

201317098B

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 神谷 和作

平成 26(2014)年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
-----	2
神谷和作	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----51
III. 研究成果の刊行物、別刷り	-----55

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）
総合研究報告書

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。

我々は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, J Clin Invest, 2014)。また遺伝性難聴 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)。また、蝸牛への幹細胞誘導因子の探索を目的と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。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、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 (投稿準備中)。

さらに人工多能性幹細胞、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。(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。

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（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。

（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。

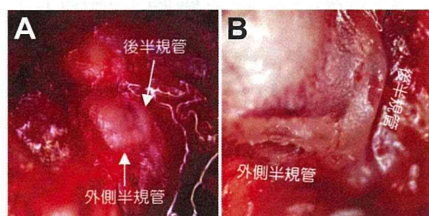
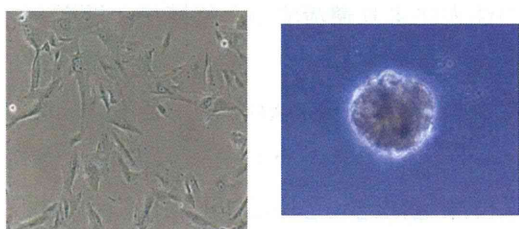


図 1 A. 経半規管細胞移植時の成熟マウス半規管。B. 後半規管および外側半規管に細胞液を還流するための小孔を開け一方に微小チューブを挿入し細胞液を注入、もう一方より外リンパ液を排出する。

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。



骨髄間葉系幹細胞の幹細胞の経半規管移植

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。

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

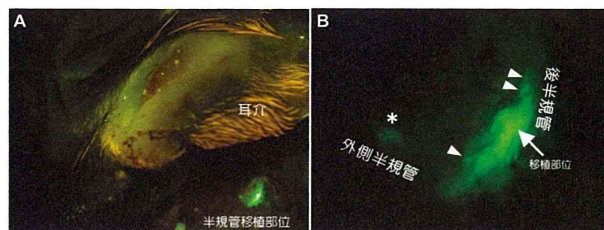


図 3 マウスへの骨髄間葉系幹細胞塊移植 2 週間後の移植部蛍光実体顕微鏡像 (A) および拡大像 (B)。耳後部切開により半規管を露出し、移植細胞塊が拒絶されずに生着していることを確認。さらに移植部位より播種性に進展し、コロニーを形成(矢頭)。後半規管から外側半規管にも移行している (*)。

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)。

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)。

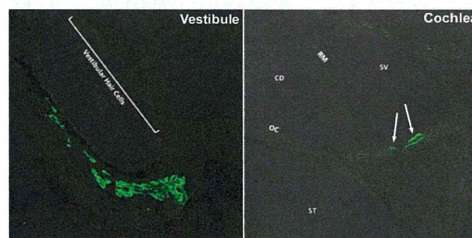


図 4 内耳有毛細胞近傍に侵入した骨髄間葉系幹細胞前庭 (Vestibule) および蝸牛 (Cochlea) の有毛細胞近傍の組織内に侵入していることが確認された。このような組織侵入率を飛躍的に高める検討を行っており、着実に導入効率が高まっている。Vestibular hair cell; 前庭有毛細胞、Cochlear hair cell; 蝸牛有毛細胞

