

## 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(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462653

研究課題名(和文)内耳幹細胞ホーミング機構を応用した遺伝性難聴への多能性幹細胞治療法の開発

研究課題名(英文)Inner ear stem cell therapy with activation of stem cell homing

## 研究代表者

神谷 和作(Kamiya, Kazusaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10374159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療のために幹細胞を蝸牛組織の異常部位へ直接挿入することは蝸牛の構造上困難であり、適切な箇所に幹細胞を導入できる細胞誘導システムが必須であると考えられる。我々は実験的に誘発した蝸牛幹細胞損傷部位において幹細胞ホーミング因子MCP1およびSDF1が高発現することを動物実験において実証した。さらに間葉系幹細胞の培養下でMCP1とSDF1の前処理により、受容体CCR2およびCXCR4のmRNA発現が有意に上昇することを定量的RT-PCRで実証した。さらにフローサイトメトリー分析により間葉系幹細胞の細胞表面のCCR2およびCXCR4を高発現する細胞が有意に増加することを実証した。

研究成果の概要(英文)：Inner ear cell therapy for sensorineural hearing loss has been expected to be an effective therapy for hereditary deafness. Previously, we developed a novel strategy for inner ear cell therapy using bone marrow mesenchymal stem cells as a supplement for cochlear fibrocytes functioning for cochlear ion transport. For cell therapy targeting hereditary deafness, a more effective cell delivery system to induce the stem cells into cochlear tissue is required, because gene mutations affect all cochlear cells expressing genes such as GJB2 encoding CX26. Stem cell homing is one of the crucial mechanisms to be activated for efficient cell delivery to the cochlear tissue. In our study, monocyte chemoattractant protein-1, stromal cell-derived factor-1 and their receptors were found to be a key regulator for stem cell recruitment to the cochlear tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：蝸牛 細胞治療 幹細胞ホーミング

## 1. 研究開始当初の背景

蝸牛らせん靭帯およびらせん板縁を構成する蝸牛線維細胞は蝸牛内イオン輸送という単純な機能を担う細胞群である。しかしながら蝸牛線維細胞の傷害は複数の先天性および後天性難聴の主要因となることが示され、その重要性が近年示唆されている。特に当講座池田勝久教授らが報告したヒト非症候性難聴 DFN3 の原因遺伝子 *Brn4* 欠損マウス (Minowa et al. *Science* 1999, 図1)での発見を機に蝸牛線維細胞の変性を主要因とした聴力低下が実証され、有毛細胞を含むコルチ器同様に正常聴力を維持する上で最重要の細胞群であることが明確に示された。また遺伝性難聴で最も高頻度な原因遺伝子であるコネキシン 26 (Cx26) 遺伝子も蝸牛線維細胞および隣接する支持細胞で機能している。これらのことから蝸牛線維細胞は多種の感音性難聴の新規治療法確立への最も重要な標的の一つと考えられる。この蝸牛線維細胞は**機能が単純だが内耳機能における重要性が高い**という点から、同細胞を治療標的とすれば特殊に分化した有毛細胞に比べて再生治療が成功する可能性が格段に高いと考えられる。研究代表者は蝸牛線維細胞の聴力機能への影響を解析するため、蝸牛らせん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 (Hoya et al. *Neuroreport* 2004)。更にこの難聴ラットの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た (図2 Kamiya et al. *Am. J. Pathol.* 2007、読売新聞 2007)**。それまで生後の処置によって蝸牛内の損傷を修復し聴力回復に成功した例はなく、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有効な治療手段となり得ることが初めて証明された。本手法は細胞移植後の拒絶反応も少なく他家移植とし

ての有用性も示され、遺伝性難聴患者内耳の**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と考えられる。

最近、心臓や精子の再生医療分野で**幹細胞ホーミングと呼ばれる幹細胞を標的組織に誘導・生着させる分子機構**が注目されているが、内耳においてもこの分子機構の増強により大量の多能性幹細胞を目的組織に誘導し生着・分化させることが可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

