

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893269

研究課題名(和文)DFN3難聴モデルマウスによる新規幹細胞治療法の開発

研究課題名(英文)Cell therapy targeting the model of DFN3 non-syndromic deafness.

研究代表者

城所 淑信(Yoshinobu, Kidokoro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60514487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Brn4-K0マウスは遺伝性難聴で最も典型的なGJB2変異型遺伝性難聴のモデル動物で最近新たに発見された「ギャップ結合ブランク崩壊」と同様の分子病態変化を示すことが明らかとなり、ギャップ結合ブランクのタンパク質複合体が有意な量の減少を示すことが明らかとなった。現在Brn4-K0マウスからセンダイウィルスを用いたiPS細胞の樹立を行っている。Brn4-K0マウスの皮下組織から線維芽細胞を採取し初代培養を行った。これらの細胞が安定的な増殖を示したため、初期化用に凍結保存した。これらの細胞に初期化因子を発現するセンダイウィルスに感染させ、多能性を示すクローンを単離する予定である。

研究成果の概要(英文)：Brn4, which encodes a POU transcription factor, is the gene responsible for DFN3, an X chromosome-linked, non-syndromic type of hearing loss. Brn4-deficient mice have a low endocochlear potential (EP), hearing loss, and ultrastructural alterations in spiral ligament fibrocytes, however the molecular pathology through which Brn4 deficiency causes low EP is still unclear. We analyzed the formation of gap junction plaques in cochlear supporting cells of Brn4-deficient mice at different stages by confocal microscopy and three-dimensional graphic reconstructions with proteomic analysis. We demonstrated that the Brn4 mutation affected the assembly and localization of gap junction proteins at the cell borders of cochlear supporting cells, suggesting that Brn4 substantially contributes to cochlear gap junction properties to maintain the proper EP in cochleae, similar to connexin-related deafness.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 再生医療

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は 1000 出生に 1 人発生するとされており、先天性疾患の中でも高頻度に起こるものの一つである。そのうち半数以上が遺伝性疾患であり、コネクシン (Cx) は世界における遺伝性難聴の原因遺伝子として変異検出頻度が最も高いものである。蝸牛においては主に Cx26、Cx30 が蝸牛線維細胞や支持細胞に分布しており、Cx は隣接する細胞との間にギャップ結合を構成し、K⁺の輸送を担っている。蝸牛では K⁺が内リンパへ流入することにより蝸牛内高電位となり有毛細胞を脱分極させ、音受容の基盤を形成しているため、ギャップ結合は音の伝達に重要な役割を担っていると考えられる。Cx 変異難聴マウスにおけるギャップ結合の形態変化については、当講座の神谷和作らにより Cx26 優性阻害マウス、Cx26 conditional-KO マウスを用いた研究(Kamiya, *Journal of Clinical Investigation in press*, 図 1)にて、ギャップ結合の断片化を伴う構造の崩壊が報告されている。

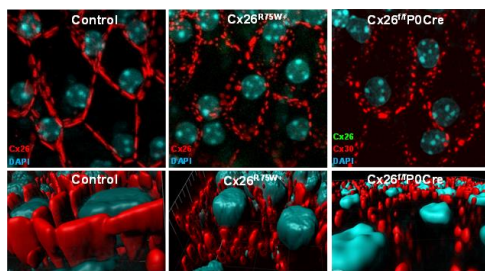


図 1、Cx26 優性阻害マウス、Cx26 conditional-KO マウスではギャップ結合プラークの断片化が観察される。

一方、Brn4 はニューロンや、蝸牛細胞の分化に関わる転写因子であり、X 染色体性の非症候性難聴では最多の疾患である X-linked deafness type3 (DFN3) の原因遺伝子として知られているが、その機序は未だ不明な点が多かった。当講座池田勝久教授らが報告したヒト非症候性難聴 DFN3 の原因遺伝子 Brn4 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た。

遺伝性難聴で最も高頻度な原因遺伝子である Cx26 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ため、研究代表者の城所淑信は Brn4-KO マウスにて、Cx26 により構成されるギャップ結合の形態を観察した。その結果、Brn4-KO マウスにおいても Cx 変異難聴と同様のギャップ結合の崩壊が共焦点顕微鏡を用いた免疫染色にて確認された。

(図 2) さらに、Western Blotting にて、定量的な解析を行った。Brn4-KO マウスでは Cx26,30 の顕著なタンパク質の発現量の低下が認められ、Brn4 遺伝子と、Cx の間に分子遺伝学的な共通点を確認された。(図 3) 近年、研究協力者神谷により蝸牛線維細胞を標的として骨髄間葉系幹細胞幹細胞を移植する画期的方法が開発され、内耳幹細胞移植により感音性難聴の聴力回復が可能であることが初めて証明された (Kamiya et al. *Am J Pathol* 2007, 図 4)。Cx は蝸牛において、線維細胞、支持細胞に存在し、カリウムイオン輸送に必須のギャップ結合プラークを形成しているため、同方法を応用することにより、Brn4-KO マウスへの骨髄幹細胞移植にて、線維細胞変性の修復が期待できる。これは根本的な遺伝子難聴治療への可能性を高めるものと考えられる。

