

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390445

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた遺伝子難聴の治療開発の挑戦

研究課題名（英文） Cell therapy and gene therapy for heredity deafness with genetically modified mice

研究代表者

池田 勝久（IKEDA KATUHISA）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70159614

研究成果の概要（和文）：本研究では独自の遺伝子改変難聴モデル動物を用い効果的な細胞導入法およびウイルスベクターを用いた遺伝子治療法を開発するため、以下の実験により良好な結果が得られている。移植用幹細胞の作製：移植用骨髄間葉系幹細胞（MSC）作製のため、C57BL/6 マウス由来 H1/A 骨髄間葉系幹細胞株に EGFP 遺伝子（緑色蛍光）をレトロウイルスにて発現させ、安定的に強度な蛍光を発する細胞を選抜クローニングした。新規 Connexin26（Cx26）欠損マウスの作製：P0 プロモーターを用いた Cre-loxP システムにより内耳特異的に Cx26 遺伝子を欠損するマウスを新規開発した。Brn-4 欠損マウスの作製：癌研究所（東京、有明）にて凍結保存した Brn-4 欠損マウスの受精卵を順天堂大学動物施設にて融解し、C57BL/6J 系統のレシピエントマウスに移植して Brn-4 欠損マウスの個体を得た。これらの交配、遺伝子タイピングによる選抜により大量の同欠損マウスを作製中である。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 を還流した。移植細胞の検出：経半規管移植後の組織を GFP 蛍光検出により移植細胞の組織進入を解析し、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。更に蝸牛線維細胞に選択的障害を与えることにより細胞導入効率が大幅に上昇した。更にこの誘導機構の解析により、ケモカイン MCP1 とその受容体 CCR2 による誘導機序が示唆されたため、CCR2 遺伝子を内耳より単離し発現用プラスミドを構築した。これを移植細胞に導入したところ、細胞生着効率が飛躍的に向上した。更に我々は Cx26 遺伝子を導入したアデノ随伴ウイルスを作製し、Cx26 欠損マウスへの遺伝子導入を行った。その結果外側壁線維細胞において Cx26 を発現させることに発現に成功した。これらの条件検討を推進することにより新規細胞治療法が Cx26 変異等による遺伝性難聴に対する更に効果の高い治療法として聴力改善につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Congenital deafness affects about 1 in 1000 children and the half of them have genetic background such as Connexin26 gene mutation. The strategy to rescue such heredity deafness has not been developed yet. Recently, a number of clinical studies for cell therapy have been reported and clinically used for several intractable diseases. Inner ear cell therapy for sensorineural hearing loss also has been studied using some laboratory animals, although the successful reports for the hearing recovery accompanied with supplementation of the normal functional cells followed by tissue repair, recovery of the cellular/molecular functions were still few. Previously, we developed a novel animal model for acute sensorineural hearing loss due to fibrocyte dysfunction and performed cell therapy with bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) as supplementation of cochlear fibrocytes functioning for cochlear ion transport. MSC has been known to have little risk for carcinogenesis compared with embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell. We injected MSC into the lateral semicircular canal and a number of these stem cells were then detected in the injured area in the lateral wall. The transplanted animals

showed a significantly higher hearing recovery ratio than controls. We analyzed the machinery of this stem cell induction to the targeted site in cochlea and found that monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) and chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) played important roles for this cell induction. To enhance the MSC induction in cochlea, we developed a novel transplant strategy by induction of MCP1 expression in host cochlear tissue and forced expression of CCR2 in MSC. Furthermore, we developed a novel mouse model for Connexin26 mutation as most frequent heredity deafness in human. With these animal models, the developed stem cells and the novel strategy to enhance the stem cell induction, we examined to establish an efficient stem cell therapy to cochlear target site followed by recovery of hearing function in heredity deafness.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000円	1,650,000円	7,150,000円
2009年度	5,000,000円	1,500,000円	6,500,000円
2010年度	4,200,000円	1,260,000円	5,460,000円
年度			
総計	14,700,000円	4,410,000円	19,110,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：GJB2・難聴・ノックアウトマウス・コルチ器・内耳

