

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20229

研究課題名(和文)鳥類胚内耳細胞を用いたiPS細胞の内耳分化誘導と加齢性難聴への応用

研究課題名(英文)Generation of inner ear cells from mouse iPS cells and its application to Age-related hearing loss

研究代表者

福永 一朗 (FUKUNAGA, Ichiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：20746581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスiPS細胞からコネキシン26を発現する細胞への分化誘導法を開発した。コネキシン26は、内耳支持細胞においてイオン輸送を行う細胞間ギャップ結合を構築する重要な要素である。分化誘導した細胞は、機能性を持ったコネキシン26およびコネキシン30のギャップ結合複合体を構築していた。更に、分化誘導した細胞において発達期蝸牛で観察されるATPやヘミチャネルに依存したCa²⁺シグナルの自家発火と伝播が観察された。他方、内耳への細胞移植効率を向上させるため、骨髄間葉系幹細胞におけるCXCR4およびCCR2の発現量をqRT-PCRにより評価し、これらを強発現する骨髄間葉系幹細胞の作製法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated Cx26 expressing cells with GJP formation from mouse iPS cells (iCx26GJC). To investigate whether the iCx26GJCs were functional, we performed scrape-loading assay with Lucifer yellow (LY) and Ca²⁺ imaging. In the iCx26GJC culture, we observed that LY diffused beyond the wounded parental cells. In contrast, such extent of dye transfer was not observed in undifferentiated iPSCs. Furthermore, iCx26GJC exhibited spontaneous Ca²⁺ transients and their propagation. The spontaneous Ca²⁺ signaling activity was clearly inhibited by the p2x receptor antagonist (PPADS) and connexin hemichannel blocker (FFA), and the activity was restored after removal of the inhibitors. on the other hand, to enhance MSC invasion to cochlea tissue, we developed a novel transplant strategy by induction of SDF-1 /MCP-1 expression in host cochlear tissue and enhanced expression of their receptors, chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) and C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) in MSC.

研究分野：発生生物学

キーワード：iPS細胞 蝸牛支持細胞 Connexin26 ギャップ結合ブランク 加齢性難聴 遺伝性難聴

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴は加齢に伴う進行的な聴力障害であり、65-75歳では約40%が、75歳以上では約70%が加齢性難聴と診断されている。また、遺伝的背景によっては40代で聴力が低下し補聴器が必要になることもあり、高度なQOLの低下をもたらす。加齢性難聴は、感音性難聴である場合が多く、内耳有毛細胞の劣化や減少が原因といわれているが詳しい病態は解明されていない。最近の報告では蝸牛線維細胞の変性が病態進行の起点となることが示唆されている。加齢性難聴の治療には補聴器や人工内耳が適用されるが、いずれも根本的な治療とはいえない。このため、加齢性難聴の根本的な治療を目指し、幹細胞を用いた細胞治療の研究が行われている。哺乳類の内耳有毛細胞は一旦失われてしまうと全く再生しないのに対し、鳥類は数週間程度で再生することが知られている。これは、鳥類の感覚上皮において内耳有毛細胞への分化誘導因子がより強力に機能しているのではないかと考えられている。鳥類における内耳有毛細胞の再生能は難聴の根本的な治療法を開発する上でキーとなる存在である。Liら(PNAS, 2003)は、マウスiPS細胞を発生初期の鳥類胚に移植し移植細胞が有毛細胞に分化したことを報告している。この報告をもとにOshimaら(Cell, 2010)は、iPS細胞塊をニワトリ胚聴覚器由来の細胞シート上で共培養し内耳有毛細胞を作製したことを報告している。しかし、多くの研究者がこの方法を試行し再現性や増殖効率に問題点があることを指摘、鳥類聴覚器由来の細胞との共培養効果が不均一で効率が悪いことが考えられた。

申請者は鳥類の発生工学を専門としており、これまで鳥類胚を操作しキメラの作出や卵殻外培養技術の研究・開発を行ってきた。このような背景から、鳥類は哺乳類と異なり胚を直接操作することができるため、非常に有用なツールであると考えた。

これらのことから申請者は、iPS細胞を鳥類胚の聴覚器に移植することで様々な段階の内耳前駆細胞を効率的に作製できるのではないかと考えた。また、申請者の所属する耳鼻咽喉科学講座では難聴の根本的な治療法を開発を行っている。同講座は、移植技術、遺伝子改変モデル、細胞導入効率促進の技術的なツールを有し、このような研究機関は世界でも皆無であるといえる。

