

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293351

研究課題名(和文) 多能性幹細胞移植・遺伝子治療による複合的内耳治療戦略

研究課題名(英文) Cell therapy and gene therapy targeting GJB2 associated hearing loss

研究代表者

池田 勝久 (Ikeda, Katsuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70159614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：Connexin (Cx) 26をコードするGjb2遺伝子は原因遺伝子の50%以上と最も高頻度に変異が検出されるが、未だ有効な根本的治療法は存在しない。我々は二種のCx26遺伝子改変難聴モデルを用いて、Cx26がギャップ結合プラーク(GJP)複合体を安定化させていることを証明した(Kamiya, 2014, J Clin Invest)。このGJPを遺伝子治療にて修復し、Cx26欠損難聴モデルマウスの聴力を有意に改善させることに成功した(Iizuka, 2015, Hum Mol Genet)。

研究成果の概要(英文)：GJB2 encodes connexin (Cx) 26, a component in cochlear gap junction. We recently demonstrated that the drastic disruption of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex composed of Cx26 and Cx30 are critical pathogenesis starting before hearing onset. To develop the effective therapy for GJB2 associated hearing loss, restoration of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex using virus vectors or multipotent stem cells such as induced pluripotent stem (iPS) cells and mesenchymal stem cell (MSC) are expected to rescue the hearing function of GJB2 related hearing loss. Mouse induced pluripotent stem cells (iPS) were used for generation of Cx26-expressing cells with proper gap junction plaque between the cells. Adeno associate virus (AAV) were used for the GJB2 gene transfer and restoration of GJP. By differentiation of iPS cells, we generated the Cx26-expressing cells with large gap junction plaque as cochlear cells.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝性難聴 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は全ての先天性疾患のうちでも最も頻度の高い疾患の1つであり、そのうち半数以上を占める遺伝性難聴は約1,600出生に1人と高頻度に発症し聴覚と言語発育の著しい障害を引き起こす極めて高度なQOLの低下をもたらす。特にコネキシン26をコードする*GJB2*遺伝子の変異は日本人における遺伝性難聴の20~30%を占めていることが我々の研究でも明らかになり (*Am J Med Genet* 90:141-145, 2000) 世界中でも最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子であることが示されてきた。これまでの研究ではその他30以上の遺伝性難聴原因遺伝子が同定されており、最終的には100以上の難聴遺伝子の関与が推察されている。このように遺伝性難聴の原因遺伝子は多種多様で、さらに標的細胞も有毛細胞、支持細胞、線維細胞など極めて多岐に渡っている。未知遺伝子による遺伝性難聴では遺伝子治療や細胞治療などの個体の差別化治療の応用はすべての症例においては困難である。これまで外的因子による内耳性難聴の欠損細胞の治療戦略は有毛細胞の分化や増殖であったが、遺伝性難聴の第一次的な原因細胞は有毛細胞以外にも線維細胞や支持細胞の場合もあり、多種多様な欠損細胞を分化誘導する新たな治療戦略が求められていた。

我々はヒト非症候性遺伝性難聴因子*Brn-4*の遺伝子欠損マウスの作成に初めて成功しこの機能解析を報告した (*Science* 285:1408-1411, 1999)。この研究はヒト非症候性遺伝性難聴であるDFN3の原因がラセン靭帯の線維細胞の変性にあることが証明されただけでなく、内リンパ電位の形成に線維細胞が不可欠であるという新しい内耳の生理学的機能を明らかにした (図1)。さらに優性と劣性遺伝形式が知られている*Gjb2*遺伝子の動物モデルを開発し (*Hum Mol Genet* 12:995-10904, 2003)、コルチ器のリンパ液を満たしている間隙の発育段階の形成不全が認められ、支持細胞の分化・機能発現が障害されていることが証明された (*Neuroscience*.156:1039-47, 2008、図2)。また有毛細胞の機能は維持されており、支持細胞のみを標的とした遺伝子・再生治療が*Gjb2* 遺伝子変異マウスの難聴のレスキューにつながることも判明した (*Neuroscience* 164:1312-1319, 2009)

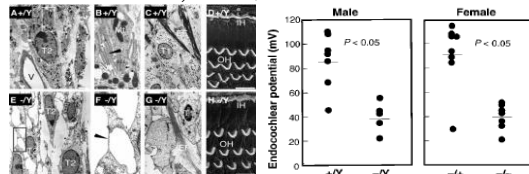


図1. 本課題で使用するヒト遺伝性難聴モデル*Brn4* 遺伝子欠損マウスにおける蝸牛線維細胞の変性 (Minowa, Ikeda et al. *Science* 1999)。蝸牛有毛細胞を含むコルチ器に変性がないにもかかわらず (H)、蝸牛線維細胞に変性が見られ (F, 矢頭)、その結果蝸牛内リンパ電位が著しく低下する (右グラフ)。→すなわち蝸牛線維細胞を正常細胞に置換することができれば聴力が回復する可能性が非常に高い。