1. 研究開始当初の背景

聴覚医学への分子生物学と分子遺伝学の応用は最先端の話題である。特に、感音難聴に対する遺伝子治療の突破口として、アデノウイルスベクターによる *Atoh1* 遺伝子の内耳への導入によってアミノ配糖体抗生物質による有毛細胞の変性が回復したことが挙げられる。一方、外的因子による難聴と対比される遺伝性難聴に関しては未だ根本的治療の研究成果は皆無である。遺伝性難聴の代表として *GJB2* 遺伝子異常は gap 結合の障害により蝸牛のコルチ器のイオン環境の変化に基づく二次的な有毛細胞の変性が難聴の原因であることを、我々は世界に先駆けて開発した優性遺伝形式の *gjb2* 変異マウスの研究から明らかにした (Hum Mol Genet 12:995-10904, 2003)。しかしながら、大部分の *GJB2* 遺伝性難聴は劣性遺伝形式であり、遺伝子変異を根本的に治療するためにはヒトの病態に等価した動物モデルを開発することが求められていた。従来の研究では *gjb2* 遺伝子のノックアウトマウスは胎盤の形成不全のため致死的であることが報告されている。そこで蝸牛に発現する *gjb2* 遺伝子を欠失させる空間的な条件付きノックアウトマウスによって

開発したヒトの *GJB2* 劣性遺伝形式の難聴を忠実に再現した動物モデルを応用して、難聴の発症機序に基づいた根本的治療に取り組むことを企画した。

2. 研究の目的

内耳コルチリンパのイオン環境の障害は外有毛細胞の運動能を失活させ、また内有毛細胞からの放出されるグルタミン酸の取り込み障害は求心性神経終末の変性を引き起こし、これらが難聴機序の本体であることを証明する。第二に、低侵襲かつ高効率な *Gjb2* 遺伝子導入法を確立する。①ベクターの種類、つまりアデノウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターの2種類で比較し、②投与方法、つまり蝸牛側壁に作製した小孔からの内リンパへの投与方法と正円窓からの外リンパへの投与方法を比較することによって検討する。第三には低侵襲で高効率な遺伝子導入法により、*gjb2* ノックアウトマウスへ正常な *gjb2* 分子を導入し、歪成分耳音響放射と聴性脳幹反応を測定し聴覚機能回復を評価し、コルチ器の三次元構築の回復を組織学的に証明する。

今回の標的である *GJB2* 劣性遺伝形式の難聴

は遺伝性難聴において最も頻度の高い。これらの難聴モデル動物を用いて根本的治療を構築するための straightforward な戦略は変異マウスの内耳に欠損した正常遺伝子を導入することである。この仕事を実現するために、第一に蝸牛に発現する *gjb2* 遺伝子を欠失させる空間的な条件付きノックアウトマウスによって、ヒトの *GJB2* 劣性遺伝形式の難聴を忠実に再現した動物モデルを開発し、難聴機序を解明する。上図のように変異体ではコルチトンネルの消失とコルチ器の虚脱を認めた。*Gjb2* 遺伝子にコードされる gap 結合蛋白であるコンキシン 26 (Cx26) は細胞骨格の重合やイオン共輸送体の活性に必須な細胞内 Ca イオンや IP3 などの細胞内情報伝達物質やグルタミン酸など細胞間の輸送に関与し、Cx26 の欠失は①柱細胞やダイテル細胞のチューブリンで代表される細胞骨格の変性と②支持細胞に存在するイオン共輸送体である *kcc3* と *kcc4* の活性障害をもたらすことを証明する。上記で得られた遺伝性難聴の分子病態の情報をもとに、新規細胞治療法、遺伝子治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子改変難聴モデルマウスの開発およびその分子病態解析

P0 プロモーターを用いた Cre-loxP システムにより、内耳特異的に Cx26 を欠損する難聴モデルマウスの作製を行った。これらの聴力を聴性脳幹反応・ABR にてモニタリングし、内耳の凍結切片、パラフィン切片、ホールマウント組織、電顕用標本を作製する。これらにより内耳組織の超微細構造の変化および難聴関連タンパク質の局在変化を解析する。内耳細胞治療法

C57BL/6 マウスを麻酔後、耳後部より削開、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。1 X10⁵ cells in 20μl の骨髄間葉系幹細胞細胞液 (EGFP 標識) を 10 分間の注入により還流する。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) 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た。同処置による聴力低下は見られない。移植後 1 週間毎

