

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791646

研究課題名（和文） 蝸牛線維細胞を標的とした Brn-4 欠損マウスへの骨髄間葉系幹細胞移植

研究課題名（英文） Cell therapy targeting cochlear fibrocyte of Brn-4 deficient mouse with bone marrow mesenchymal stem cell

研究代表者

神谷 和作（KAMIYA KAZUSAKU）

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：10374159

研究成果の概要（和文）：

本研究では遺伝性難聴の新規細胞治療法の開発を目的として骨髄間葉系幹細胞の内耳への最適移植法を検討した。移植用幹細胞としては C57BL/6 マウス由来 H1/A 骨髄間葉系幹細胞（MSC）株に EGFP（緑色蛍光）または HcRed（遠赤色蛍光）遺伝子を安定的に強度発現する細胞株を樹立した。同細胞をマウスへの経半規管外リンパ液還流法により内耳への移植を行った。移植手術前に蝸牛線維細胞に選択的障害を与える薬剤 3-nitropropionic acid (3NP)により移植前に軽微な炎症を惹起したところ、細胞導入効率が大幅に上昇した。更にこの誘導機構の解析により、ケモカイン MCP1 とその受容体 CCR2 による誘導機序が示されたため、CCR2 遺伝子を内耳より単離し発現用プラスミドを構築した。これを移植細胞に導入したところ、細胞生着効率が飛躍的に向上した。これらの条件検討を推進することにより新規細胞治療法が Brn-4 変異等による遺伝性難聴に対する更に効果の高い治療法として聴力改善につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Congenital deafness affects about 1 in 1000 children and the half of them have genetic background such as Connexin26 gene mutation. The strategy to rescue such heredity deafness has not been developed yet. Recently, a number of clinical studies for cell therapy have been reported and clinically used for several intractable diseases. Inner ear cell therapy for sensorineural hearing loss also has been studied using some laboratory animals, although the successful reports for the hearing recovery accompanied with supplementation of the normal functional cells followed by tissue repair, recovery of the cellular/molecular functions were still few. Previously, we developed a novel animal model for acute sensorineural hearing loss due to fibrocyte dysfunction and performed cell therapy with bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) as supplementation of cochlear fibrocytes functioning for cochlear ion transport. MSC has been known to have little risk for carcinogenesis compared with embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell. We injected MSC into the lateral semicircular canal and a number of these stem cells were then detected in the injured area in the lateral wall. The transplanted animals showed a significantly higher hearing recovery ratio than controls. We analyzed the machinery of this stem cell induction to the targeted site in cochlea and found that monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) and chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) played important roles for this cell induction. To enhance the MSC induction in cochlea, we

developed a novel transplant strategy by induction of MCP1 expression in host cochlear tissue and forced expression of CCR2 in MSC. Furthermore, we developed a novel mouse model for Connexin26 mutation as most frequent heredity deafness in human. With these animal models, the developed stem cells and the novel strategy to enhance the stem cell induction, we examined to establish an efficient stem cell therapy to cochlear target site followed by recovery of hearing function in heredity deafness.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000円	600,000円	2,600,000円
2010年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

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：内耳 再生医療 遺伝性難聴 骨髄間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞は成体細胞から作成できる多分化能を有する細胞であり、患者の骨髄より樹立することが可能なため既に多種の臓器において臨床での有用性が確認されており内耳への応用も非常に有効であると考えられる。研究代表者らが開発した間葉系幹細胞移植法では、移植前に蝸牛線維細胞のみに軽度な可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を置換することを可能とした。同方法を応用することにより単に細胞を補うだけでなく遺伝子変異を持つ異常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。

2. 研究の目的

先天性難聴は1000出生に1人の頻度で発生しその半数が遺伝性である。遺伝性難聴の根本的治療法は長年にわたり研究されており、近年では再生医療の遺伝性難聴への応用が大きく期待されている。現在のところ薬剤により誘発した難聴モデルの再生治療実験は研究代表者が昨年初めて成功させているが、遺伝性難聴に関しては未だ根本的治療の研究成果は皆無である。本研究では蝸牛線維細胞の変性が聴力低下の主要因であることが当研究室池田教授らにより報告されているヒト非症候性難聴 DFN3 モデル Brn-4 欠損マウスに対し、研究代表者が開発した有効性の高い間葉系幹細胞移植法を適用するという最も成功の可能性が高い組み合わせにより、これまで成功例のない遺伝性難聴に対する聴力回復の検討を試みる

