

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 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791937

研究課題名（和文）蝸牛線維細胞を標的とした遺伝性難聴治療法の開発

研究課題名（英文）Cell therapy for hereditary deafness targeting cochlear fibrocyte

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モデルとしてのコネキシン 26 等の遺伝子改変動物を用い、骨髄間葉系幹細胞や等の多能性幹細胞の分化制御や組織誘導の促進などによって効率の高い内耳細胞治療法の開発を行った。蝸牛線維細胞におけるケモカイン MCP1、および移植幹細胞における MCP1 受容体、CCR2 の発現を上昇させ、骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織への侵入を飛躍的に高めることに成功した。移植された幹細胞は特に蝸牛基底回転側、Hook portion から大量に蝸牛外側へ侵入し、蝸牛線維細胞、血管条、蝸牛支持細胞に到達させることに成功した。本手法によりこれまで不可能であった遺伝性難聴、特にコネキシン 26 変異難聴への聴力改善への可能性が現実的なものとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, 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. 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
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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

牛らせん靭帯およびらせん板縁を構成する蝸牛線維細胞はナトリウムポンプとギャップジャンクションを用いた蝸牛内イオンの能動輸送と受動輸送という極めて単純な機能を担う細胞群である。しかしながら蝸牛線維細胞の傷害は複数の先天性および後天性難聴の主要因となることが示され、その重要性が近年示唆されている。特に当研究室池田勝久教授らが報告したヒト非症候性難聴DFN3の原因因子Brn4の遺伝子欠損マウス(Minowa et al. Science 1999,)での発見を機に蝸牛線維細胞の変性を主要因とした聴力低下が実証され、有毛細胞を含むコルチ器と同様に正常聴力を維持する上で重要性の高い細胞群であることが明確に示された。更に複数の加齢性難聴モデル動物においても蝸牛線維細胞の変性が起因となることが示唆されている。また遺伝性難聴で最も高頻度な原因遺伝子であるコネキシン26(Cx26)遺伝子も蝸牛線維細胞および隣接する支持細胞で機能している。これらのことから蝸牛線維細胞は多種の感音性難聴の新規治療法確立への最も重要な標的の一つと考えられる。この蝸牛線維細胞は単一細胞としての機能が単純であるにも関わらず内耳機能における重要性が高いという点から、同細胞を治療標的とすれば特殊に分化した有毛細胞に比べて再生治療が成功する可能性が格段に高いと考えられる。

研究代表者らは蝸牛線維細胞の聴力機能への影響を解析するため、蝸牛らせん靭帯およびらせん板縁の線維細胞の二点のみに限局的な損傷を持つ聴覚障害モデルラット作製に成功(Hoya et al. Neuroreport 2004)。更にこの難聴ラットの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移植を試み、損傷部を修復し聴力回復を促進させることに初めて成功した(Kamiya et al. Am. J. Pathol. 2007、読売新聞 2007. 6. 28)。それまで生後の処置によって蝸牛内の損傷を修復し聴力回復に成功した例はなく、蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞の移植法は有効な治療手段となり得ることが初めて証明された。本手法は細胞移植後の拒絶反応も少なく他家移植としての有用性も示され、遺伝性難聴患者内耳の変異細胞を正常細胞を置換する方法としても十分応用可能であると考えられる。

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はなく遺伝子変異を持つ異常細胞を正常細胞

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。この方法論を進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と考えられる遺伝子改変難聴モデルマウスに対し、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。

研究の第一段階として前述した間葉系幹細胞の移植法および移植細胞の検出方法を更に改良し、遺伝性難聴マウスの蝸牛へ多数の移植細胞を置換、生着させる最適条件を検討。既に蝸牛組織内に間葉系幹細胞の誘導を促進する走化性因子 MCP1 の発現を増加させることにより細胞侵入促進効果が得られたため（図3）、これを更に改良し大量の正常細胞を蝸牛組織内に侵入させ、難聴モデルにおけるイオン輸送障害を改善させる。

第二段階として外リンパ液へ移植した細胞が組織へ進入し、損傷中心部への移動、隣接細胞との結合、機能性遺伝子の発現を解析

することにより、聴力回復のために必要な分子機構を検討する。これにより移植細胞に必要な遺伝子を導入し、治療効果を増強させる。これまでの結果では走化性因子 MCP1 の受容体である CCR2 遺伝子の機能により移植細胞が蝸牛外側壁へ誘導されることが示唆されたため、CCR2 遺伝子を一過的に強発現させた移植細胞を作製し移植の検討を行う。これにより移植細胞の組織誘導・修復反応が飛躍的に向上すると考えられる。本研究では我々のグループがこれまで報告した①Brn4 遺伝子欠損マウス (Brn4-KO, Science 1999)、②コネキシン 26 優性阻害変異マウス (Cx26-Tg, Hum Mol Genet 2003) に加え、新規に開発した③内耳特異的コネキシン 26 欠損マウス (Cx26-KO) を遺伝性難聴モデルとして用いることとする。変異蝸牛線維細胞を正常細胞に置換することにより聴力が回復することを明らかにする。本研究では特に間葉系幹細胞からの分化が容易であると思われる蝸牛線維細胞を標的とした細胞治療法開発を目的とした。

