

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) Pendred 症候群由来疾患 iPS 細胞を用いた病態生理と新規治療標的の探索および iPS 細胞技術を用いた症例毎の薬剤感受性の事前予測に関する研究
(英語) Exploring pathogenesis and novel therapeutic targets using Pendred syndrome patient derived hiPS cells and companion diagnosis using iPSC technology
- 研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学・医学部・教授
小川郁 (オガワカオル)
- 所属 役職 氏名： (英語) Keio University School of Medicine
Department of Otorhinolaryngology,
Professor,
Kaoru Ogawa
- 実施期間： 平成27年11月16日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) ① Pendred 症候群/DFNB4 症例のリクルートと、その基礎データの整備
② 臨床試験プロトコル策定とその遂行
③ 疾患 iPS 細胞由来内耳細胞を用いた新規治療薬の探索
- 開発課題名： (英語) ① Recruiting patients with Pendred syndrome / DFNB4 followed by preparation of their basic data
② Formulating a protocol for the clinical test followed by its implementation
③ Exploring novel therapeutic targets using Pendred syndrome patient derived hiPS cells

- 研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学・医学部・専任講師
藤岡正人 (フジオカマサト)
- 所属 役職 氏名: (英語) Keio University School of Medicine
Department of Otorhinolaryngology,
Assistant Professor,
Masato Fujioka
- 分担研究 (日本語) 疾患 iPS 細胞由来内耳細胞を用いた新規治療薬の探索
- 開発課題名: (英語) Exploring novel therapeutic targets using Pendred syndrome patient
derived hiPS cells
- 研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学・医学部・大学院生
佐伯翼 (サエキツバサ)
- 所属 役職 氏名: (英語) Keio University Graduate School of Medicine
Department of Physiology
Tsubasa Saeki
- 分担研究 (日本語) ① Pendred 症候群/DFNB4 症例のリクルートと、その基礎データの整備
② 臨床試験プロトコル策定とその遂行
- 開発課題名: (英語) ① Recruiting patients with Pendred syndrome / DFNB4 followed by
preparation of their basic data
② Formulating a protocol for the clinical test followed by its
implementation
- 研究開発分担者 (日本語) 独立行政法人国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター 聴覚・平衡覚研究部
部長
松永達雄 (マツナガ タツオ)
- 所属 役職 氏名: (英語) National Hospital Organization Tokyo Medical Center
National Institute of Sensory Organs, Division of Hearing and
Balance Research
Division Director
Tatsuo, Matsunaga

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

岡野栄之教授 (慶應義塾大学医学部生理学教室)、藤岡正人専任講師、佐伯翼君 (大学院生) とともに、Pendred 症候群確実例 3 症例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立、並行してヒト ES/iPS 細胞からの高効率な内耳細胞誘導系を確立し、患者由来内耳細胞モデルにおいて、本疾患のヒト内耳細胞には過去のマウスの知見が示唆したイオン交換障害は認められないことと、変異による異常タンパク

の細胞内凝集体形成、および細胞ストレス脆弱性を見出した。

Pendred 症候群は *SLC26A4* 遺伝子の変異で起こり、内耳障害による両側変動性進行性難聴と反復性めまい発作および甲状腺腫を示す。本疾患のヒト型変異マウスモデルは変動性内耳障害を再現せず、現在は有効な治療薬がない疾患である。研究グループでは患者由来内耳細胞による Pendred 症候群の末梢血リンパ球から iPS 細胞を分化誘導して蝸牛 PENDING 陽性細胞を作製し、患者 iPS 細胞由来ヒト内耳細胞による Pendred 症候群/DFNB4 疾患モデルを構築した。また、この細胞モデルを用いて、メトホルミンおよびラパマイシン（シロリムス）などのオートファジー促進薬が Pendred 症候群の治療に有効である可能性を示した。

松永達雄部長（NHO 東京医療センター聴覚・平衡覚研究部）とともに、Pendred 症候群/DFNB4 確実例 16 家系を新たに同定した。また、過去の Pendred 症候群/DFNB4 確実例で後方視研究を行い、難聴の周波数別の進行、変動の経時的な特徴を把握した。その結果、臨床試験の被験者予備群を確保するとともに、今後の臨床試験を行う際の、治療効果指標を見出した。これらを元に臨床試験プロトコル案を作成し、医薬品医療機器総合機構（PMDA）において3回の事前面談（医薬品戦略相談）を受けた。この結果、2017年度に PMDA において対面助言が予定された。