に聴力を聴性脳幹反応 (ABR) を測定。移植 4 週間後に測定し蝸牛を採取する。上記と同様の方法で移植 16 週間までの長期モニタリングを平行して行う。

内耳遺伝子治療法

遺伝子欠損マウスに Cx26 遺伝子および EGFP 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを構築。これを内耳正円窓経由、および半規管経由にて内耳外リンパ領域へ導入する。

4. 研究成果

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 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室は Cx26 以外にも Cx30 や Cx43 などほぼ同一箇所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。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。

内耳遺伝子治療法の開発

Cx26 遺伝子および EGFP 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を構築。これを内耳正円窓経由、および半規管経由にて上記の Cx26 遺伝子欠損マウスの内耳外リンパ領域へ導入した。これにより、成体および幼若期 (0 日齢) の遺伝性難聴モデルマウスに対し、欠失した Cx26 遺伝子を AAV にて導入し、Cx26 欠損細胞に同遺伝子を発現させること成功した。今後出生直後のマウスに導入予定である。

細胞治療実験

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、上図) 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。

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。現在、細胞導入効率を向上させるために Rho 活性化剤で細胞運動・浸潤を高めることが知られる LPA (Lysophosphatidic acid) を幹細胞と同時投与を行っている。同薬剤による導入効率の向上は現在のところ認められていない。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。

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

前述した Cx26 欠損および Cx26 優性阻害変異の難聴モデルに対し、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。

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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saitoh T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K.
Bacteriology of recurrent exacerbation of postoperative course in chronic rhinosinusitis in relation to asthma
Auris Nasus Larynx
査読有
Epub ahead of print、2011、1312-1319
 2. Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saitoh T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K.
Relationship between olfactory acuity and peak expiratory flow during postoperative follow-up in chronic rhinosinusitis associated with asthma
Ann Otol Rhinol Laryngol
査読有、119(11)、2010、576-581
 3. 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 Otolaryngol.
査読有、2010、130(9)、990-5.
 4. Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura H, 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
164:1312-1319, 2009
 5. Saito T, Kusunoki T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, Onoda J, Yokoi H, Ikeda K.
Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis. Rhinology, 47:275-9, 2009.
 6. 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, 48:576-81, 2009.
 7. Ohba S, Fujii H, Ito S, Fujimaki M, Matsumoto F, Furukawa M, Yokoyama J, Kusunoki T, Ikeda K
Overexpression of GLUT-1 in the invasion front is associated with depth of oral squamous cell carcinoma and prognosis. Hino O J Oral Pathol Med. 2009 Aug 26.
 8. Saitoh T, Kusunoki T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, Onoda J, Yokoi H, Ikeda K.
Role of Interleukin-17A in the Eosinophil Accumulation and Mucosal Remodeling in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps Associated with Asthma. Int Arch Allergy Immunol 151:8-16, 2009
 9. Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, Yokoi H, Saito T, Kawano K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K.
Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. Laryngoscope 119:1053-9, 2009.
- [学会発表] (計2件)
1. 神谷和作、池田勝久
欧州分子生物学会 (EMBO meeting)
Cochlear Gap-Junction plaque is disrupted by dominant-negative Connexin26 mutation.
2010年9月4日 スペイン・バルセロナ
 2. 神谷和作、池田勝久 コネキシン26優性阻害変異によるコルチ器周囲細胞におけるギャップ結合プラークの形成変化
日本耳科学会学術集会 東京2009年10月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 勝久 (IKEDA KATUHISA)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 70159614

(2) 研究分担者

美野輪治 (MINOWA OSAMU)

理化学研究所・上級研究員

研究者番号: 00181967

楠 威志 (TAKESHI KUSUNOKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30248025

古川 正幸 (FURUKAWA MASAYUKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 20359524

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 80317487

小池 卓二 (KOIKE TAKUJI)

電気通信大学・電気通信学部・准教授

研究者番号: 10282097

神谷 和作 (KAMIYA KAZUSAKU)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号: 10374159

欠畠 誠治 (KAKEHATA SEIJI)

研究者番号: 90261619