

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15725

研究課題名(和文) 幹細胞ホーミング機構によるiPS細胞の蝸牛への効率的誘導法の開発

研究課題名(英文) Stem cell homing for inner ear cell therapy with iPS cell

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では幹細胞自身が細胞遊走能により標的部位へ侵入・生着・分化する幹細胞ホーミングと呼ばれる機構を応用した細胞導入法の開発を行った。幹細胞ホーミング機構を惹起するため、培養ディッシュに一定濃度のケモカインを添加することにより有意にCCR2およびCXCR4分子の発現を上昇させることに成功した。これにより内耳組織への飛躍的な侵入細胞数の上昇が見られた。この機構の効率を更に高めた幹細胞処理技術を開発し生体イメージングにより移植効率の向上が確認された。内耳における幹細胞ホーミング機構を応用することにより新たな内耳細胞治療法の技術が開発できると考えられる。

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. We developed a strategy for inner ear cell therapy using bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) and established the differentiation method for inner ear like cells from induced pluripotent stem (iPS) cell. For cell therapy targeting hereditary deafness, a more effective cell delivery system to induce the stem cells into cochlear tissue is required. Stem cell homing is one of the crucial mechanisms to be activated for efficient cell delivery to the cochlear tissue. In our study, MCP-1, SDF-1 and their receptors were found to be a key regulator for stem cell recruitment to the cochlear tissue. By activating stem cell homing, we developed a novel strategy to induce a number of stem cells into cochlear tissue.

研究分野：細胞生物学

キーワード：内耳 ホーミング 幹細胞 移植 ケモカイン 蝸牛

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は 1000 出生に 1 人と先天性疾患のうちでも最も頻度の高い疾患の一つである。そのうち半数が遺伝性とされており、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。特にコネキシン 26(Cx26)をコードする GJB2 遺伝子は世界最大の遺伝性難聴原因遺伝子であり、既知原因遺伝子の中でも 50%以上の発生頻度を占めるとされている。人工内耳や補聴器の適用もあるが根本的治療法は未だ存在しない。

遺伝性難聴モデルの開発：当講座池田らはヒト非症候性遺伝性難聴因子 Brn4 の遺伝子欠損マウスを作製し内耳イオン輸送の発症機構を初めて明らかにした (Minowa, Ikeda, Science, 1999)。更に Cx26 遺伝子で初の遺伝子改変難聴モデルを開発し多くの新規分子病態を発見してきた。研究代表者らは最近、内耳特異的 Cx26 欠損モデルの開発にも成功している (Kamiya, J Clin Invest, 2014, 時事通信他)。

内耳細胞治療法の開発：申請者神谷らは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により聴力回復を促進させることに初めて成功した (Kamiya, Am J Pathol, 2007, 読売新聞他)。この幹細胞導入効率を更に高め、iPS 細胞、アデノ随伴ウイルスでの GJB2 遺伝子治療 (Iizuka, Kamiya, Hum Mol Genet, 2015, 朝日新聞他)を複合的に用いて Cx26 欠損マウスの聴力を有意に改善させることに成功した。

新しい難聴分子病態、「ギャップ結合複合体崩壊」の発見：申請者らは新規開発した Cx26 欠損マウスと Cx26 優性阻害変異マウスの分子的共通点を探索し、「ギャップ結合複合体崩壊」という全く新しい分子病態を発見した (Kamiya, J Clin Invest, 2014, 時事通信他)。これにより iPS 細胞からの疾患モデル細胞作製のための適切な指標が示され

た。

高い細胞導入効率の必要性和幹細胞ホーミング：GJB2 変異型遺伝性難聴の根本的治療には蝸牛支持細胞、線維細胞のギャップ結合によるイオン輸送の修復が不可欠であると考えられる。そのためには標的個所に大量の内耳前駆細胞を導入し、その微小環境(niche、ニッチ、ニッシュ)に応じて分化させることが必要であると予想される。

