

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21662

研究課題名（和文）幹細胞ホーミング機構を用いた内耳への新たな再生医療技術の開発

研究課題名（英文）Inner ear cell therapy by activated 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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは内耳ギャップ結合を形成するCX26の内耳特異的欠損マウスを開発し、ギャップ結合崩壊による発症機構を解明し、この異常ギャップ結合を遺伝子導入により修復することで聴力回復させる内耳遺伝子治療法を開発した。幹細胞から作製した内耳前駆細胞を蝸牛組織へ導入するためには蝸牛組織に適切な幹細胞ホーミングと呼ばれる細胞誘導の分子機構を理解し応用することが重要である。本研究ではこの機構を高めることにより遺伝性難聴の内耳組織へ適切な細胞を効率的に補充し、聴力を回復させる技術開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では世界で最も高頻度発生する難聴原因遺伝子GJB2の遺伝子改変難聴モデルに対し、研究代表者が開発した幹細胞移植法に更に内耳ホーミング機構を応用して内耳への細胞導入効率を飛躍的に高めることにより、これまで成功例のない遺伝性難聴に対する聴力回復法の開発を試みる挑戦的な研究である。iPS細胞は成体細胞の初期化により作成でき、難聴患者の血液や皮膚組織からの樹立が可能のため既に多くの疾患において実用化研究が進められており、骨髄間葉系幹細胞も安全で移植効率を高めることが知られているためどちらも有用な移植細胞として活用できる。

研究成果の概要（英文）：In the previous study, we have developed a mouse model with a CX26 defect especially in inner ear, which forms inner ear gap junctions, considered the onset mechanism due to gap junction disruption, and developed an inner ear gene therapy method that restores hearing by restoring this abnormal gap junction through gene transfer. In order to introduce inner ear progenitor cells made from stem cells into the cochlear tissue, it is important to widely apply the cell guidance molecular mechanism called stem cell homing that is correct for the cochlear tissue. We developed a technology that efficiently restores the correct cells to the inner ear tissue associated with hereditary hearing loss by increasing the amount of hearing loss, thereby restoring hearing.

研究分野：難聴

キーワード：遺伝性難聴 人工多能性幹細胞 内耳 ギャップジャンクション 分化誘導 遺伝子難聴

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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による極めて高度な QOL の低下をもたらす。特にコネキシン(CX)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原因の 20~30% を占めており世界で最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子である。遺伝性難聴の根本的治療法は存在しないが、多能性幹細胞を用いた再生医療の応用も大きく期待されている。研究代表者らは骨髄

間葉系幹細胞を用いた内耳細胞治療法開発に成功し、幹細胞治療により感音性難聴の聴力回復が可能であることを初めて実証した (Kamiya, *Am J Pathol*, 2007、読売新聞他)。また内耳ギャップ結合を形成する CX26 の内耳特異的欠損マウスを開発しギャップ結合崩壊による発症機構を解明した (Kamiya, *J Clin Invest*, 2014、時事通信、日経産業新聞他)。この異常ギャップ結合を遺伝子導入により修復することで聴力回復させる内耳遺伝子治療法を開発した (Iizuka, Kamiya, *Hum Mol Genet*, 2015、朝日新聞、NHK ニュース他)。さらに最近、人工多能性幹 (iPS) 細胞の分化誘導により、CX26 陽性内耳感覚上皮細胞が体外で作製可能であることを初めて実証した (Fukunaga, *Stem Cell Reports*, 2016、読売新聞、米 Fox News、他)。この iPS 由来細胞は今後の再生医療への応用が大きく期待されるが、このような細胞は免疫拒絶や生存性、細胞接着の観点から、移植後の組織生着が難しいことが知られている。一方で安全な多能性幹細胞として臨床応用が進んでいる骨髄間葉系幹細胞は移植時の免疫拒絶反応を強力に抑えることなど、iPS 細胞等の細胞が組織へ生着するための重要な補助的役割も担うことが明らかとなっている。同細胞は間質系細胞の特徴を持つことから iPS 由来細胞が組織へ生着するための足場としての可能性も十分に期待できる。

### 2. 研究の目的

遺伝性難聴の治療には蝸牛支持細胞、蝸牛線維細胞のギャップ結合によるイオン輸送能の修復が必要であると考えられる。そのためには標的箇所に大量の内耳前駆細胞を導入し、その微小環境 (niche) に応じて最終分化をさせることが必要と考えられる。

