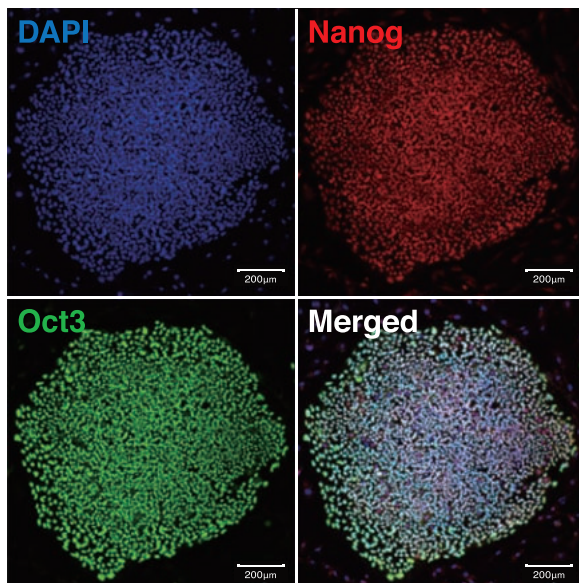




第10回

感覚器シンポジウム



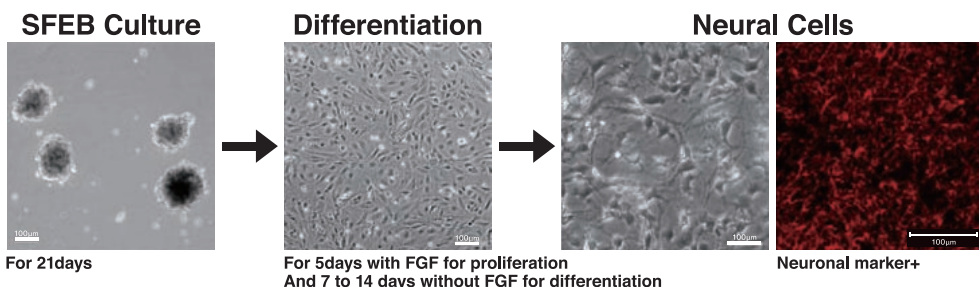
2015 3/6

Friday

開催時間/13:30~17:00

市民公開講座

岩田 岳/分子細胞生物学研究部 部長 提供



幹細胞・iPS細胞を用いた 感覚器研究の最前線

会場 ● 東京医療センター 外来棟3階 大会議室

主催 ● 東京医療センター臨床研究(感覚器)センター NISO

基調講演 再生医療の現状と展望

梅澤 明弘 / 国立成育医療研究センター 再生医療センター センター長

運動器再生医療の現状と展望 — 脊髄再生医療を中心に —

中村 雅也 / 慶應義塾大学医学部整形外科学教室 教授

この10年で大きく変わった内耳研究 — 内耳領域における幹細胞研究の現状と将来の展望 —

大島 一男 / 大阪労災病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

遺伝性網膜疾患の網羅的な病態解明への挑戦

岩田 岳 / 国立病院機構 東京医療センター 感覚器センター 分子細胞生物学研究部 部長

幹細胞・iPS細胞を用いた内耳性難聴の研究 ～新規治療法の開発に向けて～

藤岡 正人 / 慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

ENT & audiology news 2014 より引用

記録集 No.9

発行 平成 27 年 8 月

幹細胞・iPS細胞を用いた
感覚器研究の最前線

基調講演

- ①梅澤 明弘／国立成育医療研究センター 再生医療センター センター長
「再生医療の現状と展望」…………… 2

講演

- ②中村 雅也／慶應義塾大学医学部整形外科学教室 教授
「運動器再生医療の現状と展望 — 脊髄再生医療を中心に —」…………… 10

- ③大島 一男／大阪労災病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
「この10年で大きく変わった内耳研究
— 内耳領域における幹細胞研究の現状と将来の展望 —」…………… 20

- ④岩田 岳／国立病院機構 東京医療センター 感覚器センター 分子細胞生物学研究部 部長
「遺伝性網膜疾患の網羅的な病態解明への挑戦」…………… 37

- ⑤藤岡 正人／慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
「幹細胞・iPS細胞を用いた内耳性難聴の研究
～新規治療法の開発に向けて～」…………… 50

- あとがき……………国立病院機構 東京医療センター 院長 武田 純三 …… 65

① 再生医療の現状と展望

国立成育医療研究センター 再生医療センター センター長

梅澤 明弘

梅澤 今日、「再生医療の現状と展望」について、今年になってどれだけ再生医療が進んだか、新しい法律のもとで動き始めた再生医療を紹介したいと思います。

薬の話から始めたいと思います。薬と言うと、皆さんよく見るのはアスピリンとかアセトアミノフェンというものですよね。白い粉の薬です。これはバッグにも入れられますし、いつでも用意しておけます。もう一つの種類として生物製剤、「生物（なまもの）」と書いていますが、生物系の薬があります。例えば、東京医療センターでしか処方してもらえない、簡単に言うと、医者に打ってもらうとか処方してもらうといったようなやり方でしかできない薬があります。

一つ目はサイトカインで、白血球を増やすとか赤血球を増やす薬です。二つ目は抗体です。そして、今日お話しするのが、三つ目の細胞の薬です。

まず、私も今日いらしていただいた形成外科の先生と一緒に、こちらの東京医療センターでやった細胞を紹介したいと思います。骨の中の細胞です。骨の中には海綿骨と皮質骨があります。骨の海綿というスポンジみたいなところから細胞を採ります。骨髄間質細胞と言いますが、それを採取します。

腰骨から骨髄液を採って、細胞を増やして、足に注入するというを行いました。

どんな足なのかをご覧ください。左側の足を見てください。血が行かなくなって、業界用語で申し訳ありませんが、「壊死」と言って、部分的に足が死んでしまうということです。そこに対して、先ほどの骨髄の中の薬を作っていきます。

作っている様子をご覧ください。骨髄を採ります。「3日後」、「移植前」と書いてありますが、国立成育医療研究センターから昭和大学藤ヶ丘

病院に送りました。移植前の作っている様子、送る様子がここに書いてあります。今日もちょうど今、細胞が昭和大学に送られて、患者さんに投与されるところです。

では、どんなことが今行われているか。足に注射します。全身麻酔を打って、先ほどの細胞を注射器で何ヵ所も打っていきます。そうすると血管が増えて、足が治ることになります。もともとあった指が再生してくるわけではありません。潰瘍の部分、痛い部分がなくなるだけで、元の部分が戻るというところまではいきません。「再生医療と言いながら、指は再生しないじゃないか」と言われますが、再生しません。そこは今後、私の次の演者になる整形外科の先生が頑張ってくれると信じています。

移植の部屋の様子をご覧ください。手術室で、全身麻酔で足の部分にきちんと打つということです。今後どのような経過で何を一番の目標にしているかという、歩けるようになること、痛くなくなることです。この二つはとても大事です。痛みが取れるかどうか、歩く距離が伸びるかどうか、そういう治療効果を目指しています。

再生医療は、もちろんゼロリスクではありません。一般的に予期できるような副作用はありますが、それ以外に予期しないようなものはあまり多くはないということが、今は分かっています。術後1ヵ月、6ヵ月で、脈圧、歩けるかどうか、良くなっているかどうかです。評価項目で、「15、30、35」、「20、35、35」といったようなかたちで術後の経過を見て、それらを適切に評価することを行っています。

もう一つ紹介させてください。肝臓の細胞です。「幹細胞」と書くのも幹細胞、肝臓の細胞も「肝細胞」と言いますが、肝細胞はギリシャ神話

の頃から増えることが知られています。ギリシャ神話の登場人物でプロメテウスの神がいます。プロメテウスの神は右手に火を持っていますが、人間に火を渡したということです。いいことをしたようにも見えますが、ゼウスの大王が怒ってしまい、プロメテウスの神を山の上に連れて行って縛り付けて罰を与えました。

左側がゼウスの大王、こちらがプロメテウスの神です。神様ですが、このようにつながれて、「ワシに肝臓を来る日も来る日も食べさせた」というようなことがギリシャ神話に書かれています。「肝臓を来る日も来る日も食べさせた」というのは、肝臓が食べられても再生することが、ギリシャ神話の頃から既に知られていたということを示します。

肝臓の場合は再生する能力があるために、例えば、当院の肝臓の病気を持った子どもたちなら、お父さんやお母さんから肝臓を少しもらってきます。お父さんとお母さんは大変ではないかと思うかもしれませんが、肝臓はお父さんとお母さんの中でちゃんと増えてくれます。それは、皮膚が増えたりするのと一緒です。

では、私たちはこの肝臓の能力をどういう病気に使いたいかというと、子どもの病気です。難しい名前前の病気で、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症と言います。これは、遺伝子がなくて困っている子どもです。アンモニアが代謝できなくなるために高アンモニア血症になって、生まれてすぐに非常に残念な結果になってしまったり、脳の精神障害が不可逆的に起きます。非常に困っている病気ですが、治す方法の一つあります。肝移植です。お父さんかお母さんから肝臓をもらう。または、親戚やその他の方々からちょうだいすることができれば、完全に治ります。

ただ残念なことに、生まれてきてすぐのお子さんに肝臓移植をすることができません。大体5ヵ月、6ヵ月、体重が6キログラムにならないと肝移植はできません。その間を何とかしなければならぬ。臓器が移植できないなら、肝臓の細胞を移植して、5ヵ月、6ヵ月もたせてあげれば良いという考え方があります。実際、肝臓はどこから持ってくるのかというと、肝移植のときに余る肝臓があります。例えば、ある種の病気の子どもの肝臓は、肝機能は保たれている

から別の子どもには使えるとか、お母さんから300グラム採って余りを使う。手術の関係から、少し多めに採らなければいけないのだそうです。肝臓の細胞を御覧ください。

研究用試薬とは治験薬とも言いますが、新しい薬として効くのかどうか、または臨床研究という枠組みの中で、この細胞を使ってお子さんの肝移植まで持っていくということを考えています。

昔、国立大蔵病院と、国立小児病院の二つが合わさって、国立成育医療研究センターという病院になりました。そこで移植をしました。生まれて1週間ぐらいで移植をしています。外科、麻酔科、放射線科がチームを作って、門脈という肝臓に行く血管の中に先ほどの肝臓の細胞移植を行っています。実際、今まで5回投与していますが、大きな問題が起こったことはありません。

これは、外科の笠原群生先生が肝臓移植をしている手術室の様子です。こういった臨床研究は、社会にきちんと報告をしなければなりません。手術を受けた赤ちゃんは、「生後11日、重い肝臓病で、有害なアンモニアを分解できず命に危険が及ぶ状態」ということで、一人一人社会に報告することを行っています。

今までの二つ、骨の細胞と肝臓の細胞を、どういう仕組みでやっているかということ、再生医療には二つ法律があります。一つは、再生医療新法（再生医療等の安全性の確保等に関する法律）と、もう一つは医薬品医療機器等法（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律）です。法律の名前は聞きたくないでしょうが、どちらも11月25日、3ヵ月前に施行されました。私たちにとってとても大切な日なので、国会の先生方、厚生労働省の方々に感謝をして、25日に感謝の集まりをしたところです。

実際の名前はもっと長い名前前の法律ですが、再生医療新法が今までの肝臓と骨でやったやり方です。もう一つの医薬品医療機器等法は、昔は薬事法とも言っていました。この法律を使って、薬が皆さんのもとに届けられる。

再生医療新法のほうは、医者技術として皆さんのもとに提供されます。二つ目の医薬品医療機器等法で、わが国で承認されて医者が処方

できるのは、今二つあります。実際に承認されたのは、この皮膚と軟骨です。この二つの薬に対してのみ薬価が付いて、病院で普通に使うことができます。

再生医療用製品は白い粉の薬と違って、形ははっきり分かります。こちらが皮膚で、大体はがき大です。右側が軟骨です。この皮膚が幾らするかというと、30万円です。やけどのために作られた薬で、大体40枚まで使えます。軟骨は、1製品が200万円ぐらいです。

皮膚の製品を大写しにしてみます。さっき言った、はがき大で30万円のもので、効果・効能は、熱傷、やけどです。やけどのために承認されたもので、東京医療センターで使うときは、やけどのときに使うことができます。しかしこの薬は、実はほかにもたくさんの病気に使うことができます。

30年ぐらい前から病院の中で作ってきて、患者さんにやってきたのが、白斑で、これに対しても同じ薬が使えます。これは聖マリアンナ医科大学の熊谷憲夫名誉教授から借りてきましたが、左側が手術の前です。皮膚を軽く削ってさっきの薬をべたっと貼ると、ちゃんと色が付きます。なぜかということ、私たちの体には、メラノサイトという色が付いた細胞がありますが、それが入っています。

このように、やけどの薬が、白斑という白いところを普通の色にするということができるということです。これは私どもの病院で作ったものですが、茶色い色が付いています。これは、ドーパ染色で陽性になるメラノサイトという細胞が間たくさん入っているために色が付きます。

もう一つ、私たちは逆の目的にも使っています。母斑と言いますが、体じゅうに大きなほくろがある子どもたちがいます。大きなほくろがあるお子さんの写真です。こういったお子さんは、この黒いところから黒色腫というがんができてしまうことがあります。そのために、ここを削ってさっきの薬を貼ってあげることができます。国立成育医療研究センターでは、臨床試験を行っています。

これは熊谷憲夫名誉教授によるものです。まず黒いところを削ってあげる。黒いところは全部取らないといけません。取ったあと、薬を貼ってあげます。まず、おなかのところからやっ

ていますが、一つ一つ増やして行って、黒い部分を取っていこうという考え方です。

ここで言いたいのは、再生医療では、一つの薬ができるとたくさんの目的に使えます。これは皮膚ですから、あばたとか入れ墨を取るのにも同じように使っています。痛みも取れます。

そういった薬が一つできると、次々といけるということを紹介したあとは、今日のテーマである、「幹細胞と iPS 細胞を用いた感覚器研究の最前線」です。iPS 細胞は皆さんご存じだと思います。それに似た兄弟みたいな細胞があります。「ES」と言います。私たち国立成育医療研究センターがこの ES 細胞を作って、それを薬としてできるように、今準備をしています。

私たちの施設が「成育」なので、「SEES」と名前を付けました。名誉所長が、線対称のほうがいいということと、読むと「シーズ」になるので、病気の子どもたちを助ける種にしたいということで、SEES という名前を付けています。どんな特徴があるかということ、iPS 細胞と非常に似た二つの大きな特徴があります。一つは、死なない、無限に増えることができます。細胞なのに不死です。

もう一つが、どんな細胞にもなれます。これはすごいことです。何にでもなれるという能力は、iPS 細胞と全く同じです。ですから、今日は感覚器ということですが、このあとは中村雅也教授が神経の話をしませんが、神経にもなります。音を聞くための内耳の毛の生えた細胞にもなりますし、目の細胞にもなります。いろんな細胞ができます。

iPS 細胞は山中伸弥教授ですが、ES 細胞はマーティン・エバンス博士が発見しました。2007年にノーベル医学・生理学賞を取っています。これを移植すると、奇形腫ができます。奇形腫またはテラトーマという言葉聞いたことがあるかもしれません。この中にありとあらゆる成分が入っています。この黒いものが何だかわかりますか。網膜色素上皮です。iPS 細胞で、神戸の高橋政代さんが移植した元の細胞がこの中にたくさん入っています。

手塚治虫さんの漫画の話ですが、1972年にブラックジャック先生が、奇形腫からピノコを作りました。想像上ですが、ピノコは全部奇形腫から作ったと、漫画の1巻に書いてあります。

実際、何ができているかというところ、ぱっと見るとまぶたが毛が出ています。目も網膜もきれいにできます。網膜色素上皮もできます。骨はよくできます。軟骨もできます。皮膚もたくさんできます。そういう特徴を持っています。

その一部に肝臓の細胞がありました。あとで肝臓をやりますが、世界でどのように患者さんに使っているかを紹介します。アメリカ、ヨーロッパでは、脊髄損傷です。もう一つが、目の病気で加齢黄斑変性症です。わが国では、iPS細胞で1例目の臨床研究が行われました。一番下が糖尿病です。5例、34例、1例が、ES細胞でそれぞれ行われています。