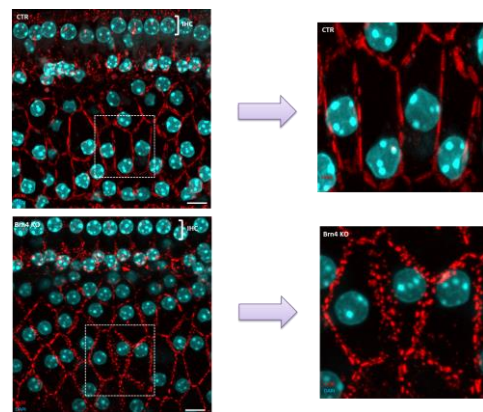


図 2、Brn4-KO マウスでも Cx 変異難聴マウスと同様のギャップ結合プラークの断片化が観察される。

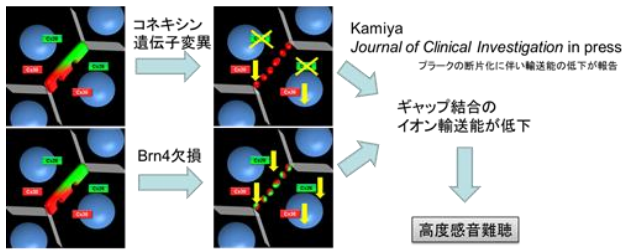


図3. Cx変異難聴マウスとBrn4-KOマウスとの間で分子遺伝学的な共通点が確認された。

2. 研究の目的

Brn4はニューロンや、蝸牛細胞の分化に関わる転写因子であり、X染色体性の非症候性難聴では最多の疾患であるX-linked deafness type3 (DFN3)の原因遺伝子として知られているが、その機序は未だ不明な点が多かった。しかし研究代表者城所淑信はBrn4-KOマウスのギャップ結合を観察することにより、Brn4と先天性難聴の最多原因遺伝子であるCx26,30の間に共通の分子病態があることを見つけた。そのため、現在治療研究が進んでいるCx26変異難聴と同様の治療研究論が、Brn4変異難聴にも応用できる可能性が高い。本研究ではさらに当講座で繁殖飼育しているBrn4-KOマウスを用いて間葉系幹細胞移植を行い、Brn4変異難聴の遺伝子治療を開発する。

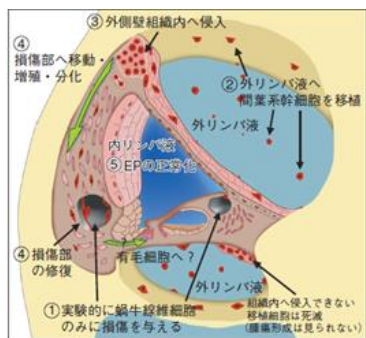


図4. 外リンパ液への間葉系幹細胞移植。薬剤投与によりらせん靱帯およびらせん板縁に選択的に損傷を与え(a)、その後外リンパ液へ骨髄から採取した間葉系幹細胞を半規管からの還流により投与した結果、投与した間葉系幹細胞(赤)が損傷部(黒)の修復を促進し高周波域の聴力回復率が有意に上昇した。黄色矢印は推測された移植細胞の組織侵入および移動経路。(Kamiya et al. *Am J Pathology* 2007, 神谷和作 *医学のあゆみ 細胞治療 Update* 2010)

3. 研究の方法

本研究では当研究室で繁殖に成功しているBrn4-KOマウスに対し、骨髄間葉系幹細胞を樹立し、経半規管外リンパ液還流法による幹細胞移植を施行、移植後の聴力変化、移植細胞検出により侵入経路とその動態を解析する。まず、無処置の細胞移植、次に研究協力者神谷が開発した、蝸牛線維細胞の軽微損傷による走化性因子MCP1・SDF1発現上昇を用いた幹細胞遊走効果蝸牛組織への細胞置換効率を飛躍的に向上させる内耳ホーミング機構を応用した細胞移植法を行う。

①骨髄間葉系幹細胞の培養樹立

生後8週齢のC57BL/6マウス大腿骨を摘出、細胞培養液での骨髄還流により骨髄細胞を得る。培養ディッシュにて10-15世代継代した後EGFP(緑色蛍光)またはHc-Red(遠赤色蛍光)発現レトロウイルスにより標識する。

我々が保有する以下の難聴モデル動物を内耳移植実験に供することとする。Brn4-KOマウス(Minowa, Science 1999): 順天堂大学動物施設にて繁殖中。

②細胞移植に適した半規管への微小カテーテル挿入による移植技術の開発

経半規管外リンパ液還流による細胞移植を行うため、全身麻酔下でBrn4-KO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する。