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、6)。

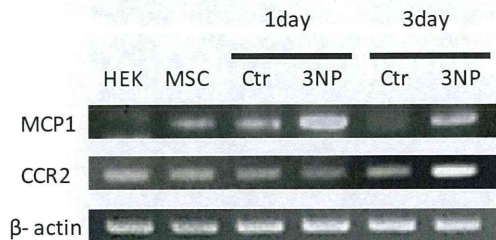


図 5 蝸牛線維細胞および骨髄間葉系幹細胞における 3NP 投与後の MCP1 とその受容体 CCR2 の mRNA 発現の変化

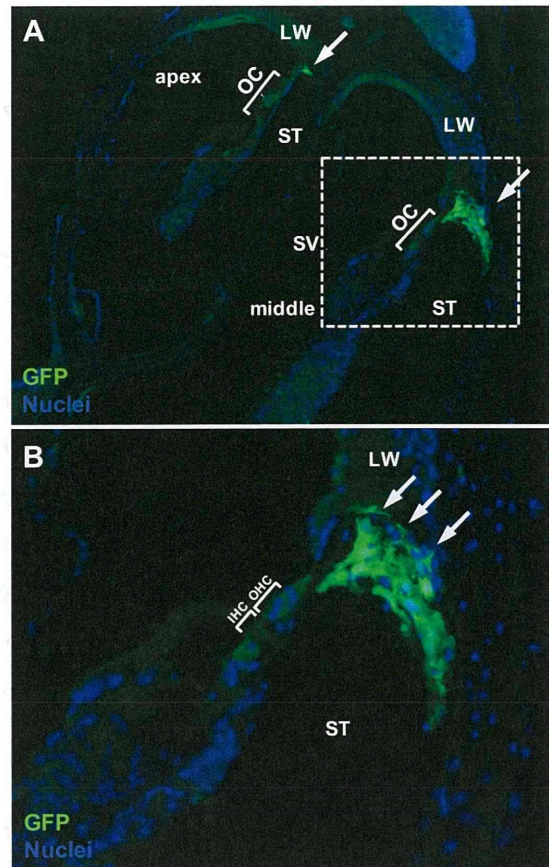


図 6 3NP で蝸牛外側壁 (Lateral Wall, LW) にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞 (GFP 標識、緑) の細胞侵入促進に成功した。3NP 投与により外側壁において走化性因子の発現が誘導されることも確認されているため、蝸牛鼓室階 (Scala Timpani, ST) の外リンパ液において浮遊していた細胞が外側壁側に誘導され外側壁組織内に侵入したと考えられる。

(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。

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, 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 9)。

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は局在した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低下することを説明することは困難であっ

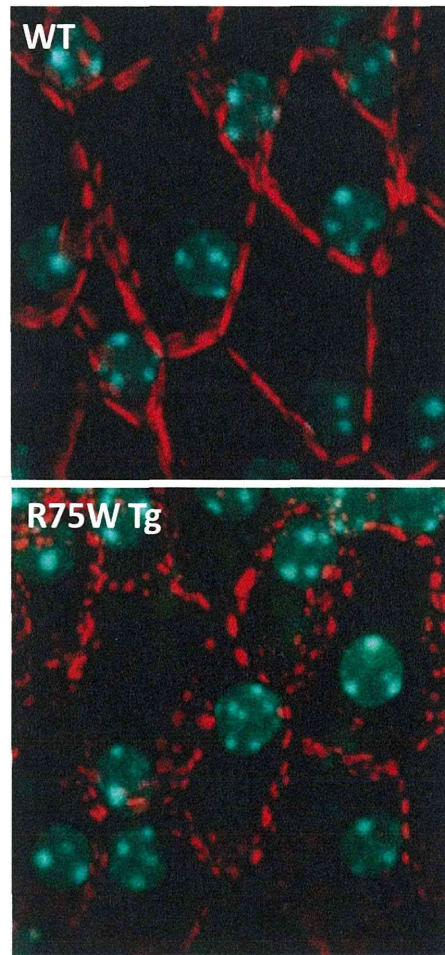


図 7 遺伝性難聴の新たな分子病態の発見
ギャップジャンクションブランクの崩壊・断片化
た。しかし本研究で我々は新たな病態として、Connexin26 の変異により、ギャップジ

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。

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8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)

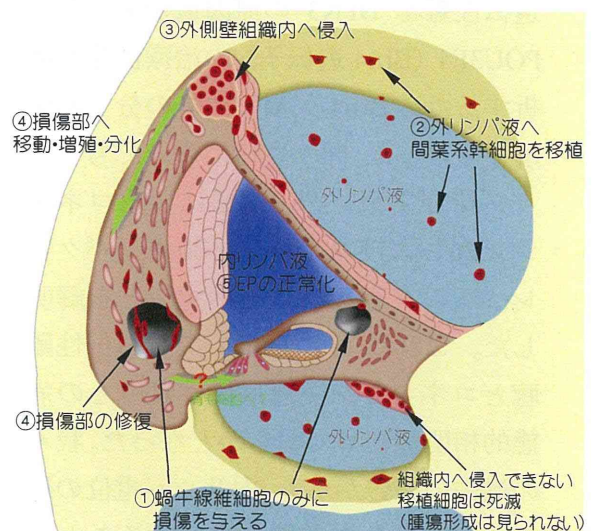


図9 蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞移植での損傷部の修復および推測された移植細胞の移動経路。(Kamiya et al. *Am J Pathology* 2007, 神谷和作 医学のあゆみ 特集・細胞治療 update 2009)