内耳細胞治療による聴力回復はアプローチが困難なため近年まで成功例が皆無であった。しかし研究代表者は蝸牛線維細胞領域へ間葉系幹細胞を導入し感音性難聴の聴力回復に初めて成功した (Kamiya et al. *Am J Pathol* 2007)。本研究では遺伝性難聴における重要な変性細胞群を標的とした**多能性幹細胞による細胞治療を幹細胞ホーミングの分子機構 (右図)を増強させる**ことにより効率化し遺伝性難聴難聴の根本的治療法開発を目指す。

研究の第一段階として前述した間葉系幹細胞の移植法および移植細胞の検出方法を更に改良し、遺伝性難聴マウスの蝸牛へ多数の**移植細胞を置換・生着させる最適条件を検討**。蝸牛組織内に幹細胞を誘導すると思われる走化性因子 MCP1・SDF1 の発現を増加させることにより細胞侵入促進効果が得られたため、これを更に改良し大量の正常細胞を蝸牛組織内に侵入・生着させ、難聴モデルにおけるイオン輸送障害を改善させる。

第二段階として外リンパ液へ移植した細胞が組織へ進入し、損傷中心部への移動、隣接細胞との結合、機能性遺伝子の発現を解析することにより、聴力回復のために必要な分子機構を検討する。これにより移植細胞に必要な遺伝子を導入し、治療効果を増強させる。これまでの結果で走化性因子 MCP1 の受容

体である CCR2 遺伝子の機能により移植細胞が蝸牛外側壁へ誘導されることが示唆されたため、CCR2 遺伝子を一過的に強発現、または発現増強させた移植細胞を作製し検討を行う。これにより幹細胞による組織誘導・修復反応が飛躍的に向上すると考えられる。

本研究では我々のグループがこれまで報告した **Brn4 遺伝子欠損マウス (Brn4-KO、Science 1999)**、**コネキシン 26 優性阻害変異マウス (Cx26-Tg、Hum Mol Genet 2003)** に加え、新規に開発した

**内耳特異的コネキシン 26 欠損マウス (Cx26-KO)** (現在論文投稿中) を遺伝性難聴モデルとして用いることとする。変異蝸牛線維細胞を正常細胞に置換することにより聴力が回復することを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では独自の**遺伝子改変難聴モデル**に対し、**iPS 由来内耳前駆細胞、骨髄間葉系幹細胞**を樹立し経半規管外リンパ液還流法を施行、移植後の聴力変化、移植細胞検出により侵入経路とその動態を解析する。

無処置の細胞移入のみでは細胞導入が不十分であると予想されるため、蝸牛組織への細胞置換効率を飛躍的に向上させる**内耳ホーミング機構を応用した細胞移植法**の開発を行う。第一に蝸牛線維細胞の軽微損傷による走化性因子 MCP1・SDF1 発現上昇を用いた幹細胞遊走効果の向上。第二にその受容体・CCR2・CXCR4 の発現増強により**蝸牛標的部位への幹細胞遊走のための最適条件を決定**する。

### 平成 25 年度

#### 人工多能性幹 (iPS) 細胞からの内耳前駆細胞の樹立

2010 年、iPS 細胞、ES 細胞から in vitro で内耳有毛細胞を作製する画期的技術が発表

され、内耳細胞を体外で人工的に増殖・分化させることが可能となった (**Oshima, Cell 2010**)。そして本年 9 月には ES 細胞からの内耳前駆細胞の新規作製法が報告された (**Chen, Nature 2012**)。これらの論文を参考に様々な分化状態の内耳前駆細胞を樹立し、内耳移植に最も適した分化度の細胞を選抜する。

#### 骨髄間葉系幹細胞の樹立および標識

生後 8 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨を抽出、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 (遠赤色蛍光) 発現レトロウイルスにより標識する。

#### 遺伝子改変難聴モデルマウス

我々が保有する以下の難聴モデル動物を内耳移植実験に供することとする。

**1.Brn4-KO マウス (Minowa, Science 1999)** : 順天堂大学動物施設にて繁殖中。

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

**3.Cx26-cKO マウス (新規開発、論文投稿中)**: 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 リコンビナーゼ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。

#### 経半規管外リンパ液還流による細胞移植

遺伝子改変マウスの後半規管および外側半規管に小孔を設け後半規管側外リンパ液中へ  $2 \times 10^5$  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 (Spheroid) 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る。移植細胞の動態を解析するため GFP 標識細胞移植 1 週間後に HcRed 標識細胞を追加移植し経時的な移植細胞侵入の変化を解析する。