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 Cx26、Cx30、

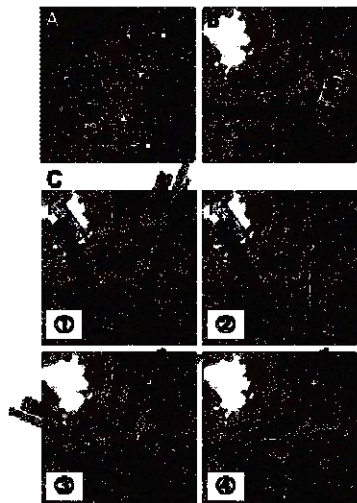


図6、A. 経半規管細胞移植前の成熟マウス半規管。B. 細胞移植時に後半規管および外側半規管に細胞液を還流するための小孔を開ける。C. 一方に微小カテーテル（シリコンチューブ）を様々な方向に挿入し細胞液を注入、もう一方より外リンパ液を吸引・排出することにより、蝸牛の頂部まで細胞を到達させる最適法を開発する。

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。

③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う。

④細胞置換効率を飛躍的に向上させる細胞

移植法の開発

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

研究協力者神谷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 (図 7)。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, 1.5μ) 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。

⑤移植細胞の動態解析および Ca²⁺イメージングシステムによる蝸牛機能解析

移植細胞の動態を詳細観察するため移植翌日のマウスより蝸牛外側壁を摘出後、器官培養を行い、共焦点顕微鏡タイムラプス解析により組織侵入後の EGFP 標識細胞の細胞移動および形態変化のライブイメージングを行う。さらに同蝸牛器官培養を用い、薬理学講座における Ca²⁺指示薬 Fluo 4-AM を用いた Ca²⁺イメージングシステムによる機能解析を行う。

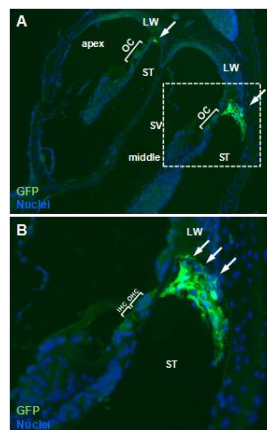
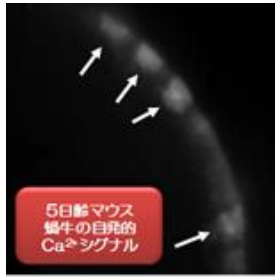


図7、薬剤にて蝸牛外側壁 (Lateral Wall, LW) にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞 (GFP 標識、矢印) の細胞侵入促進に成功した。この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。



マウス内耳のギャップ結合を介した自発的 Ca^{2+} シグナル (矢印) のイメージング解析に成功。
(順天堂大学薬理・国広)

4. 研究成果

本研究では、X染色体性の非症候性難聴では最多の疾患である X-linked deafness type3 (DFN3)、遺伝子改変病態モデルである Brn4-K0 マウスの詳細な病態解明を行った。Brn4-K0 マウスは遺伝性難聴で最も典型的な GJB2 変異型遺伝性難聴のモデル動物で最近新たに発見された「ギャップ結合プラーク崩壊」と同様の分子病態変化を示すことが明らかとなり、ギャップ結合プラークのタンパク質複合体が有意な量的減少を示すことが明らかとなった。これらは国際科学誌 PLoS One 他多くの学会ににおいて発表された。(Kidokoro et al., PLoS One 9, e108216, 2014)

現在 Brn4-K0 マウスからセンダイウィルスを用いた iPS 細胞の樹立を行っている。Brn4-K0 マウスの皮下組織から線維芽細胞を採取し初代培養を行った。これらの細胞が安定的な増殖を示したため、初期化用に凍結保存した。これらの細胞に初期化因子を発現するセンダイウィルスを感染させ、多能性を示すクローンを単離する予定である。

これらの成果により、未だ解明されていない X 染色体性の非症候性難聴の病態メカニズムの解明が大きく進展し、根本的治療法の開発へ貢献することが期待できる。

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 1 件)

① Kidokoro Y., Karasawa K., Minowa O., Sugitani Y., Noda T., Ikeda K., and Kamiya K.

Deficiency of transcription factor Brn4 disrupts cochlear gap junction plaques in a model of DFN3 non-syndromic deafness.

PLoS one 9, e108216, 2014

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0108216

[学会発表] (計 2 件)

① 城所淑信, 神谷和作, 美野輪治, 池田勝久
Brn4-K0 マウスにおけるギャップ結合プラークの崩壊.

耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会

2015 年 8 月 29 日

ホテルグランヴィア大阪(大阪市)

② 城所淑信, 神谷和作, 美野輪治, 池田勝久
Brn4-K0 マウスにおけるギャップ結合プラークの崩壊.

日本耳鼻咽喉科学会総会

2014 年 5 月 15 日

ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

城所 淑信 (KIDOKORO Yosinobu)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：60514487

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者