Cx26 関連難聴発症機構の解明

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 (図 7)。(Kamiya et al., Journal of Clinical Investigation, 2014)

Brn4 欠損難聴マウスの解析

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 症候群難聴モデルマウスの解析

・ 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。

Cx26 変異におけるコルチ器形成異常

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。

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 11)。

・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 12-14)。

・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 18)。(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 19)。

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。主要な成果を以下にまとめる。

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 15)。
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 15)。
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 16)。
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 12-14)。

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. Humal Molecular Genetics 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。

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

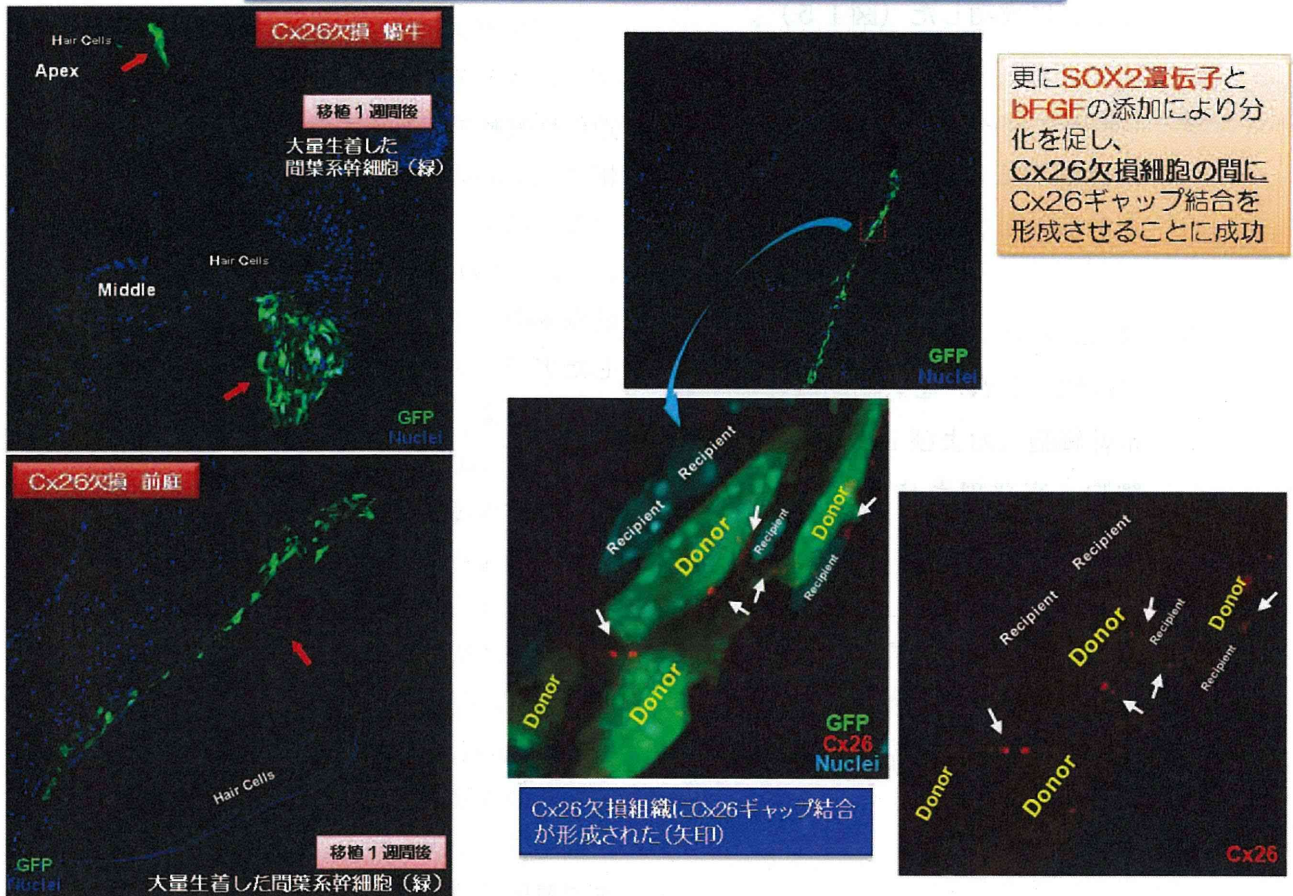


図 10 新規開発したコネクシン 26 欠損マウスへの CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) の導入。移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

