幹細胞が変える内耳治療戦略

ES/iPS 細胞から内耳細胞への分化誘導法を用いた 治療法開発への展開

大島 一男

要約：幹細胞とは多分化能（複数系統の細胞に分化する能力）と、自己複製能（細胞分裂後も自身と同じ能力を維持する能力）を併せ持つ細胞と定義される。皮膚や腸管といった臓器では幹細胞からの再生が経常的に行われているが、聴覚の感覚受容器である有毛細胞は一旦傷害されると再生しないため、内耳に幹細胞は存在しないと言われてきた。ところが近年、聴覚器から幹細胞を単離し有毛細胞に分化可能であることが報告され、内耳にも幹細胞が存在していることを示唆する報告が相次いでいる。また、ES 細胞や iPS 細胞といった内耳由来ではない多能性幹細胞から有毛細胞へ分化誘導する方法も近年開発されるなど、内耳の幹細胞研究は日本を含め世界中で活性化してきている。内耳の解剖学的な複雑さ、アプローチの難しさ、細胞数が極めて少ない、などの理由で内耳の研究は他の領域に比べ困難である。現在行われている治療法では治療困難な難聴に取り組むため、これまで遺伝子治療などが研究されてきたが、幹細胞研究が進み有毛細胞を人工的に作成できるようになると、これまでとは違う展開が期待できる。今後、内耳への幹細胞移植による細胞治療や、大規模ドラッグスクリーニングによる再生薬の開発などへの展開が望まれる。また、先天難聴に対しても、難聴患者からの iPS 細胞を利用して、テーラーメイド的な医療も不可能ではない。幹細胞研究が今後の難聴治療戦略を変えていくと思われるが、実際に臨床の場で使われる際には、安全性、倫理面、長期成績に留意することが必須である。

1. 背景

ヒトの内耳は聴覚器に約 1 万 5 千個、前庭器にはその数倍の有毛細胞を備えている。これらの有毛細胞は、

音刺激由来の機械的振動（前庭器では加速、回転運動）を生理的電気信号に変換する機械－電気変換（mechano-electrical transduction）の役を担っており、聴覚・バランス覚の欠かせざる一次感覚受容体である。この機能は種を超えて保存されており、魚類の側線に存在する水圧や水流の変化を感知する受容細胞と、より複雑な構造を持つ哺乳類聴覚器の有毛細胞は基本的に同様のメカニズムで成り立っている。詳細は割愛するが、有毛細胞の表面に存在する不動毛（stereocilia）が周囲のリンパ液（魚類側線では水流）により動かされることにより、不動毛の先端部にあるとされているイオンチャネル（未同定）が力学的に開口され、陽イオンが細胞内に流入し、有毛細胞が脱分極し、シナプスを介して一次神経にシグナル伝達される(1)。

このように、解剖学的・電気生理的には種や機能を超えて非常に類似している有毛細胞であるが、哺乳類の有毛細胞をその他の脊椎動物の有毛細胞から決定的に異にする要素は、哺乳類の有毛細胞は一旦失われると基本的には再生しないという点である。Corwin ら(2)は 1985 年に、両生類と魚類では前庭器が新規の有毛細胞の分化発生を伴いつつ継続的に成長し続けることを報告した。追って、鳥類では、前庭器自体の解剖学的サイズの変化は無いものの、継続的な有毛細胞のターンオーバーが起こっていることが報告された(3)。一方、哺乳類の前庭器では継続的な有毛細胞のターンオーバーは見られず、傷害後に僅かに新規の有毛細胞の再生が見られるのみである(4)。聴覚器においては差異はさらに明確で、鳥類では音響外傷により有毛細胞を消失した感覚上皮が数週間以内でほぼ完全に再生される(5,6)のに対し、哺乳類では全く再生しない。アミノグリコシド、シスプラチンなど薬剤による傷害、

