

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16904

研究課題名(和文)非症候性難聴DFN3の蝸牛ギャップ結合を標的とした幹細胞治療法の開発

研究課題名(英文)Stem Cell Therapy Targeting Cochlear Gap Junction in Non-Syndromic Deafness DFN3

研究代表者

城所 淑信(Yoshinobu, Kidokoro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60514487

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): Brn4はニューロンや、蝸牛細胞の分化に関わる転写因子であり、X染色体性の非症候性難聴では最多の疾患であるX-linked deafness type3 (DFN3)の原因遺伝子であるが、その機序は未だ解明されていない。研究代表者はBrn4欠損マウスと先天性難聴CX26(GJB2)変異難聴ともにギャップ結合複合体崩壊を有することを発見した。ギャップ結合を標的とした治療法開発が同疾患にも適用できると予想される。本研究では、初期の細胞変性がギャップ結合複合体を形成する蝸牛線維細胞であることを明らかにし、蝸牛線維細胞およびギャップ結合を指標としマウス内耳への骨髄間葉系幹細胞移植の最適条件を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性高度難聴の約半数は遺伝子の関与があるといわれている。原因となる遺伝子産物の一つであるBrn4はニューロンや、蝸牛細胞の分化に関わる転写因子でありX染色体性の非症候性難聴では最多の疾患であるX-linked deafness type3 (DFN3)の原因遺伝子として知られているが、その機序は未だ不明であり、その解明が求められている。本研究ではその解明および幹細胞ホーミング機構と呼ばれる分子機構の活性化の解析を行うことで内耳の標的組織への侵入能力の高い細胞、内耳誘導性の間葉系幹細胞の探索を行っており、将来的に新たな治療技術の可能性が示すことができ、学術的および社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文): Brn4 is a transcription factor involved in the differentiation of neurons and cochlear cells and is known to be the causative gene of X-linked deafness type 3 (DFN3), the most common form of X-linked nonsyndromic deafness, although the mechanism of this disease remains largely unknown. The principal investigator has discovered that Brn4-deficient mice and CX26(GJB2) mutant mice, the most common type of congenital deafness, share a common molecular pathogenesis called "gap junction complex disruption". This discovery is expected to lead to the development of therapies targeting gap junction complexes for this disease as well. In this study, we identified that the initial cellular degeneration is in cochlear fibrocyte that form gap junction complexes, determined the optimal conditions for bone marrow mesenchymal stem cell transplantation into the inner ear of mice using cochlear fibrocyte and their gap junctions, and developed a inner ear cell therapy for hearing loss.

研究分野：難聴

キーワード：遺伝子難聴 幹細胞ホーミング機構 蝸牛ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

先天性高度難聴の発症率は 1,000 人に 1 人の割合であり、その約半数は遺伝子の関与があるといわれている。原因となる遺伝子産物の 1 つである Brn4 はニューロンや、蝸牛細胞の分化に関わる転写因子であり X 染色体性の非症候性難聴では最多の疾患である X-linked deafness type3 (DFN3) の原因遺伝子として知られているが、**Brn4 のその機序は未だ不明な点が多く、その解明を行うことが新たな治療法を開発できる可能性があるためその解明が求められている。**

2. 研究の目的

研究代表者は **Brn4 欠損マウスと先天性難聴で最も高頻度である CX26(GJB2)変異難聴の間**に「ギャップ結合複合体崩壊」という共通の分子病態を持つことを初めて発見した。これによりギャップ結合を標的とした治療法開発が同疾患にも適用できると予想される。以前の当グループの報告では初期の細胞変性がギャップ結合複合体を形成する蝸牛線維細胞であることが明らかとなっており、本研究では**蝸牛線維細胞およびそのギャップ結合を指標とした Brn4 欠損マウス内耳への骨髄間葉系幹細胞移植の最適条件を探索し、Brn4 変異型難聴の細胞治療法を開発すること**を目的とする。

