

平成 27 年度 総括研究報告書

難治性疾患実用化研究事業

研究開発課題名：GJB2 変異難聴患者由来 iPS 細胞によるギャップ結合複合体崩壊を指標とした遺伝性難聴の病態解明と治療研究

研究代表者：順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学講座 神谷 和作

【背景と目的】

遺伝性難聴は約 1,600 出生に 1 人と高頻度に発症し聴覚、言語発育障害の極めて高度な QOL の低下をもたらす。その 50%以上の要因を占めるのがギャップ結合を形成するコネクシン 26 (Cx26) 遺伝子、GJB2 の変異による遺伝性・感音性難聴である。研究代表者らは新しい内耳細胞治療法を開発し、多能性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を世界で初めて実証し (Kamiya, Am J Pathol, 2007, 読売新聞他)、それまで不可能とされていた遺伝性難聴の根本的治療への道が大きく広がった。一方で多くの遺伝子改変難聴モデルの開発により「ギャップ結合複合体崩壊」という全く新しい発症機構を発見し、患者ギャップ結合機能が体外で簡便に機能評価できることを証明した (Kamiya, J Clin Invest, 2014, 時事通信、日経産業新聞他)。本研究では、我々の幹細胞技術と GJB2 遺伝子治療技術により、GJB2 変異患者 iPS 細胞由来の内耳前駆細胞に正常 GJB2 遺伝子を導入し、ギャップ結合複合体を修復した安全な細胞クローンを選抜、同細胞を内耳へ移植することにより蝸牛イオン環境を回復させ、根本的治療の存在しなかった GJB2 変異患者の聴覚再生を目指す。樹立した患者 iPS 細胞由来疾患モデル細胞をバンク化し、将来的に新規薬剤等の治療効果と安全性を評価できる患者のギャップ結合機能を指標とした検査ツールを構築する。

【主な研究成果】

遺伝子治療によるギャップ結合の修復：我々は Cx26 欠損難聴モデルマウスの内耳へ Cx26 搭載 AAV を投与することにより内耳細胞において欠損した Cx26 を補い、ギャップ結合を修復することにより難聴モデルマウスの聴力を回復させることに成功した (Iizuka, Kamiya & Minowa, Ikeda, Human Molecular Genetics, 2015) (NHK ニュース、読売新聞、朝日新聞、日経新聞 2015 年 4 月他)。

マウスおよび実験動物モデル由来 iPS 細胞の樹立と内耳前駆細胞の分化誘導：正常マウス (C57BL/6J) および GJB2 欠損マウスの内耳細胞由来 iPS 細胞を樹立した。これらの iPS 細胞を用いて下記の分化誘導実験を行った。内耳有毛細胞への三次元分化誘導法の検討により、iPS 細胞から Cx26 ギャップ結合を有する細胞の作製に成功した。この方法では iPS 細胞の浮遊培養後に独自のフィーダー細胞を用いた接着培養を行い分化制御因子として最適な添加因子の組み合わせが選抜された。電子顕微鏡ではこれらの細胞間にギャップ結合の超微細構造が確認された。GJB2 変異難聴患者の iPS 細胞を用いて同細胞を安定的に作製することが出来れば、ギャップ結合修復を行った細胞治療や創薬のための疾患モデル細胞としての活用が期待できる。血液細胞からのヒト iPS 細胞の樹立も行われ、マウス同様に分化誘導の検討が進められている。