キーワード：有毛細胞、内耳再生、iPS 細胞、ES 細胞、細胞移植
スタンフォード大学 医学部耳鼻咽喉科

(Stanford University, Department of Otolaryngology – Head & Neck Surgery, 801 Welch Road, Stanford, California, 94305 USA)

E-mail: oshimak@stanford.edu 原稿受領日：2012 年 12 月 27 日、依頼原稿

Title: Therapeutic approaches by using in vitro induction system of hair cells from ES/iPS cells

Author: Kazuo Oshima

音響傷害、加齢、血行障害、ウイルス感染、免疫反応などが、後天性に有毛細胞が消失する主な原因であるが、前庭器と聴覚器では臨床的意義が決定的に異なる。急性的な前庭機能障害はめまい・歩行障害などの臨床症状を伴うが、しだいに中枢での代償により緩和される。慢性的に進行した場合は全く無症状のこともあり得る。一方、聴覚器の有毛細胞の減少は直ちに難聴という症状を生じ、改善が見られることはない。この聴覚器の有毛細胞の冗長性の欠如が、感音難聴が治療困難であり新たな治療戦略が長年渴望されてきた所以である。

本稿では、有毛細胞の再生を担う幹細胞の存在、胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いた有毛細胞への分化誘導、これらの技術を用いての今後の展望、について述べる。

2. 哺乳類の内耳に内在性幹細胞は存在するのか

内耳と幹細胞の関連性を語るに当たって、2つのアプローチがなされている。①内耳に内在する幹細胞の存在の証明、②多能性幹細胞から有毛細胞への分化誘導法の確立、である。本項目では、①の内在性幹細胞について解説する。内耳の発生過程では、種を問わず、分化の最終段階の前駆細胞が非対称分裂することにより“有毛細胞”と有毛細胞の直下に位置する“支持細胞”を生じる。そして、鳥類では、この支持細胞が直接的に有毛細胞に分化するか、または、支持細胞が対称分裂により自己増殖して生じた2つの娘細胞のうちの一方が有毛細胞に分化することで、有毛細胞を再生している。すなわち、支持細胞が有毛細胞の再生の際に幹細胞的な役割を担っている訳である(5-7)。一方、哺乳類内耳では、前庭器では同様の現象がごく僅かの頻度で観察されるものの、聴覚器では有毛細胞傷害後もこの現象は起こらない。傷害を受けた有毛細胞が消失し、その間隙を支持細胞が埋めるだけである。しかし、神経幹細胞の単離の際に用いられる sphere 法などの幹細胞単離技術を用いることで、生体内では再生のプロセスが見られない哺乳類の聴覚器にも幹細胞の特徴を持つ細胞が存在することが報告されてきている(8-15)。Li らは、2003 年に、マウス新生仔の前庭器から sphere 法を用いて多能性幹細胞を単離し、ニワトリの内耳等に移植後、有毛細胞を含む複数種の細胞に分化可能であることを示した(15)。また、Oshima らは同様の方法を用い、マウス聴覚器からも幹細胞を単離し、*in vitro*で有毛細胞へ分化可能であることを報告した(8)。これら前庭器・聴覚器由来の幹細胞は、自己複製し多分化能を持つことから幹細胞と定義されるわ

けだが、支持細胞はその局在や機能により複数種に分類されるため、実際にどの種の支持細胞が幹細胞能(stemness)を持つのかは完全に明確にはされていない。White らは支持細胞特有のマーカーの発現の差異を用いてフローサイトメトリーにより聴覚器の支持細胞を分画し、柱細胞または Hensen 細胞が幹細胞能を持つことを示した(9)。また、Sinkkonen らは異なるアプローチにより上記2種の支持細胞を含む分画が幹細胞能を持つことを示している(13)。生体内では再生しない哺乳類の聴覚器にも stemness をもつ細胞が存在する、と言うと矛盾して聞こえるが、相次ぐ報告により裏付けられコンセンサスとなってきた(8-15)。しかし、厳密にどの種類の支持細胞が幹細胞なのかは厳密には明らかになっておらず、また、この幹細胞はマウスでは生後3週を境に急速に単離が困難になり、成体ではほとんど単離不可能となる(8)。そして、なぜ鳥類等では再生する有毛細胞が進化の過程で哺乳類での再生能を失ったのか。これらが解明されれば、ほ乳類の聴覚器での有毛細胞をどう再生させられるのか、という問いに答える一助となろう。

3. 多能性幹細胞から有毛細胞への分化誘導

2つめのアプローチが、多能性幹細胞からの有毛細胞への誘導である。ES 細胞は、発生中の胚盤胞の内部細胞塊から作られる多能性幹細胞で、自己複製能と多分化能という幹細胞の特性を持つ。理論上身体のあるあらゆるタイプの細胞に分化することが可能であり、近年様々な細胞への分化誘導法が確立されてきている(16)。iPS 細胞は、4つの遺伝子（山中因子：Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を線維芽細胞などに導入することにより成熟細胞の初期化を行い多能性幹細胞を作成する技術で、2012年のノーベル生理学医学賞を受賞した技術として有名である(17)。iPS 細胞は、ES 細胞と同様の幹細胞の特性を持つが、ES 細胞とは異なり、患者自身から細胞を作成できるため、倫理面の問題や移植時の免疫拒絶など様々な問題点を解消できるため期待される一方、遺伝子導入の際にウイルスベクターを使うこと、がん化の可能性があること、といった問題点も指摘されている(16)。Li ら(18)は、マウス ES 細胞を *in vitro* で内耳感覚器細胞の前駆細胞のマーカーを発現する細胞まで分化させ、これらをニワトリの発生段階の内耳に移植し、移植細胞がニワトリ組織内に組み込まれ有毛細胞へ分化することを報告した。その後、Oshima ら(19)はこのプロトコルを改良し、移植を伴わずに純粋に *in vitro* で、マウス ES 細胞と iPS 細胞から前駆細胞の段階を経て有毛細胞にまで分化させ

うることを報告した。また、この誘導された有毛細胞はパッチクランプ後に顕微鏡下で不動毛を振動させると電流を生じ、機械-電気変換能を持つことが示された。しかし、分化誘導の効率が未だ高くないため、今後の改良が期待される。また、Ouji らはある細胞培養上澄液を用いることで、より短期間で有毛細胞への分化誘導が可能であると報告した(20)。

4. 今後の展望

昨今の幹細胞研究の手法の進歩により、10年前には夢物語でしかなかったことが現実になってきている訳だが、この *in vitro* 誘導法が確立されてということが今後可能になるのかについて考察したい。

まずは細胞移植治療である。有毛細胞に分化する一歩手前の状態の前駆細胞を聴覚器内に移植し、失われた有毛細胞を移植細胞により補填する、というのが基本的な考え方だが、聴力の回復という究極の目的を達成するためには、a) 移植細胞が内耳のリンパ液内で生存すること、b) 移植細胞が解剖学的・機能的に正しい位置に生着すること、c) 移植細胞が正しく有毛細胞に分化すること（がん化しないこと）、d) らせん神経節細胞（一次ニューロン）が残存していない場合は神経再生も必要、e) 分化した細胞が聴神経と正しくシナプスすること、といったハードルを乗り越えなければならず、未だ効率的な方法は確立されていない。また、内耳は肝臓や脳といった実質臓器ではないため、より移植治療を困難にしている点も挙げておく。移植細胞としては、神経幹細胞(21-23)、骨髄由来幹細胞(24, 25)、ES細胞(26-29)などを内耳傷害モデルに移植する試みが多く報告されてきているが、ほとんどがらせん神経節細胞への分化を目的とした細胞移植であり、本来の有毛細胞の位置近傍への生着も報告されているものの、機能的な有毛細胞にまで分化させられた報告は未だない。有毛細胞の移植治療による再生については今後の研究の進展が待たれる。2012年にChen らは、らせん神経節細胞を破壊したスナネズミ内耳にヒトES細胞由来の神経前駆細胞を移植し、難聴の改善が見られたと報告した(30)。これは細胞移植による難聴改善の初めての報告であり、大きな一歩といえる。しかし、臨床の場では、らせん神経節細胞のみが傷害されていることは少なく、有毛細胞が傷害されている、または、両者が傷害されていることがほとんどであるため、そのまま現状を再現できているわけではない。だが、らせん神経節細胞が再生できれば、人工内耳により電氣的に変換された音信号を直接らせん神経節細胞に伝えることで難聴治療を行うハイブリッド療法と

いったことも可能となろう。

次に、ドラッグスクリーニングである。高価で手間のかかる動物を使わずとも、大量に *in vitro* で作成した誘導有毛細胞を用いてスクリーニングを行うことができれば、耳毒性を持つ薬剤 (ototoxic)・耳毒性からの保護効果を持つ薬剤 (otoprotective)・有毛細胞の再生を促す薬剤 (otoregenerative) の効率的な選別が可能になる。Otoregenerative drug の概念は、潜在的に幹細胞能を持つが再生プロセスを開始しない内在性幹細胞を薬理的に刺激して有毛細胞への分化を促す、ということである。これまでの研究で、Notch pathway の阻害(31-40)、Atoh1 の過剰発現(41-46)、細胞周期抑制因子の阻害(47-53)により有毛細胞の再生や過剰な発生が見られることが報告されている。これらは重要な知見の蓄積であるが、全て実験動物を用いた *in vivo* または *ex vivo* をベースになされていて大量の細胞の入手が困難なため、大規模スクリーニングに関していえば最適とは言えない。筆者らのグループは、ヒトES、iPS細胞から有毛細胞への分化誘導プロトコルも開発中であり、実用されれば、本来はほぼ入手不可能なヒト有毛細胞を大量に入手可能となり、ヒト有毛細胞に対する薬理効果を大規模にスクリーンすることも可能となる。

3つ目の方向性は、患者由来iPS細胞を用いた研究である。先天性難聴患者の有毛細胞を（聴神経腫瘍の手術でもない限り）バイオプシーすることは不可能であるが、ある遺伝子変異を持つ患者由来のiPSを作成し *in vitro* で有毛細胞に分化させることができれば、その変異を持つ有毛細胞を *in vitro* で再現することが可能になる訳である。これはバーチャルバイオプシーとも呼ばれる手法で、たとえばDFNB2と呼ばれる先天性難聴はミオシン7Aの変異が原因であるが、この患者の線維芽細胞からiPS細胞を作成し、ミオシン7A異常をもつヒト有毛細胞へ分化誘導することが理論上可能である。これまで不可能だったヒト先天難聴を *in vitro* で再現できれば、病態の解明に役立ち、さらには治療法の開発に繋がることにもなる。この手法は、同じくバイオプシーが不可能なパーキンソン病の神経細胞の *in vitro* での再現などに実用され始めている(54)。

有毛細胞の再生が鳥類などで報告されてから約25年間で、哺乳類内耳の再生に関する我々の知見は飛躍的に拡大したが、治療困難な内耳性難聴の克服にむけて、今後も、細胞治療・遺伝子治療・薬理学を含めた集学的なアプローチが必要であろう。また、有毛細胞のみならず、他の内耳の構成因子である神経細胞・血

