

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620  
研究種目：挑戦的萌芽  
研究期間：2011～2012  
課題番号：23659799  
研究課題名（和文）難聴遺伝子変異マウスへの効率的 iPS 細胞導入法の開発  
研究課題名（英文）Cell therapy for hereditary deafness using induced pluripotent stem cell  
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

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では我々の内耳への細胞治療技術を応用し全内耳細胞への分化能を持つ内耳前駆細胞を作製し内耳移植に最適な細胞を選抜することを試みた。これまでの研究では iPS 細胞から耳胞細胞や有毛細胞への分化誘導法は既報の方法に独自の改良を加え、FGF3/FGF10 刺激後に内耳由来のフィーダー細胞と共培養させることにより内耳発達過程の様々な分化度の iPS 由来内耳前駆細胞を大量に増殖させることが可能となった。Nanog プロモーターで制御されるレポーター緑色蛍光 (GFP) 遺伝子を用いることにより、蛍光発色する未分化コロニーを排除した内耳前駆細胞を接着培養にて増殖させ、通常の凍結保存により維持することに成功している。この株の一つでは、有毛細胞マーカー Myosin7a を発現し有毛細胞様のアクチン重合構造を頂部に持つ細胞が確認された。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we generated the novel inner ear progenitor cells from induced pluripotent stem (iPS) cells which express hair cell marker Myosin7a with proliferation potency. After the stimulation with FGF3 and FGF10, iPS cells were co-cultured with mitotically inactivated adult inner ear multipotent stem cells which we recently generated. They can be proliferate after the cryopreservation. In these methods, we obtained several lines of inner ear lineage cells such as hair cell marker Myosin7a positive cells with apical cilia composed of actin filament, Connexin26 expressing cells. It was suggested that these methods enables to replace multiple types of inner ear cells with any abnormalities

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：耳科学

## 1. 研究開始当初の背景

多様な細胞に分化能を有する iPS 細胞を我々が開発した遺伝性難聴マウス内耳に移植し、欠損した細胞を再生させ、聴力の根本的治療に挑む萌芽研究を企画する。我々は世界で初めてヒト非症候性遺伝性難聴のノックアウトマウス (Brn-4) を作成し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。さらに、Gjb2 遺伝子の優性阻害変異を持つ動物モデルを開発し (Hum Mol Genet 12:995-10904, 2003)、コルチ器の形成不全と支持細胞の分化・機能発現が障害されることが判明された

(Neuroscience. 2008. 08. 027)。また既に線維細胞傷害動物での幹細胞移植での難聴の回復 (Am J Pathol 171:214-226, 2007) や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) により細胞移入の基盤研究を整備してきた。

## 2. 研究の目的

遺伝性難聴は約 1,600 出生に 1 人の高頻度に発症する疾患であり、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。これまでの研究により 30 以上の原因遺伝子が同定されたが、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。未知な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。そこで、全く新たな発想として、多種多様な欠損細胞を一元的に修復する治療法として iPS 細胞に注目し、すべてのタイプの遺伝性難聴を網羅的に治療施行できる可能性が期待される革新的な研究である。

遺伝性難聴の原因遺伝子は多種多様で、治療への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。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・増殖が中心であったが、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があり、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。そこで、多様な細胞へ分化し得る iPS 細胞 (induced Pluripotent Stem Cell) を移植することによって、多彩な病態を示す遺伝性難聴の網羅的な根本治療を立案するに至った。

人工多能性幹細胞、iPS 細胞は成体細胞から作成できる胚性幹 (ES) 細胞と同等の多分化能 (全能性) を有する細胞と考えられるため、将来的な再生医療への応用が大きく期待されている。しかし ES 細胞同様に腫瘍化の制御や分化制御が困難であり、未だ内耳細胞治療における成功例は報告されていない。我々は同細胞を内耳再生治療に応用するための第一のターゲットとして、遺伝性難聴において最も頻度が高いとされているコネクシン 26 の遺伝子欠損マウスを新規に開発した。コネクシン 26 は有毛細胞、支持細胞、蝸牛線維細胞および血管条など多種の細胞に高く発現するため、損傷の度合いに応じて多様に分化する iPS 細胞の移植が最も効率の高い移植方法であると考えられる。さらに 2007 年に蝸牛線維細胞のみ可逆的損傷を与えその損傷部に間葉系幹細胞を導入する方法を開