これらの技術を複合することで、加齢性難聴の根本的な治療法が開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、加齢性難聴の根本的な治療法を開発を目指し、主にin vitroおよびin vivoにおいてiPS細胞由来の内耳前駆細胞を効率的に作製するための最適条件を明らかにすることを目標とする。移植対象の動物として蝸牛線維細胞が変性すると考えられている

加齢性難聴モデルマウス(B6)および、当研究グループで独自に維持している以下の遺伝性難聴モデルマウスを用いる。

- Brn4KO (ヒト非症候性難聴DFN3モデル Brn4欠損マウス, Minowa *et al. Science*, 1999)
- Cx26Tg (Cx26優勢阻害変異型Tgマウス, Kudo *et al. Hum Mol Genet*, 2003)
- Cx26cKO (Cx26内耳特異的欠損マウス, Kamiya *et al. J Clin Invest*, 2014)

これらのモデルマウスに対して作出した細胞の移植を行い、移植細胞の動態を解析することにより、iPS由来内耳前駆細胞の最適な蝸牛導入条件を開発する。

また、様々な分化レベルでのiPS由来細胞を使用するため、奇形種形成の有無と細胞導入処置による聴力低下を同時に確認しiPS細胞研究で重視されている安全性についても評価を行うことにより、現実的な細胞治療法を確立する。

3. 研究の方法

平成27年度

1. 鳥類内耳細胞を用いたマウスiPS細胞由来の移植用幹細胞の作製

本研究は、iPS細胞をin vitro () またはin vivo () において耳胞細胞や有毛細胞へ分化誘導し、その作製効率を比較する。また、作製過程における様々な分化度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。

in vitro でのiPS細胞由来の内耳前駆細胞の作製

iPS細胞およびES細胞からin vitroで内耳有毛細胞を作製する技術(Oshima *et al. Cell*, 2010; Chen *et al. Nature*, 2012; Koehler *et al. Nature Protocols*, 2014)を応用し全ての内耳細胞への分化能を持つ前駆細胞を作製し内耳移植に最適な細胞を選抜する。

マウスiPS細胞から耳胞細胞や有毛細胞への分化誘導法は、主にOshima(2010)およびKoehler(2014)の方法を参考とし、この過程で作られる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。

- Oshima法(Cell, 2010)

マウスiPS細胞を浮遊培養時に分化制御因子としてDkk1, SIS3, IGF-1 (D/S/I)を添加する。その後、bFGFを添加しニワトリ胚内耳由来の細胞シート上で培養する。

- Kohler法(Nature Protocols, 2014)

マウスES細胞の浮遊培養時に分化制御因子としてBMP4, SB-431542, FGF-2, LDN-193189 (B/S/F/L)を添加する。その後、N2を添加し培養する。

免疫蛍光染色により培養日数と分化段階を詳細にモニタリングし移植用細胞の作出をする。また、後述するニワトリ胚聴覚器への移植に適した iPS 細胞の分化段階を明らかにする。

in vivo での iPS 細胞由来の感覚上皮への分化誘導法の確立

鳥類の内耳有毛細胞は哺乳類と異なり、損傷後の再生能力を有することが知られている。鳥類の感覚上皮においては内耳有毛細胞への分化誘導因子がより強力に機能していると考えられている。

また、鳥類は胚発生の過程を母胎内ではなく卵殻内で行うため、移植等の胚操作を直接かつ簡便に行うことができる唯一のツールである。

三次元培養により作製した様々な段階の iPS 細胞塊を前述した鳥類胚の胚操作技術を用いてニワトリ胚の聴覚器に移植し培養する、その後酵素処理および単離培養により大量増殖が可能な内耳前駆細胞群を得る新規分化誘導法を確立させる。

平成 28 年度

2. 移植幹細胞の経半規管移植

本研究では、1 で作成した iPS 細胞由来の移植用細胞を難聴モデルマウスの内耳に移植することで、移植細胞の動向および聴力の回復について明らかにする。

マウス径半規管への幹細胞移植

マウスの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 を還流後、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で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

上記移植後の蝸牛組織を還流固定し凍結切片およびホールマウント組織を得る。免疫染色後、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。また、移植前後で聴性脳幹反応 (ABR) により聴力を測定し、聴力の回復と効果の持続性を明らかにする。

4. 研究成果

In vitro におけるマウス iPS 細胞から内耳細胞への分化誘導法の開発

無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq; Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation) を用いた内耳有毛細胞への分化誘導法 (Kohler *et al.*, 2013, 2014) を改良し、マウス iPS 細胞から胚様体を作製、その後、当研究室で独自に樹立した内耳由来のフィーダー細胞上で接着培養した。

