欠損マウスへの CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) の導入。移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

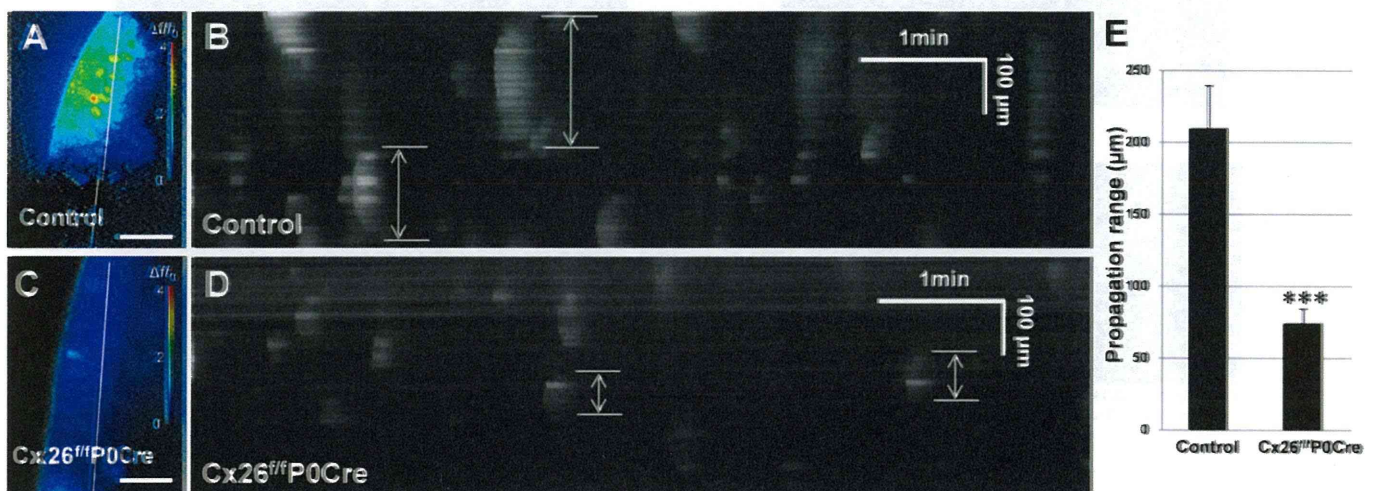


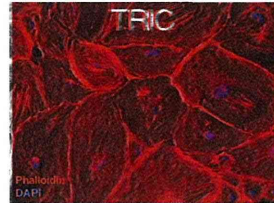
図2 Ca²⁺指示薬 Fluo-4 による蝸牛細胞のカルシウムイオン濃度変化の解析

コネクシン 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12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

成体内耳幹細胞

TRIC (Trypsin Resistant Inner Ear Cell)



Spheroid 1d



SSEA1: Specific marker for mouse embryonic stem (ES) cell

Myosin 7a (Myo7a): Specific marker for cochlear hair cell

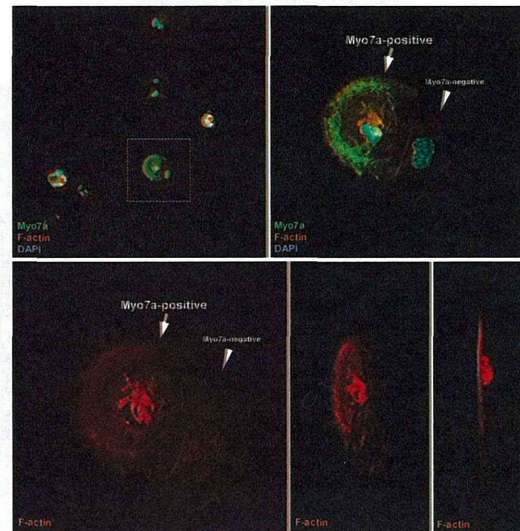


図3 成体由来内耳幹細胞(TRIC)の樹立

(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 Trypsin 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