3. 研究の方法

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 10-15 世代継代した後 EGFP (緑色蛍光) または Hc-Red (遠赤色蛍光) 発現レトロウィルスにより標識した。マウス経半規管外リンパ液還流による細胞移植手術を行った。全身麻酔下でマウスの後半規管および外側半規管に小孔を設け、様々な挿入法により微小カテーテルを挿入することで外リンパ液中へ 2×10^5 cells の細胞液を還流、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。移植細胞の動態の解析は、GFP 標識細胞移植 1 週間後に Hc Red 標識細胞を追加移植し経時的な移植細胞侵入の変化により評価した。また、蝸牛組織を還流固定し凍結切片およびホールマウント組織を得た。抗 EGFP 免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により移植細胞の生着部位と頻度を解析した。さらに、移植細胞における蝸牛線維細胞の主な機能的タンパク質である Cx26、Cx30、Na⁺/K⁺ATPase の発現と局在を免疫組織化学にて解析した。Cx26 の免疫蛍光染色の共焦点画像からギャップ結合プラークの三次元画像を構築し、そのプラーク長の解析によってギャップ結合の崩壊度や細胞治療による修復率を解析し、最適な細胞移植条件を探索した。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 (DPOAE) により測定。移植 4 週間後に蝸牛内電位 (EP) を測定し蝸牛を採取した。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った。これまでにミトコンドリア機能阻害剤、3 ニトロプロピオン酸 (3NP) の局所投与により線維細胞の損傷と同時に走化性因子 MCP1 の mRNA 発現が高まり、移植間葉系幹細胞が損傷部に侵入することが示唆された。本研究では、走化性因子の発現を高めることを目的とし遺伝子改変マウスに聴力低下を生じない低濃度の 3NP を内耳正円窓へ局所投与、その 3 日後に幹細胞の内耳移植を行った。

4. 研究成果

骨髄間葉系幹細胞の中で、移植に適した細胞集団を選抜するために幹細胞ホーミング機構と呼ばれる分子機構の活性化を解析し、内耳の標的組織への侵入能力の高い細胞、内耳誘導性の間葉系幹細胞の探索を行った。同解析では培養細胞への処置により内耳への誘導性に関わる分子を高発現する細胞集団が存在することが確認できた。この細胞は内耳への移植細胞として有効であると考えられる。さらに、多能性幹細胞から内耳細胞への分化機構の

解明のため、ES細胞から内耳用細胞への分化誘導法の検討を行い、TGFbeta阻害剤とBMP4による薬剤添加処理の調節で効率的にConnexin26分子を発現させる方法を開発した。さらに、マウス内耳への細胞治療実験のための細胞液投与法の検討を行い高効率の蝸牛内への投与手技を確立した。これらを用いたマウス内耳への細胞治療実験のため、細胞液投与法の検討を行い、内径70μmの微小チューブの半規管への挿入法を検討し、10~20μLの細胞液を効率的に注入することが可能となった。これらの細胞は二光子顕微鏡にて解析を行い、EGFP陽性の移植細胞は前庭および蝸牛への生着が確認された。以上から、蝸牛線維細胞およびそのギャップ結合を指標としたマウス内耳への骨髄間葉系幹細胞移植の最適条件を探索し、内耳細胞治療法を技術開発が進展した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kusunoki Takeshi, Homma Hiroto, Kidokoro Yoshinobu, Yoshikawa Akihisa, Tanaka Kumiko, Kubo Satoko, Wada Ryo, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Tracheal Stenosis and Recurrent Nerve Paralysis Due to Thyroid Malignant Lymphoma with Huge Chronic Thyroiditis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinics and Practice	6. 最初と最後の頁 93 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4081/cp.2020.1276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusunoki Takeshi, Homma Hiroto, Kidokoro Yoshinobu, Yoshikawa Akihisa, Tanaka Kumiko, Kubo Satoko, Wada Ryo, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 11
2. 論文標題 A Case of Nasopharyngeal Tuberculosis with Cervical Lymph Node Tuberculosis Suspected of Cervical Malignant Disease at the First Examination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinics and Practice	6. 最初と最後の頁 43 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/clinpract11010008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda K, Ito S, Hibiya R, Homma H, Ono N, Okada H, Kidokoro Y, Shiozawa A, Kusunoki T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Postoperative Management of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Impact of High-Dose Corticosteroid Nasal Spray.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Arch Otorhinolaryngol	6. 最初と最後の頁 101-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0038-1668515.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城所 淑信、楠 威志
2. 発表標題 当科で経験した節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型の一例
3. 学会等名 第33回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間 博友、城所 淑信、楠 威志
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎診断のための鼻茸生検とステロイド投与の影響
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関