では、私たちは何がしたいのかというと、子どもの病気に使いたいのです。いつも一定の品質で、たくさん作ることができ、無限に増えて何にでもなれるES細胞でアンモニア代謝能を持つ細胞を作って、薬として同じ方法で肝臓に移植してあげればよいということで、計画を立てています。

今は、安全かどうか、効くのかどうかを見る試験をやっている段階です。患者さんと同じ病気であるモデル動物を作りました。ネズミの遺伝子を壊すことが可能です。寿命は大体4週間です。普通のネズミは2年ですから、さっきの薬を入れて、寿命が4週間ではなく、2ヵ月とか3ヵ月にどんどん延びてくれば、ちゃんと効いたこととなります。病気の子どもたちに、早く薬を届けるために、研究を全力でやっています。

最後に、iPS細胞の話をして終わりたいと思います。iPS細胞はES細胞のような格好をしています。よく、アメリカで話すときは、「ピザのような」と言いますが、平べったいピザのような格好です。なぜ「ピザのような」と言うかというと、実はネズミのiPS細胞は盛り上がっていて、目玉焼きのような感じなんです。形が少し違うということです。大阪地方では「お好み焼きの形をしています」と言い方で紹介しています。

発見したのは山中伸弥教授で、2012年にノーベル賞を受賞しました。実際に、去年9月12日、iPS細胞を原料とした1例目の臨床研究が行われました。高橋政代さんは理化学研究所の眼のお医者さんです。皮膚を採ってきてiPS細胞を作り、黒いところの細胞を作って、眼科医がそ

こに移植したということです。今のところ、特に問題になるようなことは起こっていないという発表をされています。

ここまでではお話しすることは許されていますが、私自身も審査に入っています。どのようなリスクがあるか、どのような利益があるかということをして30人ぐらいで一生懸命考えて、実際に最終判断をしたのは9月10日ぐらいでした。次の日の新聞に載りましたが、夜の10時ぐらいまで議論して、少なくとも国の委員会としては認めたということです。

最後に、私ども国立成育医療研究センターを紹介させてください。iPS細胞やES細胞を作っている研究所がここにあります。こちらは親子のゾウです。象徴的ですが、物語みたいに言われているのは、夜になると、お母さんが出産で痛いときには、大きなお母さんゾウが病棟に行って一緒にいてくれる。抗がん剤を飲んでいて大変な子どもたちには、小さなゾウが行って脇に付いてくれるという話があります。私たちの中ではこのゾウがシンボルになっています。

全体像を見て終わりたいと思います。ここが病院で、ここが研究所、そしてここが事務棟です。ここには「夢の懸け橋」と呼んでいる橋があって、私たちが産業界と一緒に薬を作る、病院ではその患者さんを治す、事務方はきちんとしたシステムを構築するという、三位一体となって、子どもの病気に対して安全にきちんとしたかたちで治るような新しい薬を届けたいと考えています。以上です。ありがとうございました。

加我 梅澤先生、どうもありがとうございました。会場の方々から何か質問はありませんか。梅澤先生、成育医療研究センターではいろいろな科がありますが、通常の治療法以外に、いつも再生医療を頭に入れながら、研究所と一緒に動いているのでしょうか。

梅澤 ありがとうございます。私たちの病院では、新しい薬として再生医療とともに、遺伝子もやっています。昨年、遺伝子の治療を行いました。大事な遺伝子が欠けているお子さんがいます。そのお子さんの細胞に遺伝子を入れて、患者さんに戻しました。今のところ患者さんとはとても順調です。

もう一つ、たんぱく質の薬があります。酵素

が足りない子どもがいて、その子どもたちに酵素製剤という酵素の薬を入れてあげると元気になります。普通なら車椅子で来るような子どもたちが、うちの病院でたんぱく質を打ってもらって元気になって、注射が嫌だと言って暴れるぐらい元気になります。注射が入ると楽しそうにするので、もしかしたらだんだん調子が良くなっていくのではないかと思います。問題なのは、薬代が高いということです。この問題さえ解決すれば、すごくいいだろうと思います。

ですから、子どもの病院では、たんぱく質、遺伝子、再生医療、あとは機械です。機械はどういうのかというと、びっくりするかもしれませんが、お母さんのおなかの中にある胎児を治療しています。お母さんのおなかの中で胎児の血管を閉じるということを、佐合治彦先生がやっています。こういった病気を、生まれて来る前にきちんと診断しようということも普通にやっています。

聞いたことがあると思いますが、出生前診断というやり方があります。そういうこともやりますし、着床前診断もしています。この病院は世田谷区にあるお母さんと子どもの病院です。そういった新しい治療や診断に対して、この4月1日から名前が「国立研究開発法人」になり、研究を中心とした法人に生まれ変わります。

今までと変わるかといったら、何も変わりません。ただ、今、加我先生に言っていただいたように、新しいタイプの薬、機械、診断を世に出すために、厚生労働省の行政のチーム、病院の医師をはじめとした看護師、薬剤師も全部含めて、臨床研究センターがここに 있습니다。

ここに赤い屋根の臨床研究センターがあり、そこでは治験というものを、医者やわれわれ研究者を助けるチームがいます。そういう人たちを全国からヘッドハンティングして、数学の専門家、「信頼性保証」と業界では言いますが、ちゃんとやっているかどうかを見張る人、品質管理、教育をやる人たちがたくさんいます。

世田谷通り沿いにあり、東名高速から見ると結構大きく見えますから、見たときには、「ここなのか」と思い出していただければと思います。
加我 梅澤先生、去年から新しい難病指定の疾患になりますね。小児の難病疾患は何百とあり、恐らくいくら研究してもまだまだということがたくさんあって、大変ホットな感じで研究されているのではないかと思います。どうぞ、今後たくさんの難しい病気の子どものために、ご活躍ください。

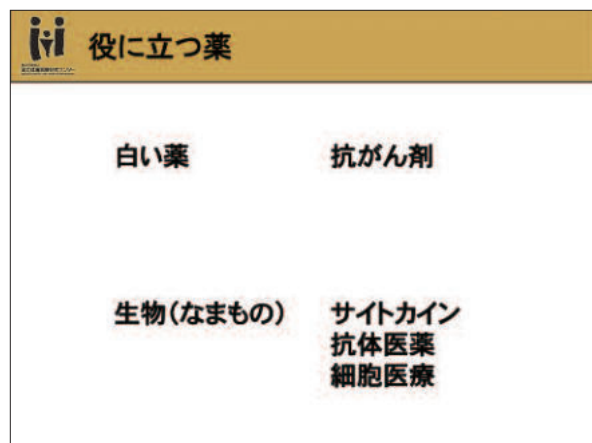
梅澤 ありがとうございます。今後ともよろしくお願いします。どうもありがとうございます。

加我 どうもありがとうございました。

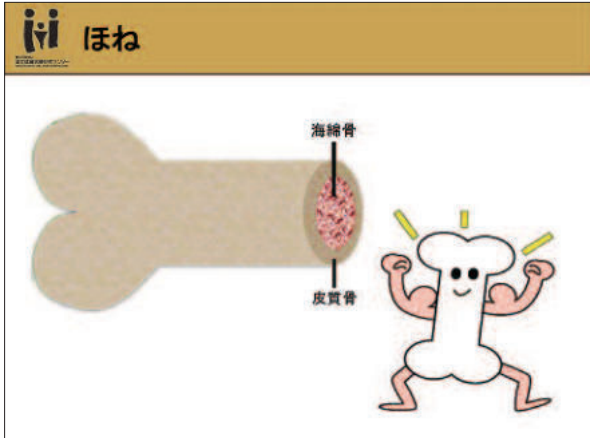
1



2



3

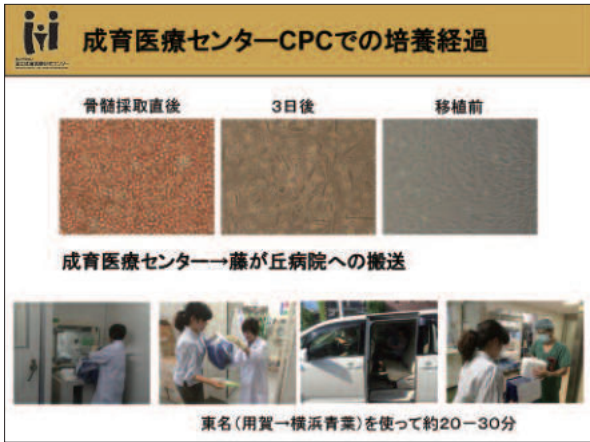


5

4



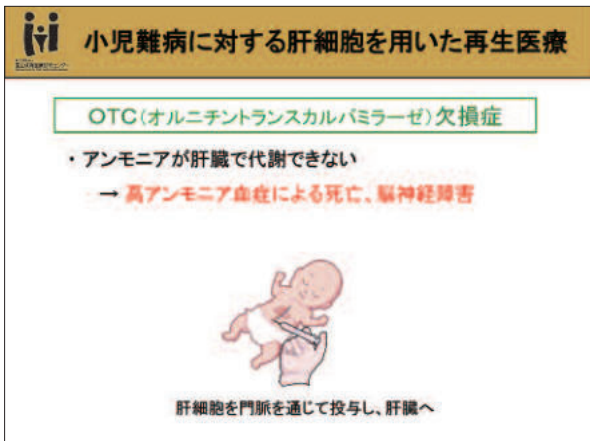
6



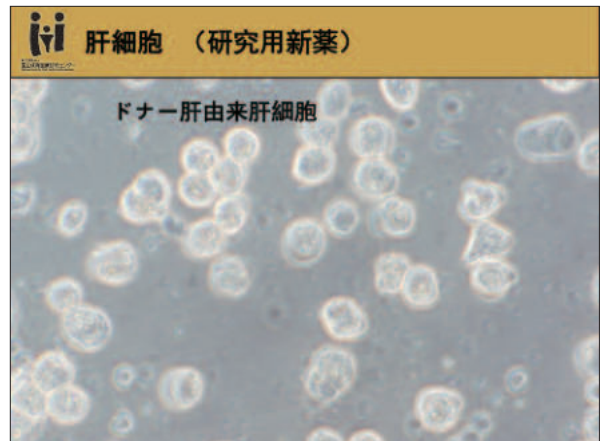
7



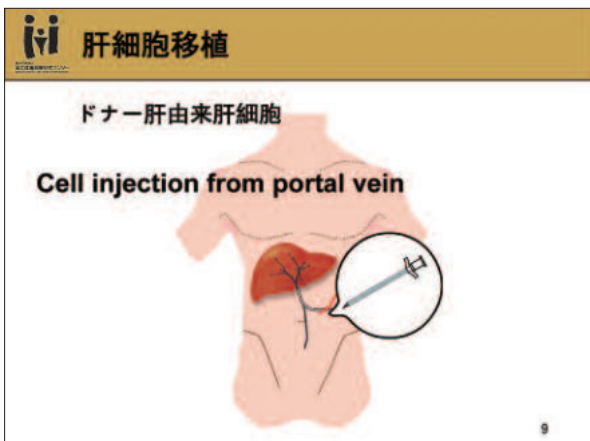
8



9



10



9



11

再生医療

- 再生医療新法
- 医薬品医療機器等法

13

熱傷のくすり

自家培養表皮



15

成育医療研究センターで樹立したES細胞



SE iii ES

17

ES細胞(胚性幹細胞)

エバンス先生

2007年
ノーベル医学生理学賞



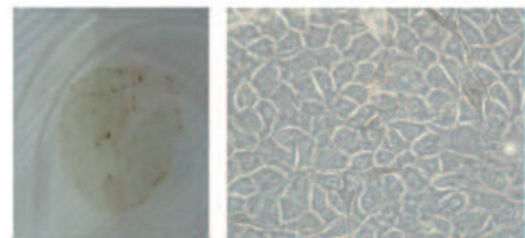

12

再生医療等製品

JTEC	表皮、軟骨、角膜
TERUMO	筋芽細胞
JCR	骨髄間質細胞

14

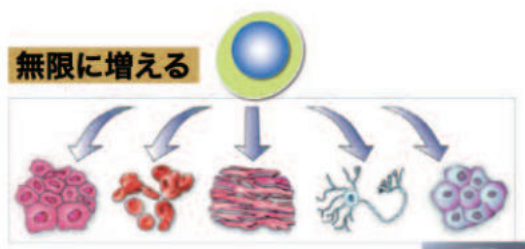
白斑のくすり



16

ES細胞(胚性幹細胞)

無限に増える



どんな細胞にもなれる

18

奇形腫 (テラトーマ)



5mm

ii 米国・欧州でのES細胞を用いた再生医療

Asterias Biotherapeutics 社 脊髄損傷	5例
Ocata Therapeutics社 萎縮型加齢黄斑変性症 若年性遺伝性黄斑変性症	34例
ViaCyte社 糖尿病 I型	1例

ii モデル動物を治療。



寿命は四週間。

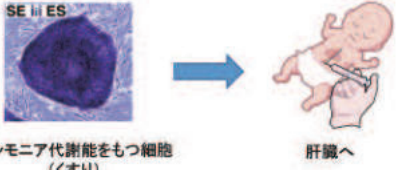
ii 研究所



ii 小児難病に対するES細胞を用いた再生医療

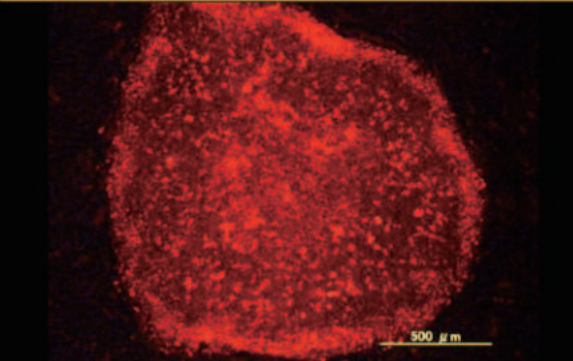
OTC(オルニチントランスカルバミラーゼ)欠損症

- ・体内の窒素から生じるアンモニアが肝臓で代謝できない
- 高アンモニア血症による死亡、脳神経障害



アンモニア代謝能をもつ細胞 (くすり) → 肝臓へ

ii iPS細胞



500 μm

ii 子どもたちと、おかあさんと一緒に。



② 運動器再生医療の現状と展望 — 脊髄再生医療を中心に —

慶應義塾大学医学部整形外科学教室 教授

中 村 雅 也

中村 本日は、「運動器再生医療の現状と展望」、特に脊髄再生ということでお話しさせていただきます。感覚器のシンポジウムで、運動器のことを話すのも何ですが、私たち整形外科が特に注目しているのは、皆さんご存じのように、日本は今、超高齢化社会を迎えています。これは一番新しいデータですが、平均寿命は女性で86歳、男性でもとうとう80歳を超えました。この先どうなるかというのを世界と比較しても、日本は世界にもまれな超高齢化社会を迎えます。特に問題になっているのは介護保険です。介護保険は日本が世界に誇る優れた保険制度であることは間違いありません。

当初は高齢者を若い人たちで支える、言わば御神輿を想定していました。それがだんだんと騎馬戦になり、これがあと何十年かすると、肩車のような状態になってしまう。これでは日本の将来はどうなるかということが懸念されています。

実際に何が問題かということ、こちらに書いてあるように実際の寿命は男性80歳、女性が86歳ですが、健康である期間、いわゆる健康寿命との乖離が男性9年、女性で13年弱あります。確かに医学は進歩し、寿命が延びたのはいいことかもしれませんが、ただ、ベッドで寝たきりになっている状態が、本当に人間として人生を全うしているか。やはり、ぼけずに動けるのが幸せです。

私は再生医療の講演をする機会をいただきますが、よく、「先生、再生医療と言うけれど、先生たちが向かっているところは不老不死ですか」と言われます。そんなことは全然ありません。人間死なないほど不幸なことはありません。私が一番目指したいのは、「元気でぼっくり」です。要するに、健康寿命と実際の寿命をできるだけ

差をなくする。そのためには、運動器が非常に重要です。手前みそになりますが、私は中枢神経と運動器が最も大事だと思っています。体が動けても頭がぼけてしまったら大変です。かえって大変かもしれません。かといって、頭がしっかりしていても動けないというと、また大変です。