3. 研究の方法

実験動物

二種類のコネキシン 26 変異マウスを実験に用いることとする。

1. コネキシン 26 優性阻害変異マウス
2. コネキシン 26 欠損マウス (新規開発)

移植幹細胞

C57BL/6 マウス由来骨髄間葉系幹細胞、H1/A 細胞を用いた。レトロウイルスにて EGFP (緑色蛍光遺伝子) が標識してある。

移植方法

経半規管外リンパ液還流法 (Iguchi et al. 2004) を用い 1×10^4 cells/ μ l の細胞懸濁液

を 20 μ l 内耳へ投与した。

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ルマウント組織を得る。抗 EGFP 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する。初期に移植された EGFP 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う。

細胞置換効率を飛躍的に向上させる細胞移植法の開発

1. 蝸牛線維細胞の軽微損傷による走化性因子 MCP1 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走化性因子 MCP1 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 (右図)。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

(20-100mM, 1.5 \cdot) を内耳正円窓へ局所投与、その翌日に前述した間葉系幹細胞の移植実験を行う。この前処置は予備実験で既に効果が得られており、更なる検討により細胞導入効率および正常細胞への置換効率が高まると考えられる。

2. MCP1 受容体・CCR2 過剰発現細胞の作製及

び同細胞による移植実験

我々は上記の 3NP 局所投与マウスの蝸牛外側壁より、走化性因子 MCP1 の受容体である CCR2 をクローニングし既に同遺伝子過剰発現用プラスミドを構築した。これを移植細胞に一過性に発現させ、3NP 局所投与後の移植に用いる (左図)。これにより、前述の細胞遊走効果が増強され、細胞侵入効率が飛躍的に高まることが期待できる。

4. 研究成果

本研究では蝸牛線維細胞の修復に関わる遺伝子のスクリーニングを目的として 3NP 投与後蝸牛外側壁組織の DNA マイクロアレイ解析が行われ、発現上昇因子として単球走化活性因子 MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) がスクリーニングされた (Kamiya et al. Am J Pathol. 2007)。

我々は MCP1 およびその受容体である CCR2 に関し RT-PCR によりそれらの発現動態を解析した。その結果、蝸牛線維組織損傷における MCP1 の急激な発現上昇およびそれに引き続く MCP1 受容体である CCR2 の発現上昇が確認された。蝸牛組織での MCP1 の mRNA 発現は 3NP 投与後 1 日で急激に上昇し 3 日目に低下するが高発現状態を保っている。CCR2 は 1 日目よりも 3 日目に上昇することが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞においても CCR2 の mRNA 発現が確認され、同細胞が MCP1 によって誘導され得ることが示された。

さらに遺伝性難聴モデルとしてのコネキシン 26 等の遺伝子改変動物を用い、骨髄間葉系幹細胞や等の多能性幹細胞の分化制御や組織誘導の促進などによって効率の高い内耳細胞治療法の開発を行った。蝸牛線維細胞におけるケモカイン MCP1、および移植幹細胞における MCP1 受容体、CCR2 の発現を上昇させ、骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織への侵入

を飛躍的に高めることに成功した。移植された幹細胞は特に蝸牛基底回転側、Hook portion から大量に蝸牛外側へ侵入し、蝸牛線維細胞、血管条、蝸牛支持細胞に到達させることに成功した。本手法によりこれまで不可能であった遺伝性難聴、特にコネキシン 26 変異難聴への聴力改善への可能性が現実的なものとなった。

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) Gianluca Esposito, Sachine Yoshida, Ryuko Ohnishi, Yousuke Tsuneoka, Maria del Carmen Rostagno, Susumu Yokota, Shota Okabe, Kazusaku Kamiya, Mikio Hoshino, Masaki Shimizu, Paola Venuti, Takefumi Kikusui, Tadafumi Kato, Kumi O. Kuroda Infant Calming Responses During Maternal Carrying In Humans and Mice Current Biology (2013) 23(9):739-45 査読有

2) Cell therapy for hereditary hearing loss with stem cell homing factors.

Kamiya K.

Nihon Yakurigaku Zasshi.

2013;141(4):191-4. 査読無

3) 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

Otology & Neurotology, 2012. 33(4):655-9 査読有

4) 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 Workshop 2011 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 meeting 2011 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

神谷 和作 (Kamiya Kazusaku)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号: 10374159