

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861599

研究課題名(和文) 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた感音難聴に対する新しい内耳再生療法の試み

研究課題名(英文) A novel regenerative therapy for sensorineural hearing loss

研究代表者

吉岡 哲志 (YOSHIOKA, Satoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：20648539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類においては内耳有毛細胞や聴神経細胞は一度障害されると再生しないとされ、感音難聴の治療は不可能と考えられてきた。従って、従来治療不可能とされた感音難聴を治療する唯一の手段が各種幹細胞を用いた内耳再生療法と考えられる。本研究では幹細胞を用いた新しい内耳再生療法の開発を目的としている。そしてバルプロ酸による胚性幹(ES)細胞のneurogenesis促進効果の分子機構を、網羅的発現解析の手法を用いて検討した。またES細胞からの内耳前駆細胞への分化誘導法を確立する為に、ES細胞のTlx3遺伝子領域にレポーター遺伝子GFPをノックインし、FACS sortで内耳前駆細胞を選択的に回収することを試みた。

研究成果の概要(英文)：Sensory hair cells and auditory neurons do not regenerate throughout life, and loss of these cells is irreversible and cumulative. However recent advances in stem cell biology have provided hope that stem cell therapy will come closer to regenerating sensory hair cells and auditory neurons in humans. In the present study, we have investigated the effects of sodium valproate on the fate of embryonic stem cells. Consequently sodium valproate has clearly demonstrated to promote neurogenesis of ES cells. Thereafter we performed the comprehensive gene expression analysis of ES cells during differentiation into inner ear progenitor cells. Furthermore, to establish the methods for selecting inner ear progenitor cells exclusively, we have integrated GFP, a reporter gene, into the Tlx3 allele of the ES cell lines.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：突発性難聴 内耳虚血 胚性細胞 骨髄由来間葉系幹細胞 再生医療

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

【1】研究開始当初の背景

感音難聴の代表的な疾患である突発性難聴は40～50歳代に好発し、急激に発症して高度の感音難聴をきたす疾患であり、我が国では年間約2万5000人が罹患する(Clin. Otolaryngol. Allied Sci. 27: 458, 2002)。そして感音難聴の多くは内耳性難聴で内耳有毛細胞や聴神経細胞(=ラセン神経節細胞)に障害が見られることが報告されている。更に感音難聴は軽度なものを含めると65歳以上人口の約6割に認められ、75歳以上人口の実に3分の1が日常生活に支障をきたすレベルの感音難聴を有することが知られている。

哺乳類においては内耳有毛細胞(特に蝸牛有毛細胞)と聴神経細胞の形成は発生時に限られ、出生後は内耳有毛細胞や聴神経細胞は一度障害されると再生しないとされ、感音難聴の治療は不可能と考えられていた。従って、従来治療不可能とされた感音難聴を治療する唯一の手段が各種幹細胞を用いた内耳再生療法と考えられる。実際神経幹細胞、胚性幹細胞(ES細胞)、iPS細胞などの移植によって内耳有毛細胞や聴神経細胞が再生することが報告されている(Trends Mol Med 10:309-15,2004; Nat Med 9:1293-9, 2003)。また我々も内耳に移植された、神経幹細胞が内耳有毛細胞に分化して、内耳障害が軽減する事を明らかとした(Neuroreport. 16: 1545-1549, 2005)。

【2】研究の目的

最近申請者等は、骨髄由来間葉系幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cells;BMSC)を高効率で聴神経様細胞に分化誘導する方法を開発した(Stem Cells 29: 836-846, 2011)。内耳再生療法が成功するには、移植された細胞が神経投射し、正しい神経伝達路を形成する必要がある。即ちBMSC由来聴神経様細胞を単に内耳に移植してもそれだけでは十分ではない。実際には移植した聴神経様細胞が内耳有毛細胞や蝸牛神経核細胞と機能的シナプスを形成し、内耳での聴覚神経伝導路の機能を回復させることを確かめる必要がある。そこで、本研究はBMSCから分化誘導して作成した聴神経様細胞を感音難聴モデル動物に移植し、更に移植した細胞のシナプス形成を促すことで、内耳での聴覚神経伝導路の機能を回復させる、革新的な内耳再生療法の開発を目的としている。平成14年、平成15年度研究実施報告書でも報告したように、従来使用していた血清を使い果たしたため、最近新しい血清に変更した。

その結果骨髄由来間葉系幹細胞の神経系への分化誘導が、以前のように効率的に作成出来なくなった。いくつもの血清のlotチェックを行い、効率的に内耳神経細胞への分化誘導が可能な血清を選択するように努力したがあまり良い結果が得られなかった。このため、血清を用いずに効率的に神経系への分化誘導を行えるSFEB (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate)法に切り替えて、神経系への分化誘導実験を行っている。SFEB法を使用する関係上、BMSCの代わりにES細胞を用いての検討を行っている。この系を用いて、当初の計画書通りに、sodium valproateによる幹細胞のneurogenesis促進効果の分子機構の検討を網羅的発現解析の手法を用いて検討した。またES細胞から内耳神経細胞への分化誘導にはTlx3が重要な働きをすることが知られているので(Stem Cells 29: 836-846, 2011)、Tlx3陽性細胞をFACS sortにて回収するため、Tlx3のexon3と3'UTRの間にGFPをノックインしたES細胞の作成を試みた。

【3】研究の方法

(1) 培養細胞

本研究で用いたEB5 (AES0151 Riken) およびEB3 (AES0139 Riken) は feeder free の ES 細胞として知られている E14tg2a ES cells (CRL-1821™, ATCC)より作成された。Oct-3/4-IRES-BSD-pA vector を Oct-3/4 allele に integrate させ、Oct3/4 発現依存性に blasticidin S 抵抗性遺伝子を発現する。その結果 blasticidin S 20µg/ml でその未分化性を維持できる(Mol. Cell. Biol. 22: 1526-1536, 2002)。更に Bf1 (AES0179 Riken) は、EB3 の Foxg1 allele に Venus をノックインしたものであり、EB3 が神経に分化した際には Venus の発現によって神経分化した細胞の可視化が可能である。

(2) マウス ES 細胞から神経幹細胞への分化誘導：Wataya 等の方法(PNAS USA.105: 11796-801, 2008)に従い、SFEB(serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate)法にてマウス ES 細胞 (EB5 : Riken) から神経幹細胞への分化誘導を行なった。この手法は血清を全く使用しないので、安定した結果を得られる手法として知られている。

(3) 大脳皮質特異的神経幹細胞の単離と未分化細胞の除去:

Eiraku 等の方法(Cell Stem Cell 3:519-32, 2008)に従い、大脳に特異的な regional marker である FoxG1 遺伝子座に Venus 遺伝子をレポーター遺伝子としてノックインした ES 細胞株(FoxG1::venus 株)を SFEB 法で神経幹細胞に分化させた後、FoxG1 遺伝子を発現し Venus の蛍光(緑色)を発している細胞を FACS Sorter にて分離した。これにより大脳皮質特異的の神経幹細胞を単離すると同時に、未分化細胞の混入による腫瘍の発生を防ぐことが可能となった。

(4) 免疫染色法

一次抗体として抗 MAP2 抗体(rabbit polyclonal Ab)を用いて 2 時間インキュベートした。次いで二次抗体として Biotinylated horse anti-rabbit IgG を用い 30 分間インキュベートした。その後 Vectastain ABC 試薬で 30 分間インキュベートした。

最後に DAPI(Nakarai 1 $\mu\text{g/ml}$, 濃度)にて核染色を行った。

(7) 統計的処理

各分析データは 2 群の比較に関しては Student T 検定を行い、評価した。p 値が 0.05 以下を有意とした。全てのデータは mean \pm SD にて表記した。* は $p < 0.05$ を表す。