実際に、私が整形外科教室を預かるようになって、運動器のさまざまな研究をやるようになっていますが、キーワードは三つあります。老化と再生とスポーツ・外傷です。もちろん、整形外科ですから骨も軟骨もあります。実は、これまで筋肉の研究は非常に遅れていて、今後精力的に始めていきたいと思っています。靭帯や末梢神経、もちろんこれまでずっと続けてきた脊髄。何といたってもこの中で、中枢神経である脳と脊髄が一番治すのが大変な組織であることは間違いありません。

私は整形外科ですから、今日もおみえになっていますが、脊髄損傷の患者さんの治療にあたるのがしばしばあります。この画像は私が実際に治療にあたった18歳のラグビー選手です。大学1年生の菅平の夏合宿でのことです。ラグビーをご存じの方は分かるかもしれませんが、「ナンバー2」と言ってスクラムを組むときのファーストローのセンターです。両手が隣の選手の肩に掛かります。ここでスクラムが崩れるとどうということが起きるかということ、ラグビーの世界では「顔から突っ込め」、「地面に顔から行くんだ」と言います。ですが、恐怖心が先立つと人間は体をすくめるので、首が中に入ります。そこに後ろから強い力が加わると、このように頸椎が脱臼してしまいます。

こういった患者さんに対してわれわれは何ができるかということ、実際に脱臼を整復して頸椎

の前方固定をします。頸椎後方にも実はワイヤリングをしています。こうやってレントゲンだけを見ると一見治ったかに見えます。ところが、実際の脊髄は完全に切れています。当然ですが、脳の命令はここから下には一切伝わりません。今、彼のできることは肩を動かすだけです。肘も動かなければ手も使えません。足も動きません。その一瞬の出来事で、彼の人生は180度変わってしまいます。だけど、われわれができるのはここまでです。だからこそ、脊髄の再生医療の実現というのが長い間切望されてきました。

私はもう20年以上脊髄の研究をしていますが、研究を続ければ続けるほど、その大変さを実感します。ちょうど大きなジグソーパズルを作る作業に似ています。たくさんの異なるピースが必要です。その中には、もちろん今日のテーマである幹細胞移植、また、慢性期脊髄損傷に対しては軸索進展疎外因子の克服、リハビリテーション、急性期の抗IL6受容体抗体、評価系としての画像診断、栄養因子、スキヤフォールド、もちろんまだ未解決のパーツもあります。これらのすべてやってきましたが、今日は時間の関係で、今われわれが一番力を入れている幹細胞移植、特にiPS細胞由来の神経幹細胞移植についてお話ししたいと思います。

神経科学の世界では、大体10年に一度大きなブレイクスルーがあります。1980年代のトピックといえば、やはり神経成長因子の同定でした。1990年代には神経幹細胞のマーカーが同定されたり、選択的な培養法が確立され、幹細胞生物学が爆発的に進歩しました。

そして2000年代はというと、間違いなく今日私がお話しさせていただくiPS細胞だと思います。私は1990年代に研究を始めましたが、そのときに神経幹細胞を使ってまず何をやったかというと、ラット脊髄損傷に対するラット神経幹細胞の有効性を証明しました。その結果をもってすぐに患者さんの治療を行ってもいいかということ、いくら何でも齧歯(げっし)類と霊長類の間には神経機能解剖学も遺伝的なバックグラウンドもかなりの隔りがあります。それはあまりにも拙速であろうと考えて、われわれは、霊長類であるサルの脊髄損傷に対する、ヒト神経幹細胞移植の有効性・安全性を検証しようという方向に研究を進めました。

これもだいぶ前の仕事になりますが、これはコモンマームセットという小型ザルです。中世期の貴族の婦人がペットにしていたという、肩に乗るぐらいの小さなサルです。この動物を使用して頸髄損傷を作ります。そして、この写真が実際に移植したヒト神経幹細胞です。こちらのMRIが対照群で、こちらが移植群です。髄内のT1低信号、T2高信号は、空洞とその周囲にあるグリア瘢痕を示しています。細胞を移植してあげると、明らかにその信号変化は縮小します。実際に組織で見ても、空洞が小さくなって、周囲には移植した細胞が、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化していくことが分かりました。

この研究で使用した脊髄損傷モデルは不全損傷です。われわれがサル脊髄損傷モデルを確立するときに、5センチの高さから硬膜上に15グラム、17グラム、20グラムの異なる重さの重錘を落とすことで、軽度、中等度、重度と三つの損傷程度の異なるモデルを作製しました。20グラムで作るとほぼ完全麻痺を来します。当初はこのモデルで実験をやりたかったのですが、20グラムの損傷を作ると生存率が20%と低いうえに、このサルは1匹50万円するので、とても研究になりません。ですから、中等度のモデルでやりました。

次に、運動機能をどうやって評価するのが問題でした。このサル脊髄損傷モデルも、われわれが世界で初めて確立したので、確固たる機能評価法を持っていませんでした。定量性があって再現性がある、誰が見ても納得できるデータを出すため、サルの飼育ケージの中に赤外線センサーを張り巡らせて、それを横切るたびにカウントするという、24時間体制の三次元自発運動量モニタリングというシステムを作りました。ただ、これがたまらないのは、当たり前ですが、かなり費用がかかります。10頭やるためには、10個必要になります。損傷前の自発運動量を100%とすると、損傷直後は大体5%まで落ちますが、対照群で損傷後3ヶ月で約30~40%ぐらいまで戻ります。一方、移植群では80%まで戻ります。この結果は、人と同じ霊長類でヒト神経幹細胞の有効性が立証できたわけですから、マスコミでも非常に大きく取り上げていただきました。

これはワシントンポストの記事ですが、「Stem cells to heal monkey spinal cord」との見出しで大きく取り上げて頂きました。海外の友達からも、「いよいよ臨床研究に行くんだね」と言われました。ところが実際、これらのデータを出して10年以上たっていますが、臨床研究には届いていません。それはなぜかという、倫理的な問題です。

私たちが当初考えていた戦略は、中絶胎児由来の神経組織から神経幹細胞を採ってきて、それを試験管で増やして移植するという戦略でした。問題となったのは、ここです。皆さんもご存じのとおり、2006年に厚労省から出された、いわゆるヒト幹指針、「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」です。実際に私もその審議会に2回ほど参考人として招致されて、われわれのサルデータのプレゼンしました。

その中でどういった議論がされるかという、日本の倫理的な問題と欧米の倫理的な問題は全くポイントが違います。欧米では何が一番重視されるかという、移植される患者さんの安全性がすべてです。ところが日本の倫理的な問題は中絶胎児です。「中絶胎児由来の組織を使うとは何事だ。中絶をどんどん促すようなことにならないか。中絶胎児の命はどうなるんだ」と言われました。

私は、「もちろん中絶される方々には皆さんいろんな事情があるかもしれない。ただ、言葉は悪いかもしれないけど、臨床の現場では破棄されている組織です。破棄されている組織を治療法のない患者さんに使うのがどうして非倫理的なんですか」と訴えかけても、結局答えは出ませんでした。出てきた指針では、「中絶胎児由来の組織に関しては、なお継続審議を要す」という、曖昧な形で決着しました。その後も何度か改定されましたが、結局答えはいまだ出ていません。

そういった流れを間近にみて、日本でわれわれが考えている再生医療は無理ではないかと本当に思いました。研究をやめようかとも思いました。理論的に考えれば、患者さんの体から神経幹細胞が誘導できて、それを増やして移植する自家移植が一番いいに決まっています。ただ、そんな細胞はその当時ありませんでした。

ところが、全く同じ2006年に山中先生が iPS

細胞を発表されました。すぐさま山中先生に共同研究のお願いをしましたが、彼はとてもわれわれの研究にける思いをよく分かってくれました。それは、彼はもともと整形外科医で、かつラグビー選手でしたから、先輩が目の前で脊髄損傷になったのを見ていたからです。そして、iPS 細胞を用いた脊髄再生医療に向けた研究が本格的に始まりました。

先ほど梅澤先生からもお話がありましたが、iPS 細胞もいろいろ変遷がありました。いわゆる山中 4 因子で体細胞から iPS 細胞を作ると、確かにあらゆる細胞になることができます。ですから、よくマスコミで「万能細胞」と言われます。しかし、これは誤解を招く表現です。何でも治る魔法の細胞のように思われますが、実際には何になるか分からない細胞です。

実際に、十分な神経系への分化誘導をかけないで脳に移植すると、頭部が膨れ上がっているのがおわかりかと思いますが、神経にもなりますが、軟骨、気管上皮、あるいは筋肉にもなります。この写真は、脊髄に移植後のものですが、こんな大きな腫瘍を作ってしまいます。いわゆる奇形腫というものです。何になるか分からない、何にでもなれるということです。

ですから自分たちが治したい組織に、いかにしっかりと分化誘導するかが非常に重要になります。その点でわれわれにアドバンテージがあったのは、ES 細胞を使った研究を継続して行っていたということです。詳細は省きますが、iPS 細胞を、胚様体を介して神経幹細胞に誘導すると、しっかりと中枢神経系の 3 系統に分化してくれることが分かりました。

ただ、iPS 細胞は無理やり作った細胞です。何が常に問題になるかという、造腫瘍性です。これを見るためにわれわれもマウスの脳に移植して、研究を進めました。本日は時間の関係でいきなりヒト iPS 細胞の話をしませんが、もちろんマウスの研究を先に行いました。これは後日談ですが、マウスの iPS 細胞ができたあと、山中先生と横浜で文部科学省が主催するシンポジウムでご一緒する機会がありました。2006年の冬でしたが、「山中先生、患者さんを治すためにはヒトの iPS 細胞が必要ですよね。いつ頃できるんですか？」と聞いたら、「いや、霊長類と齧歯類は、随分隔たりがあって大変ですよ」と言

われました。「それはそうですよね。勿論大変ですわ」と言っていたら、次の年にできました。私は、「何であのときにすぐ言ってくれなかったのですか」と言ったら、山中先生の論文をご覧になった方は分かると思いますが、アメリカのハーバードのグループとほぼ同じ内容の論文が同じ雑誌に2編が続けて出ています。日本が一步先んじていても、論文が出る時は一緒になってしまいます。「敵を欺くにはまず味方から」ということで、共同研究者であるわれわれにも教えてくれなかったそうです。それだけ大変な領域だということだと思います。

余談はさておき、山中先生から四つのヒトiPS細胞株を頂いて、神経分化を行い、三株からは神経幹細胞ができました。さらに造腫瘍性を見るためにこれらの細胞を脳に移植をすると、「201B7」という細胞株から造腫瘍性は見られません。一方、「G1」はちょっと怪しくて、「G4」はかなりまずいという結果になり、確率で言うと4分の1でした。

造腫瘍性のメカニズムは後半でお話しますが、私たちが一番知りたかったのは、造腫瘍性を来さない安全なiPS細胞株を用いて本当に脊髄損傷に効くのかどうかを見たかったのです。そこで免疫不全マウスの脊髄損傷に移植を行いました。このグリーンに光っている細胞が移植した細胞で、非常にきれいに生着をして移植部から遠くに移動していきます。さらに、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統に分化します。齧歯類と違うのは、ニューロンが多いことです。大体40~50%がニューロンになります。どんな神経細胞になっているのかが当然気になりますから、そのフェノタイプを見ると、GABA作動性あるいはコリン作動性ニューロンになっていました。これだけの移植細胞がニューロンになって、損傷脊髄の中でいったい何をやっているのだろうと考えました。

これらは免疫染色の写真です。移植した細胞は緑に光ります。 $\beta 3$ チューブリンというのは、ニューロンのマーカーです。シナプス蛋白であるマウス特異的Basongが、移植細胞から分化したニューロンの周りに共在しています。また、ホストのマウスのニューロンの周りには、ヒト特異的なシナプトフィジンが共存しています。これらは免疫電顕所見で、post-synaptic density

がホストマウスニューロンと移植細胞との間で見られます。

われわれはこれをリレーメカニズムと呼んでいます。損傷部分の神経線維を、ちょうど手をつなぐようなかたちで移植細胞由来ニューロンが神経回路網の再構築に寄与しているのではないかという所見を捉えることができました。

では神経線維はどうなっているかというのを見ると、神経線維もいろいろあります。セロトニン作動性神経であったり、GAP43という再生軸索がありますが、対照群と比べると移植群でこれだけの各マーカー陽性の神経繊維が増えてくる。しかも損傷の尾側部位でこれだけの変化が出るのが分かりました。実際に統計学的にも有意とされています。

では、運動機能はどうかということですが、後肢の運動機能を評価するOpen-field scoring scaleというのがあります。大体100日以上まで経過を見ますが、対照群の4点にわざわざ線を引いてあります。われわれが臨床で使うフランケルの分類で言うと、下肢に加重できる有用な機能回復が4点以上で、それ以下では加重できない、ここがまさにその境目です。つまり、マウスで4点以上ということは、細胞移植により体重を後肢にしっかり荷重できるまで機能が回復したことを意味します。

実際に電気生理学的にも、motor evoked potentialと言いますが、脳を刺激して、その刺激が脊髄を通り、後肢筋肉で波形として捕らえることができます。対照群ではこの電位は取れないことが分かります。組織学的にも、安全な細胞を移植してあげれば、100日以上が過ぎても造腫瘍性が見られないということが分かりました。

この結果を受けて、次に何を行ったかということ、前述のサルを用いた研究です。われわれは常に齧歯類から霊長類、そして患者さんにといい戦略を採っています。移植細胞は、しっかり生存し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化します。移植部の空洞が小さくなり、髄鞘染色でも移植をすると、髄鞘面積が対照群に比べて有意に増加するということが分かりました。さらに、運動機能で非常に重要と言われる、脳からの命令を手足に伝える皮質脊髄路という神経投射路があります。これをCaMK α 染色で評価すると、対照群と比べて、

移植群では有意にこの神経線維が増えるということが分かりました。

ここまで組織像ばかり見せていますが、実際にどのくらい良くなったのかということ、動画を示したいと思います。これが対照群で、損傷してから3ヵ月たっています。非常に厳しい損傷ですから、3ヵ月たっても、これだけ床をたたいたり、お尻をさわって刺激しても、マモセットはなかなか動きません。間延びしたビデオですが、実際にこれだけの時間動かないということを皆さんに分かってもらうために、こういう動画にしています。

次に、Bar-grip testと言いますが、目の前にペンを出すと、こういった動物はつかみ取る反射があります。目の前の体幹面に垂直なペンは何とかつかみ取りますが、平行なペンは前腕の回内外ができないので、つかみ取ることができません。小指がペンにさわだけです。もちろん、ペンを目の上3cmに上げただけで、肩が上がりませんから、ペンをつかみ取ることはできません。上げようとしますが、これ以上、上がりません。これだけ重度な機能の機能障害をきたします。

次に行ったのが、Cage-climbing testといいます。ケージに逆さまに張り付けます。通常でしたら、四肢の機能によって体幹を保持して、下に人がいるので逃避行動を取ります。Uターンして上に逃げていきます。ところが張り付くことすらできません。これは下で網で受けていますが、ずるずると落ちてきてしまいます。これだけ重篤な四肢の機能障害が出ているのが対照群です。

では、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を移植したらどうなるかというのが、こちらです。一見して動きが全然違うのがお分かりいただけると思います。ちょっと休憩していますが、刺激を与えるとまたぴょんぴょんと動き出します。目の前にペンを出すとしっかりとつかみ取ります。手の動きが全然違うのがお分かりいただけると思います。目の前のペンが並行でも垂直でもつかみ取りますし、ペンを上に上げると、肩が上がるのでしっかりとペンをつかむことができます。ケージに張り付けると、当然しっかりと体幹を保持して方向転換をして逃避行動を取ります。これだけの機能の改善が得られるというこ

とです。

ただ、こういった有効性・安全性が担保される最も大事な点は、最初に造腫瘍性を検討して安全な細胞株を選ぶことです。信号で言うと、青色と黄色と赤色の細胞をお見せしましたが、黄色の、ちょっと怪しいかなと思われる253G1細胞株由来神経幹細胞を移植すると、このような腫瘍を形成します。神経病理学の先生と議論すると非常に興味深いコメントが返ってきます。もちろん人工の細胞ですから、全く同じものは臨床では出てきませんが、あえて言うなら、低悪性度のグリオーマに非常に似ていると言われます。