## 移植後の聴力変化の解析

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。

## 平成 26 年度

### 内耳幹細胞ホーミング機構を応用した効率的細胞誘導法の開発

#### 1. 蝸牛線維細胞におけるホーミング分子 MCP1・SDF1 発現の誘導

我々の以前の報告では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ホーミング分子 (リガンド) MCP1・SDF1 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 (20-100mM, 1.5 $\mu$ ) 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う。同条件を RT-PCR 法により最適化する。この前処置は予備実験で既に効果が得られており、最適条件の検討により細胞導入効率が飛躍的に高まると考えられる。

#### 2. 幹細胞表面の MCP1 受容体 CCR2 および SDF1 受容体 CXCR4 の発現を増強させる

我々は培養上の条件や添加物により幹細胞におけるホーミング分子 (受容体) の発現を大きく変化させることが可能であることを発見した (右図)。この条件を最適化することにより、幹細胞表面にホーミング分子 (受容体) を最大限に発現させホーミング効率 (細胞誘導効率) を飛躍的に高める条件を決定する。

## 平成 27 年度

### 移植細胞検出および最適誘導条件の検討

上記移植後の蝸牛組織を還流固定し凍結切片およびホルマウント組織を得る。抗 GFP 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する。更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コネキシン 26、コネキシン 30、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase の発現と局在を免疫組織化学にて解析する。初期に移植された GFP 標識細胞および追加移植された HcRed 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する。

また移植細胞が外リンパ液から蝸牛外側壁組織へ侵入する経路を特定するため、蝸牛外側壁が外リンパ液と接している前庭階付近の組織を中心に走査電子顕微鏡で外側壁の表面観察を行う。

上記の結果をもとに移植幹細胞および蝸牛への幹細胞ホーミング分子制御 (平成 26 年度) の最適条件を決定する。

#### 4. 研究成果

我々は遺伝性難聴で最も高頻度に発生するコネキシン 26 遺伝子変異の遺伝子改変動物を開発し、その病態を明らかにし (Kamiya et al, J Clin Invest, 2014 124, 1598-1607)、これらの聴力改善を目指した遺伝性難聴への幹細胞治療法の開発を進めてきた。内耳細胞治療において作製された細胞を蝸牛組織の異常部位へ直接挿入することは蝸牛の構造上困難であり、適切な箇所へ幹細胞を導入できる細胞誘導システムが必須であると考えられる。我々は実験的に誘発した蝸牛幹細胞損傷部位において、他臓器における幹細胞ホーミング因子とされる MCP1 および SDF1 が高発現することを推測し、動物実験において実証した。さらに間葉系幹細胞の培養下で MCP1 と SDF1 の全処理を行ったところ、それらの受容体である CCR2 および CXCR4 の mRNA

発現が有意に上昇していることが定量的 RT-PCR で実証された。さらにフローサイトメトリー分析により間葉系幹細胞の細胞表面の CCR2 および CXCR4 を高発現する細胞が有意に上昇することを実証した。この幹細胞ホーミング機構の惹起により内耳への細胞誘導効率が増強された骨髄間葉系幹細胞を作製することが可能となった。

上記の実データから得られたの内耳への幹細胞ホーミングの理論は、Frontiers in pharmacology 誌において論文発表された ( Kamiya, 2015, Frontiers in pharmacology, 2015, 6, 2 )。

#### 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 )

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

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

Kamiya, K. (2015)

Inner ear cell therapy targeting hereditary deafness by activation of stem cell homing factors.

Frontiers in pharmacology **6**, 2

査読有

DOI: 10.3389/fphar.2015.00002

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

Anzai, T., Fukunaga, I., Hatakeyama, K., Fujimoto, A., Kobayashi, K., Nishikawa, A., Aoki, T., Noda, T., Minowa, O., Ikeda, K., and Kamiya, K. (2015)

Deformation of the Outer Hair Cells and the Accumulation of Caveolin-2 in Connexin 26 Deficient Mice.

PloS one **10**, e0141258

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0141258

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)

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

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)

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)

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)

〔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

神谷 和作 (KAMIYA, Kazusaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 10374159

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: