

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) 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
(英語) Pathological and therapeutic study of GJB2 related hearing loss targeting cochlear gap junction by using patients derived iPS cells.

研究開発担当者 (日本語) 医学部耳鼻咽喉科学 准教授 神谷 和作
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of medicine, Department of Otorhinolaryngology, Associate professor, Kazusaku Kamiya

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 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
開発課題名： した遺伝性難聴の病態解明と治療研究
(英語) Pathological and therapeutic study of GJB2 related hearing loss targeting cochlear gap junction by using patients derived iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 医学部耳鼻咽喉科学 教授 池田 勝久
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of medicine, Department of Otorhinolaryngology, Professor, Katsuhisa Ikeda

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 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
開発課題名 : した遺伝性難聴の病態解明と治療研究
(英 語) Pathological and therapeutic study of GJB2 related hearing loss
targeting cochlear gap junction by using patients derived iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) ゲノム・再生医療センター 特任教授 赤松 和土
所属 役職 氏名 : (英 語) Center for Genomic and Regenerative Medicine , Professor, Wado
Akamatsu

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 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
開発課題名 : した遺伝性難聴の病態解明と治療研究
(英 語) Pathological and therapeutic study of GJB2 related hearing loss
targeting cochlear gap junction by using patients derived iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所・バイオリソースセンター 開発研究員 美野輪 治
所属 役職 氏名 : (英 語) RIKEN BioResource Center , Research and Development Scientist, Osamu
Minowa

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 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
開発課題名 : した遺伝性難聴の病態解明と治療研究
(英 語) Pathological and therapeutic study of GJB2 related hearing loss
targeting cochlear gap junction by using patients derived iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 医学部耳鼻咽喉科学 非常勤助教 飯塚 崇
所属 役職 氏名 : (英 語) Faculty of medicine, Department of Otorhinolaryngology, Assistant
Professor, Takashi Iizuka

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 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
開発課題名 : した遺伝性難聴の病態解明と治療研究
(英 語) Pathological and therapeutic study of GJB2 related hearing loss
targeting cochlear gap junction by using patients derived iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 医学部耳鼻咽喉科学 准教授 井下 綾子
所属 役職 氏名 : (英 語) Faculty of medicine, Department of Otorhinolaryngology, Associate
Professor , Ayako Inoshita

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

遺伝性難聴で最も頻度の高い GJB2 変異型難聴の原因となる CX26 ギャップ結合形成細胞への分化誘導は、再生医療の実現のために期待されているが、その作製法、分化誘導法は皆無であった。これらの細胞を体外で作製することが可能となれば、創薬や再生医療への応用が可能となるため、難聴モデルおよび GJB2 変異患者由来の iPS 細胞の樹立と内耳細胞の分化誘導法の確立を目指した。

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学講座、神谷和作准教授らのグループが中心となり、iPS 細胞の分化誘導により内耳における CX26 ギャップ結合形成細胞の作製を試みた。正常 iPS 細胞と GJB2 欠損マウス由来の iPS 細胞を用いて上記の細胞を作製、比較解析することにより、GJB2 変異型難聴の発症メカニズムや治療薬開発のための薬剤スクリーニングに応用可能であると考えられる。この研究ではまず正常マウス (C57BL/6J) および GJB2 欠損マウスの内耳細胞由来 iPS 細胞をセンダイウイルスベクターにより樹立した。樹立した iPS 細胞を用いて下記の分化誘導実験を行った。報告されている iPS 細胞から内耳有毛細胞への三次元分化誘導法 (Koehler, Nature, 2013) を改良し検討を行ったところ、iPS 細胞より 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蝸牛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。また独自に開発した蝸牛フィーダー細胞を用いることにより CX26 ギャップ結合プラーク形成細胞を分離後に増殖させることに成功した。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。スクレープローディングダイトランスファー (SLDT) 試験ではこれらの細胞間にギャップ結合の物質輸送が機能していることが示された。P27kip1 の発現も確認されたことから、蝸牛支持細胞様の細胞へと分化していることが示唆された。

さらに GJB2 欠損マウスからも iPS 細胞の樹立を行い、上記の内耳細胞への分化を行った。その結果、研究代表者神谷らが報告した「蝸牛ギャップ結合プラーク崩壊」という発症の初期段階に観察される病態機構 (Kamiya, J Clin Invest, 2014) を再現することに成功した。

これらの結果は国際幹細胞学会誌、Stem Cell Reports 誌にて発表された (Fukunaga, Stem Cell Reports, 2016)。蝸牛支持細胞は蝸牛において CX26 の発現量が最も高く、GJB2 変異型難聴を標的とした細胞治療や創薬スクリーニングの疾患モデル細胞のために必須の細胞である。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。

現在、順天堂大学医学部ゲノム再生医療センターの赤松和土特任教授のグループ、耳鼻咽喉科学講座池田勝久教授らが中心となり、順天堂大学医学部倫理委員会の承認を得て順天堂医院の GJB2 変異難聴患者からの採血を行い、iPS 細胞の樹立を進めている。

英文

GJB2 encodes connexin (Cx) 26, a component in cochlear gap junction. We recently demonstrated that the drastic disruption of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex composed of Cx26 and Cx30 are critical pathogenesis starting before hearing onset (Kamiya, Journal of Clinical Investigation, 2014;124(4):1598–1607). To develop the effective therapy for GJB2 associated hearing loss, restoration of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex using virus vectors or multipotent stem cells such as induced pluripotent stem (iPS) cells are expected to rescue the hearing function of GJB2 related hearing loss. Mouse induced pluripotent stem cells (iPS) were used for generation of Cx26-expressing cells with proper gap junction plaque between the cells. Adeno associate virus (AAV) were used for the GJB2 gene transfer and restoration of GJP (Human Molecular Genetics. 2015, 24(13):3651-61.).

Previously, we have demonstrated that the drastic disruption of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex composed of CX26 and CX30 are critical pathogenesis starting before hearing onset. Therefore, cochlear CX26-gap junction plaque (GJP)-forming cells such as cochlear supporting cells are thought to be the most important therapeutic target for the treatment of hereditary deafness. The differentiation of pluripotent stem cells such as induced pluripotent stem (iPS) cells into cochlear CX26-GJP-forming cells had not been reported. To develop the effective therapy for GJB2 associated hearing loss, restoration of GJP macromolecular complex using iPS cells are expected to rescue the hearing function of GJB2 related hearing loss.

In this study, we performed the development of a novel strategy to differentiate induced pluripotent stem cells into functional CX26-GJP-forming cells that exhibit spontaneous ATP- and hemichannel-mediated Ca²⁺ transients typical of the developing cochlea. Furthermore, these cells from CX26-deficient mice recapitulated the drastic disruption of GJPs, the primary pathology of GJB2-related hearing loss (Fukunaga, Stem Cell Reports, 2016, 7(6), 1023–1036). These in vitro models should be useful for establishing inner-ear cell therapies and drug screening that target GJB2-related hearing loss.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