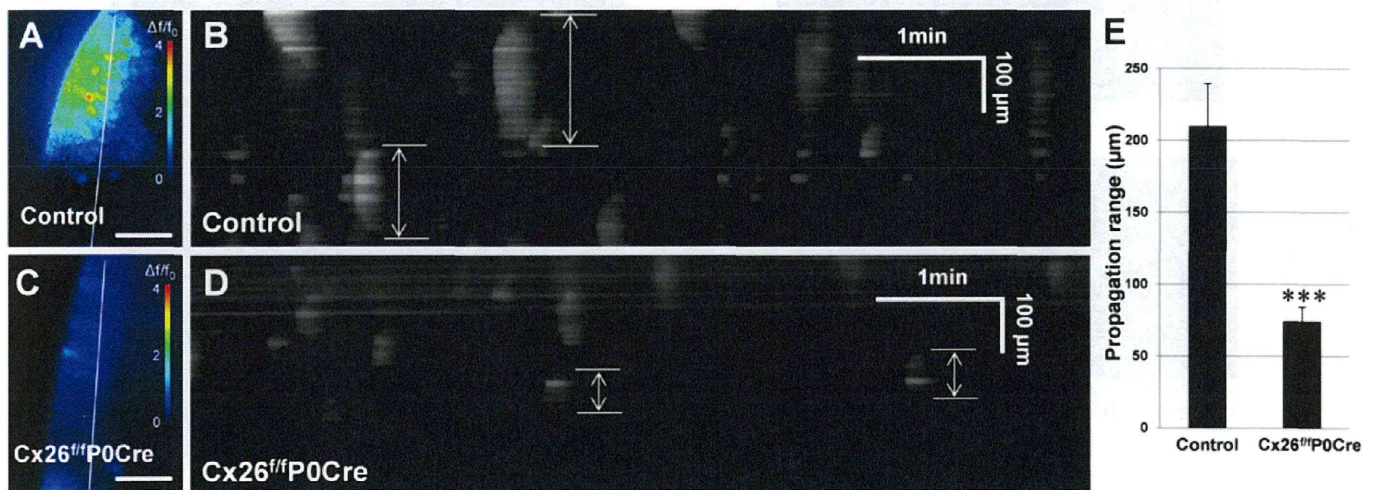


図 11 Ca²⁺指示薬 Fluo-4 による蝸牛細胞のカルシウムイオン濃度変化の解析

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 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