【4】研究成果

(1) ES 細胞に対する sodium valproate の neurogenesis 促進効果

LIF を含む ES 細胞維持培地で培養している Bf1 を神経分化誘導培地で培養し、開始後 14 日目で Venus の発現を指標に神経分化細胞のみを FACS sort した。

Sort した細胞を神経分化誘導・維持培地で培養し、4 日後に sodium valproate (1 mg/ml) を添加し、7 日目まで培養後、一部は抗 MAP2 抗体を用いた免疫染色を施行し、neurogenesis 促進効果の有無を検討し、残りは組織を回収後、網羅的遺伝子発現解析をおこなった。

抗 MAP2 抗体を用いた免疫染色では sodium valproate 投与群 (VP-Tx) で明らかに MAP2 陽性細

胞の割合が増大し(図 1)、未投与群 (No-Tx) に比して統計的にも有意差を認めた(図 2)。

図 1 : sodium valproate による MAP2 染色の変化

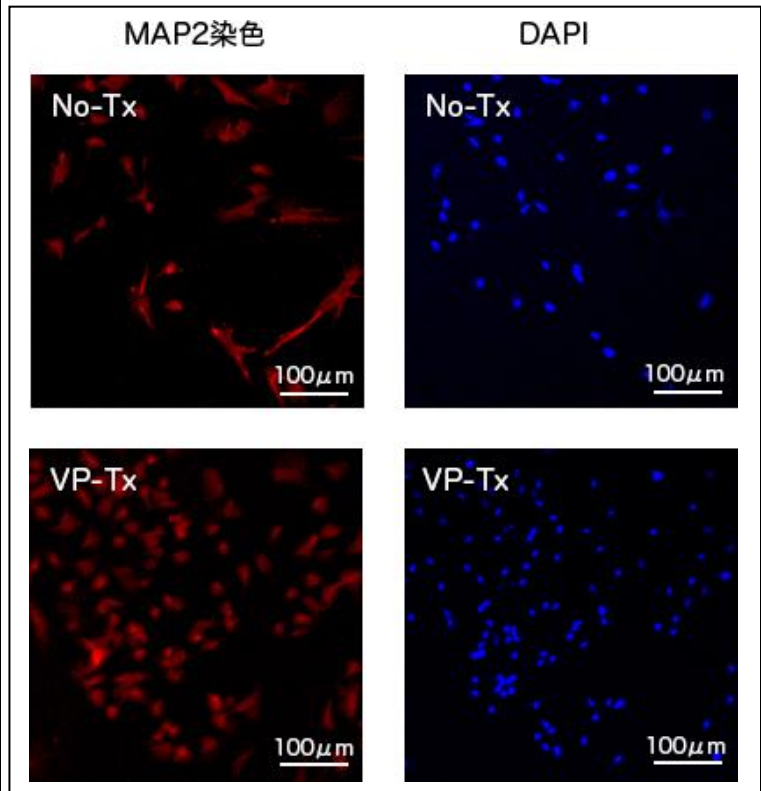
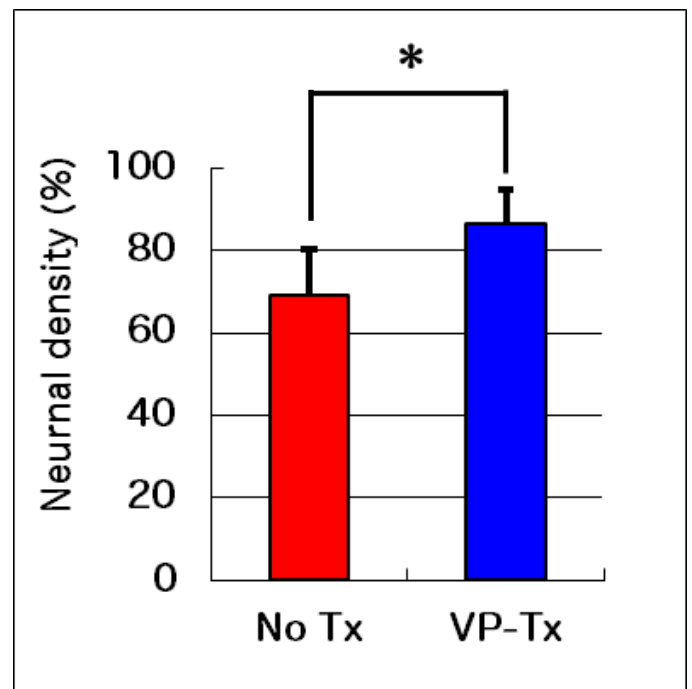
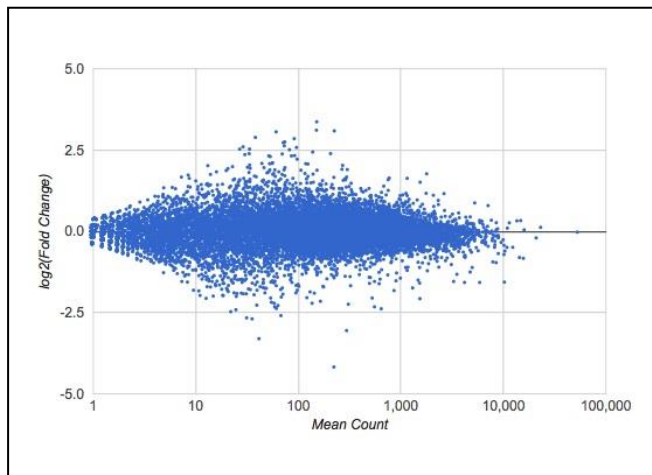