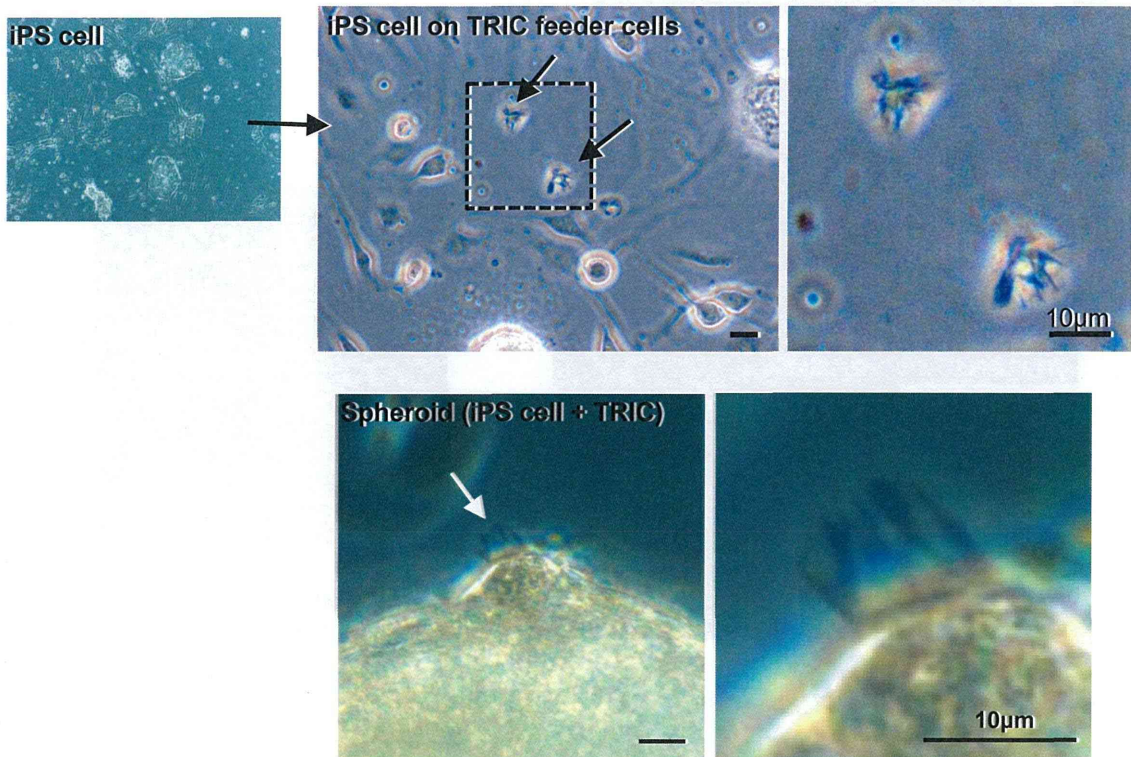


図4 TRICをフィーダー細胞(未分化細胞の増殖や分化を促進する細胞)とした人工多能性幹(iPS)細胞の内耳細胞への分化誘導
iPS細胞をマイトマイシン処理により増殖活性を失ったTRIC上に播種すると頂部に繊毛を持つ細胞が多数検出された。胚葉体(spheroid)培養においても繊毛様構造の形成が見られた。