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 0件、国際誌 13件）

1. Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr Res.* 2017 181:75-82.
2. Takayama Y, Wakabayashi T, Kushige H, Saito Y, Shibuya Y, Shibata S, Akamatsu W, Okano H, Kida YS. Brief exposure to small molecules allows induction of mouse embryonic fibroblasts into neural crest-like precursors. *FEBS Lett.* 2017 591(4):590-602.
3. Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Kobayashi T, Ohyama M, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differential X Chromosome Inactivation Patterns during the Propagation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Keio J Med.* 2017, Jan 20.
4. Suzuki S, Akamatsu W, Kisa F, Sone T, Ishikawa KI, Kuzumaki N, Katayama H, Miyawaki A, Hattori N, Okano H. Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. 483(1):88-93.
5. 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 Reports* 2017. Jan 3;18(1):68-81.
6. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, Akamatsu W, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H. Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016 Dec 21. doi: 10.1111/cga.12206. [Epub ahead of print]
7. Fukunaga, I., Fujimoto, A., Hatakeyama, K., Aoki, T., Nishikawa, A., Noda, T., Minowa, O., Kurebayashi, N., Ikeda, K., and Kamiya, K. In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca²⁺ Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea., *Stem cell reports*, 2016, 7, 1023-1036.
8. Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Fukuda K, Okuno H, Fujimura T, Kuroda T, Ohyama M, Akamatsu W, Nakagawa T, Okano H. LNGFR+THY-1+ human pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells have the potential to develop into mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2016 Dec;92(5):270-280.
9. Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, Akamatsu W, Okano H, Baba K. Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT_{2A} polymorphism. *J Prosthodont Res.* 2016 Dec 1. pii: S1883-1958(16)30106-2.

10. Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T. Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Transl Psychiatry*. 2016 Nov 1;6(11):e934.
11. Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N, Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, Akamatsu W, Okano H. Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*. 2016 Oct 3;9(1):88.
12. Bamba Y, Shofuda T, Kato M, Pooh RK, Tateishi Y, Takanashi J, Utsunomiya H, Sumida M, Kanematsu D, Suemizu H, Higuchi Y, Akamatsu W, Gallagher D, Miller FD, Yamasaki M, Kanemura Y, Okano H. In vitro characterization of neurite extension using induced pluripotent stem cells derived from lissencephaly patients with TUBA1A missense mutations. *Mol Brain*. 2016 Jul 19;9(1):70.
13. Ichiyanagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2016 Apr 12;6(4):496-510.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 内耳ギャップ結合を標的にした細胞治療・遺伝子治療法の開発、口頭、神谷和作、大阪国際会議場、2016/3/17、国内。
2. GJB2 変異遺伝性難聴の分子病態解析と新規治療法の開発、口頭、神谷和作、名古屋国際会議場、2016/5/19、国内。
3. Genetics in otology, Molecular pathology of cochlear gap junction in GJB2 associated hearing loss, Kazusaku Kamiya 口頭、(招待講演) 10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, 英国・エジンバラ 2016/6/8、国外。
4. Gene therapy and cell therapy targeting cochlear gap junction formation for GJB2-associated hearing loss、口頭、Fukunaga I, Iizuka T, Hatakeyama K, Fujimoto A, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K、フランス・モンペリエ、2016/9/20、国外。
5. GJB2 変異型遺伝性難聴への細胞治療法・遺伝子治療法の開発、口頭、神谷和作、池田勝久、盛岡グランドホテル、2016/10/21、国内。
6. 赤松和土「疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経疾患モデル解析の改良」第 16 回再生医療学会 シンポジウム 2017/3/9 国内。
7. 赤松和土「iPS 細胞技術を用いた神経疾患の病態解明と治療法開発」第 39 回小児遺伝学会 シンポジウム (招待講演) 2016/12/9 国内。
8. 赤松和土「iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究」日本線維筋痛症学会第 8 回学術集会 スポンサーシンポジウム (招待講演) 2016/9/17 国内。

9. 赤松和土「iPS 細胞技術を用いた神経疾患解析と治療法開発」第 58 回日本小児神経学会 シンポジウム（招待講演）2016/6/4 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「iPS 細胞を使って神経系の病気に苦しむ患者さんを助けられるか？」 赤松和土 順天堂大学 医学部 基礎研究医養成プログラム主催 高校生のための夏休み医学教室：研究医とのサイエンストーク 2016 年 7 月 26 日国内.
2. iPS 細胞から遺伝性難聴の原因となる内耳ギャップ結合形成細胞を作製
～難聴の再生医療と薬剤開発へ～、神谷和作、順天堂大学プレスリリース、2016/11/11, 国内.

(4) 特許出願