その結果、コネキシン 26 陽性のギャップ

結合プラーク様構造を構築する細胞 (iCx26GJC) を作製した (図 1)。コネキシン 26 は、内耳支持細胞において細胞間イオン輸送を行うギャップ結合複合体 (Gap Junction Plaque, GJP) を構築する重要な要素であり、内耳リンパ液中のイオン組成を保っている。

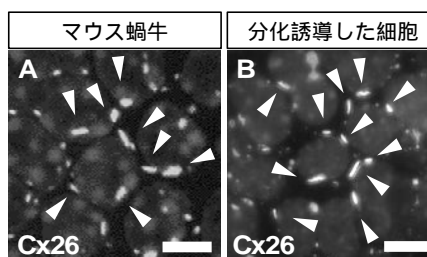


図 1. 作製した細胞における Cx26 の発現
作製した細胞はマウス蝸牛と同様に細胞間でギャップ結合を構築していた。

iPS 細胞から分化誘導したコネキシン 26 ギャップ結合プラークを構築する細胞 (iCx26GJC) は、コネキシン 30 を共発現していた。コネキシン 30 は、コネキシン 26 と共に内耳支持細胞において細胞間ギャップ結合複合体を構築している。

iCx26GJC が細胞間で構築したコネキシン 26 およびコネキシン 30 のギャップ結合が機能的であるか調べるため、Scrape loading dye transfer assay を行った。その結果、未分化な iPS 細胞やフィーダー細胞では色素 (Lucifer yellow) の拡散が観察されなかったのに対し、分化誘導した細胞 (iCx26GJC) では色素の拡散が観察された。

つぎに、分化誘導した細胞に対しカルシウムイメージングを行った。その結果、発達期の蝸牛で観察されるようなカルシウムシグナルの自家発火と伝播が観察された。

観察されたカルシウムシグナルが ATP/Hemichannel 依存的なものであるか調べるため、p2x レセプター阻害剤 (PPADS) とコネキシンヘミチャネルブロッカー (FFA) の投与試験を行った。その結果、PPADS/FFA の投与により可逆的なカルシウムシグナル伝播の抑制が観察された。分化誘導した細胞で観察されたカルシウムシグナルの伝播は ATP/Hemichannel 依存的なものであり、同様の現象が発達期蝸牛でも観察されている。

以上の結果から、iPS 細胞から分化誘導したコネキシン 26 ギャップ結合を構築する細胞は、蝸牛支持細胞、特に outer- inner-sulcus cells で観察される特徴を有していることから、蝸牛支持細胞様細胞であると考えられた。

疾患モデル iPS 細胞の樹立と In vitro における GJB2 変異型遺伝性難聴の病態の再現

遺伝性難聴は 1,600 出生に 1 人と高頻度で発症し、聴覚と言語発育に著しい障害を引き起こすため極めて高度な QOL の低下をもたらす。特に、コネキシン 26 (Connexin26, Cx26)

をコードする Gap junction beta 2 (*GJB2*) 遺伝子は、世界最大の遺伝性難聴の原因遺伝子である。申請者の所属している研究グループは、*GJB2* 変異型遺伝性難聴モデルマウスを作製・Cx26 が欠損することによりギャップ結合プラークが劇的に崩壊、細胞間イオン輸送能が低下することを明らかにした(Kamiya et al., J Clin Invest, 2014)。本研究では、*GJB2* 変異型難聴モデルマウスの蝸牛線維細胞から iPS 細胞を樹立、申請者らの開発した分化誘導法を用いて内耳細胞を作製した。

その結果、*GJB2* 変異型遺伝性難聴の分子病態であるギャップ結合複合体の崩壊を再現した(図 2)。

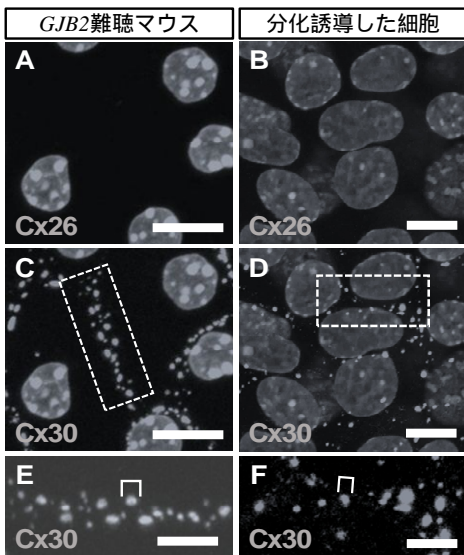


図 2. *GJB2* 難聴モデルマウスの内耳細胞と iPS 細胞由来の疾患モデル細胞コネクシン 26 の欠損によるギャップ結合複合体の崩壊を再現した。

これまで、ES/iPS 細胞からコネクシン 26 ギャップ結合複合体を構築し、機能性を持った蝸牛支持細胞様細胞への分化誘導法は報告されていなかった。また、iPS 細胞を用いた invitro における *GJB2* 変異型遺伝性難聴の病態の再現も報告されておらず、本研究の成果は世界的に報じられた(図 3 および図 4, 読売新聞, 米 Fox News, 英 Sunday Express 他)。更に、同論文は、掲載誌(Stem Cell Reports, 2016, 7(6))の表紙にも選出された(図 5)

Stem cells could cure deafness from birth

By Lucy Johnston
HEALTH EDITOR

SCIENTISTS believe they are on the brink of a cure for congenital deafness after producing stem cells to correct a hereditary defect.

Researchers have found a way of growing human cochlear cells which can be used to replace faulty ones in people deaf from birth due to a genetic error.

They hope a treatment could be available to patients within five to 10 years.

Professor Kazuhisa Kamiya, a specialist in ear diseases who is leading the research, which was published in the journal Stem Cell Reports, said: "I am very excited by what we have done. We hope this work will lead to a cure for a form of hereditary deafness."

"We have found a way to make cochlear stem cells. The next step is to find a way to safely inject them into the patient's ear."

It is possible a therapy could be available within five to 10 years.

The work, which is being carried out in a laboratory at Junendo University in Tokyo, Japan, aims to correct a mutation in a gene called

Scott's View



"We need to get out of here! I've just heard what they're going to do to us next..."

can change into another type of more specialised cell through a process known as differentiation. They occur in embryos as embryonic stem cells and in adults as repair cells.

Hereditary hearing loss is often caused by a genetic mutation in the hair cells of the ear, which are found in the inner ear, or cochlea, and are the sensory receptors of sound.

Patients with this condition are currently treated with an artificial cochlear implant, which helps transfer sound to the patient's hearing nerves.

Many scientists believe stem cells could offer a better solution by restoring the normal function of the hair cells and, as a result, the patient's hearing.

Human ears born with about 11,000 hair cells in each ear that are vital to transmit sound. As the body ages, it experiences the slow progression of hearing loss due to the death of these cells from excessive noises, exposure to certain drugs, and ageing.

One approach could be to place stem cells surgically within the

cochlea so they fuse with the remaining cells in the inner ear, and develop and function as normal non-faulty hair cells.

Currently there are no cures for most types of hearing loss.

The latest research into stem cells follows previous work led by Dr Marcelo Rivolta, from the University of Sheffield, who is also developing stem cell technologies to repopulate the deaf ear with cells vital to hearing that have been lost.

This work offers hope of a cure for people with this type of hearing loss.

His colleague, Dr Sarah Boddy, has also been working on a project investigating the potential of human bone marrow stem cells as a way to reverse hearing loss.

The team has shown that human bone marrow stem cells can be converted into ear cells after exposure to a mixture of chemicals produced by fetal cochlear cells.

About a third of 60-year-olds say they are hearing impaired, a number that rises to half by age 75.

難聴発症の経過再現

遺伝子を変異させて難聴にしたマウスの iPS 細胞 (人工多能幹細胞) から内耳細胞を作製し、難聴を発症する様子を体外で再現した。順天堂大学の神谷和准教授らのチームが発表した。

順大チーム成功

脳を移植する再生医療につながる」と期待される。論文は11日、国際幹細胞学会誌に掲載される。

このタイプの難聴は、GJB2 という遺伝子に突異があり、音の振動を神経に伝える内耳の細胞間のつながりが壊れている。遺伝性難聴の半数以上を占める。根本的な治療法はなく、補聴器や

iPS細胞活用 治療期待

人工内耳で聴力を補うだけだった。

研究チームは、マウスの iPS 細胞から内耳細胞を作製する手法を開発。GJB2 が働かないようにしたマウスの iPS 細胞から作製した内耳細胞では、細胞同士をつなぐたんばく質が次第に壊れ、難聴を発症していく様子を再現できた。

神谷准教授は「難聴を再現した細胞を使って、細胞間のつながりを修復する薬を開発できれば、根本的な治療につながる」と話す。

図 4. 読売新聞 2016.11.11



図 5. 論文掲載号の表紙

In vivo におけるマウス iPS 細胞から内耳細胞への分化誘導法の開発

Li らのマウス ES 細胞を鳥類胚の耳胞(内耳原器)へ移植する方法を参考に、マウス iPS 細胞胚様体を孵卵 50 時間後のニワトリ胚の耳胞へ移植した。細胞移植 24 時間後に蛍光顕微鏡下で観察した結果、耳胞への細胞の定着が確認された。また、Oshima ら(2010)がマウス ES/iPS 細胞から内耳有毛細胞へ分化誘導する際に用いた、鳥類内耳由来のフィーダー細胞株を樹立した。

幹細胞ホーミング機構を用いた内耳への効率的な細胞移植法の開発

薬剤の局所投与により人為的に誘発した蝸牛線維細胞損傷部において、他臓器における幹細胞ホーミング因子とされる MCP1(Monocyte Chemoattractant Protein-1)および SDF1(Stromal cell-derived factor-1)が高発現することを発見した。

更に、MCP1 や SDF1 の受容体である CCR2(C-C chemokine receptor type-2)および

図 3. Sunday Express 2016.11.20

CXCR4(CXC Chemokine Receptor)の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて評価し、これらを強発現する骨髄間葉系幹細胞の作製法を開発した。

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4件)

1. Ichiro Fukunaga, Ayumi Fujimoto, Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Atena Nishikawa, Tetsuo Noda, Osamu Minowa, Nagomi Kurebayashi, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya. In vitro models of *GJB2*-related hearing loss recapitulate Ca^{2+} transients via a gap junction characteristic of developing cochlea. *Stem Cell Reports*, 7, 1023-1036, 2016. 査読有.
2. Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama, Katsuhisa Ikeda. Connexin26 regulates assembly and maintenance of cochlear gap junction macromolecular complex for normal hearing. *AIP Conference Proceedings*, 1703, 30018; 1-3, 2015. 査読有.
3. Takashi Anzai, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama, Ayumi Fujimoto, Kazuma Kobayashi, Atena Nishikawa, Toru Aoki, Tetsuo Noda, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya. Deformation of the Outer Hair Cells and the Accumulation of Caveolin-2 in Connexin 26 Deficient Mice. *PloS one*, 10(10), e0141258, 2015. 査読有.
4. 福永一朗, 畠山佳欧里, 青木 徹, 藤本あゆみ, 西川貴菜, 美野輪治, 池田勝久, 神谷和作. マウス iPS 細胞からコネクシン 26 陽性細胞への分化誘導とギャップジャンクションプラークの形成. *耳鼻咽喉科ニューロサイエンス* 30, 11-12, 2016. 査読無.

〔学会発表〕(計9件)

国際学会

1. Ichiro Fukunaga, Takashi Iizuka, Kaori Hatakeyama, Ayumi Fujimoto, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya. Gene therapy and cell therapy targeting cochlear gap junction formation for *GJB2* associated hearing loss. *Inner Ear Biology*. Montpellier, France. September 17-21, 2016.
2. Ichiro Fukunaga, Ayumi Fujimoto, Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Atena Nishikawa, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya. Generation of Cx26-gap junction plaque forming cell from iPS cell. *Inner Ear Biology*. Montpellier, France. September

17-21, 2016.

3. Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Atena Nishikawa, Ayumi Fujimoto, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya. Differentiation of mouse iPS cell into Cx26-positive cell and formation of inter cellular Cx26-gap junction plaque. Association for Research in Otolaryngology 39th midwinter meeting. San Diego, USA. February 20-24, 2016.

国内学会

4. 福永一朗, 畠山佳欧里, 青木 徹, 藤本あゆみ, 西川貴菜, 美野輪治, 池田勝久, 神谷和作. iPS 細胞から Connexin26 ギャップ結合プラークを構築する細胞への分化誘導. 第 16 回日本再生医療学会総会. 仙台. 2017 年 3 月 7-9 日.
5. 福永一朗, 池田勝久, 神谷和作. iPS 細胞からコネクシン 26 発現細胞への分化誘導とギャップ結合プラークの構築. 第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会. 長野. 2016 年 10 月 5-8 日.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

1. 名称: 内耳前駆細胞の製造法
発明者: 福永一朗, 神谷和作.
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特願
番号: 2016-030662
出願年月日: 2016 年 2 月 22 日.
国内外の別: 国内
2. 名称: 内耳細胞の製造法.
発明者: 福永一朗, 神谷和作.
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特願
番号: PCT/JP2017/006332
出願年月日: 2017 年 2 月 22 日.
国内外の別: 国外

〔その他〕

1. ホームページ
http://www.juntendojibi.com/?page_id=3251

6. 研究組織

(1)研究代表者

福永 一朗 (FUKUNAGA, Ichiro)
順天堂大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 20746581

(4)研究協力者

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