こういった細胞はどうしてできるかを調べていかなければいけないのですが、詳細に検討していくと、いわゆる山中4因子の中で、OCT3/4が移植後14日の段階では増えてこないものが、100日を超えると再活性化が起きます。ほか因子では起きません。こちらでもそうです。組織で見ても移植細胞のうちのOCT3/4の陽性細胞がぐっと増えてきます。

これが何を意味しているかということ、この当時私たちが使っていたiPS細胞は、第二世代のiPS細胞と言って、染色体に山中因子の遺伝子が取り込まれます。分かりやすく言うと、染色体に傷が付くという言い方をします。中に取り込まれているから、リプログラミング後にしばらくの間サイレンシングが起こったように見えていても、経時的に再活性化が起きて腫瘍化につながるのではないかと考えました。

こういった結果を踏まえて、今、iPS細胞を用いた脊髄再生医療はどういうところにいるかということ、当初私たちは、脊髄損傷の患者さんから体細胞を頂いてiPS細胞を作って、神経幹細胞に誘導して移植するという戦略を考えていました。ところが今の技術は何が問題かということ、まず、患者さんの体細胞を頂いて、iPS細胞を樹立し神経分化をさせるのに合計で半年かかります。急性期の患者さんが来ても慢性期になってしまいます。一番いい治療のタイミングは損傷後2から4週の亜急性期ですが、それを逃してしまいます。

さらに、実際に十分な安全性の検証や品質管理ができるのか、費用は一体いくらかかるのかなどが懸念事項として上がります。事実、神戸

の先端医療センター病院で始まった網膜の治療は、現在の試算では大体一人に2千万円かかります。これでは実際の医療として根付くかというところと厳しいと言わざるを得ません。こういった点を克服するためにどういう戦略を採るのか。

CiRA (サイラ/京都大学 iPS 細胞研究所) の山中先生は、iPS バンク構想というのを立ち上げて、ボランティアから体細胞を頂いてしっかりと安全な iPS 細胞のストックを樹立し、中核拠点として各拠点にその細胞を供給しようという構想を立てられました。一方、実際に細胞を移植するわれわれ側の一番大きい問題は、やはり造腫瘍性です。それを克服するためには何が重要かということ、安全性をいかに担保するか。そして、実際に臨床に使う細胞を作れるのかどうか。現実的な課題をクリアしていかなければなりません。

iPS 細胞に関しては、山中先生たちが非常に苦労されましたが、われわれも実はかなり苦労しました。何が苦労したかということ、iPS 細胞は毎年新しい細胞が出ていました。Nature や Science 等のトップジャーナルを賑わせてくれました。われわれ移植する側に、その細胞がすぐ来たとしても、分化誘導して移植して、「有効で安全です」と分かったときには、また新しい iPS 細胞が出てきます。それまでに蓄積したデータは全部無駄になってしまいました。こんなことが3回ぐらいありました。

ですから、「最終バージョンの iPS 細胞を早く作って欲しい」とずっと言っていたのですが、彼らも大変だったのはパテント (特許) が絡んだからです。アメリカとのしのぎ合いです。その中でほぼ最終のコンストラクトが決まり、このスライドのインテグレーションフリー、要するに染色体に傷がつかない iPS 細胞を樹立することに成功しました。

これもいち早く頂いて、分化誘導後に損傷脊髄に移植するとしっかりと生着します。これはバイオイメーキングとあって、移植細胞の増殖と生存を定量的に、しかも非侵襲的に評価しています。増えてくるとどんどん増えてきますが、非常に安定しています。ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統にしっかりと分化し、後肢の運動機能評価でも、4点にまで回復し有意差が出ます。これでいよいよい

けるなと思いました。もちろん長期成績を見ても、造腫瘍性を来さない。この「414C2」という細胞株を使ったことで、これをクリアできました。

しかし現実にはさらに厳しく、これはビギナーズラックでした。インテグレーションフリーですべての問題が片付くかと思ったら、これを見ると、上の三つの iPS 細胞株由来神経幹細胞は増えません。これはバイオイメーキングという、先ほども出しましたが、photon count で細胞の生存、増殖をモニタリングできます。ところがこの下の「B3」細胞株由来神経幹細胞はどんどん増えていきます。先ほどは4分の1が安全で、今回は4分の3でしたが、4分の1で危険な細胞が出てきます。

先ほども安全性の確立と言いましたが、単純化すると、一番いいシナリオは、「いい iPS 細胞があって、いい分化誘導をして、いい神経幹細胞ができて、腫瘍化しない」です。一番悪いシナリオは、「悪い iPS 細胞があって、悪い神経幹細胞ができて、造腫瘍性が出る」です。

ただ、話はこんなにシンプルではありません。いい iPS 細胞を使っているにもかかわらず、分化誘導の過程で悪い神経幹細胞ができてしまいます。ですから、われわれがクリアしなければいけない問題は三つあります。いかにいい iPS 細胞を評価、選別するか。そして、分化誘導法をどうやって最適化するか。最終産物である iPS 細胞由来の神経幹細胞のいいものをどうやって選別するか、この三つです。

iPS 細胞の評価法は、非常に力を入れてやってきました。こちらに書いてある一般的な核型解析だったり、プラスミドの残存、分化能の確認などは、京大の CiRA から各拠点に出荷されるときに基準でもあります。もちろん一般的な細菌検査も当然やります。ただ、われわれが一番注目したのは、神経幹細胞に分化誘導するときの造腫瘍性にかかわる遺伝子プロファイルを何とか同定したいということです。

こちらは、まずレトロウイルスで樹立した iPS 細胞のもともとの体細胞です。こちらは腫瘍化しないヒト ES 細胞があります。さらに腫瘍化しなかった iPS 細胞、腫瘍化した三つの細胞株も書いてあります。この遺伝子の発現パターン17個が、全く違うのがお分かりだと思います。

これは何を意味するかというと、こちらの腫瘍化を来したものは、この17遺伝子に限って言うと、元の体細胞の特性を継承している。要するに、リプログラミングが完全に起こっていないということです。その不完全なリプログラミングによって、ゲノムの不安定性を来して、造腫瘍性にかかわってくるのではないかと考えました。

こちらはインテグレーションフリーで臨床に使うものとほぼ同じプロトコルで樹立した iPS 細胞です。これが線維芽細胞で、これが ES 細胞ですが、ご覧頂くとこれらの遺伝子発現パターンから iPS 細胞に関してはほぼクリアしているのが分かります。ですから iPS 細胞の品質は間違いなく良くなっています。

では、この iPS 細胞を使って分化誘導をしたときにどういったことが起こるか、われわれはプロトコル A、B、C と異なる方法で分化を行いました。浮遊系と、浮遊系と接着系あるいは接着系という三つを試しながら、これだけの細胞株を CiRA から頂いて、こちらはフィーダーフリーの iPS 細胞、こちらはオンフィーダーの iPS 細胞です。

別にこのスライドを細かく説明する気はありません。ただ、私が言いたいのはこれだけ大変な思いをしているということです。マーカーの発現であったり、形態を全部細かく見ています。われわれが最初に臨床で行こうと思っているのは、フィーダーフリーを考えています。フィーダーフリーで、これはいいと思われたクローンが二つ出ました。B2 と A3 です。

ところが核型解析をすると、この A3 ではトリソミーが起きていました。これはまずいだろうと、結果的に B2 という細胞に限って分化誘導を行いました。三つの異なるプロトコルで誘導しています。こちらは接着系ですから、形態は少し変わります。きれいにニューロンのマーカーを発現します。形態的にも大きな差はありません。

ところが、移植をすると、プロトコル A から腫瘍化しません。これが頭でこれが脊髄です。ところがプロトコル B と C で誘導した神経幹細胞を移植すると腫瘍ができます。同じ iPS 細胞を使っても、いい iPS 細胞から、分化誘導の過程で悪い iPS 細胞の神経幹細胞ができます。も

しろん、できなければ、一番良かったのですが、逆に腫瘍ができたことで、できたものとの間でどういう違いがあるかということを検討することができました。

当然、造腫瘍性にかかわるメカニズムはいろいろあります。ターゲットジーンに対する SNP であったり、fusion gene あるいは次世代シーケンサーによる mRNA の発現、DNA の methylation 等です。当初われわれはすべてやるつもりはありませんでしたが、昨年の高橋政代先生の臨床研究開始に向けての検討会で、結果的にすべてやることになりました。実は、私もそこにいましたが、最初だからこんなに厳しいのかと思いましたが、そうではありませんでした。次も、その次もデータがある程度蓄積されて安全性が担保されるまでは、しばらくの間はこれぐらいの検討はすべて行って頂くという方針でした。ですから、われわれはこれを全部やっています。

その中で、まずこの結果を一部出します。この上の二つの円は、レトロで樹立した移植前の iPS 細胞由来の神経幹細胞、こちらは移植後です。こちらはインテグレーションフリーの iPS 細胞から樹立した神経幹細胞の移植前と移植後、いずれも腫瘍性が見られたもので、発現が 5 倍以上だったものをすべて抽出すると、インテグレーションフリーであろうがレトロであろうが、共通のものがあります。これら 55 個の遺伝子を同定することができました。この 55 個プラス、がん関連遺伝子は大体 200 ちょっとありますが、そういったものを網羅的に調べることによって、造腫瘍性を回避できるのではないかと、一つの突破口になれるとわれわれは考えています。

その次に、実際に脊髄再生医療に用いる細胞の製造も、実はたくさんの課題があります。これは CiRA からわれわれのところに送られてきます。送られるだけでも、輸送試験を既に数回やっています。圧センサー、温度センサー、実際に CiRA にある業者が取りに行き、それを運んできます。慶應でもう 1 回細胞を起こし、もう 1 回 CiRA に戻す。その過程で細胞がしっかりと起きるかどう、性質が変わっていないかどうか、そういうこともやらなければいけません。私たちのほうで分化誘導をかけて、安全性を検討して、さらに 1 回ストックを採ります。

その間に凍結・融解という作業が加わります。これも実は臨床医療に向けた大きな課題です。これで生存率をどのぐらいにするかという辺りを検討し、最終的な臨床研究に行きます。

実際に、慶應でこういう研究をやっている、患者さんに本当に使える細胞が作れるのかというのが、ずっと懸念事項でしたが、山中先生がノーベル賞を受賞したことが追い風になって、一昨年、CiRA とほぼ同様のクオリティーのセルプロセッシングセンターを造ることができました。

ただ、CPC の運用を開始すると、黙っていても年間 4 千万円程度のお金が消えていきます。厳しいです。お金がいくらあっても足りない。ありがたいことに、平成25年から「(再生医療実現) ネットワークプログラム拠点 A」という大型研究費を頂いて、岡野先生と私は研究推進主任として参画しています。10年で年 4 億円と言ったら、皆さん「えーっ」と思われるかもしれませんが、そんなに甘くはありません。これはステージゲート方式と言って、第一ステージをクリアしないと第二ステージに行けません。テレビゲームのようなものです。第一ステージの出口は、亜急性期の完全脊損の患者さんに対する臨床研究の開始です。開始しなければなりません。第二ステージは、慢性期の不全損傷の患者さんに対する臨床研究の開始であり、最終ゴールは慢性期の完全損傷の患者さんに対する臨床研究の開始になります。

われわれは、第一ステージをクリアしないと次にいけないので、そのために今、CiRA から届いた iPS 細胞を、われわれのほうで分化誘導をかけて、スクリーニングして造腫瘍性を見て、有効性・安全性を見て、一つ二つの細胞株に絞り込みます。それを使って臨床研究に行こうという段階です。

では、実際にこの亜急性期の患者さんだけ治せばいいかというと、当然そうではありません。第二ステージに向けた基礎研究も同時進行でやらなければならないのです。第一ステージを抜けて万々歳とって、次にすぐ来る第二ステージを抜ける目途が立っていなければ、その次はありません。

私たちが今取り組んでいるのは、慢性期の不全損傷マウスに対するヒト iPS 細胞由来神経幹

細胞です。実はここに示しているのは、iPS 細胞のもう一つの強みで、オリゴデンドロサイト前駆細胞に誘導し、損傷脊髄に移植してました。この緑色は GPF で移植細胞のマーカー、赤色は MBP という髄鞘のマーカーです。このピンクに見えている部分が移植細胞由来の髄鞘を意味します。これは本当に驚きでした。ただ、残念なことに細胞移植だけでは後肢運動機能はよくなりません。損傷後 6 週、ヒトで言うと大体半年以上経過しているマウスに移植しても、全く効きません。

何が重要かという、リハビリです。こういった荷重をサポートするトレッドミルの上で運動させると、慢性期脊髄損傷マウスであっても後肢運動機能の改善が得られます。「脊髄損傷を治す」と一言で言っても、病態が非常に多様で、損傷直後の人もいれば、亜急性期の人もいるし、慢性期の人もいます。いわんや完全損傷と不全損傷は全く違います。それが組み合わせできません。

今日は話せませんでしたでしたが、細胞移植は、急性期の不全損傷あるいは完全損傷の患者さんに対していきなりやるのではありません。われわれは今、急性期脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の治験をやっています。こういう薬で完全損傷になる人を不全に救ってあげて、リハビリをやって機能改善を得られれば、それでいい訳です。ところが、亜急性期から慢性期に至っても機能改善が得られない人には、やはり細胞移植が必要だと思っています。特に慢性期になった場合には、軸索再生にはセマフォリン 3A 阻害剤、あるいはコンドイロチナーゼ ABC という軸索進展疎外因子を抑制する薬剤との併用が重要です。

ただ、それだけではありません。先ほど言ったようにリハビリが非常に重要です。先ほどラットではああいう機械をお見せしましたが、ヒトではどうするのか、当然われわれも考えます。ここに書いてある HAL です。これは筑波大学の山海（嘉之）先生が造りました。実は、ドイツで治験を終えて臨床で保険収載されています。日本で開発されたものが、日本でまだ行われていません。皮肉な現実です。実際にわれわれも、これを使った慢性期の不全損傷の患者さんに対する臨床治験をこの 4 月から始めます。これは既に論文にもなっています。

こういった細胞移植とリハビリテーション、あるいは薬剤と併用することによって、今までできなかった脊髄の再生、患者さんにとって意味のある再生ができるのではないかと考えています。

今日お話しした内容は、こちらにはすべて書ききれていませんが、数多くの整形外科の大学院生の血と汗と涙の結晶です。もちろん整形外科の岡野先生、京都大学の山中先生、リハビリ教室の里宇（明元）先生、こういった先生方とのこれまでの共同研究の成果を話しました。ご清聴、どうもありがとうございました。

松永 中村先生、どうもありがとうございました。ただ今の発表にどなたかご質問ないでしょうか。では、一つ、私がお聞きします。やっぱり慢性期の治療が一番チャレンジングかと思いますが、物理的に障壁となるものがかなり高くできあがっていて、そこをまた新たに通過していくということですが、これはどのように可能なのか、先生は仮説をお持ちかと思いますが、教えていただければと思います。

中村 ありがとうございます。話の中でも出たように、われわれの最終ゴールは、今日もいらしていますが、慢性期の患者さんを治すことです。確かにハードルは高いですが、損傷部に細胞だけ移植したらそれで治るかといったら、そんなことはあり得ません。慢性期の場合は、特に空洞もあります。グリア瘢痕もあります。われわれが考えているのは、単なる細胞移植というより、次世代の移植治療です。要するに、立体的な構築をした次世代の移植は、移植する前に環境をそこに導入するというような考え方でないと、多分慢性期の、特に完全損傷は治らないと思います。

慢性期の不全損傷ならそこまでやらなくてもいいと思います。実際、軸索が残っているところに再髄鞘化が起こったり、リレーメカニズムで、リハビリを併用することでかなり機能改善が得られると思いますが、完全損傷の場合には、やはりそこに先ほど言ったような軸索進展疎外因子だったり栄養因子だったりスカフォールド、足場などが重要です。

実は、東大の竹内先生たちと共同研究をしていますが、スカフォールドの中で、培養によって細胞を増やして、分化誘導を方向付けし

た状態で、そのスカフォールドの中に栄養因子を徐放化しながら損傷部に移植する。そこまでやらないと、慢性期の完全損傷は治らないと思います。ただ、いきなりそれらを全部組み合わせるというのではなく、やはり一つずつ有効性・安全性を押さえていきながら、最終的には併用療法というかたちで臨床に行くのが妥当と考えています。