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。

内耳組織へ大量の内耳前駆細胞を導入し組織浸潤させるためには適切な幹細胞ホーミングの分子機構を理解し応用することが重要であると考えられる。

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 GJB2 変異型遺伝性難聴における重要な変性細胞群を標的とした iPS 細胞による細胞治療を幹細胞ホーミングの分子機構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。

3. 研究の方法

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)。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 ; Koehler, Nature 2013)。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。

遺伝子改変難聴モデルマウス

以下の独自の遺伝性難聴モデル動物を細胞治療実験に供するため、作製を進めている。

(1) Cx26-KO マウス (Kamiya, J Clin Invest 2014): 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。理研・順天堂にて繁殖・維持。

(2) Cx26-Tg マウス (Kudo, Hum Mol Genet 2003): Cx26 優性阻害変異を有する難聴モデルトランスジェニックマウス。理研・順天堂にて繁殖・維持。

(3) Brn4-KO マウス (Minowa, Science 1999): Pou3f4(Brn4)を欠損する難聴モデルマウス。癌研究所由来の受精卵より産出。理研・順天堂にて繁殖・維持。

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 2×10^5 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している。

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っている。

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 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。

幹細胞表面に MCP1 受容体 CCR2 および SDF1 受容体 CXCR4 の発現増強を増強させる最適条件の検討

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。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している。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ー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⁺/K⁺-ATPase の発現と局在を免疫組織化学にて解析している。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っている。

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の最適条件を決定している。

4. 研究成果

幹細胞技術の発展により感音性難聴に対する内耳への細胞治療法の応用が期待されているが、内耳の解剖学的特徴から聴力を温存しつつ標的部位に細胞を移植する直接的アプローチは困難である。本研究では幹細胞自身が細胞遊走能により標的部位へ侵入・生着・分化する幹細胞ホーミングと呼ばれる機構を応用した細胞導入法の開発を行った。

以下の条件検討により内耳への幹細胞ホーミングに関する新規知見が得られ、技術開発が進展した。

(1) 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) におけるホーミング受容体の発現惹起

骨髄間葉系幹細胞は幹細胞ホーミング分子として知られる MCP1 の受容体 CCR2 を発現することが報告されている。この受容体分子は培養ディッシュに一定濃度のケモカインを添加することにより発現上昇することが予備実験で明らかとなっており、定量 PCR によりその最適条件を選抜して移植細胞とした。

(2) 内耳への移植手術

上記二種の移植用細胞を後半規管からの外リンパ液還流により投与する。蝸牛側の正円窓には、ホーミング因子とされる MCP1 または SDF1 を融合したゼラチンハイドロゲルを留置し、MSC のホーミングを惹起した。

幹細胞ホーミング機構を惹起するため、培養ディッシュに一定濃度のケモカインを添加

することにより有意に CCR2 および CXCR4 分子の発現を上昇させることに成功した。これらを用いてケモカイン発現を惹起した内耳への細胞移植を行ったところ、内耳組織へ 60 倍以上の侵入細胞数の上昇が見られた。

内耳における幹細胞ホーミング機構を応用することにより新たな内耳細胞治療法の技術が開発できると考えられる。

(3) 移植細胞の生体イメージング

さらに生体内での移植細胞を追跡するため、移植マウスを用いた生体イメージングの検討を行った。骨や皮膚を透過して移植細胞を観察するため、遠赤外光を発する HcRed にて標識した骨髄間葉系幹細胞を作製した。これらを用いて内耳に投与して 1 週間後に *in vivo* イメージングシステムにより観察したところ、耳後部の皮膚を透過して移植細胞の蛍光を観察することに成功した。これらの方法により、移植後のマウス生体内での移植細胞の動態観察が可能となると考えられる。

(4) ホーミング因子受容体の高発現細胞の選抜 また、フローサイトメーターによる解析により幹細胞ホーミング因子を高発現する細胞の解析も行った。この実験ではある条件下での培養により骨髄間葉系幹細胞にあるホーミング因子受容体を高発現する分画が存在することが明らかとなった (未発表)。このような細胞分画を活用することにより、内耳への移植効率を飛躍的に高める方法が開発できると考えられる。