管条の再生についても総括的に考慮されるべきである。そして、実際に臨床の場で使われる際には、安全性や長期成績に留意することが必須である。

文 献

- 1) Beurg M, et al. *Nat Neurosci*. 2009;12:553-558.
- 2) Corwin JT, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:3911-3915.
- 3) Jorgensen JM, et al. *Naturwissenschaften*. 1988;75:319-320.
- 4) Warchol ME, et al. *Science*. 1993;259:1619-1622.
- 5) Corwin JT, et al. *Science*. 1988;240:1772-1774.
- 6) Ryals BM, et al. *Science*. 1988;240:1774-1776.
- 7) Cruz RM, et al. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;113:1058-1062.
- 8) Oshima K, et al. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2007;8:18-31.
- 9) White PM, et al. *Nature*. 2006;441:984-987.
- 10) Diensthuber M, et al. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2009;10:173-190.
- 11) Zhang Y, et al. *J Neurosci Methods*. 2007;164:271-279.
- 12) Jan TA, et al. *Association of Research in Otolaryngology Midwinter Meeting*. 2010;Abstract number 21.
- 13) Sinkkonen ST, et al. *Sci Rep*. 2011;1:26.
- 14) Malgrange B, et al. *Mech Dev*. 2002;112:79-88.
- 15) Li H, et al. *Nat Med*. 2003;9:1293-1299.
- 16) Yamanaka S, et al. *Nature*. 2010;465:704-712.
- 17) Takahashi K, et al. *Cell*. 2006;126:663-676.
- 18) Li H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13495-13500.
- 19) Oshima K, et al. *Cell*. 2010;141:704-716.
- 20) Ouji Y, et al. *Cell Death Dis*. 2012;3:e314.
- 21) Hu Z, et al. *Exp Neurol*. 2004;185:7-14.
- 22) Ito J, et al. *Acta Otolaryngol*. 2001;121:140-142.
- 23) Tamura T, et al. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2004;65-68.
- 24) Naito Y, et al. *Neuroreport*. 2004;15:1-4.
- 25) Matsuoka AJ, et al. *Laryngoscope*. 2006;116:1363-1367.
- 26) Hildebrand MS, et al. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2005;6:341-354.
- 27) Coleman B, et al. *Cell Transplant*. 2006;15:369-380.
- 28) Sakamoto T, et al. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2004;551:48-52.
- 29) Okano T, et al. *NeuroReport*. 2005;16:1919-1922.
- 30) Chen W, et al. *Nature*. 2012;490:278-282.
- 31) Lanford PJ, et al. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2000;1:161-171.
- 32) Zine A, et al. *J Neurosci*. 2001;21:4712-4720.
- 33) Lanford PJ, et al. *Nat Genet*. 1999;21:289-292.
- 34) Brooker R, et al. *Development*. 2006;133:1277-1286.
- 35) Zine A, et al. *Development*. 2000;127:3373-3383.
- 36) Yamamoto N, et al. *J Mol Med*. 2006;84:37-45.
- 37) Takebayashi S, et al. *Dev Biol*. 2007;307:165-178.
- 38) Doetzelhofer A, et al. *Dev Cell*. 2009;16:58-69.
- 39) Ma EY, et al. *J Neurosci*. 2008;28:2261-2273.
- 40) Hori R, et al. *Neuroreport*. 2007;18:1911-1914.
- 41) Bermingham NA, et al. *Science*. 1999;284:1837-1841.
- 42) Woods C, et al. *Nat Neurosci*. 2004;7:1310-1318.
- 43) Gubbels SP, et al. *Nature*. 2008;455:537-541.
- 44) Zheng JL, et al. *Nat Neurosci*. 2000;3:580-586.
- 45) Kawamoto K, et al. *J Neurosci*. 2003;23:4395-4400.
- 46) Izumikawa M, et al. *Nat Med*. 2005;11:271-276.
- 47) Chen P, et al. *Development*. 1999;126:1581-1590.
- 48) Lowenheim H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:4084-4088.
- 49) Sage C, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7345-7350.
- 50) Sage C, et al. *Science*. 2005;307:1114-1118.
- 51) Mantela J, et al. *Development*. 2005;132:2377-2388.
- 52) Huang M, et al. *Cell Cycle*. 2011;10:337-351.
- 53) Yamasoba T, et al. *Cell Tissue Res*. 2006;325:23-31.
- 54) Imaizumi Y, et al. *Mol Brain*. 2012;5:35.