松永 ありがとうございます。もう一つぐらい質問を受けられると思いますが、いかがでしょうか。ではもう一つ、本当にいい細胞の一つ準備するのがすごい大変だということが今よく分かったのですが、よく新聞なんかではたくさんストックしておいて、急性にすぐ使えるようにというような、バンクのようなプロジェクトを進めていくという話も聞いていますが、一つでもあれだけ大変なのを、そんなに万人に向くようにたくさんためることは可能でしょうか。

中村 先生がおっしゃりたいのは、iPS細胞のたくさんの異なる、よくマスコミではHLA（ヒト白血球型抗原）のホモの3座一致の・・・。

松永 はい、そういうことです。

中村 皆さん思われているのはiPS細胞の最も大きな利点は、自家細胞であるために免疫拒絶がないということです。これは間違いありません。しかしiPSバンク構想では、他家移植を想定しています。他人の細胞になりますから、免疫拒絶を克服するためにどういう戦略をしているかということ、HLAにはA, B, DRの3座ありますが、その3座一致のホモのドナーからiPS細胞を作製することによって、大体150個の細胞株を樹立すれば、日本全体の95%以上をカバーできるという試算が既に出ています。

全部は今日お話しできませんが、もちろん皆さんご存じのように、中枢神経系は免疫学的に寛容な場所です。さらに、iPS細胞由来神経幹細胞は、実は胎児の神経幹細胞もそうですが、細胞そのものが免疫反応を抑制する作用があります。ですから、実際に、HLAのホモも3座一致が必要かどうか、あるいは不適合の場合でどのぐらいの免疫拒絶が起きるのか、それをどのようにスクリーニングするのかというのを、現在私たちは精力的に研究しています。

その中で、いくつか面白い知見が出てきていて、恐らく150株までの数は必要ないのではない

かと私は思っています。より現実的な落としどころは見えてくると思っています。一つの細胞株を樹立するのに2億円ぐらいかかりますから、150個と簡単に言いますが、300億円プロジェクトになります。実際どのぐらいの意味があるのか。免疫抑制が投与しなくてすむのかどうか、

そこはしっかりと議論しないと、国家の予算の無駄遣いになってしまいますから、慎重に検討しようと思っています。

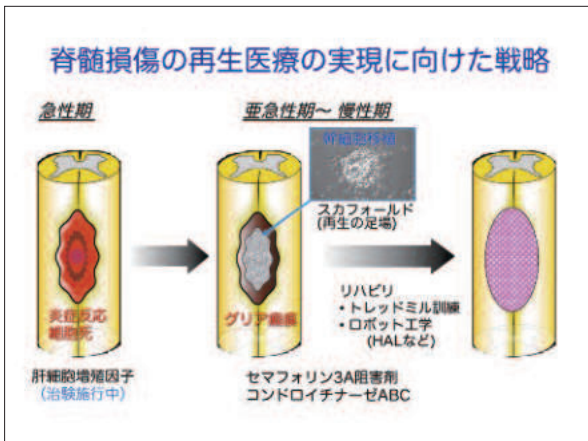
松永 先生、どうもありがとうございました。

中村 どうもありがとうございました。

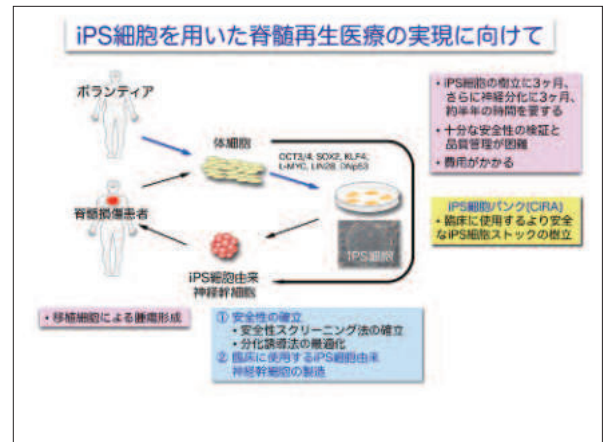
1



3



2



③ この10年で大きく変わった内耳研究 —内耳領域における幹細胞研究の現状と将来の展望—

大阪労災病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

大 島 一 男

大島 今日はずいぶん難聴ということで、先ほどの脊髄の話からはだいぶ変わった内容になりますが、内耳研究、特に聴覚再生の研究です。これに関して厳密に10年ではありませんが、ここ10年・15年で本当に180度教科書が書き換えられてしまったという出来事が起きました。あらゆる再生の領域でもそうだと思いますが、耳の領域、特に聴覚の領域に関してどういうことが起きたかを紹介します。

本日話す目次として、まず耳のことをご存じない方もいると思うので、耳の簡単な仕組み、どのように音が聞こえるのかについて説明いたします。それから、内耳再生の研究を歴史的に見ていこうと思います。ポイントとしては、耳の細胞が再生するのかしないのかということです。

先ほど、中村先生からすばらしい話がありましたが、もう一度、幹細胞とは何なのか、本日のテーマのES細胞・iPS細胞について軽く説明を加えたいと思います。それから、私が携わった最近の研究の中から二つほど多少詳しく解説します。

それから最後に、臨床で遭遇する難治性難聴がどのようなものか、今後どのような研究がなされていくのか、どのような方向で考えていくべきかについて、お話しします。

先ほどご紹介にありましたボストン時代、ここにおられる務台英樹先生と一緒にラボで働かせていただきました。それから、私のあとのあとで話される藤岡正人先生は、時期はかぶっていませんがMEEIで隣のラボでした。この結構立派なビルが、ハーバード大学の一部で耳鼻科と眼科だけの病院と研究施設になります。そのあとスタンフォードに移りましたので、今日話す内容は基本的にこの2ヵ所で研究した内容です。

まず、聴覚のメカニズムです。耳たぶで集めた音が外耳道から中に入っていきます。突き当たりが鼓膜です。音の信号が鼓膜を震わせます。その信号がツチ、キヌタ、アブミという小さな骨三つを伝わって内耳に入ります。その中で蝸牛の中にある細胞が音を電気信号に換えて、その電気信号が神経を伝わって脳に行き、それが音だと認識されます。それが「音を聞く」というメカニズムです。

大きく分けて、外耳、中耳までが原因で起こる難聴のことを「伝音難聴」と言います。音を伝えるのがこのメインの働きです。そのあと、その音を感じて神経に伝達する仕事を持っている内耳、あるいはその神経の障害で起こる難聴を「感音難聴」と言います。伝音難聴は手術とかで音の伝わりを良くしたり、中耳炎を取り除いたり、鼓膜に穴が開いているのを張り直してあげることで治ることが多いですが、この内耳の障害で起きる感音難聴は治療が難しいという状況です。

内耳には、めまいとかバランスを感じる前庭もありますが、今日は聞こえの臓器である蝸牛について注目していきたいと思います。蝸牛はカタツムリの形をしていますが、これはその殻を破ったところです。この青く塗られているところが「コルチ器」と言って、感覚細胞が密集しているところです。このカタツムリを輪切りにして切片を採って、顕微鏡で見るとこのようなきれいな構造体を取っていますが、この辺のコルチ器と言われるところに感覚領域があります。

電子顕微鏡で上のほうから見ると、有毛細胞という細胞の上面に毛が生えている細胞がきれいに並んでいるのが見受けられます。この細胞をさらに詳しく見ると、細胞の先にこのように細い線があります。この細い線が引っ張られて

イオンチャンネルが物理的に開かれ、そこを通して陽イオンが細胞内に流入する事で、音の振動が電気信号に換えられるというメカニズムになっています。ちなみにこのイオンチャンネルはまだ同定されていないので、これを見つけるとすごく大きな仕事になると言われていますが、いまだにこのメカニズムははっきりとは分かっていません。

先ほどから、「聞こえとバランス」という言葉を用いましたが、有毛細胞と一口に言っても形が全然違います。聞こえに関しても、外有毛細胞と内有毛細胞と2種類あります。実際のセンサーは内有毛細胞です。内有毛細胞はちょっとランダムな形ですが、外有毛細胞はきれいな「V」あるいは「W」のような形をしています。

それから、めまい・バランスのほうのセンサーの細胞は、このように真ん中にしゅっと引っ張られているような形を取っていて、いろんな種類があることが認められます。働きとしては一緒に、動きを電気信号に換えるのがメインの仕事の細胞です。

さて、疾患としての難聴ですが、世界中に2億8千万人の患者さんがいると言われていて、非常に多いです。先天難聴としては千出生当たり1人で、これは先天性疾患としては非常に高い率です。感覚器障害あるいは視覚障害、いろいろな障碍の中で考えても、難聴が最も多い感覚器障害で、実は治療のデマンドがすごく高い疾患であることを認識してください。

難聴の原因はいろいろありますが、遺伝的な背景であったり、ある種の薬—抗がん剤や抗生剤を使ったあとで難聴が起こる、騒音に常にさらされる、年齢によるもの、中耳炎とかそういうものも当然あります。本日注目したいのは、難治性の内耳性難聴です。いったん障害されるとなかなか治らない有毛細胞の恒久的ダメージによる内耳性の難聴に注目していきます。

このように、内有毛細胞、外有毛細胞はきれいに並んでいます。これは実験モデルですが、有毛細胞を薬か音かで障害するとそのあと再生してきません。これが、内耳性難聴が臨床的に治せない原因です。ここでクイズです。

今言ったように、ヒトの有毛細胞は再生しません。これによって内耳性難聴が治らないということです。では、霊長類、サルとかを見渡し

て、有毛細胞は再生してくるのか、哺乳類全体を見渡して有毛細胞は再生しないのか。爬虫類、鳥類、両生類、魚類はどうなのか。どの辺りまで聴力を再生できるのかというところの線引きは、実はここです。

哺乳類だけが、有毛細胞をいったん障害されると再生しない。逆に言うと、爬虫類、鳥類、両生類、魚類は再生してきます。いったん聴覚が失われても、例えばサメの歯が生え替わるように有毛細胞が生え替わって、再生する能力を持っている。なぜか哺乳類だけはできないという現実です。

ちなみに、耳がどこにあるのか調べてみました。カエルは鼓膜がむき出しです。爬虫類は隠れがちで、目の後ろに薄く開いているところが耳です。魚に至っては分かりにくいですが、この辺に耳があります。

有毛細胞が生え替わるという話をしましたが、いつ頃分かってきたのかという歴史的な話をすると、そんなに古くはありません。1981年、最初にジェフ・コーウィンというアメリカの研究者が、サメを用いて、それこそサメの歯が生え替わるように、出生後ずっとサメが生きている間じゅう有毛細胞がターンオーバーして入れ替わり続けるということを発見しました。次いで、同じグループが、鳥類でも同じことが起こる、常にターンオーバーを繰り返していることを4年後に発表しました。

常にターンオーバーしていますが、特に音を使って有毛細胞を壊すというモデルを試みると、そのあとさっと治ることが分かりました。それが1988年です。人工的であれ自然であれ、有毛細胞が壊されても、魚類、鳥類は再生する能力を持っている。同様に、爬虫類や両生類でも研究が行われています。

これが1988年の「サイエンス」に載った、ジェフ・コーウィンの鳥類のダメージ後のデータです。先ほどお見せしたのは毛が見えていませんが、4週間もすれば結構生えてきて、12週間もすれば元通りに生えそろうというのが鳥類の内耳です。スライスで見ても、正常の場合はこのように産毛のような毛が生えていますが、ダメージしてしまうとこのように平坦な表面になってしまい、4週間から12週間もすれば毛が戻ってくるという状態です。

では、哺乳類はどうかというところで、実は1993年にこれもまた大きな発見がありました。先ほどから、前庭と蝸牛の二つに分けていますが、蝸牛が聞こえ、前庭がバランスの感覚です。前庭のバランス感覚のほうでは、薬を使って有毛細胞を潰しても、実はそのあと再生してくるということが、1993年にアメリカのグループから発表されました。これがそのときの論文です。

正常は毛がきれいに生えそろっています。それから薬で潰しました。つるつるの表面になっていますが、1ヵ月もすればちょこちょこ生えてくるということですが、これが果たして「元通り」と言っているのかどうかということです。ここに関しては大きな発見でしたが、再生は限定的な状態で、しかも前庭に限られるということは、聴覚の再生とは結び付かないということです。このあとも、聴覚の有毛細胞が再生するかどうかの研究は続きましたが、再生しないということがずっと言われていましたし、そのように教科書に書いてありました。

ここで、なぜ哺乳類だけ再生しないのか、ということが起きているのかを深く考えてみると、そもそも再生と言うからには、有毛細胞の種となるような細胞が必要になります。そういう種となる幹細胞が存在しているのかどうかです。仮に存在していたとして、なぜ哺乳類では自発的に再生してくれないのかというところで、大きく二つの方向性があります。

一つ目は「ブレーキ」が常にかかっているかもしれないという事。鳥類とかには存在しないブレーキが哺乳類ではかかっている、という事です。あるいは鳥類などでは存在している「アクセル」が壊れている。この2方向についてさまざまな研究がなされていますが、結論としては、哺乳類は有毛細胞を再生できていないです。

内耳の中に幹細胞があるのかというようなことを考えていきたいわけですが、まず再生医学を考えると、その臓器、われわれの場合は内耳になりますが、「臓器」と「幹細胞」の関係性には2方向あります。

一つ目は、先ほどの中村先生の話にありましたが、幹細胞から目的の細胞を作るという「分化誘導」という方向です。もう一つは、内耳自体に果たして内在性の幹細胞が存在するのか、

組織から幹細胞を「単離」できるのかという方向性です。先ほども示したように、そもそもそういう種が存在するのかが謎でしたので、2000年に入ってから、まずわれわれグループは、種がもともと存在しているのかを解析するところから始めました。

幹細胞について軽く説明を加えますが、幹細胞は概念的にはかなり古いです。1908年に、ロシア人が概念としてはこういうものがあるのではないかと提唱していたらしいです。実際に「これが幹細胞だ」と細胞が採られ始めたのが1960年代に入ってからとされています。実際このときの細胞はいろいろなものが混ざっていたり、今のレベルとは程遠いとは思いますが、1960年代から実際に使われ始めました。

幹細胞の必要条件について話します。一つ目が自己複製能力で、幹細胞にはこれが絶対必要です。自分をそのままコピーできる能力、しかも限られた微小環境でとてっきり自己複製を行って、それをどんどん無限に増やしていける。もう一つが、多分化能で、万能細胞と言われますが、いろんな複数種類の細胞に分化する、形を変えていけるということが重要な特徴です。さらに厳しい定義ですと、単細胞増殖能、たった一つの幹細胞を取り出して培養することで、その臓器を完全再現できないといけないという厳しい定義もありますが、主にこの1番、2番がまず示さなければならない幹細胞の定義です。

幹細胞の種類としては、例えば内耳にある幹細胞は体性幹細胞、体にある幹細胞です。体性幹細胞には他にもいろんなものがあります。肝臓だったり筋肉だったり神経だったり、心臓だったり。生殖幹細胞というのは睾丸や卵巣の中にある細胞です。こういう幹細胞はもともと体の中にあります。ただ内耳に関しては、再生しないためそのようなものはないと言われていました。それとは全然別の幹細胞の種類として、ES細胞やiPS細胞が存在します。こういった分類は、どこにあるかという分類方法です。

それから、分化能という分類方法を見てみますと、一つ目は、「全能性」(トティポテンシー)、トータルという意味です。例えば受精卵です。受精卵は細胞1個から人間を胎盤も含めて丸ごと作れます。「多能性」(プルリポテンシー)は、いわゆる万能細胞と言われる細胞です。細胞の

中には大きく分けて、外胚葉、中胚葉、内胚葉という三つの種類がありますが、この三つともが生み出せる細胞が多能性幹細胞です。万能細胞とも言われます。

もう少し能力が落ちて、例えば皮膚の幹細胞などは皮膚の細胞にしかありません。でも、幾つかの種類にはなります。こういうのを「複能性」と言ったり、「小能性」や「単能性」や、ちょっとした言葉遊びのようなものがありますが、こういった分化能に応じた分類方法もあります。

先ほど中村先生からも紹介がありました、ES細胞を簡単に解説します。受精卵をしばらく育てていくと胚盤胞というというステージになります。胚盤胞の中に内部細胞塊という細胞の塊があります。これを取り出して特殊な培養をすると、この全能性のES細胞が採れるというのが、マーティン・エバンス先生によって発見されました。全能性ですので、例えば外胚葉では皮膚神経や内耳を、さらには中胚葉・内胚葉由来の細胞も作り出せるということです。われわれが注目している内耳は外胚葉由来ですので、外胚葉になります。