最近の我々の研究により iPS 細胞から GJB2 変異型難聴の標的となる内耳細胞を作製することが可能となったが、本研究により内耳における幹細胞ホーミング機構の解明が進むことにより iPS 由来細胞を用いた内耳細胞治療の方法開発が進展し、将来的な臨床応用へ向けての活用が期待できる。

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5件)

1. Fukunaga I, Fujimoto A, Hatakeyama K, Aoki T, Nishikawa A, Noda T, Minowa O, Kurebayashi N, Ikeda K, and Kamiya K. In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca²⁺ Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea. Stem cell reports, 2016, 7, 1023-1036.
2. Anzai T, Fukunaga I, Hatakeyama K, Fujimoto A, Kobayashi K, Nishikawa A, Aoki T, Noda T, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K. Deformation of the Outer Hair Cells and the Accumulation of Caveolin-2 in Connexin 26 Deficient Mice. PLoS One 2015, 10, e0141258
査読有
3. Iizuka T., Kamiya K., Gotoh S., Sugitani Y., Suzuki M., Noda T., Minowa O., and Ikeda, K. Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. Hum Mol Genet 2015, 24(13):3651-61.
査読有
4. Kamiya K. Inner ear cell therapy targeting hereditary deafness by activation of stem cell homing factors. Frontiers in Pharmacology 査読有 6:2. (2015)
5. Kamiya K, Karasawa K, Kobayashi K, Miwa A, Ikeda K. Differentiation of iPS cells to cochlear cells are regulated depending on the part of cocultured organs. J Otol Rhinol 査読有 S1: 34-36 (2015)

〔学会発表〕(計5件)

1. シンポジウム・内耳と免疫 内耳基礎研

究の新展開を求めて、内耳ケモカイン発現を応用した内耳組織への多能性幹細胞誘導法の開発、口頭、神谷和作、[招待講演]第36回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2018年2月23日 下関

2. 内耳ギャップジャンクションを標的としたiPS細胞からの遺伝性難聴モデル細胞と内耳細胞治療法の開発、口頭、神谷和作、[招待講演]ワークショップ「ギャップジャンクションワークショップ - コネキシン・イネキシン・パネキシン：構造から発生、病理まで -」 ConBio2017 日本分子生物学会年会 2017年12月9日 神戸
3. 蝸牛ギャップ結合を標的とした遺伝性難聴の創薬と治療法開発、口頭、神谷和作、[招待講演]テーマセッション内耳基礎研究の展望、第27回日本耳科学会学術集会 2017年11月24日 神戸
4. Genetics in otology, Molecular pathology of cochlear gap junction in GJB2 associated hearing loss, Kazusaku Kamiya 口頭、(招待講演) 10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, 英国・エジンバラ 2016/6/8、国外 .
5. Gene therapy and cell therapy targeting cochlear gap junction formation for GJB2 associated hearing loss、口頭、Fukunaga I, Iizuka T, Hatakeyama K, Fujimoto A, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K、フランス・モンペリエ、2016/9/20、国外

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：内耳前駆細胞の製造法
発明者：神谷和作、福永一郎
権利者：学校法人順天堂
種類：特許
番号：特願 2016-030662 号
出願年月日：2016.2.22
国内外の別：国内特許出願

名称：内耳前駆細胞の製造法
発明者：神谷和作 福永一郎
権利者：学校法人順天堂
種類：特許
番号：PCT/JP2017/006332
出願年月日：2017.2.21
国内外の別：国外特許出願

取得状況（計 0 件）

〔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：01234567

(2)研究分担者

福永一郎（FUKUNAGA, Ichiro）
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20746581

(3)連携研究者

(4)研究協力者

美野輪治（MINOWA, Osamu）
藤本あゆみ（FUZIMOTO, Ayumi）
畠山佳欧里（HATAKEYAMA, Kaori）