iPS(人工多能性幹)細胞からの
内耳前駆細胞の樹立

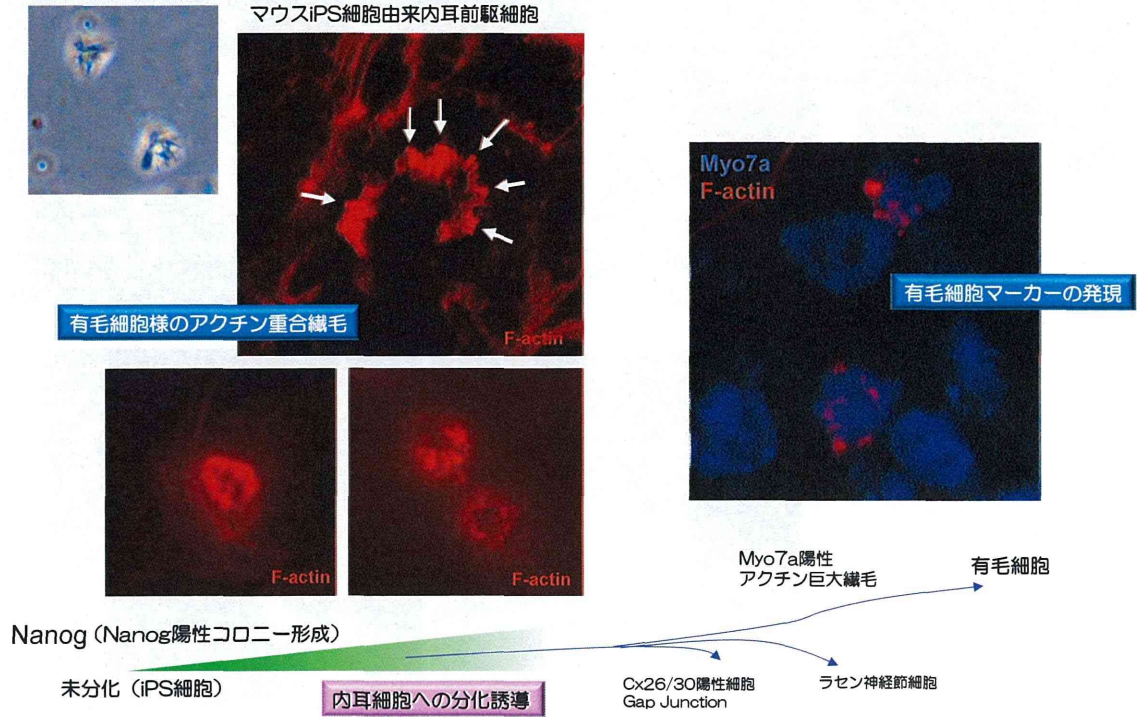


図5 TRIC フィーダー細胞により分化誘導した iPS 細胞のアクチンフィラメントおよび Myo7a 発現
 分化誘導させた iPS 細胞はファロイジンによるアクチン重合染色によって有毛細胞様の構造体（中央上 矢印）を示した。（右上）このアクチン重合繊維構造は Myosin7a 陽性細胞に多く見られた。
 本実験では未分化マーカー-Nanog の発現に一致して GFP(緑色蛍光)を発現する iPS 細胞を使用することにより未分化細胞の混入を除去する培養法を確立した。これにより様々な分化方向性を示す内耳前駆細胞の安定した産生が可能となった（下模式図）。