ES細胞は受精卵由来であるため、大きな問題はやはり倫理的問題です。これは英語の1コマ漫画です。天国におじいさんと子どもがいて、おじいさんは「わしはES細胞の研究による治療法ができるのを待っている間に死んでしまったんじゃ。おぬしはどうじゃ」みたいに聞いているのですが、「僕がそのES細胞の元になった胎児だよ」と、ちょっとブラックな漫画です。

これに端的に表されていると思いますが、このような倫理問題が存在するのがES細胞です。それ以外にも、ES細胞を移植に用いると、当然ES細胞は自分の細胞ではありません。結局、ヒトからヒトへの移植になるので、免疫的な問題が出てきます。それから安全性の問題では、いろんな細胞になり得るということで、がん細胞に行ってしまう可能性もあります。新しい世代のES細胞なども作られてきて、改良はされていますが、依然として倫理面の問題は残っています。

そこで出てきたのが、iPS細胞です。2007年に発表された、山中伸弥先生らによる発明です。これは普通の体細胞、皮膚の細胞から作ることができます。これも万能性で、皮膚から採って

きた細胞を培養して、この四つの因子を細胞に導入して培養を続けると、万能性を持つiPS細胞が出来上がります。これら4つの因子は、「ヤマナカファクターズ」と名前が付いて世界中でそう呼ばれています。iPSは、倫理的問題が全くクリアできた状態です。単に患者さんの皮膚から採れば、それが幹細胞の元になるので、受精卵や中絶胎児を用いることは全くありません。

それから、移植の際に拒絶反応がありません。自分の細胞由来ですので、拒絶反応について全く考えなくていい。ただし、万能細胞であるが故のジレンマですが、やはりがん化の危険性が残ります。また、当初はウイルスベクターを使っていたので、ウイルスのDNAなどが一緒に入ってしまうという問題も存在していました。

体性幹細胞の例の一つは皮膚です。これは有名な話ですが、皮膚が一番下の底のほうに幹細胞があって、それが28日、1ヵ月ぐらいで置き換わっていくという話がちまたでも知られていると思います。

この画像はどこから拝借したかというのと、某化粧品会社です。「自己美肌力の母、幹細胞」という化粧品の宣伝で、幹細胞を使って商売されているような状態です。この化粧品を塗ることでどれだけ幹細胞に生物学的な影響があるのかわかりませんが、それほど幹細胞という言葉が今、世間を賑わせていて、さらにはポジティブなイメージがあるということで、面白いので出してみました。それほど今は広がっています。

もう一つは腸です。例えばこれは高校の生物の教科書にも載っていますが、一番底にある陰窩いんかというくぼみです。幹細胞があって、底のほうから徐々に分化していきながら上のほうで生え替わって行って、先のほうで古いやつが死んでいくというかたちで、何日か何週間かです入れ替わると習った覚えがあります。これは少し古い画像なので、「腸幹細胞」と書いてあります。

でも、実はこれが幹細胞と同定されていたわけではありません。これは、2007年に「ネイチャー」に載った論文です。このときに初めてこれだけ有名な、再生する腸の幹細胞が同定されました。ついこの間です。パネート細胞と白いところの間に囲まれて、青く光っているLgr5陽性の細胞が実は幹細胞だったと、2007年にやっ

と分かりました。このように再生することが知られる臓器でも、「これが幹細胞だ」というのは、非常に難しいということを示しています。

彼らは細胞1個だけから腸の構造を作るということをしています。これはまた別のグループによる実験ですが、ここから1個だけ細胞を取り出します。これをどんどん育てていくとこのような球状のものができて、最終的には突起物ができて、本当に腸のように蠕動します。そのようなものが細胞1個から作れる。それもこれもいろんな技術が発達したからです。例えば、Lgr5という細胞が陽性のものだけを釣ってくるような技術ができて初めて、このようないろんな発展が見られてきたということです。

耳に戻ります。耳は1993年頃から、「結局、聴覚の有毛細胞は再生しない」というところで停滞していました。ここで幹細胞学の発展というブレークスルーが起きました。そのあとの2003年、「ネイチャーメディシン」に載った論文です。マウスの前庭が再生することは知られていたのですが、それでも幹細胞が存在しないと思われていた内耳に幹細胞があったということを見ました。

これは、私や務台先生が行っていたラボから発表されました。それから続いている論文がどんどん出てきます。そして、3、4年後に、何と再生しないと知られている蝸牛の、音を感じる有毛細胞のほうも幹細胞があるということが言われてきました。どうにかたちで出てきたのかというところで、私たちのデータをお見せします。

これが内耳です。方法としては、いろんなところから細胞を顕微鏡の下で手術しながら採ってきます。集めてきた細胞を特殊な処理をして、1粒1粒ばらばらにほぐします。それを1週間ぐらい培養するとこのような肉だんごのような浮遊細胞塊ができてきます。まずこれを作るのが、幹細胞単離の第一段階です。これを張り付けてさらに2週間ぐらい培養します。

すると、このように光った細胞が見えてきます。光っている元は何かという説明ですが、天然の有毛細胞を見てみますと、例えば、赤いところはPV3というマーカーで、この白いところはミオシンⅦaだったり、Atoh1というマーカーだったりします。そのような天然の有毛細胞に

見られるものが、人工の有毛細胞の中に複数個見られるということで、幹細胞を単離して有毛細胞に分化誘導できたという証拠になります。

それだけでは物足りないので、人工の有毛細胞の電気的な特性を調べたところ、天然の細胞に近い特性を持つことが分かりました。これが2007年の話です。そのあとヒトの蝸牛を手に入れる機会がありましたので、何度かトライしましたが、人の有毛細胞はなかなか難しく、それらしきものが採れたか採れないか、結局これは発表していません。そういう方向性もあり得ます。

今、話したのは、幹細胞がないと思われていた蝸牛に幹細胞があることが分かったということです。といたしても、ほぐした細胞の中にあつたというだけで、実際先ほどお見せした中でのどの細胞が幹細胞なのか、まだ分かっていません。さらに技術がどんどん発展していきましたので、いろんなマーカーを使って、コルチ器にある細胞をさらに細分化していきました。結論としては、この水色の部分の細胞だけが増殖能、いわゆる自己複製能を持っていて分化する機能を持っていました。この辺が人工の有毛細胞になりますが、天然のものに近いようなものが得られてきたというのが、2011年です。

いろんな困難な点があつて、他の業界には遅れていますが、耳の業界でもこのようなことが進んできているという状態です。とにかく幹細胞が採れることが分かりましたが、耳の細胞は、そもそも内毛細胞の数で言っても一つの耳の中に3,500個しかありません。数えられるレベルです。例えば、網膜でも耳の何億倍の細胞が一気に採れます。実験を行っていくうえでも、ネズミを犠牲にするわけですが、1日に行う手術が100匹だったりします。それを数人がかりで手術したりということで、なかなか研究が進みません。

マウスから細胞を集めることが大変困難なので、内耳の幹細胞を何とか人工的に作っていかないと、その次に行ったのが幹細胞から内耳の細胞への「分化誘導」です。その途中で内耳性の幹細胞を経由しようという考え方です。これが理想形です。ES細胞から培養皿上で養殖の有毛細胞を作っていきたいというのが夢です。これができれば、ネズミを何百匹と犠牲にしな

くても解析実験などができるのではないか。あるいはその細胞を移植することで、移植治療に用いられるのではないかという夢が広がります。

ただ、形としても本来の天然に似なければなりませんし、機能的に振動の信号を電気信号に換えるという本来のメカニズムも持ち合わせないといけないというところで、なかなか難しいです。これが天然の有毛細胞ですが、この細い糸のような部分が引っ張られることで電気信号が生じます。重要なポイントはまず形で、特徴的な形を再現したい。もう一つは機械信号を電気に変換する能力を再現したいというところでは、実際に物理的な振動を電気に本当に換えられるのかということで、実験をしました。毛のところを棒で押します。それでその細胞がどのような電流を生み出すかを解析しました。押したときに電流が流れるという天然の有毛細胞が持っているものを人工で再現することができました。さらには、有毛細胞の電気変換能力はストレプトマイシンなどの薬でブロックがかかるのも特徴ですが、そのようなものも再現できて、いよいよ天然に近い人工物を作ることができました。

では、実際に物理的な振動を電気に本当に換えられるのかということで、実験をしました。毛のところを棒で押します。それでその細胞がどのような電流を生み出すかを解析しました。押したときに電流が流れるという天然の有毛細胞が持っているものを人工で再現することができました。さらには、有毛細胞の電気変換能力はストレプトマイシンなどの薬でブロックがかかるのも特徴ですが、そのようなものも再現できて、いよいよ天然に近い人工物を作ることができました。

これは、ガイドラインなしで作るのはなかなか難しいです。やはり天然物にならなければなりません。一部の外胚葉の膨らみから内耳は分化して発生していきますが、このステップを借りようということです。これが受精卵です。これが完成品の有毛細胞ですが、途中でいろいろなポイントを作っていきます。例えば、ES細胞・iPS細胞から始めていきますが、ゴールの有毛細胞に至る前までに外胚葉の細胞をまず作り、あるいは内耳の前駆細胞を作りというステップを作っていました。とにかく自然にならうというのが、分化誘導する業界では有効な手段です。

これが結果のダイジェストです。ES細胞からとある誘導をかけて、内耳は外胚葉由来ですので、外胚葉に富んだ肉だんごを作るのを第一目標としました。それができて、そのあとさらに特殊な処理をして、耳の前駆細胞が持ち合わせているマーカーを持っている細胞を大量に作ることに成功しました。

最終的に毛が生えた細胞が欲しかったのですが、そこを作るのが非常に困難で、ニワトリの細胞ととある細胞と一緒に培養することで、できることがわかりました。こういうかたちでい

ろいろなマーカーが発現しています。有毛細胞特有なものが発現してくるものが作れました。

電子顕微鏡で見るとこのように毛が生えています。これはマウス ES 細胞由来のもので、もう少し細かく見ていくと、このようにしゅつとした形の有毛細胞が認められました。iPS 細胞からも同様に作ることができました。さらに細かく見ると、先ほどから述べている毛、細かい糸のようなものが先に伸びているのが確認され、その毛に特有のたんぱく質が発現しているということも確認しました。

次は、実際に物理的な振動を電気に本当に換えられるのかということで、実験をしました。毛のところを棒で押します。それでその細胞がどのような電流を生み出すかを解析しました。押したときに電流が流れるという天然の有毛細胞が持っているものを人工で再現することができました。さらには、有毛細胞の電気変換能力はストレプトマイシンなどの薬でブロックがかかるのも特徴ですが、そのようなものも再現できて、いよいよ天然に近い人工物を作ることができました。

次のステップは、当然ヒトです。ヒトの ES から誘導実験をしたいというところで試行錯誤を繰り返しましたが、先ほど話がありましたが、齧歯類と霊長類は全く違います。マウスでは2週間ぐらいでできたものが、ヒトではそもそものプロトコルだけでも、仮のプロトコルが32日で、最終的にはもっとかかりました。

昨年やっと発表できましたが、このように毛の生えた形の有毛細胞を分化誘導することができました。齧歯類に遅れて4年です。電子顕微鏡ですが、これがヒト ES 細胞から分化したものです。ベストではありませんが、このようにしゅつと立ち上がった、毛が生えた細胞が認められました。

これが究極の夢です。毛の生えた細胞がびしゅつと培養皿に並ぶような、有毛細胞シートを作りたい。これを行うことで、今まで苦労していた有毛細胞の採取という問題がクリアされます。最後に、これを用いてどのようなことが将来可能になるかを考えていきます。

実際、われわれ耳鼻咽喉科が臨床でどのような難聴を困難な難聴と見なしているかですが、一つは「突発性難聴」です。時々芸能人、例えば

「浜崎あゆみが突発性難聴で入院」とかニュースになりますが、突然発症します。突然、片方の耳が聞こえなくなります。ステロイドをしたり高気圧酸素をしたり、いろんな方法がありますが、治る方は3分の1にすぎません。それ以外の方は中途まで治るか、全く治らないという厄介な病気です。

それから「加齢性難聴」です。これは年齢とともに有毛細胞が失われていくので、非常に多くの方が困っている疾患です。「先天性難聴」は、千出生当たり1人で、これも非常に臨床で遭遇する難聴です。「ムンプス難聴」はおたふく風邪です。おたふく風邪は身近な病気と思われるかもしれませんが、それで難聴を来します。時には両側で、ある日突然全く聞こえなくなるということがあります。非常に困ります。普通に生活していた人が、ある日突然、全く聞こえなくなります。

「メニエル病」はめまいが主体ですが、めまい発作を繰り返すたびに、リカバリーするポテンシャルが下がって、だんだん聴覚が衰えていきます。そのようなメニエル病で何回も発作を繰り返した患者さんの難聴も、治すのが非常に困難な難聴です。「耳鳴り」は難聴とは違いますが、聴覚機能の問題という事ではある意味同様に、聞こえているけど耳鳴りが24時間鳴り続けてどうにかかなりそうだという事で、困られている方もいます。

この辺に関しても、何とか将来治療法を見つけていければという方向性です。いわゆる未来的な治療法と呼ばれるもので、このようなものが新聞に載っていたりします。例えば、「遺伝子治療」です。「薬剤治療」は、どちらかという新薬をいかにどう効率よく作っていくかという考え方です。そして、「細胞移植」です。このような未来医療みたいなものがありますが、この三つの枠組みを軽く解説します。

例えば、「遺伝子治療」です。先天性難聴が一つの疾患モデルだと思います。今回、幹細胞から有毛細胞を作ることができることを紹介しましたが、生まれつき難聴のマウスの皮膚を拝借してiPS細胞を作って、そこから有毛細胞を作ると、結局それは先天難聴の有毛細胞を試験管で再現できるということです。

先ほどは健常マウスですが、難聴マウスを使

いたい。これは一つの例で、シェイカー2というマウスですが、ミオシン15が欠損しているマウスです。これはヒトにも同じような疾患があり、DFNB3という遺伝性の難聴です。この疾患の方は、ミオシン15がないが故に難聴です。それと全く同じモデルがマウスに存在します。

有毛細胞を見ると、先ほど毛がきれいに立ち上がっていましたが、シェイカー2の有毛細胞では細胞の毛が小さい丸いものにしかありません。遺伝子のミオシンがない分伸びません。そのようなモデルに対して、ミオシン15Aを遺伝子導入してあげたという2005年の実験です。このような短い毛が遺伝子を入れてあげることで伸びてきて、天然のものに近い、本来の健常な状態に近い状態に戻るということが発見されました。

これを用いることで、例えば、マウスの難聴モデルのiPS細胞から作った有毛細胞を培養皿に作り、この遺伝子導入をしてやることで戻るといえることになれば、ヒトの治療に進む前の大事な一步目の研究になると思います。ほかにもいろんなモデルがあります。いろいろ候補があり、ここからiPS細胞を作ることを行っている最中で、そこからまだ治療には至っていません。まずマウスモデルのiPS細胞を作る。シェイカー2以外にも難聴があるマウスが存在しています。

マウスのあとは、ヒトです。ヒトのES細胞・iPS細胞から有毛細胞を作るのが、去年発表できたというところを話しました。では、その次の最終的な第三段階は何があるか。先天性難聴の患者さんからiPS細胞を作ります。それを培養皿の中で有毛細胞に分化させます。

例えば、肝臓や筋肉の病気の方から、検査のために細胞を頂くことは可能です。ただ、頭蓋骨の奥の方にあるヒトの内耳から「細胞をちょっとください」というのは、絶対に不可能です。同様のことが脳でも言えると思います。例えば、パーキンソン病の患者さんの脳の一部を検査に使うからということで拝借することはできませんが、このような方法を使うことで、今まで研究として用いることが全くできなかった患者さんの有毛細胞を研究することができる。さらに、いろんな治療が深まっていくのではないかと思います。こういうものは、バーチャルバイオシーと呼ばれています。採れないものを培