図 2 : sodium valproate による MAP2 陽性細胞の割合の変化



次いで、次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った(Illumina 社、HiSeq1500) (図3)

図3 : sodium valproate による遺伝子発現変化



得られたデータを BaseSpace (<http://basespace.illumina.com>)を用いて発現解析を行ったところ、2倍以上に発現量が増大した遺伝子 397 個と、半分以下に発現量が低下した遺伝子 326 個を認めた。

現在 GOstats (<http://gostat.wehi.edu.au/>)や Panther-Pathway (<http://www.pantherdb.org/pathway/>)といった Data mining tool を用いて更なる検討を行っている。なお、予備的データではあるが、向神経性シグナル伝達に関わる遺伝子の発現上昇が認められている。

(2) Tlx3 発現依存性に GFP を発現する ES 細胞の作製

Tlx3 の遺伝子発現を可視化し、FACS sort するために、ES 細胞の Tlx3 遺伝子領域にレポーター遺伝子 GFP をノックインすることを試みた。ノックインには、最新のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いた。

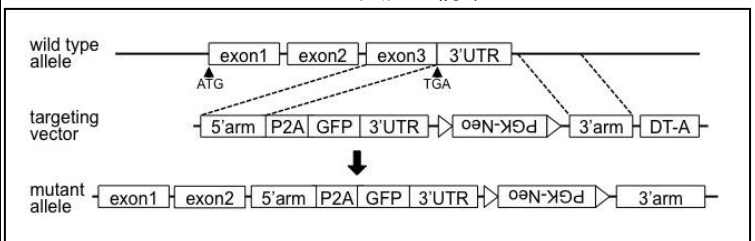
GFP の発現が Tlx3 遺伝子プロモーターの制御下に置かれるようにするため、GFP 遺伝子は Tlx3 のタンパク質コーディング領域と 3'UTR の間に挿入されるようにターゲティングベクターを設計した。また、Tlx3

と GFP の遺伝子発現がポリシストロニックに制御されるようにするため、Tlx3 と GFP の間は 2A ペプチド配列で接続した。ターゲティングベクターを構築する上で pMulti-ND-1.0 を使用した(大阪大学医学部竹田潤二先生より御分与戴いた)。pMulti-ND-1.0 には DT-A (ジフテリアトキシン A サブユニット) カセットおよびネオマイシン耐性遺伝子 (neo) が組み込まれているので、ポジティブ-ネガティブ選別が可能となる。且つ neo は loxP で挟まれているため、ターゲティング後に neo を除去するのが容易となる (図4)。