また蝸牛線維細胞の聴力機能への影響を解析するため、蝸牛ラセン靭帯およびらせん板縁の線維細胞の二点のみに限局的な損傷を持つ聴覚障害モデルラット作製に成功

(*Neuroreport* 19:15(10):1597-600, 2004)、さらにこのモデルラットに対し半規管からの外リンパ液還流法による骨髄間葉系幹細胞移植を試み、損傷部を修復し聴力回復を促進させることに初めて成功し、蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞の移植法は細胞移植後の拒絶反応も少なく他家移植としての有用性が証明された (*Am. J. Pathol.* 171:214-26.2007)。さらに、未熟マウスでのウイルスベクター導入実験 (*Hum Gene Ther* 19:384-90, 2008) 等により内耳への遺伝子導入療法の基盤研究を整備してきた。以上の複数の手段によって遺伝性難聴の内耳の変異細胞を正常細胞に置換する方法としても十分応用可能であることが示された。

本研究では、多種多様な欠損細胞を一元的に修復する治療法として i) 欠失した遺伝子の導入と ii) 骨髄間葉系幹細胞および成人細胞から樹立可能な新規多能性幹細胞 iPS 細胞 (induced Pluriopotential Stem Cell) の移入を我々の作製した遺伝性難聴モデルマウスへ適用し安全性・有効性評価を行うことにより、これまで皆無であった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。

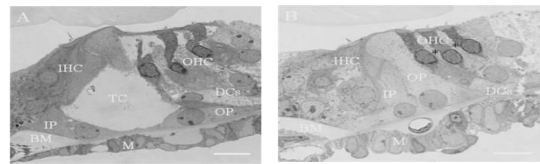


図2. *Gjb2* 遺伝子変異ではコルチ器のリンパ液の間隙の消失と支持細胞の分化に障害を認める (右: 野生型、左: 変異型) (Inoshita, Ikeda et al. *Neuroscience* 2009)

2. 研究の目的

遺伝性難聴の根本的治療法は皆無であり、新たな治療戦略を必要としている。本研究は右に示すように内耳幹細胞治療法とウイルスベクターによる内耳遺伝子導入法という2種類の独自に開発したアプローチを組み合わせ、独自の遺伝性難聴モデルに適用する。主に標的とするのは蝸牛線維細胞・支持細胞および同細胞で機能するコネキシン26遺伝子である。この治療による聴力回復に関する有効性と安全性を評価する。



3. 研究の方法

本研究ではこれまで開発してきた独自の研究ツール・手法を複合的に組み合わせ、遺伝性難聴の最適治療戦略を検討する。以下の流れにより実験を遂行する。

1. 遺伝子改変難聴モデルマウスの開発
2. 各種多能性幹細胞の開発および機能評価
3. 内耳遺伝子治療用ウイルスベクターの開発
4. 幹細胞・ウイルスベクターの複合的投与
5. 移植細胞・導入遺伝子産物の検出および分析
6. 細胞置換効率を向上させるための細胞移植法の検討
7. 全データをもとにした有効性・安全性評価

平成 25 年度

1. 遺伝性難聴モデルマウスの開発 (美野輪、神谷)

以下の独自の遺伝性難聴モデル動物を内耳細胞治療実験に供することとし、交配を進めている。

1.Brn4-KO マウス (Minowa, *Science* 1999): 癌研究所由来の受精卵より産出・順天堂大にて交配。

2.Cx26-Tg マウス (Kudo, *Hum Mol Genet* 2003): 順天堂大学動物施設にて繁殖、維持。

3.Cx26-KO マウス (新規開発): Cx26 は全身に遺伝子欠損させると胎生致死となるが、我々は P0-Promoter により制御される Cre recombinase 遺伝子を用いて内耳特異的に同遺伝子を欠損させる Cx26-KO マウスを新規開発した。同マウスが高度難聴を有することは確認済みである。

2. 各種多能性幹細胞の開発および機能評価 (池田、神谷、飯塚)

◆骨髄間葉系幹細胞 (MSC)