養皿で作るということです。

それから、移植実験です。これは軽く写真だけ見ますが、このような前駆細胞を内耳の中に注入します。ただ、先ほど脊髄の話がありましたが、ああいう固形臓器ではなく、耳というのは液体の中に膜がただ浮いているという非常にややこしい構造を持ったものです。例えば、細胞を入れても、このように空の中に残ります。なかなか目的のところに行ってくれません。そこに行ったとしても、とどまってくれない。あるいは、このように奇形腫を作ってしまうと、何の治療をしているのか分からないという状況になっていきます。移植実験は非常に難しい状態です。

最後に「薬剤治療」です。個人的には、これが究極のかたちではないかと思っています。恐らくあとの藤岡先生から詳しい話があるかもしれませんが、とにかく新しいタイプの薬を作っていくというのが究極ではないか。例えば、私自身、難聴を患ったとして、実際細胞移植や遺伝子、ウイルスを使って遺伝子を入れてもらいたいかという、やはり微妙なところがあります。でも、「この薬を飲んだら、難聴が治るよ」と言われたら、それは試してみたいかもしれない。

究極はこちらのほうにあるのではないかと思います。例えばですが、先ほど作った人工の有毛細胞をこのようにトレーの中に敷き詰めます。大手の製薬会社は何百万、何千万というようなドラッグのストックを持っているので、それをいちいち試していきます。例えば、新薬が耳に対する毒性があるかないかの検査にも用いることができますし、毒性を与えても、保護薬があれば治せるとなれば難聴の予防になります。

シスプラチンという抗がん剤で難聴になることが知られていますが、その前にこの予防薬を飲んでおけば難聴にならないとか、そういうことができます。究極は再生試験です。ダメージをうけてしまった有毛細胞に、ある薬を与えることで再生してくるといようなことをアメリカで進行中です。ヒトに対しての有用な薬がまだ出てきているわけではありません。

最後に、こちらに来る前にインターネットで、「難聴」、「再生」を調べると、やはり慶應大学が出てきます。いわゆる知恵袋で「難聴に悩んで

いる人は慶應大学に行けばいいでしょうか」という質問がありました。答えとしては、誰かが「まだですね」と書いていました。慶應大学はすごいなというところと、この質問は私たちも患者さんからよく聞かれます。今後10年で治らない難聴を治せるかと言われると、やはり難しいかもしれない。今後20年ぐらいでは何とか切り口が見つかっていければいいと考えています。

本日は、治すことが難しい難聴に、今後どのように対応していけるかということについて話しました。ご清聴ありがとうございました。

角田 ありがとうございます。どなたか質問はありますか。先生、どうぞ。

Q 一点、質問させてください。2013年1月頃に慶應の先生方のグループが、難聴、要するにブレーキをかけているものを薬で抑えられるという発見をしたと、私も報道で拝見しましたが、先生が今おっしゃっている創薬はまさにその部分のことでしょうか。

あと、もう一点お聞きしたいのは、10年では難しいかもしれない、20年であれば可能性はあるという話を伺いましたが、時間がかかっている一番の壁は何でしょうか。

大島 ご質問、ありがとうございます。一点目は私が答えるのが正しいかどうか分かりませんが、いわゆるノッチインヒビターという薬です。藤岡先生のペーパーで、ハーバードと共同で発表された論文だと思いますが、それがまさにその方向性です。細胞を入れるというのは、ほかの臓器ではあり得ると思いますが、内耳に関しては本当に難しい。だから、もともと内在性に存在している幹細胞を刺激して、薬でたたき起こして再生させる治療が今後望まれるのではないかと思います。

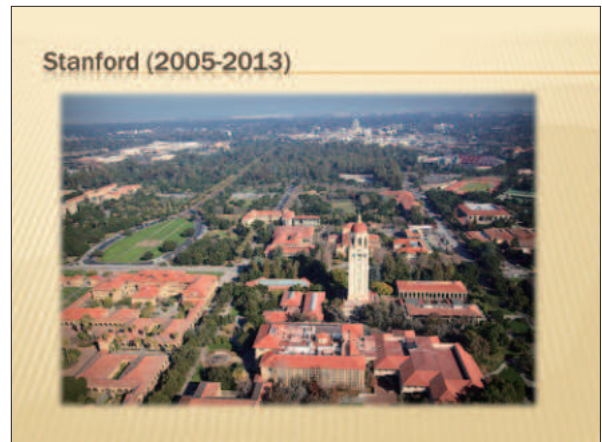
あと、タイムスパンの問題ですが、10年に一度ぐらいのブレークスルーがあるかどうかで続いているので、現状を見渡してもここ5年で何か大きく変わるか、当然あるとは思いますが・・・例えば、スタンフォードでは今後10年でこういうことに対しての治療法を開発していくと大看板をぶち立てていますが、きつめに言つての10年だと思います。でも、何とか希望的観測で、20年ぐらいで見つかってほしいと思っ言わせてもらいました。

この10年で大きく変わった内耳研究
内耳領域における
幹細胞研究の現状と
将来の展望

大阪大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
大阪労災病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科
大島一男

目次

- ✦ 内耳の解剖・聴こえのしくみ
- ✦ 内耳再生の研究 歴史的に
 - 再生するのかもしれないのか
- ✦ 再生とは？ 幹細胞とは？
 - ES、iPS など
- ✦ 最近の研究
 - 内耳から幹細胞へ
 - 幹細胞から内耳へ
- ✦ 臨床で遭遇する難治性難聴への応用は？
 - 突難・老難・先天難・ムンプス・メニエル 治療への応用



聴覚のメカニズム

蝸牛 コルチ器 (青色)

Dr David Furness, Monash University

http://www.witox.jp.co.jp/

有毛細胞の種類

蝸牛-外有毛細胞 (outer hair cells of cochlea)

前庭器の有毛細胞 (vestibular hair cells)

蝸牛-内有毛細胞 (inner hair cells of cochlea)

難聴

- ✦ 2億8千万人の聴覚障がい者 (WHO調べ)
- ✦ 先天難聴=1人/1000 出生
- ✦ 最も多い感覚器障がい
- ✦ 原因: 遺伝的背景、薬剤、騒音、加齢 etc
 - 内耳性難聴=有毛細胞の恒久的ダメージ

再生しない有毛細胞

Dr. Marc Lenoir, University of Strasbourg

Quiz ○か×かでお答えください

- ✓ ヒトの有毛細胞は再生しない
- ✓ 霊長類の有毛細胞は再生しない
- ✓ 哺乳類の有毛細胞は再生しない
- 爬虫類も有毛細胞は再生しない
- 鳥類も有毛細胞は再生しない
- 両生類？
- 魚類？

“有毛細胞の再生”についての研究の歴史

1981 → 1988

- 1981 サメ:出生後のHC発生 (Corwin JT 1981 JCN)
- 1988 鳥類:出生後のHC発生 (Corwin JT 1985 PNAS)
- 鳥類:音響外傷後のHC再生 (Corwin & Cotanche 1988 Science)
- 鳥類:音響外傷後のHC再生 (Ryals & Rubel 1988 Science)

“有毛細胞の再生”についての研究の歴史

1981 → 1988 → 1993

- 1981 サメ:出生後のHC発生 (Corwin JT 1981 JCN)
- 1988 鳥類:出生後のHC発生 (Corwin JT 1985 PNAS)
- 鳥類:音響外傷後のHC再生 (Corwin & Cotanche 1988 Science)
- 鳥類:音響外傷後のHC再生 (Ryals & Rubel 1988 Science)
- 1993 哺乳類 前庭:GM傷害後のHC再生 (Forge et al. 1993 Science)
- 哺乳類 前庭:GM傷害後のSC細胞分裂 (Warchol et al. 1993 Science)

“有毛細胞の再生”についての研究の歴史

1981 → 1988 → 1993

- 1981 サメ:出生後のHC発生 (Corwin JT 1981 JCN)
- 1988 鳥類:出生後のHC発生 (Corwin JT 1985 PNAS)
- 鳥類:音響外傷後のHC再生 (Corwin & Cotanche 1988 Science)
- 鳥類:音響外傷後のHC再生 (Ryals & Rubel 1988 Science)
- 1993 哺乳類 前庭:GM傷害後のHC再生 (Forge et al. 1993 Science)
- 哺乳類 前庭:GM傷害後のSC細胞分裂 (Warchol et al. 1993 Science)

再生するが、寂だめ。しかも、音響に感られる

有毛細胞は再生する！ ただし。。。

鳥類における有毛細胞の再生 J. Corwin 1988 Science

SCIENCE • VOL. 259 • 12 MARCH 1993

Ultrastructural Evidence for Hair Cell Regeneration in the Mammalian Inner Ear

Andrew Forge,* Lin Li, Jeffrey T. Corwin, Graham Nevill

なぜ、哺乳類の有毛細胞は再生しないのか？

- ✖ そもそも、再生の“種”となる幹細胞が存在しているのか？
- ✖ 存在しているとしたら、なぜ自発的に再生しないのか？

常にブレーキがかかっている？

Cell cycle inhibitor
Notch inhibition
E-cadherin
etc.


アクセルが壊れている？

Atch1
cAMP
etc.

内耳における再生医学

内耳の感覚器に幹細胞は存在するのか？

幹細胞



内耳

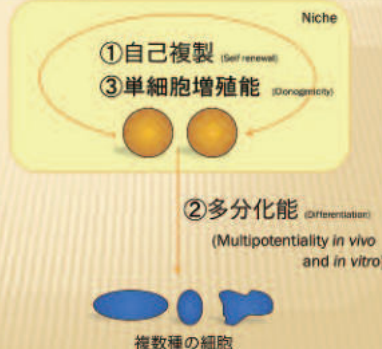


← 単離

幹細胞 STEM CELLS

1908年：ロシア人 Alexander Maksimov により、概念として提唱された

1960年代：骨髄・脳などから単離され始める



幹細胞の種類

- ▶ 体性幹細胞
 - 造血幹細胞
 - 生殖幹細胞 etc
- ▶ ES細胞
- ▶ iPS細胞




分化能


分化能	例
▶ Totipotency (全能性)	受精卵
▶ Pluripotency (多能性)	ES細胞、iPS細胞
▶ Multipotency (複能性)	皮膚幹細胞など
▶ Oligopotency (少能性)	
▶ Unipotency (単能性)	

Embryonic stem cells (ES細胞)

- ▶ 受精卵の内部細胞塊から作られる
- ▶ Pluripotent (全能性)
 - 3胚葉とも
- ▶ 倫理的問題
 - 受精卵由来であるため
- ▶ 移植の際に免疫的問題
 - 同種移植
- ▶ 安全性の問題
 - 癌化の危険性あり

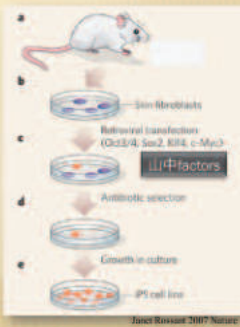


Embryonic stem cells (ES細胞)

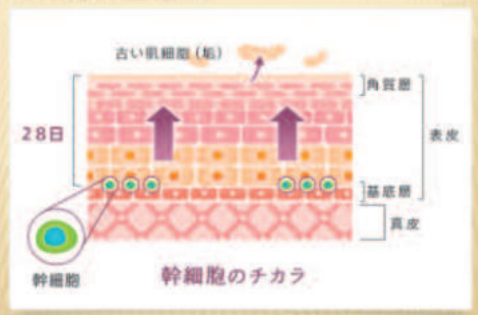


Induced pluripotent stem cells (iPS細胞)

- ▶ 2007年 山中教授
- ▶ 体細胞から作られる
- ▶ Pluripotent (万能性)
- ▶ 倫理的問題なし
 - 皮膚細胞などから
- ▶ 移植の際に拒絶反応無し
 - 自家移植
- ▶ 安全性の問題は残る
 - 癌化の危険性
 - ウイルスベクター使用

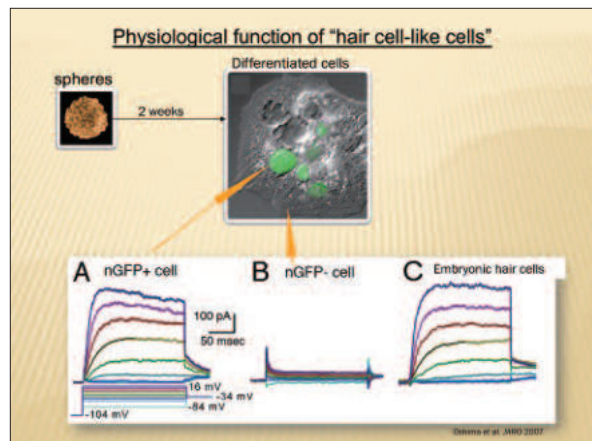
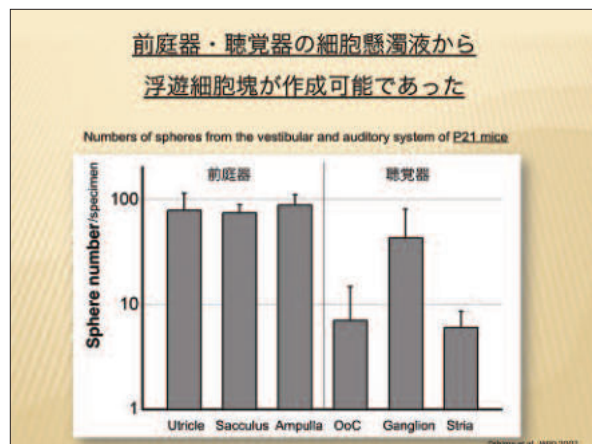
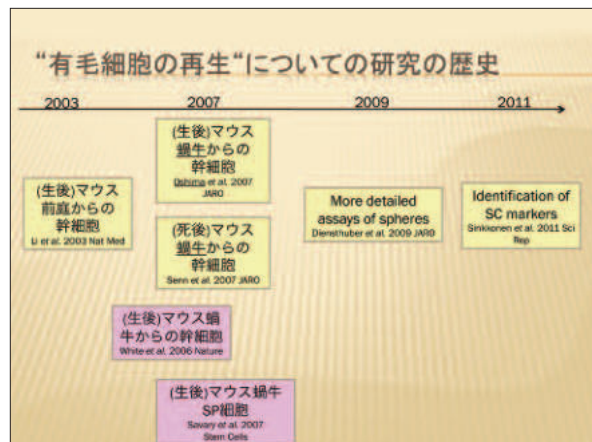
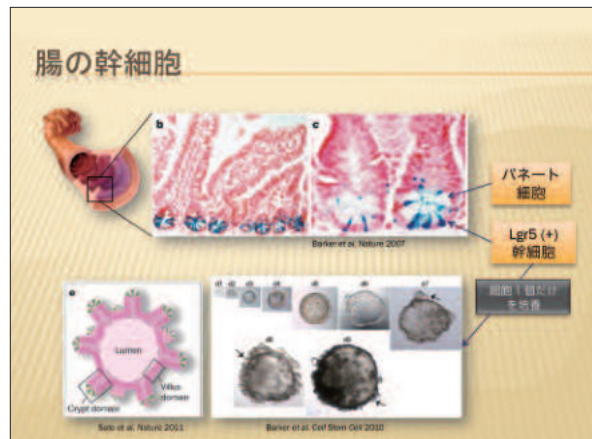
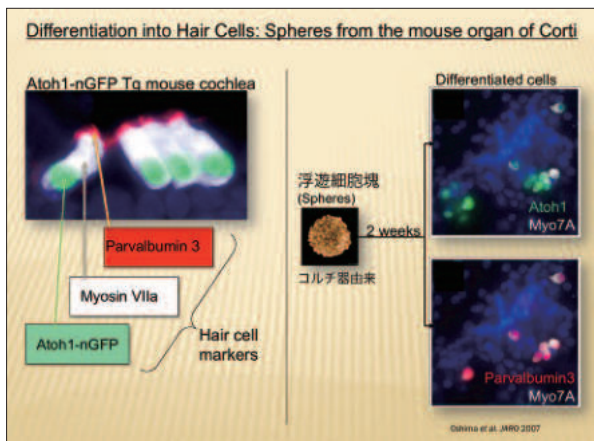
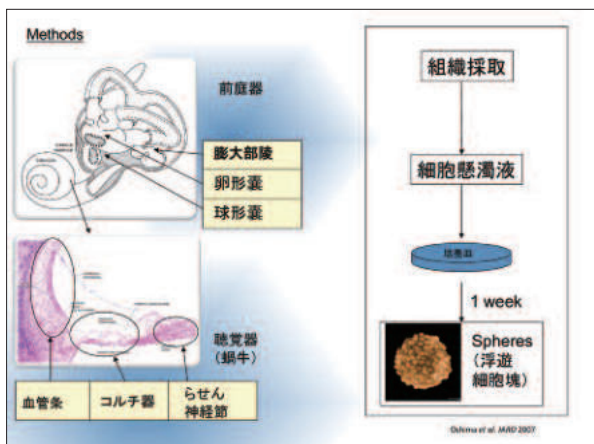
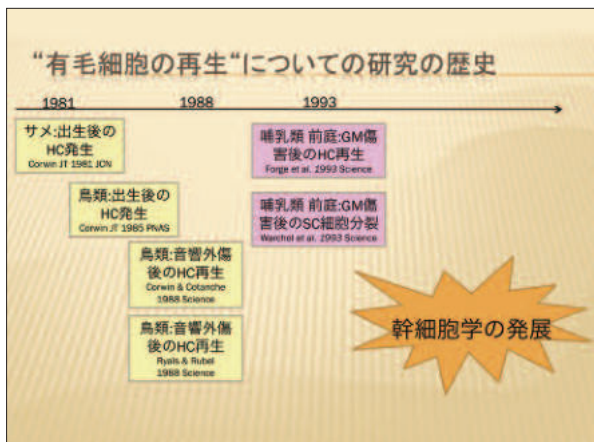
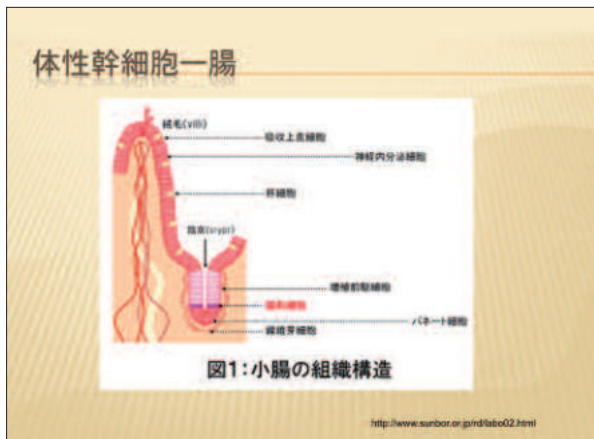