発した (Kamiya et al Am J Pathol 2007)。同方法を iPS 細胞の内耳移植へ応用することにより、単に細胞を補うだけではなく遺伝子変異を持つ細胞を正常細胞に置換するという全く新しい観点での方法論の発展が期待できる。この方法論を発展させていくことにより、将来的には多様な遺伝性難聴患者に対し、薬物治療、遺伝子治療、組織移植とは異なり、組織損傷の種類と度合いに対応した低リスクで高い効果を持つ治療法の開発が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### iPS 細胞の調整および分化誘導・移植用細胞の調整

マウス iPS 細胞は理研バイオリソースセンターからの供与を受けフィーダー細胞存在下で培養を行っている。iPS 細胞から耳朧細胞や有毛細胞への分化誘導法は既に報告されており (Oshima et al. Cell 2010)、この方法に従い iPS 細胞より内耳発達過程の様々な分化度の細胞を作出し移植に用いることとする。同方法では iPS 細胞の浮遊培養後に接着培養を行い分化制御因子として Dkk1, SIS3, IGF-1 (D/S/I) 添加培養、その後の bFGF 添加後に鶏杯卵形囊細胞との共培養を行う。同培養では in vitro で最終分化まで誘導されるため以下の移植細胞群を作製する。

- ①無処置 iPS 細胞
- ②D/S/I 添加群
- ③D/S/I+bFGF 添加群
- ④D/S/I+bFGF 添加+鶏杯卵形囊共培養群

これらを用途に応じ EGFP (緑色蛍光)、Hc-Red (遠赤色蛍光) 又は  $\beta$  ガラクトシダーゼ発現レトロウイルスにより標識し移植用細胞とする。

#### 遺伝子改変難聴モデルマウスの作製

我々が保有する以下の難聴モデル動物を内

耳 iPS 細胞移植実験に供することとする。

①Brn4-KO マウス (Minowa, Science 1999) : 現在癌研究所にて保管中の受精卵より産出。

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

③Cx26-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。同マウスは胎生致死にはならず、高度難聴を有し、聴覚以外の異常は持たず発育することを確認済みである。

#### iPS 由来移植細胞の経半規管外リンパ液還流による移植

iPS 由来細胞の移植には我々がこれまで行ってきた間葉系幹細胞の移植法を用いることとする (図 1)。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、後半規管側の外リンパ液中へ  $2 \times 10^5$  cells の細胞液を還流、小孔の修復のために移植細胞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。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。

### 4. 研究成果

本研究ではこれまでの報告および我々の細胞治療技術を応用し全内耳細胞への分化能を持つ内耳前駆細胞を作製し内耳移植に最適な細胞を選抜することを試み、以下の成果を得た。

成体由来内耳幹細胞 (TRIC) の樹立  
成熟マウス蝸牛の過剰トリプシン処理により得られた細胞コロニーを単離し、増殖させることに成功。これらは継代および安定増殖が可能であり Tripsin Resistant Inner ear Cell (TRIC) と名付けた。TRIC の胚葉体培養一日後、未分化細胞マーカー SSEA1 および有毛細胞マーカー Myosin7a 陽性細胞が検出された。その後の接着培養により Myosin7a 陽性細胞のみに頂部にアクチン凝集による構造体を形成した。

#### iPS 細胞と TRIC の混合培養

TRIC をフィーダー細胞 (未分化細胞の増殖や分化を促進する細胞) とした人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞の内耳細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞をマイトマイシン処理により増殖活性を失った TRIC 上に播種すると頂部に繊毛を持つ細胞が多数検出された。胚葉体 (spheroid) 培養においても繊毛様構造の形成が見られた。

TRIC フィーダー細胞により分化誘導した iPS 細胞のアクチンフィラメントおよび Myosin7a 発現分化誘導させた iPS 細胞はファロイジンによるアクチン重合染色によって有毛細胞様の構造体を示した。このアクチン重合繊毛構造は Myosin7a 陽性細胞に多く見られた。本研究では未分化マーカー Nanog の発現に一致して GFP (緑色蛍光) を発現する iPS 細胞を使用することにより未分化細胞の混入を除去する培養法を確立した。これにより様々な分化方向性を示す内耳前駆細胞の安定した産生が可能となった。

これまでの研究では iPS 細胞から耳細胞や有毛細胞への分化誘導法は上記論文の方法に独自の改良を加え、FGF3/FGF10 刺激後に内耳由来のフィーダー細胞と共培養させることにより内耳発達過程の様々な分化度の iPS

由来内耳前駆細胞を大量に増殖させることが可能となった。Nanog プロモーターで制御されるレポーター緑色蛍光 (GFP) 遺伝子を用いることにより、蛍光発色する未分化コロニーを排除した内耳前駆細胞を接着培養にて増殖させ、通常の凍結保存により維持することに成功している。この株の一つでは、有毛細胞マーカー Myosin7a を発現し有毛細胞様のアクチン重合構造を頂部に持つ細胞が確認された。同細胞は、様々な内耳細胞への分化能を持つ考えられるため、我々の遺伝性難聴モデルマウスへの細胞治療により、変異細胞から正常細胞への置換が可能であると考えられる。

#### 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 2 件)

1) Hiroko Okada, Takashi Iizuka, Hideki Mochizuki, Tomoko Nihira, Kazusaku Kamiya, Ayako Inoshita, Hiromi Kasagi, Misato Kasai, Katsuhisa Ikeda, Gene transfer targeting mouse vestibule using adenovirus and adeno-associated virus vectors  
Otolology & Neurotology, 2012. 33 (4) :655-9  
査読有

2) 神谷和作 池田勝久 多能性幹細胞を用いた遺伝性難聴に対する内耳細胞治療法の開発  
Inner ear cell therapy for hereditary deafness with multipotent stem cells  
日本臨床 特集・幹細胞治療 2011  
69 (12) :2215-2219 査読無

[学会発表] (計 6 件)

招待講演

1) 第 22 回日本耳科学会シンポジウム 2012 年 10 月 5 日 名古屋  
遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞治療法の開発  
神谷和作 美野輪治 池田勝久

2) 第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会シンポジウム 2012 年 7 月 6 日 東京  
遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞

治療法の開発  
神谷和作 池田勝久

3)第 85 回日本薬理学会 シンポジウム講演  
2012年3月16日 京都  
Cell therapy for hereditary hearing loss  
with stem cell homing factors  
Kazusaku Kamiya, Miho Muraki, Kana Ogawa,  
Katsuhisa Ikeda

国際学会

4)Kamiya K, Karasawa K, Osamu Minowa,  
Ikeda K

Connexin26 mutations that cause  
hereditary deafness lead to  
macromolecular complex degradation of  
cochlear gap junction plaques  
Association for Research in  
Otolaryngology (ARO), 36th MidWinter  
Meeting,  
2013年2月 米国 ボルチモア

5)Kamiya K, Muraki M, Ogawa K, IKEDA K  
Cochlear Gap Junction Plaque is Disrupted  
by connexin26 Mutation  
48th Inner Ear Biology Workshop2011 2011  
年9月 ポルトガル リスボン

6)Kamiya K, Muraki M, Ogawa K, IKEDA K  
Cochlear Gap Junction Plaque is Disrupted  
by connexin26 Mutation  
EMBO meeting2011 2011年9月 オーストリア  
ウィーン

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

池田 勝久 (Katsuhisa Ikeda)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70159614

### (3)連携研究者

神谷 和作 (Kazusaku Kamiya)  
順天堂大学・医学部・講師  
研究者番号：10374159

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