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る。

培養ディッシュにて 10-15 世代継代した後 EGFP (緑色蛍光) または Hc-Red (赤色蛍光) 発現レトロウイルスにより標識。

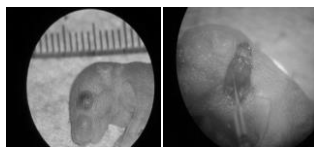
◆マウス iPS 細胞

理研バイオリソースセンターから供与を受け培養および分化誘導を進めている。2010 年に発表された同細胞の内耳有毛細胞への分化誘導方法 (Oshima et al. *Cell* 2010) を改変して内耳前駆細胞を作製しており、複数の分化ステージの内耳前駆細胞が樹立された。また比較として我々が新規に樹立した成体内耳幹細胞を使用する。

3. 内耳遺伝子治療用ウイルスベクターの開発 (飯塚、神谷)

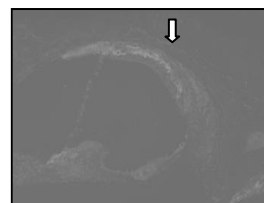
◆アデノ随伴ウイルス (AAV) およびレンチウイルスの作製

以前の研究で導入効率の高かった AAV および染色体

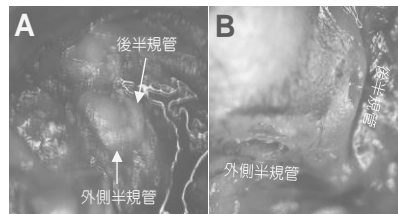


幼若マウスでの遺伝子導入操作 (Iizuka, Ikeda et al. *Human Gene Therapy* 2008)

への遺伝子導入による永続的発現が可能なレンチウイルスを用い Brn4 および Cx26 遺伝子を発現するウイルスベクターを作製。



(←)成熟 Gjb2KO マウスへの正常 AAV-Gjb2 遺伝子導入ラセン鞘とラセン板に Gjb2 蛋白の発現を認める。



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。(神谷和作 医学のあゆみ 細胞治療 Update)

4. 幹細胞・ウイルスベクターの複合的投与 (池田、神谷、飯塚)

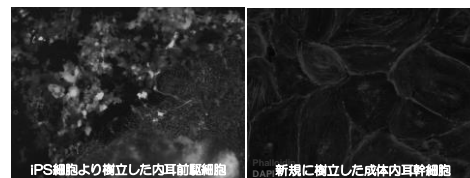
◆経半規管細胞移植実験

外側半規管より 2×10^5 cells in 20 μ l の間葉系幹細胞または iPS 細胞 (EGFP 標識) を 10 分間還流 (上図)。

◆遺伝子導入

上記で作製した AAV およびレンチウイルスベクターをガラスキャピラリーにて正円窓または半規管より 0.5 μ l 投与 (前頁写真)

◆聴力モニタリングおよび内耳採取



平成 26 年度

5. 移植細胞・導入遺伝子産物の検出および分析 (神谷、飯塚)

◆移植細胞・導入遺伝子動態

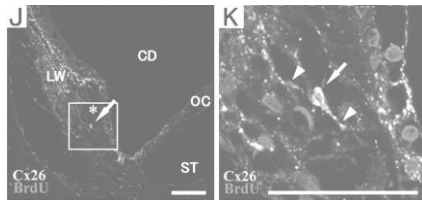
共焦点顕微鏡により EGFP 標識移植細胞のおよび導入遺伝子 (Brn4, Cx26) の動態を解析。走査電子顕微鏡での外側壁表面構造解析。

◆機能的蛋白同定

ターゲットとなる内耳細胞の主な機能的タンパク質であるコネキシン 26、コネキシン 30、Na⁺/K⁺ATPase の発現と局在を免疫組織化学にて解析。

◆侵入経路分析

初期に移植される EGFP 標識細胞および追加移植する Hc-Red 標識細胞を比較することにより移植細胞の移動や組織への侵入経路を分析。



外側壁損傷部へ侵入し、線維細胞ネットワークを再構築する移植細胞。組織侵入後分裂し(矢印)、隣接細胞とコネクシン26の発現を伴い接合している(矢頭)。(Kamiya et al. 2007 *Am J Pathol*)

6. 細胞置換効率を向上させるための細胞移植法の検討 (池田、神谷、飯塚)

◆ 単球走化活性因子 MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) の測定
線維細胞損傷モデルラットの DNA マイクロアレイ解析を行い、神経幹細胞の遊走を促進させる単球走化活性因子 MCP1 の RNA 発現増加を発見した (Kamiya et al. *Am. J. Pathol.* 2007)。本申請では Brn4 欠損マウスおよび Cx26 変異マウスにおける MCP1 の詳細な経時的発現動態を RT-PCR および免疫組織化学によりモニタリングし、細胞の組織誘導のメカニズムや細胞治療に最適な投与時期を決定する。

◆ MCP1 発現による細胞誘導メカニズムの解析

本申請では、走化性因子の発現を一過性に高めることを目的とし各マウスの蝸牛に聴力低下を生じない低濃度の 3NP (20-100mM, 1.5μ) を内耳正円窓へ前投与し、間葉系幹細胞の移植実験を行う。移植後細胞の動態および聴力モニタリングを行い、聴力改善効率および細胞導入効率または細胞置換効率を無処置の移植動物と比較する。この前処置の検討により細胞導入効率および正常細胞への置換効率を向上させるメカニズムを検討する。

平成 27 年度

◆ 全データをもとにした有効性・安全性評価 (池田、神谷、美野輪、飯塚)

遺伝子・細胞治療実験に用いた各ウイルス・幹細胞および移植対象とした各モデルマウスに対し、以下の指標により安全性・有効性および適用対象とされる成熟ステージの評価を行い、最適な組み合わせでの多能性幹細胞・遺伝子治療条件を各専門家の分担により検討する。

細胞移植を適用する成熟ステージの評価 (神谷)

1. 幼若期 (出生直後～生後2週齢)
2. 成熟期 (生後8週齢～生後12週齢)
3. 老齢期 (生後30週齢～生後40週齢)

有効性評価 (池田、神谷)

組織学的解析

1. 蝸牛外リンパ液から蝸牛組織へ侵入率の判定
2. 組織内での移動能力の判定
3. 内耳における機能的細胞への分化度の評価
4. 聴力検査 (ABR, DPOAE)
各周波数での聴力改善の評価

安全性評価 (池田、飯塚)

病理診断

1. 移植細胞の奇形腫形成の頻度
2. 蝸牛および前庭における組織変性の有無
3. 移植細胞拒絶反応の頻度
4. 聴力評価 (ABR, DPOAE)、平衡機能検査
(移植による一時的、長期的聴力低下の有無)



4. 研究成果

【概要】

Connexin (Cx) 26 をコードする Gjb2 遺伝子は原因遺伝子の 50%以上と最も高頻度に変異が検出されるが、未だ有効な根本的治療法は存在しない。Cx26 は蝸牛ギャップ結合の構成要素の一つであり、蝸牛リンパ液のイオン組成を高電位に維持することで音の振動から神経活動への変換を可能としている。我々は二種の Cx26 遺伝子改変難聴モデルを用いて、Cx26 がギャップ結合プラーク (GJP) 複合体を安定化させていることを証明した (Kamiya, 2014, *J Clin Invest*)。この GJP を遺伝子治療にて修復し、Cx26 欠損難聴モデルマウスの聴力を有意に改善させることに成功した (Iizuka, 2015, *Hum Mol Genet*)。さらに骨髄間葉系幹細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた細胞治療法の開発を進めてきた。本研究により最も典型的な遺伝性難聴に対する新たな分子病態理論に基づいた細胞治療・遺伝子治療法の開発が期待できる。

【マウス iPS 細胞の樹立と内耳前駆細胞の分化誘導】

正常マウス (C57BL/6J) および GJB2 欠損マウスの内耳細胞由来 iPS 細胞をセンダイウイルスベクターにより樹立した。樹立した iPS 細胞を用いて下記の分化誘導実験を行った。報告されている iPS 細胞から内耳有毛細胞への三次元分化誘導法 (Koehler, *Nature*, 2013) を改良し検討を行ったところ、iPS 細胞より Cx26 ギャップ結合を有する細胞の作製に成功した。この方法では iPS 細胞の浮遊培養後に蝸牛フィーダー細胞を用いた接着培養を行い分化制御因子として最適な添加因子の組み合わせが選抜された。また独自に開発した蝸牛フィーダー細胞を用いることにより Cx26 ギャップ結合プラーク形成細胞を分離後に増殖させることに成功し

た。免疫組織学的解析から蝸牛支持細胞様の細胞へと分化していることが示唆された(投稿中)。蝸牛支持細胞は蝸牛において Cx26 の発現量が最も高く、GJB2 変異型難聴を標的とした細胞治療や創薬スクリーニングの疾患モデル細胞のために必須の細胞である。GJB2 変異難聴患者の iPS 細胞を用いて同細胞を安定的に作製することが出来れば、ギャップ結合修復を行った細胞治療や創薬のための疾患モデル細胞としての活用が期待できる。