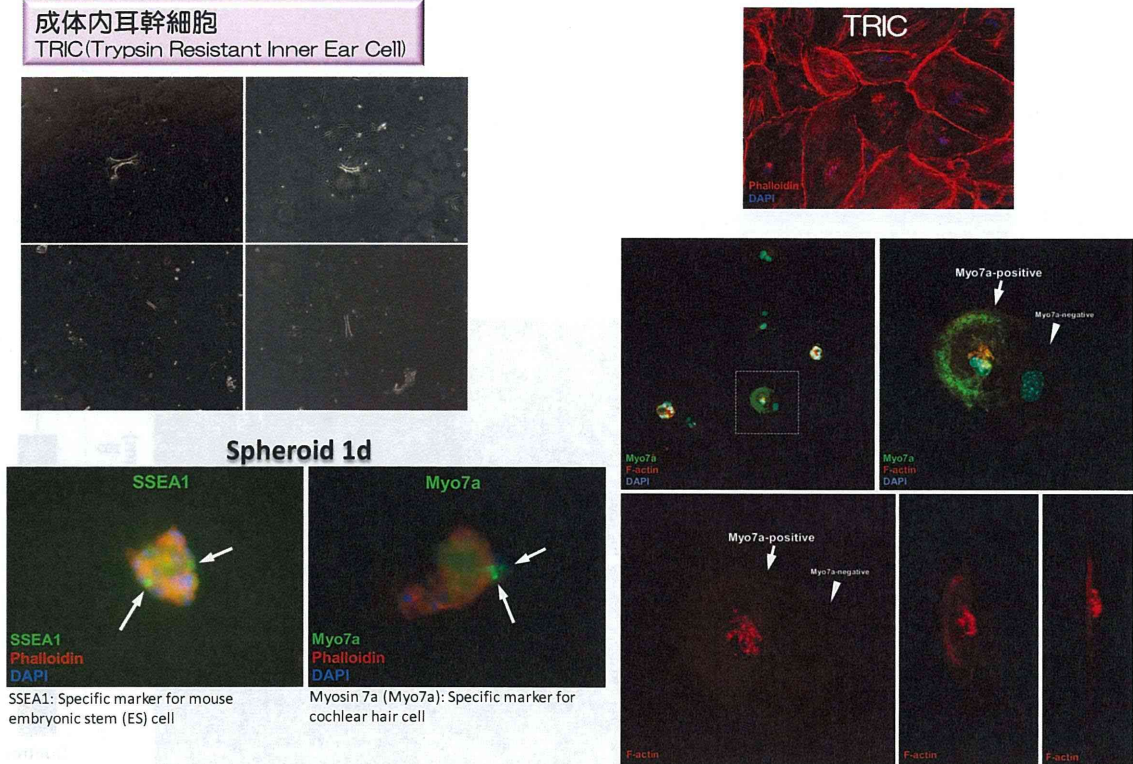


図 12 成体由来内耳幹細胞(TRIC)の樹立

(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 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 Myosin7a 陽性細胞が検出された。(右下) その後の接着培養により Myosin7a 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

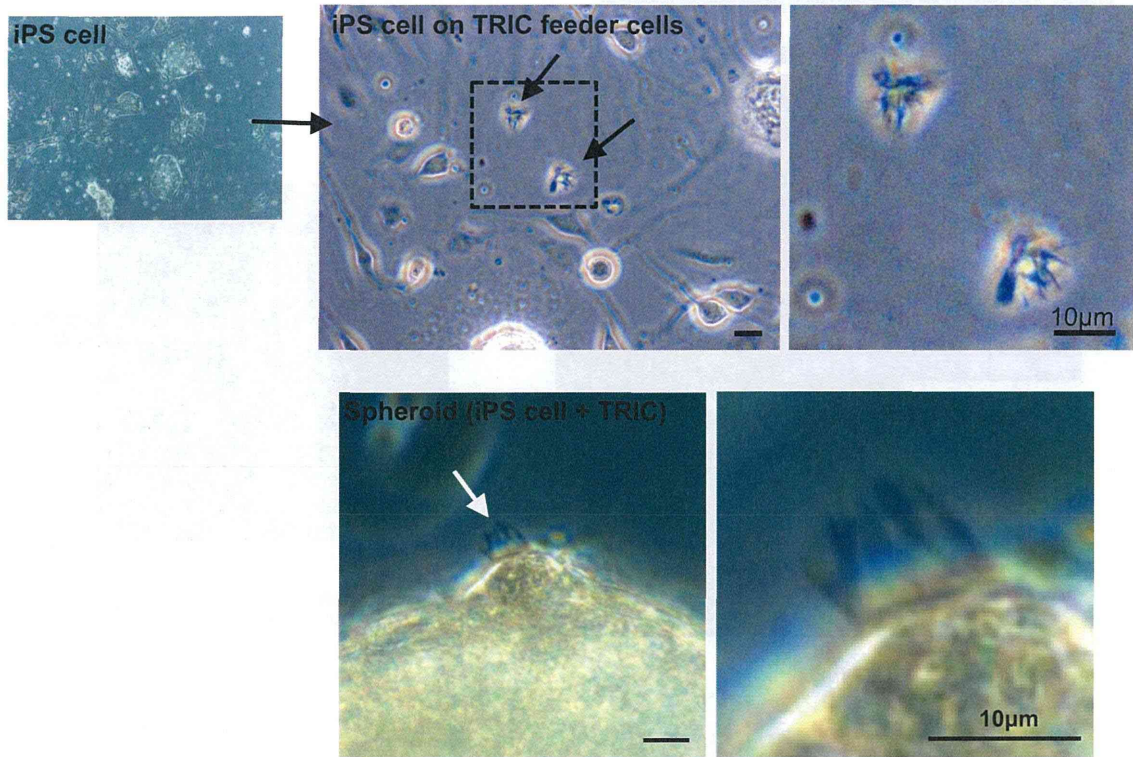


図 13 TRIC をフィーダー細胞（未分化細胞の増殖や分化を促進する細胞）とした人工多能性幹（iPS）細胞の内耳細胞への分化誘導
iPS 細胞をマイトマイシン処理により増殖活性を失った TRIC 上に播種すると頂部に繊毛を持つ細胞が多数検出された。胚葉体（spheroid）培養においても繊毛様構造の形成が見られた。