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 (上図)。これまでの我々の研究では、内耳でのこの機構にはケモカイン MCP1 と SDF1 が重要な役割を担っていることが明らかとなった (H28-29 挑戦的萌芽研究・神谷和作)。大量の内耳前駆細胞を蝸牛組織へ導入するためには蝸牛組織に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と考えられる。本研究ではこの機構を高めることにより遺伝性難聴の内耳組織へ適切な細胞を効率的に補充し、聴力を回復させる技術開発を目的とする。

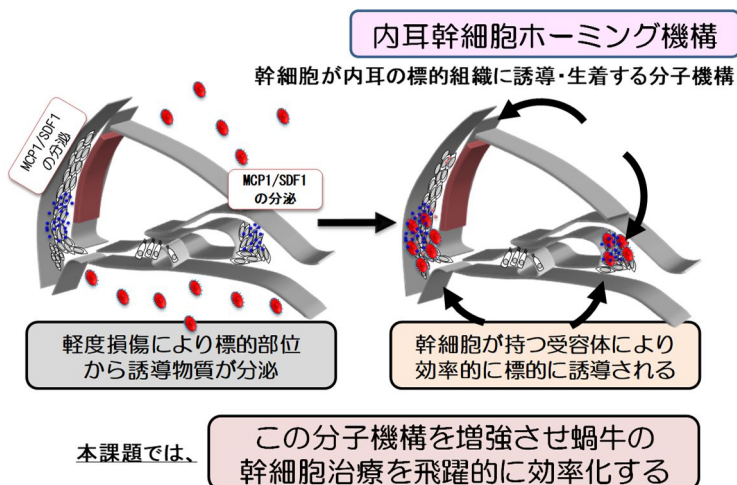
### 3. 研究の方法

人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立と内耳前駆細胞の作製

申請者らは iPS 細胞から内耳様細胞を分化誘導する技術を開発してきた。同細胞は発達期の蝸牛と同様の機能を有し、内耳リンパ液のイオン環境を改善する内耳ギャップ結合の形成能を持つ内耳再生医療に適した細胞であると考えられる。同細胞は培養 20 ~ 30 日程度で成熟するが、培養 10 ~ 20 日では未成熟であり増殖能も保持している。この分化誘導直後の未成熟の内耳前駆細胞を細胞解離液によって分離し、移植用細胞液とする。

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を作製する。

#### MSC と iPS 由来内耳様細胞の内耳への移植手術

移植レシピエントとして GJB2 遺伝子欠損マウスと用いる。移植細胞としては上記二種の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する。上記の処置により組織侵入した MSC が足場となり iPS 由来内耳様細胞が蝸牛に生着することが期待できる。

#### 4 . 研究成果

コネクシン(CX)26 をコードする GJB2 遺伝子の変異は、世界で最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子である。 遺伝性難聴の根本的治療法は存在しないが、多機能性幹細胞を用いた再生医療の応用が期待されている。研究代表者らは、内耳ギャップ結合を形成する CX26 の内耳特異的欠損マウスを開発し、ギャップ結合崩壊による発症機構を解明し、この異常ギャップ結合を遺伝子導入により修復することで聴力回復させる内耳遺伝子治療法を開発した。幹細胞から作製した内耳前駆細胞を蝸牛組織へ導入するためには蝸牛組織に適切な幹細胞ホーミングと呼ばれる細胞誘導の分子機構を理解し応用することが重要である。本研究ではこの機構を高めることにより遺伝性難聴の内耳組織へ適切な細胞を効率的に補充し、聴力を回復させる技術開発を目的とした。本年度はこれまで確立した iPS 細胞からの分化誘導法のさらなる改良を目指した。蝸牛支持細胞の特徴を有するヒト iPSC 由来の機能性 CX26 ギャップジャンクション形成細胞( iCX26GJCs ) の作製を試みたところ、同細胞は細胞-細胞間の境界にギャップジャンクションプラーク様の形態を持ち、蝸牛支持細胞で発現するいくつかのマーカーの発現を確認した。さらに、典型的な GJB2 変異を持つ患者の iPS 細胞から iCX26GJCs を作製し、GJB2 関連難聴の病態を再現することに成功した。これらの *in vitro* モデルは、GJB2 関連難聴の様々な変異に対する最適な治療法の確立や薬剤スクリーニングに有用であると考えられ、国際誌にも論文発表している( Human Molecular Genetics, 2021 )。更に分化誘導法の改良を行い、細胞境界にて凝集したギャップ結合複合体を形成する高分化型の細胞シートを作製することに成功し、その大量培養系も確立した。今後は本課題で得られた細胞工学技術および細胞工学技術を用いて iPS 由来内耳細胞および間葉系幹細胞を内耳へ導入して聴力を回復させる内耳細胞治療法を確立させる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Murakoshi Michio, Koike Yuhi, Koyama Shin, Usami Shinichi, Kamiya Kazusaku, Ikeda Katsuhisa, Haga Yoichi, Tsumoto Kohei, Nakamura Hiroyuki, Hirasawa Noriyasu, Ishihara Kenji, Wada Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effects of salicylate derivatives on localization of p.H723R allele product of SLC26A4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 928 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.03.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Satoshi, Kusunoki Takeshi, Nakagawa Hiroshi, Toyoda Yu, Nojiri Shuko, Kamiya Kazusaku, Furukawa Masayuki, Takata Yusuke, Okada Hiroko, Anzai Takashi, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 166
2. 論文標題 Association Between Earwax Determinant Genotypes and Acquired Middle Ear Cholesteatoma in a Japanese Population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Otolaryngology Head Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/01945998211000374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Cheng Chen, Kyoko Shirai, Atsushi Kawano, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling Gap junction beta 2 gene-related deafness with human iPSC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human molecular genetics	6. 最初と最後の頁 1429-1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Cheng Chen, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Akito Koike, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya	4. 巻 21
2. 論文標題 Activin/Nodal/TGF- Pathway Inhibitor Accelerates BMP4-Induced Cochlear Gap Junction Formation During in vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.602197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Cheng Chen, Madoka Iizumi, Takahiro Shiga, Rina Matsuoka, Takashi Anzai, Remi Hibiya-Motegi, Shori Tajima, Katsuhisa Ikeda, Wado Akamatsu, Kazusaku Kamiya	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p. G45E/Y136X mutation in GJB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Shirai Kyoko, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Shiga Takahiro, Chen Cheng, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kawano Atsushi, Kamiya Kazusaku	4. 巻 47
2. 論文標題 Generation of two induced pluripotent stem cell lines from PBMCs of siblings carrying c.235delC mutation in the GJB2 gene associated with sensorineural hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101910 ~ 101910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Oe Yoko, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Chen Cheng, Iizumi Madoka, Shiga Takahiro, Matsuoka Rina, Anzai Takashi, Hibiya-Motegi Remi, Tajima Shori, Ikeda Katsuhisa, Akamatsu Wado, Kamiya Kazusaku	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p.G45E/Y136X mutation in GJB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102290 ~ 102290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Ichiro, Oe Yoko, Chen Cheng, Danzaki Keiko, Ohta Sayaka, Koike Akito, Ikeda Katsuhisa, Kamiya Kazusaku	4. 巻 9
2. 論文標題 Activin/Nodal/TGF- Pathway Inhibitor Accelerates BMP4-Induced Cochlear Gap Junction Formation During in vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.602197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神谷和作、宇梶太雄、中川綾哉、濡木理
2. 発表標題 GJB2遺伝子変異型難聴に対するAll-in-one AAV vectorをもちいたゲノム編集治療法の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷和作、新井大祐
2. 発表標題 マウスES細胞をもちいたGJB2遺伝子変異型難聴モデルの開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷和作
2. 発表標題 内耳上皮細胞を標的としたバイオ医薬品の開発
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷和作
2. 発表標題 内耳ギャップ結合遺伝子の加齢性難聴への関与
3. 学会等名 第30回 日本耳科学会総会・学術講演会テーマセッション
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷和作
2. 発表標題 遺伝性難聴への遺伝子治療ベクターおよび中分子医薬品の開発
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会・パネルディスカッション・AMED研究
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 神谷 和作	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 AAVベクターを用いた内耳への遺伝子治療	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 改変型アデノ随伴ウイルスベクター	発明者 神谷和作	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、198101	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 内耳前駆細胞の製造法	発明者 神谷和作	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、072002	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

患者iPS細胞で遺伝性難聴を再現 ~ 世界最多の難聴型への薬剤スクリーニングが可能に ~ <a href="https://med.juntendo.ac.jp/news/20210518-01.html">https://med.juntendo.ac.jp/news/20210518-01.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------