次に、Cas9 タンパクがゲノムを切断するための適切な標的配列の探索と選定を CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org/>) を用いて行った。その結果を元に、Cas9 タンパクとガイド RNA を発現させるベクターを pX330 (addgene, #42230) を用いて作成した。

また、ゲノム上における Cas9 の標的配列の決定に合わせて、相同組み換えのための 5'arm と 3'arm を作成し、ターゲティングベクターを完成させた。

図4 : GFP ノックイン ES 細胞の構築



作成した上記 2 種類のベクターを、EB5 にトランスフェクトした。G418 によりスクリーニングを行い、さらに PCR によりジェノタイピングを行った結果、適切なゲノム領域に GFP が組み込まれているノックイン EB5 を 9 クローン得ることに成功した。現在、このクローンの性能を評価中である。

(3) 結語

① sodium valproate は明らかに ES 細胞に対して neurogenesis 促進効果を持つことが示された。

網羅的遺伝子発現解析では 2 倍以上に発現が増大した遺伝子 397 個と、半分以下に発現が低下した遺伝子 326 個を認めた。

現在 GOSTats (<http://gostat.wehi.edu.au/>)や Panther-Pathway (<http://www.pantherdb.org/pathway/>)といった Data mining tool を用いて更なる検討を行っている。

② Tlx3 陽性細胞を FACS sort にて回収するため、Tlx3 の exon3 と 3'UTR の間に GFP をノックインした ES 細胞の作成を試みた。

この数年急速に発達したゲノム編集システムの1つである CRISPR/Cas9 システムを用いるため、pCas-Guide コンストラクトと Targeting vector を作成した。

その後両者を ES 細胞に遺伝子導入し、Tlx3 allele に integrate させ、Tlx3 発現依存性に GFP を発現する ES 細胞を作製した。現在その機能を評価中である。

【5】主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

[1]. 鈴木亜季、岩田昇、中田誠一、吉岡哲志、桜井一生、内藤健晴、鈴木賢二：気管切開を要した舌扁桃炎および多発喉頭蓋嚢胞化膿症例 (査読有) 日耳鼻感染症・エアロゾル学会誌 3:42-49, 2015

[2]. 吉岡哲志：特集 小児科医の疑問に答える－耳鼻咽喉科の知識 中耳炎 耳管の形態と機能・成人とはどう違うのか？ 小児科診療 (査読無) 7: 885-890, 2014

[3]. 中田誠一、藤井直子、吉岡哲志、鈴木健二：画像診断パーファクトガイド 読影のポイントとピットフォール 頭頸部・リンパ節炎 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 (査読無) 86: 280-287, 2014

[4]. Yoshioka S, Naito K, Fujii N, Katada K: Movement of the Eustachian Tube During Sniffing in Patients With Patulous Eustachian Tube: Evaluation Using a 320-Row Area Detector CT Scanner. Otol Neurotol. (査読有)

34:877-83, 2013

[5]. 犬塚恵美子, 吉岡哲志, 堀部晴司, 内藤健晴：口蓋裂一次手術時における滲出性中耳炎の統計的観察 耳鼻咽喉科臨床 (査読無) 106: 883-891, 2013

(図書) (計 2 件)

[1]. Fujii N, Yoshioka S (edit by Kazuhiro Katada, Melvin E.C): Volume Scanning in the Field of Otolaryngology. Area Detector CT, Medical Tribune (査読無), pp173-181, 2015

[2]. 吉岡哲志：診断・対策－気道異物の診断 気道食道異物摘出マニュアル 日本気管食道科学会編 金原出版 (査読無) 41-53, 2015

【6】研究組織

(1)研究代表者

吉岡哲志 (YOSHIOKA, Satoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：20648539