iPS(人工多能性幹)細胞からの
内耳前駆細胞の樹立

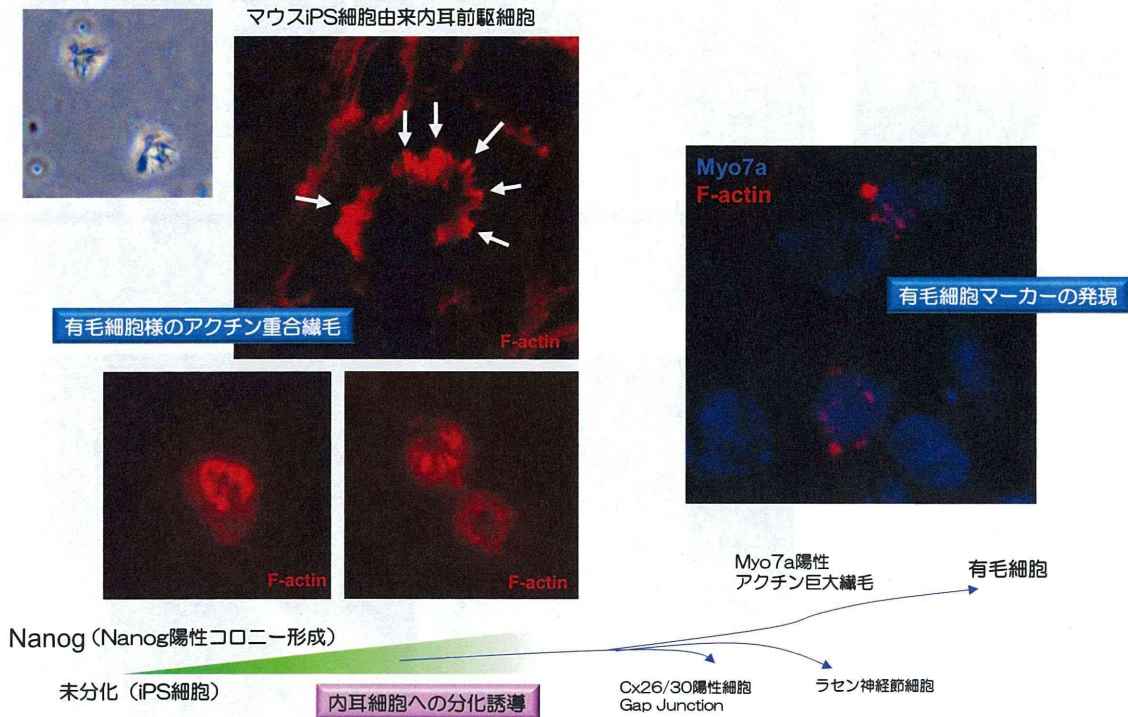


図 14 TRIC フィーダー細胞により分化誘導した iPS 細胞のアクチンフィラメントおよび Myo7a 発現
分化誘導させた iPS 細胞はファロイジンによるアクチン重合染色によって有毛細胞様の構造体（中央上 矢
印）を示した。（右上）このアクチン重合繊維構造は Myosin 7a 陽性細胞に多く見られた。
本実験では未分化マーカーNanogの発現に一致してにGFP(緑色蛍光)を発現するiPS細胞を使用することによ
り未分化細胞の混入を除去する培養法を確立した。これにより様々な分化方向性を示す内耳前駆細胞の安定し
た産生が可能となった（下模式図）。