英文

Mutations in the *SLC26A4* gene result in Pendred syndrome/DFNB4, with the clinical symptoms of bilaterally variable progressive deafness, repetitive vertigo attacks and thyroid goiter. The lack of disease model using human cells result in failures in clinically effective treatment for these diseases. Here we show that cochlea PENDING positive cells induced by iPS cells from Pendred syndrome peripheral blood lymphocytes can model degenerative phenotypes of disease cells that can account for the symptoms of the disease which cannot be recapitulated in the mouse models. We also found that autophagy-inducers such as metformin and rapamycin (sirolimus) were effective for the cellular susceptibility. These results suggest the effectiveness of these drugs for the future therapy of Pendred syndrome. We are currently preparing for the clinical trials.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 11 件、国際誌 5 件）

1. Fujioka M, Okano H, Edge AS. Manipulating cell fate in the cochlea: a feasible therapy for hearing loss. *Trends Neurosci.* 2015;38(3):139-44.
2. Tsuchihashi NA, Hayashi K, Dan K, Goto F, Nomura Y, Fujioka M, Kanzaki S, Komune S, Ogawa K. Autophagy through 4EBP1 and AMPK regulates oxidative stress-induced premature senescence in auditory cells. *Oncotarget.* 2015 28:6(6):3644-55.
3. Kanzaki S, Watanabe K, Fujioka M, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ogawa K. Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system: Drug availability in inner ear following different dose of systemic drug injections. *Hear Res.* 2015 330(Pt A):142-6.

4. Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, Niwa K, Endo S, Fujioka M, Shiotani A. ERK2 mediates inner hair cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Sci Rep.* 2015 18;5:16839.
5. Hosoya M, Fujioka M, Ogawa K, Okano H. Distinct Expression Patterns Of Causative Genes Responsible For Hereditary Progressive Hearing Loss In Non-Human Primate Cochlea. *Sci Rep.* 2016 Feb 26;6:22250
6. Hosoya M, Fujioka M, Kobayashi R, Okano H, Ogawa K. Overlapping expression of anion exchangers in the cochlea of a non-human primate suggests functional compensation. *Neurosci Res.* 2016 Sep;110:1-10
7. Inagaki Y, Fujioka M, Kanzaki S, Watanabe K, Oishi N, Itakura G, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ogawa K. Sustained Effect of Hyaluronic Acid in Subcutaneous Administration to the Cochlear Spiral Ganglion. *PLoS One.* 2016 21;11(4):e0153957.
8. Suzuki N, Hosoya M, Oishi N, Okano H, Fujioka M, Ogawa K. Expression pattern of wolframin, the WFS1 (Wolfram syndrome-1 gene) product, in common marmoset (*Callithrix jacchus*) cochlea. *Neuroreport.* 2016 3;27(11):833-6.
9. Hosoya M, Fujioka M, Okano H, Ogawa K. Distinct Expression Pattern of a Deafness Gene, KIAA1199, in a Primate Cochlea. *Biomed Res Int.* 2016;1781894.
10. Yamamoto N, Kanno A, Matsunaga T*. Genetics of Inner Ear Malformation and Cochlear Nerve Deficiency. In: Cochlear Implantation in Children with Inner Ear Malformation and Cochlear Nerve Deficiency. Kaga K (Ed.). Springer: Tokyo. 2016; 47-59.
11. Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S, Akamatsu W, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Rep.* 2017 3;18(1):68-81.
12. 松永達雄*. 遺伝子診断・平衡障害. In : 永井良三・シリーズ総監修. 山嵜達也、小川郁、丹生健一、久育男、森山寛、宇佐美真一・編集. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科研修ノート改訂第2版, 診断と治療社, 2016; 622.
13. 松永達雄*. 新しい検査・解釈 遺伝子とめまい疾患. *JOHNS.* 2016; 32(1):45-48.
14. 永井遼斗、松永達雄*, 図説シリーズ「目で見る遺伝医学」－難聴の遺伝医学, 国立医療学会誌「医療」. 2016; 70(3):160-166.
15. 松永達雄*. 遺伝性難聴と内耳再生医療, 日本医事新報. 2017; 4846:29

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. PENDRED 症候群疾患特異的 iPSC 細胞由来内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング 口頭 細谷誠, 藤岡正人, 松永達雄, 小川郁, 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会, 国際フォーラム, 東京都千代田区 2016/5/20-23 国内