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスを麻酔後、耳後部より削開、後半規管および外側半規管に小孔を開け、

外側半規管より半規管膨大部へ向けて微小チューブを挿入。1 X10⁵ cells in 20μl の骨髄間葉系幹細胞細胞液 (EGFP 標識) を 10 分間の注入により還流する。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により術後のリンパ液の漏出を抑えた。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た。同処置による聴力低下は見られない。移植後 1 週間毎に聴力を聴性脳幹反応 (ABR) を測定。移植 4 週間後に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。

4. 研究成果

移植用幹細胞の樹立:成育医療センター研究所生殖医療研究部との共同研究により移植用骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を得た。まず C57BL/6 マウス由来 H1/A 骨髄間葉系幹細胞株に EGFP 遺伝子をレトロウイルスにて発現させ、安定的に強度な緑色蛍光を持つ細胞を選抜・クローニングした。さら H1/A 細胞から強度に遠赤色光を発する HcRed 遺伝子を導入した発現細胞も同様の方法にて選抜し移植用細胞を樹立した。移植細胞の検出: 経半規管移植後の組織を GFP 蛍光検出により移植細胞の組織進入を解析し、前庭線維細胞組織内、蝸牛ラセン板縁組織内に移植細胞の生着を確認した。更に蝸牛線維細胞に選択的障害を与える薬剤 3-nitropropionic acid (3NP) により移植前に軽微な炎症を惹起したところ、細胞導入効率が大幅に上昇した。更にこの誘導機構の解析により、ケモカイン MCP1 とその受容体 CCR2 による誘導機序が示唆されたため、CCR2 遺伝子を内耳より単離し発現用プラスミドを構築した。これを移植細胞に導入したところ、細胞生着効率が飛躍的に向上した。これらの条件検討を推進することにより新規細胞治療法が Brn-4 変異等による遺伝性難聴に対する更に効果の高い治療法として聴力改善につながると考えられる。

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 8 件)

1. 神谷和作 実験動物を用いた内耳細胞治療研究へのアプローチ 耳鼻咽喉科臨床 査読無、補 126、2010、1-5
2. Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kamiya K, Kawano A, Suzuki M, Hattori N, Ikeda K. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 査読有、75 (2)、2011、211-214
3. Yan D, Kamiya K, Ouyang XM, Liu XZ. Analysis of subcellular localization of Myo7a, Pcdh15 and Sans in Ush1c knockout mice. Int J Exp Pathol. 査読有、92 (1)、2011、66-71
4. Kasai M, Hayashi C, Iizuka T, Inoshita A, Kamiya K, Okada H, Nakajima Y, Kaga K, Ikeda K. Vestibular function of patients with profound deafness related to GJB2 mutation. Acta Otolaryngol. 査読有、2010、130(9)、990-5.
5. Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutari K, Fujii M, Matsunaga T. Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid. Neurochem Int. 査読有、2010 56(3):487-94.
6. 神谷和作 難聴に対する細胞治療法の開発 医学のあゆみ 特集号・細胞治療 Update,

査読なし 2009 Vol229, No. 9, 863-867

7. Kamiya K, Cell therapy targeting cochlear fibrocytes, *Otology Japan* 査読なし 2009, 19(3):214-218
8. Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura H, Shinkawa H, Ikeda K
Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission, *Neuroscience*. 査読有 2009;164(3):1312-9

[学会発表] (計 2 件)

1. 神谷和作
欧州分子生物学会 (EMBO meeting)
Cochlear Gap-Junction plaque is disrupted by dominant-negative Connexin26 mutation.
2010年9月4日 スペイン・バルセロナ
2. 神谷和作、池田勝久 コネキシン26優性阻害変異によるコルチ器周囲細胞におけるギャップ結合プラークの形成変化
日本耳科学会学術集会 東京 2009年10月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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・講師
研究者番号：10374159