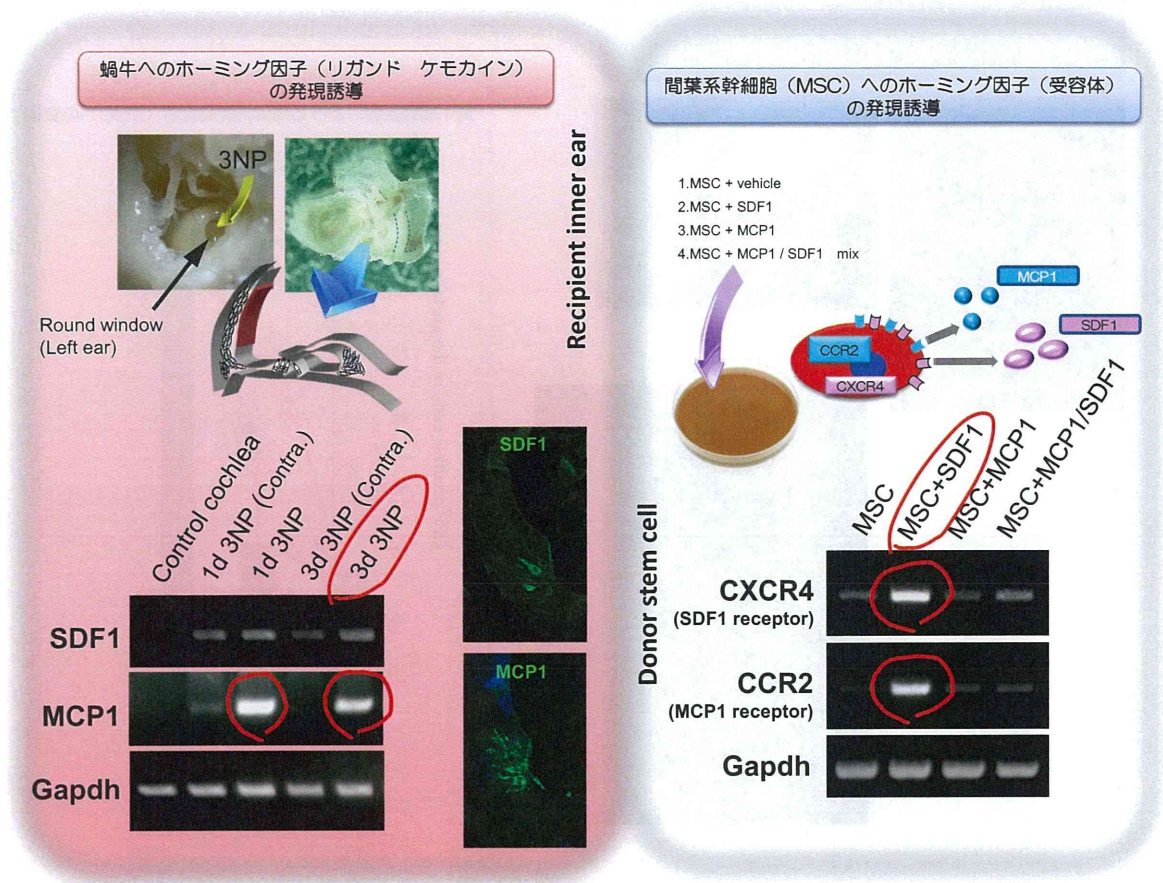


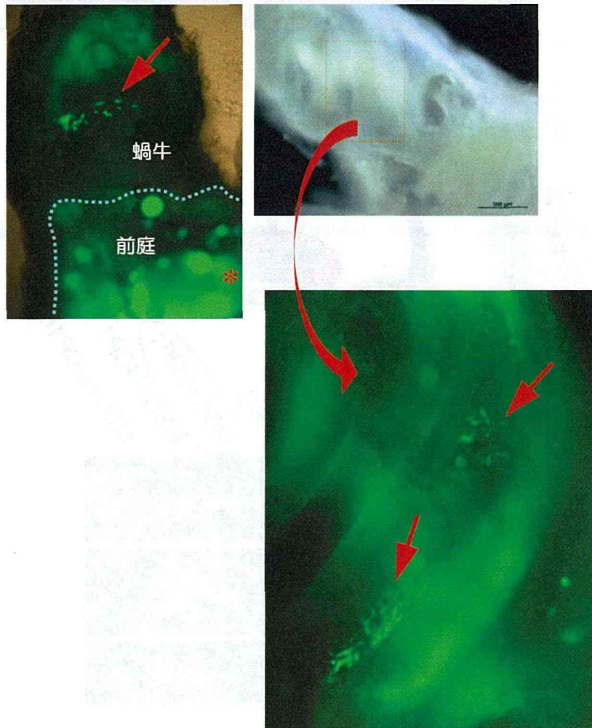
図 15 蝸牛における幹細胞ホーミング機構を応用した高効率幹細胞導入法の開発

(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。

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

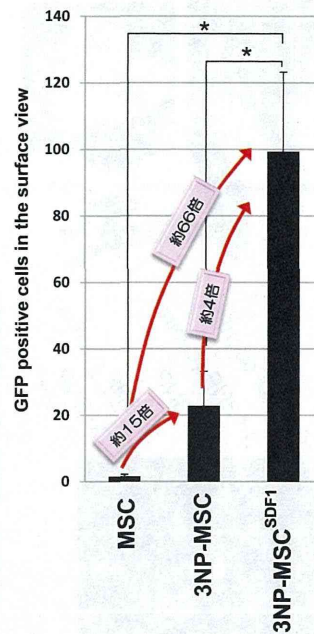