2. ヒト ES/iPS 細胞をソースとした高純度内耳有毛細胞誘導系と人工蝸牛感覚上皮シート作成のこころみ ポスター 藤岡正人, 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京都港区, 2016/7/21-22 国内
3. PENDRED 症候群疾患特異的 iPS 細胞由来内耳細胞を用いた薬剤スクリーニング ポスター 細谷誠, 藤岡正人, 岡本理志, 曾根岳史, 松永達雄, 赤松和土, 小川郁, 岡野栄之, 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京都港区, 2015/7/21-22 国内
4. A mutated PENDRIN formed intracellular aggregations in the inner ear cells induced from Pendred syndrome patients-specific iPS cells 口頭 細谷誠, 藤岡正人, 松永達雄 第 38 回 日本神経科学大会, 兵庫県神戸, 2015/7/28-31 国内
5. コモンマーモセット蝸牛における SLC26A および SLC4A ファミリー陰イオン交換輸送体の発現パターンの検討 口頭 細谷誠 第 60 回日本聴覚医学会総会・学術講演会, 京王プラザホテル 2015/10/21-23 国内
6. Translating back and forth in between benchside and bedside by hiPS based-technology and a primate model 口頭 藤岡正人, the13rd. Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 一橋大学一橋講堂, 東京都千代田区, 2015/12/3-4 国内
7. 特別講演「難聴の遺伝子診療と全身疾患」, 口頭, 松永達雄. 第 15 回世田谷区医師会医学会, 東京都世田谷区 (世田谷区医師会館 3 階大ホール), 2015/12/5 国内
8. A mutated PENDRIN formed intracellular aggregations and caused increase of susceptibilities for cell stress in the inner ear cells induced from Pendred syndrome patients-specific iPS cells, 口頭, Hosoya M, Fujioka M, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H. Association for research in otolaryngology 39th Annual MidWinter Meeting, San Diego, California, USA, 2016/2/20-24 国外
9. Minding species gaps in the cochlea: non-human primate and patient derived- hiPSc models for the study of hereditary hearing loss, 口頭, Fujioka M, Hosoya M, Suzuki N, Okano H, Matsunaga T, Ogawa K. Association for research in otolaryngology 39th Annual MidWinter Meeting, San Diego, California, USA, 2016/2/20-24 国外
10. Increasing contribution of genetic tests for hearing loss to patient care, 口頭, Matsunaga T. 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Tokyo, Japan, 2016/3/28 国内
11. 院で幼児期に初回人工内耳手術を行った聴覚障害児 138 児の療育・就学状況について 口頭 南修司郎, 竹腰英樹, 正由紀子, 松永達雄, 加我君孝 第 117 回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 愛知県名古屋市, 2016/5/18-21 国内
12. Minding species gaps in the cochlea: non-human primate and patient derived- hiPSC models for the study of hereditary hearing loss 口頭 藤岡正人, モンペリエ (フランス) 2016/9/19-21 海外
13. 両側進行性内耳性難聴の病態生理研究～疾患 iPS 創薬の立場から～ 口頭 藤岡正人, 細谷誠, 鈴木法臣, 大石直樹, 松崎佐栄子, 小川郁 第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会, ホテル国際 21, 長野県長野市, 2016/10/5-8 国内
14. 疾患 iPS 研究が示唆する Pendred 症候群に対する低用量シロリムス療法の可能性 口頭, 細谷誠, 藤岡正人, 松永達雄, 小川郁. 第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会, ホテル国際 21, 長野県長野市, 2016/10/5-8 国内

15. 新生児聴覚スクリーニングで発見された一側性または両側性難聴児における内耳奇形 口頭, 増田 佐和子, 臼井智子, 松永達雄, 第26回日本耳科学会総会・学術講演会, 第26回日本耳科学会総会・学術講演会, 長野県長野市, 2016/10/5-8 国内
16. コモンマーモセット難聴モデルの樹立と、創薬・再生医療研究への応用 口頭 藤岡正人, 第6回マーモセット研究会大会, 東京大学農学部弥生講堂, 東京都文京区, 2016/12/12-14 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 招待講演: 難聴の遺伝子診断について, 松永達雄, 第3回全国難聴児早期療育研修会, 2016/11/20, 国内
2. 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科研究ホームページ
<http://www.ent.med.keio.ac.jp>

(4) 特許出願