【GJB2 変異難聴患者を標的とした遺伝子改変モデル動物の作製、動物実験データ解析および評価】

本課題では遺伝性難聴の疾患モデル細胞のための iPS 細胞の樹立および細胞治療実験のための遺伝子改変難聴モデル動物を作製している。以下の遺伝子改変難聴モデルマウスを iPS 細胞樹立用細胞の採取および細胞治療実験に用いている。

1. Cx26 優性阻害変異トランスジェニック (Tg)マウス (Kudo, Hum Mol Genet 2003)

2. Cx26 欠損 (KO) マウス (Kamiya, J Clin Invest, 2014) (Iizuka, Hum Mol Genet, 2015)

これらのマウスは同一の遺伝的背景 (C57BL/6J) で交配維持し、背景となる同腹仔の聴力は聴性脳幹反応 (ABR) によって検査され、近親交配に起因する遺伝子多型から生じる聴力低下を排除することにより品質を管理している。既に供給した Cx26 欠損マウスの蝸牛線維細胞の初代培養から Cx26 が欠損した iPS 細胞が樹立された。Cx26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおいても iPS 細胞樹立のためのマウスが供給され、初期化因子導入用の線維芽細胞が得られている。今後は細胞治療を目的とした難聴モデルマウスの作製を行う。聴力に関する遺伝的背景の洗浄(難聴に関わる遺伝子多型の排除のための選抜交配)を聴性脳幹反応 (ABR) にて繰り返すことにより、ヒト遺伝性難聴患者のモデルとした質の高い疾患モデル動物を作製できる見込みである。

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 12 件)

① Iizuka, T., Kamiya, K., Gotoh, S., Sugitani, Y., Suzuki, M., Noda, T., Minowa, O., and Ikeda, K. (2015)

Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness.

Human molecular genetics **24**, 3651-3661

査読有

DOI:10.1093/hmg/ddv109

② Hiroko Okada, Kazusaku Kamiya, Takashi Iizuka and Katsuhisa Ikeda. (2015)

Postnatal Development and Maturation of the Vestibular Organ in

Dominant-Negative Connexin 26

Transgenic Mouse.

J Otol Rhinol **S1**, 37-40

査読有

DOI: 10.4172/2324-8785.S1-009

③ Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Kazuma Kobayashi, Asuka Miwa and Katsuhisa Ikeda. (2015)

Differentiation of iPS Cells to Cochlear Cells are Regulated Depending on the Part of Co-cultured Organs.

J Otol Rhinol **S1**, 34-36

査読有

DOI: 10.4172/2324-8785.S1-008

④ Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama and Katsuhisa Ikeda. (2015)

Connexin26 regulates assembly and maintenance of cochlear gap junction macromolecular complex for normal hearing.

AIP Conference Proceedings **1703**,

30018;30011-30013

査読有

DOI: 10.1063/1.4939333

⑤ Kamiya, K., Yum, S. W., Kurebayashi, N., Muraki, M., Ogawa, K., Karasawa, K., Miwa, A., Guo, X., Gotoh, S., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Ito-Kawashima, S., Iizuka, T., Sakurai, T., Noda, T., Minowa, O., and Ikeda, K. (2014)

Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires connexin 26.

J Clin Invest **124**, 1598-1607

査読有

DOI: 10.1172/JCI67621

[学会発表] (計 38 件)

① GJB2 変異遺伝性難聴に対する細胞治療・遺伝子治療法の開発

神谷和作

第 15 回日本再生医療学会総会

2016 年 3 月 17 日

大阪市

② Restoration of Cochlear Gap Junction for GJB2 Associated Hearing Loss

Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga

Association for Research in Otolaryngology (ARO), 39th Annual MidWinter Meeting

2016 年 2 月 22 日

サンディエゴ(アメリカ)

③ Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga,

Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Ayumi Fujimoto, Atena Nishikawa, Takashi Anzai, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda
Cochlear gap junction plaque, stabilized macromolecular complex composed of specific connexins
52nd Inner Ear Biology Workshop
2015年9月13日
ローマ(イタリア)

④ Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Osamu Minowa, Megumi Funakubo, 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24日
ボルチモア(アメリカ)

⑤ 神谷和作 美野輪治 池田勝久
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11月24日
フィレンツェ(イタリア)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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, Katsuhisa)
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・疾患モデル評価研究開発チーム・開発研究員
研究者番号：00181967

神谷 和作 (KAMIYA, Kazusaku)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10374159

飯塚 崇 (IIZUKA, Takashi)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：40372932

(3) 連携研究者

()

研究者番号：