図 16 幹細胞ホーミング機構を応用した Cx26 欠損マウスへの骨髄間葉系幹細胞移植

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。

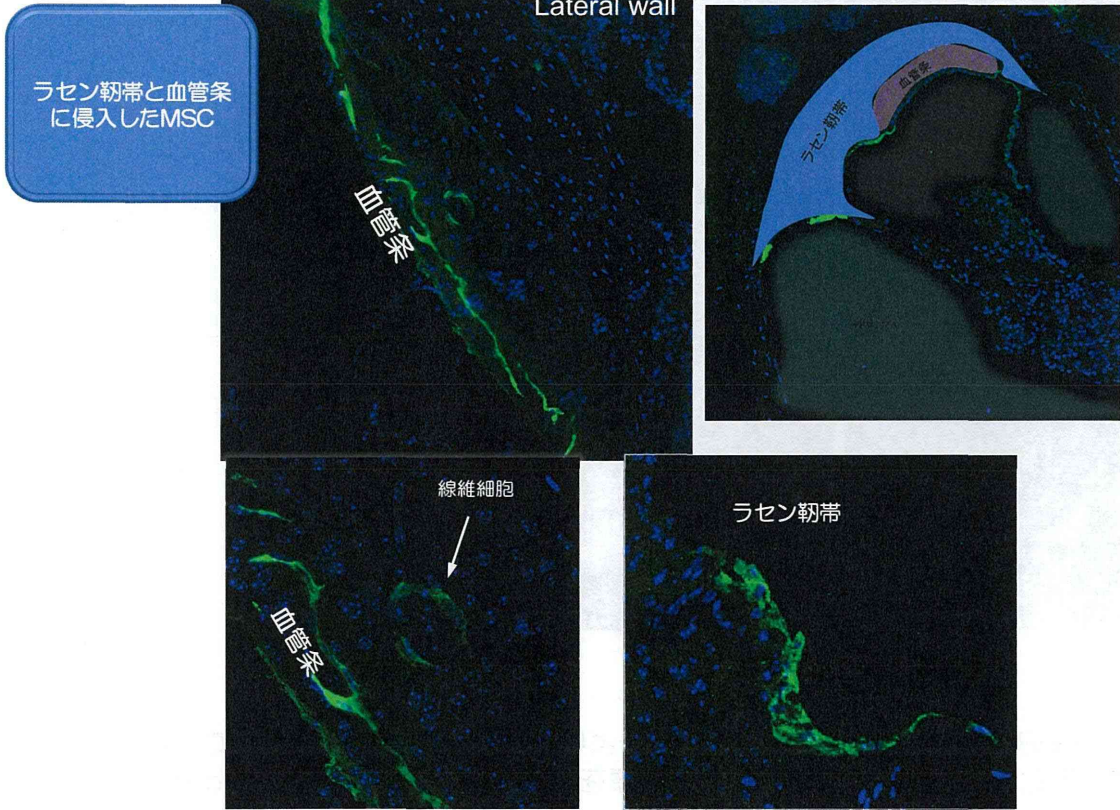


図 17 Cx26 欠損マウス蝸牛に侵入・生着した骨髄間葉系幹細胞

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) 外リンパ液経由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韧带中央部に生着させることに成功した。