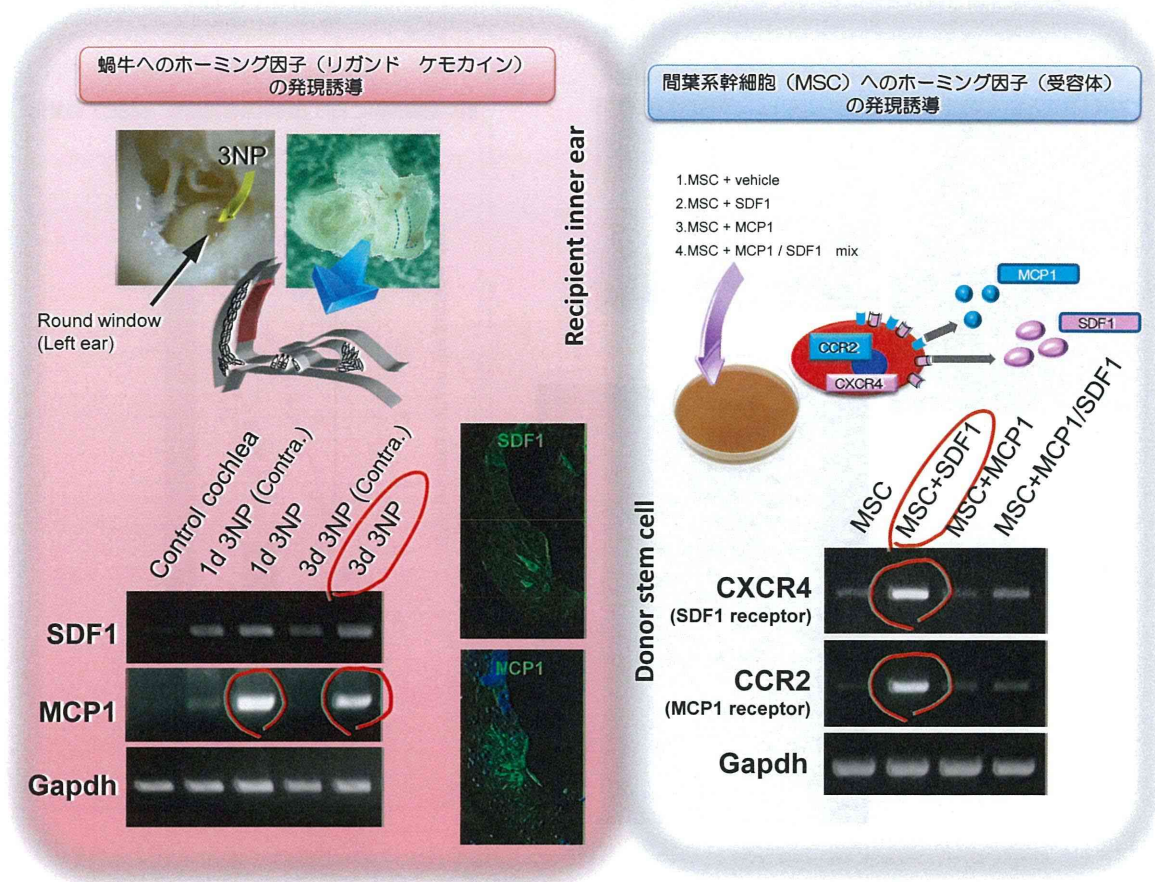


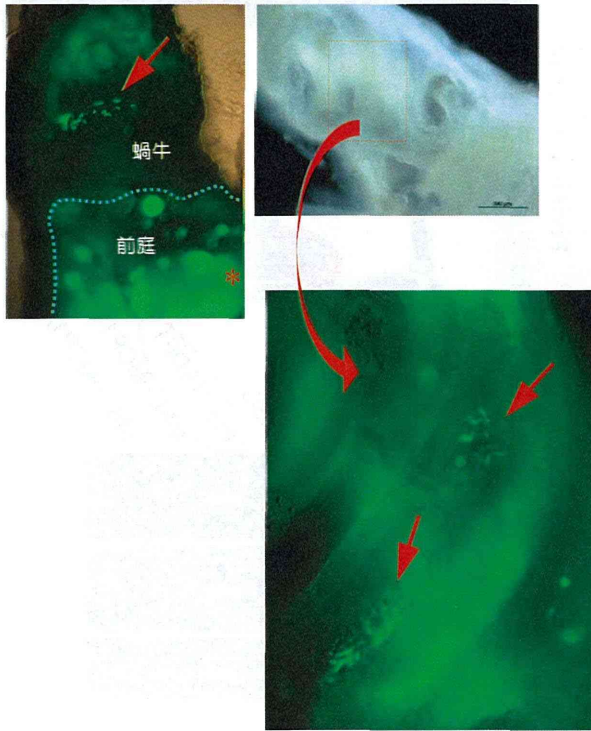
図6 蝸牛における幹細胞ホーミング機構を応用した高効率幹細胞導入法の開発

(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。

ホーミング分子の発現誘導によって
蝸牛内へ誘導された間葉系幹細胞



蝸牛組織表面における間葉系幹細胞数 (MSC) の変化

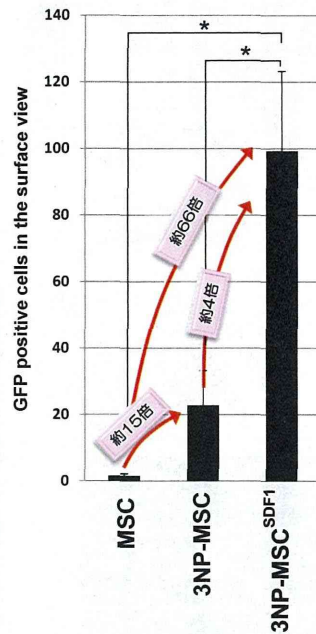
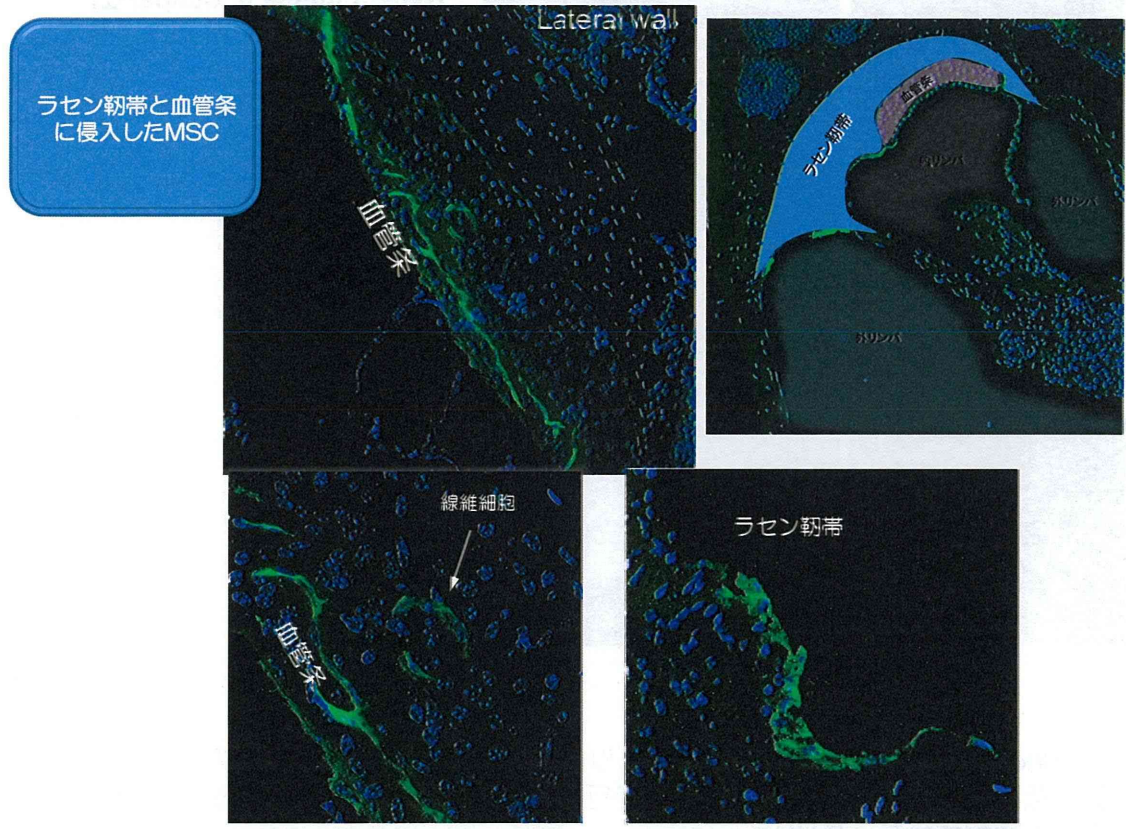


図7 幹細胞ホーミング機構を応用したCx26欠損マウスへの骨髄間葉系幹細胞移植

Cx26欠損マウスへの前述の3NP刺激および移植間葉系幹細胞へのSDF1前処置により経半規管外リンパ液還流による内耳幹細胞移植を施行し週間後に蝸牛へ侵入した間葉系幹細胞を解析した。

(左写真) 3NP処置およびSDF1処置後の移植では多くの細胞が導入され、摘出した側頭骨の蛍光実態顕微鏡観察においても前庭領域から蝸牛へ侵入していることが確認できた(矢印)。(右グラフ) 蝸牛への侵入細胞数を計測した結果、間葉系幹細胞へのSDF1前処置と3NP前処置により蝸牛導入効率が約66倍、SDF1前処置のみでも約4倍に上昇することが確認された。



ラセン靭帯と血管条に侵入したMSC

図8 Cx26欠損マウス蝸牛に侵入・生着した骨髄間葉系幹細胞

Cx26欠損マウスへの前述の3NP刺激および移植間葉系幹細胞へのSDF1前処置により経半規管外リンパ液還流による内耳幹細胞移植を施行し週間後に蝸牛へ侵入した間葉系幹細胞を解析した。

(左上・左下) 血管条細胞および蝸牛線維細胞への移植間葉系幹細胞の侵入。(右上) 外リンパ液経路で導入された間葉系幹細胞は内リンパ腔領域への侵入によりラセン靭帯中央部に生着させることに成功した。