

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592480

研究課題名(和文)コンフォーカルマイクロエンドスコープを用いた新しい内耳遺伝子導入方法の開発

研究課題名(英文)new gene transduction to inner ear with confocal-micro endoscope

研究代表者

田浦 晶子 (Taura, Akiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70515345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：現段階では内耳有毛細胞への遺伝子導入は非常に困難で、ターゲットを絞った遺伝子導入は殆ど不可能である。そこで本研究では微分干渉観察にてaliveな状態で有毛細胞を明視下に同定し、微小ガラス管にてGFPを内耳組織に注入し、遺伝子導入を行った。高効率での導入は困難であったため、イオノフォーシスにより微小電流を流したところ、導入効率の増加を認めた。さらにCell attach法を用い、イオノフォーシスによりGFPを導入したところ、一部の有毛細胞への遺伝子導入は可能であったが、効率は低かった。またコンフォーカルマイクロエンドスコープにて内耳組織を観察し、一部有毛細胞が観察出来た。

研究成果の概要(英文)：At present, it is difficult to transfer genes into hair cells in inner ear. Also it is hard to transfer genes into only hair cells. In this study, we identified hair cell and tried to induce GFP into hair cells. Using glass micro-pipette, we injected GFP gene into inner ear tissues and passed an electric current. By adding electric current, the transduction efficiency increased. Furthermore, we attached glass pipette to cell surface and make micropore chemically and passed weak electric current. In this method, we could successfully induce GFP genes into hair cells. However, the efficiency was not good. Also using confocal micro endoscope, we could observe hair cells.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内耳有毛細胞 遺伝子導入 コンフォーカルマイクロエンドスコープ

1. 研究開始当初の背景

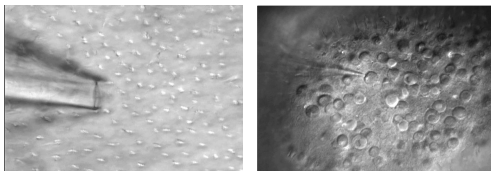
近年のヒトゲノム解析研究の発展によって多くの原因遺伝子が明らかにされ、もはや難聴は原因不明の疾患ではなくなりつつある。難聴の遺伝学的検査は、2008年7月に先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として厚生労働省に承認され、現在臨床的に難聴の遺伝子診断が可能になった。先天性難聴の少なくとも50%は遺伝子の関与によるものとされ、遺伝子診断が必要不可欠である。また現在、老人性難聴や騒音性難聴に関連する遺伝子の研究が盛んに進められており、将来的には様々な難聴に関する遺伝子が明らかになり、治療や予防が可能になる時代が必ず来ると考えられる。

2. 研究の目的

遺伝子治療としては、現在世界中様々な臓器で臨床試験が行われているものの、内耳領域では未だに遺伝子治療効果についての報告は殆どないのが現状である。動物実験で Atoh1 の遺伝子導入により、異所性に有毛細胞の発現を認めたとの報告 (Izumikawa, 2005) もあるものの、その異所性有毛細胞がシナプス形成し、機能しているかまでは不明である。今後、難聴の原因遺伝子が同定され、遺伝性難聴も治療可能となりうるはずである。近年ギャップ結合を担う遺伝子欠損に対する報告は見られるようになってきたが、残念ながら有毛細胞における単一遺伝子欠損に対し、その欠損遺伝子を導入する事で症状が rescue できるか、現段階では不明なのである。そのために、本研究では内耳有毛細胞に遺伝子を導入し、その効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まず内耳蝸牛および前庭組織培養を行い、*ex vivo* での遺伝子導入を行う。方法としては 1) Injection 法と 2) Cell attach 法 (電気生理学的手法の一つである穿孔パッチ法) を用いて、GFP を reporter gene としてカチオン化ポリマー (PEI) を用いてプラスミドの導入を行った。



1) Injection 法 2) Cell attach 法

また、カチオン化ポリマー PEI と結合させ陽イオン化した DNA プラスミドを ガラスピペットを用いて 10nA の電流を流して遺伝子を導入した (イオノフォレーシス)。

またコンフォーカルマイクロエンドスコープを用いて、ターゲットとなる遺伝子導入

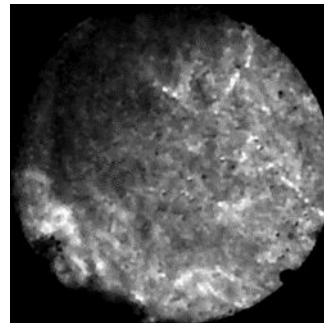
細胞の同定を行った。

4. 研究成果

H23 年度

まず初めに confocal-mico-endoscope を用いてマウスの生後 2 日齢および adult の側頭骨および前庭を 4%PFA にて固定し、phalloidin で染色したものと、固定せずに FM1-43 を取り込ませたものを用いて観察した。固定して phalloidin 染色したサンプルにおいて有毛細胞の同定が可能であった。しかし、working distance が短いために内視鏡と組織をほぼ接着させる必要があり、内耳組織での解像度は高くなかった。

コンフォーカルマイクロエンドスコープを用いた前庭組織 (一部で感覚毛様構造を認めた)

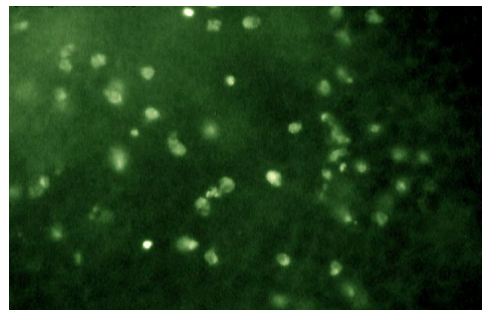


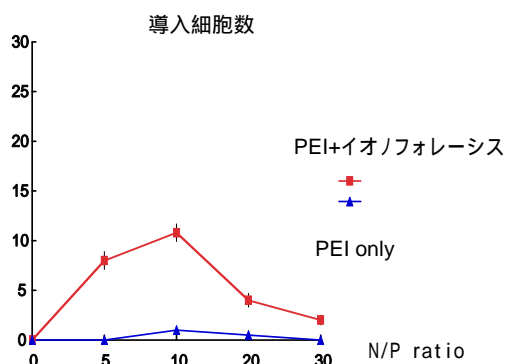
またカチオン化ポリマー (PEI) を用いての GFP 導入は、293 細胞には可能であったが、内耳前庭組織への導入は困難であった。

H24-5 年度

1) PEI を用いての GFP プラスミドの内耳前庭組織への導入が困難であったため、内耳有毛細胞に電気生理学的イオノフォレーシスを用いて、矩形波電流を流し、細胞内にプラスミドを流入させると導入効率の増加を認める事が出来た。様々な濃度および方法にて至適導入効率を確認した結果、N/P 比が 10 の場合において導入効率の増加を認める事が出来た。

1) PEI+イオノフォレーシス (前庭): 導入効率が増加

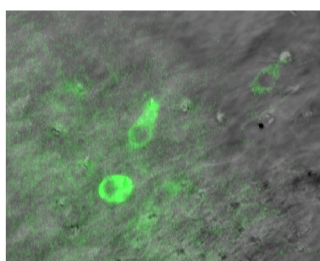




2) Cell attach 法

微分干渉観察下において有毛細胞を明視下におき、ガラスピペットを細胞表面に接着させ、ナイスタチンにて微小穿孔を開けて遺伝子を導入した。その際にもより遺伝子が導入されやすい様に、微小電流を流したところ、一部の有毛細胞において GFP 導入が可能であった。

2) Cell attach 法：一部だが有毛細胞に導入出来た



H26 年度

iPS 細胞を用いて遺伝子導入を行い、有毛細胞への分化誘導を試みた。GFP の導入は injection 法にて可能であったが、効率は低かった。そのために FuGENE にて遺伝子導入を行ったところ、内耳有毛細胞の前駆細胞には効率よく遺伝子導入が可能であった。しかしながら、そこから内耳有毛細胞への分化誘導が困難であったため、有毛細胞での遺伝子発現の確認は出来なかった。

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 3 件)

- 1) 田浦晶子, 伊藤壽一: 有毛細胞の再生治療. *Clinical Neuroscience*. Vol. 29 (12). 1382-1384. 2011
- 2) 田浦晶子: トピックス 内耳再生医療. *Equilibrium Research*. Vol. 73. 538-542. 2014
- 3) Taura A, Ohnishi H, Ochi S, Ebisu F, Nakagawa T, Ito J. Effects of mouse

utricle stromal tissues on hair cell induction from induced pluripotent stem cells. *BMC Neurosci*. 2014;15(1):121

[学会発表](計 14 件)

- 1) 田浦晶子, 中川隆之, 伊藤壽一: 内耳障害における PKC 経路についての検討: 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会 2011 年 5 月 19-21 日. 国立京都国際会館(京都市)
- 2) 田浦晶子, 中川隆之, 伊藤壽一: PKC 経路活性化による内耳障害治療: 第 21 回日本耳科学会. 2011 年 11 月 24-26 日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)
- 3) TAURA A, ANGUNSRI N, NAKAGAWA T, HAYASHI Y, KITAJIRI S, OMI E, ISHIKAWA K, ITO J: Insulin-like growth factor 1 protects vestibular hair cells from aminoglycosides: The 14th Japan-Korea Joint meeting of otorhinolaryngology HNS. 2012 年 4 月 13 日. Kyoto, Japan
- 4) 田浦晶子, 中川隆之, 伊藤壽一: Espin 遺伝子導入による感覚毛再生: 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会. 2012 年 5 月 10-12 日. 朱鷺メッセ(新潟市)
- 5) 田浦晶子, 中川隆之, 伊藤壽一: Ionophoresis による遺伝子導入についての検討: 第 22 回日本耳科学会. 2012 年 10 月 4-6 日(第 22 回日本耳科学会ポスター賞受賞). 名古屋国際会議場(名古屋市)
- 6) 田浦晶子, 伊藤壽一: iPS 細胞を用いた内耳再生治療<厚労科研・前庭機能異常に関する調査研究> 24 年度報告会. 2013 年 1 月 19 日. 東京医科大学病院(東京都)
- 7) 田浦晶子, 中川隆之, 伊藤壽一: Espin 遺伝子導入による内耳再生治療: 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21-23 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 8) TAURA A, FUNABIKI K, TORII H, MATSUNAGA M, ITO J: Characteristic findings of stabilometry in patients with cervical vertigo: 2nd Joint World Congress of ISPRG and Gait and Mental Function. 2013 年 6 月 22-26 日. Akita, JPN
- 9) 田浦晶子: 未来の前庭障害治療: 第 4 回大阪めまいフォーラム. 2013 年 9 月 7 日
- 10) 田浦晶子, 伊藤壽一: ヒト iPS 細胞を用いた前庭障害治療<厚労科研・前庭機能異常に関する調査研究> 25 年度報告会. 2014 年 1 月 18 日. 東京医科大学病院(東京都)
- 11) 田浦晶子, 越智翔平, 大西弘恵, 中川隆之, 伊藤壽一: ヒト iPS 細胞を用いた前庭障害治療への試み. 第 13 回日本再生医療学会総会. 2014 年 3 月 4-5 日. 国立京都国際会館(京都市)

12) 田浦晶子, 坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一: iPS細胞を用いた内耳障害治療への試み: 第115回日本耳鼻咽喉科学会. 2014年5月16日. ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)

13) 田浦晶子, 中川隆之, 伊藤壽一: ヒト iPS細胞を用いた前庭障害治療.: 第73回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会. 2014年11月6日(第73回日本めまい平衡医学会ポスター受賞)パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

14) Taura Akiko, Nakashima Noriyuki, Onishi Hiroe, Nakagawa Takayuki, Ito Juichi: The Regenerative Therapy for Vestibular Disorders with human induced pluripotent stem (iPS) cells: Inner ear Biology Workshop. 2014年11月1-4日. Kyoto, JPN

〔図書〕(計2件)

1) Taura A: Gene Therapy. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer Japan KK; 2014:215-221

2) Taura A: Self-Repair. Regenerative Medicine for the Inner Ear. Tokyo, Japan: Springer Japan KK; 2014:189-197

〔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:
出願年月日:
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

田浦 晶子 (TAURA AKIKO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 70515345

(2) 研究分担者

中川 隆之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 50335270

坂本 達則 (SAKAMOTO TATSUNORI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60425626

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHINICHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 00532970

戎 富美 (EBISU FUMI)

京都大学・大学院医学研究科・特定研究員
研究者番号: 70596197

(3) 連携研究者

船曳 和雄 (FUNABIKI KAZUO)
研究者番号: 60425626