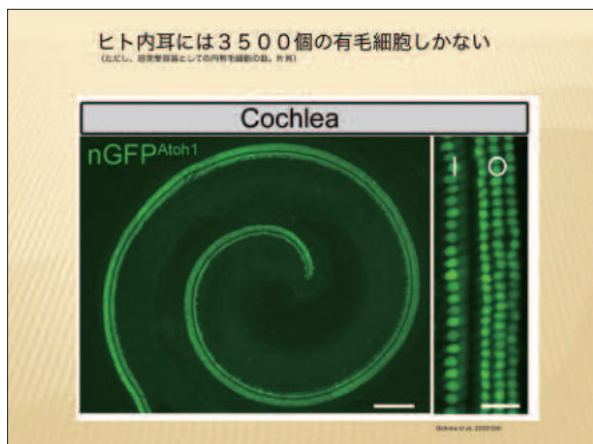
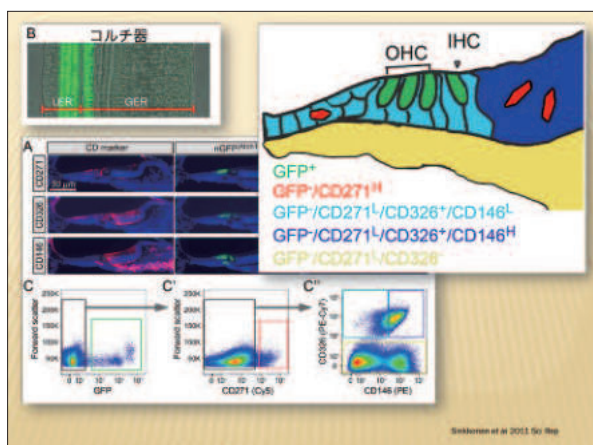
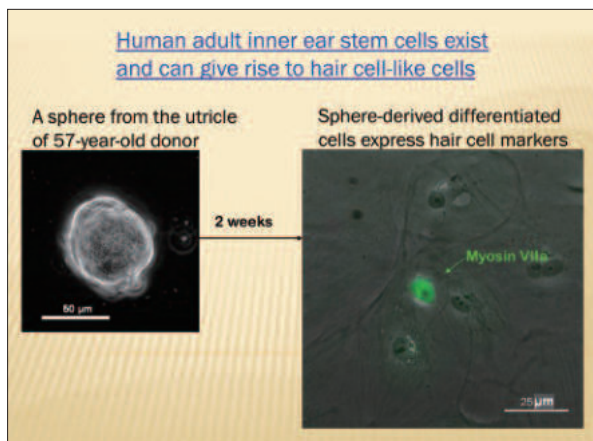
体性幹細胞—皮膚



幹細胞のチカラ

<http://www.menard.co.jp/stemcell/images/sec10img1.png>





幹細胞からの有毛細胞の作成

ES細胞などの幹細胞 → 培養皿上の有毛細胞

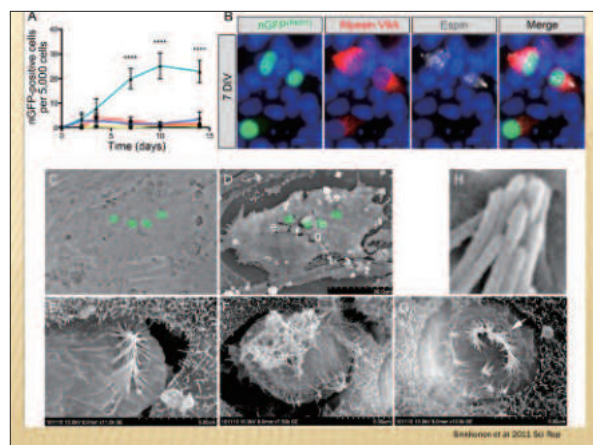
人工有毛細胞が作成できれば

- 有毛細胞の解析実験などに役立つ
- 移植治療などに使えるのでは？

人工有毛細胞は
形態的に
機能的に
天然の有毛細胞に相同であるべき！

内耳性幹細胞

- 内在性幹細胞が蝸牛に存在することは分かった
- では、どの細胞が幹細胞なのか？



内耳における再生医学
人工的に有毛細胞を分化誘導できるか？

幹細胞 → 分化誘導 → 内耳

“天然の”有毛細胞の形態と機能

Mechanosensitivity (機械電気変換能)

Cell

Mechanosensitive Hair Cell-like Cells from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells

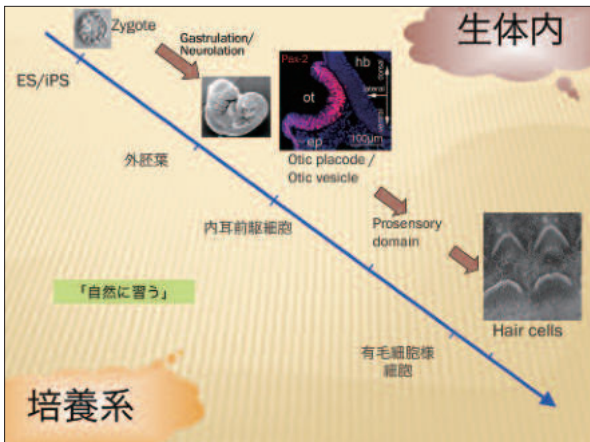
Kazuo Oshima,^{1,2} Kuryoo Shin,^{1,2} Marc Diensthuber,^{1,2,3} Anthony W. Peng,^{1,2} Anthony J. Ricci,^{1,2} and Stefan Heller^{1,2,4}

¹Department of Otolaryngology—Head and Neck Surgery
²Department of Molecular and Cellular Physiology
 Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305
³Present address: Department of Otolaryngology—Head and Neck Surgery, Goethe University Medical School, 80580 Frankfurt am Main, Germany
⁴Correspondence: hellers@stanford.edu
 DOI 10.1016/j.cell.2010.03.035

SUMMARY Probably the most suitable renewable source for the generation of sensory hair cells are pluripotent stem cells, such as embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) (Beisel et al., 2008; Briande and Heller, 2009). Whereas

Mechanosensitive sensory hair cells are the linchpin of our senses of hearing and balance. The inability of the

Oshima et al. 2010 Cell



Timeline: d0 (ES or iPS) → d5 (Floating, D/S/I) → d8 (Adherent, bFGF) → d20 (Co-culture with embryonic chicken utricular stroma cells)

Otic progenitors (耳性前駆細胞)

ES cell-derived

Control	D/S/I-treated

50 μm Pax2

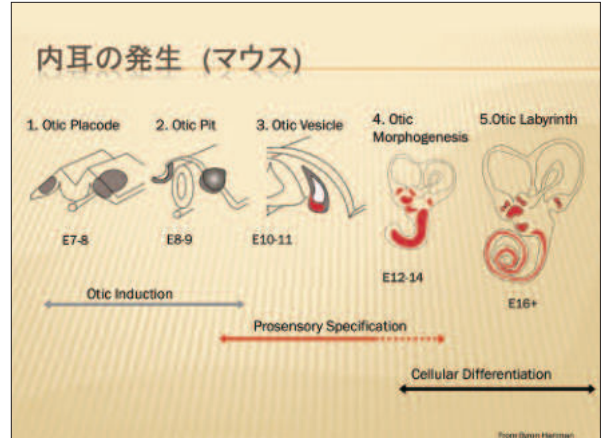
Oshima et al. 2010 Cell

有毛細胞"様"細胞 (SEM)

A: ES cell-derived

B: iPSC cell-derived

Oshima et al. 2010 Cell



Timeline: d0 (ES or iPS) → d5 (Floating, D/S/I) → d8 (Adherent, bFGF) → d20 (Co-culture with embryonic chicken utricular stroma cells)

ES細胞

Embryoid bodies + 外胚葉誘導

Oshima et al. 2010 Cell

Timeline: d0 (ES or iPS) → d5 (Floating, D/S/I) → d8 (Adherent, bFGF) → d20 (Co-culture with embryonic chicken utricular stroma cells)

"人工"有毛細胞

nGFP (nGFP)	Myo19a (Myo19a)	Merge
+Epc/ul	Myo19a (Myo19a)	Merge

Oshima et al. 2010 Cell

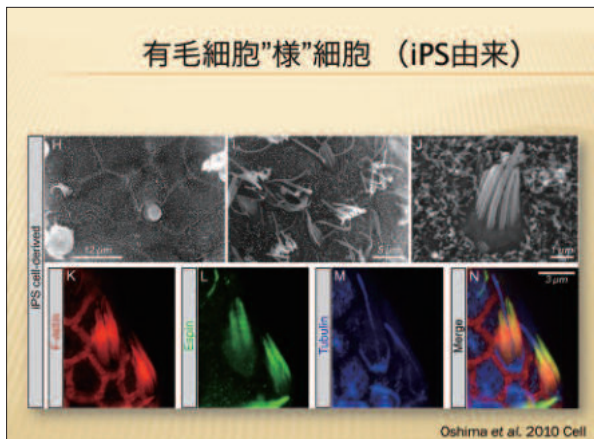
有毛細胞"様"細胞 (ES由来)

Stereocilia (不動毛) Kinocilium (動毛)

D: Pax2 E: Epc/ul F: Tubulin G: Merge

Oshima et al. 2010 Cell

有毛細胞”様”細胞 (iPS由来)



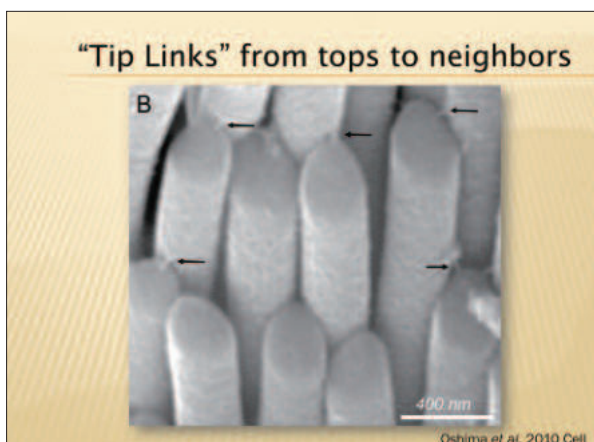
Oshima et al. 2010 Cell

“Lateral links” between stereocilia



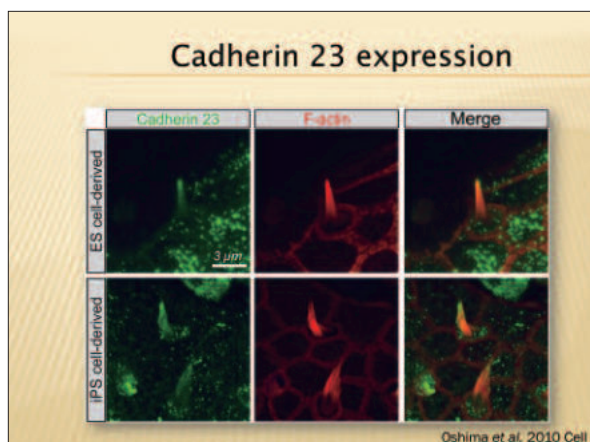
Oshima et al. 2010 Cell

“Tip Links” from tops to neighbors



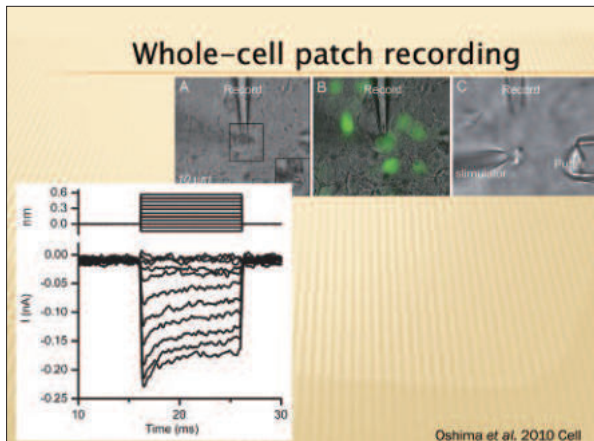
Oshima et al. 2010 Cell

Cadherin 23 expression



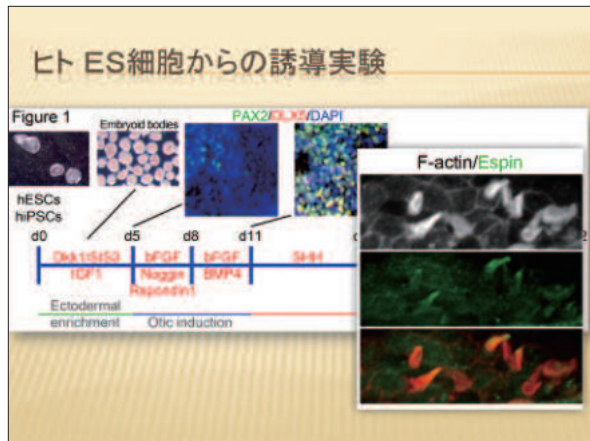
Oshima et al. 2010 Cell

Whole-cell patch recording



Oshima et al. 2010 Cell

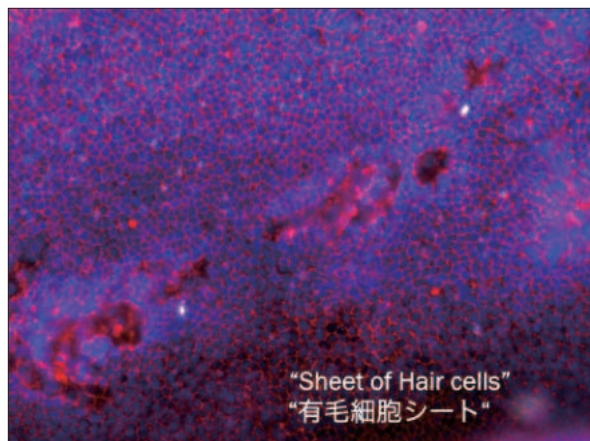
ヒト ES細胞からの誘導実験



ヒトES細胞からの分化






human embryonic stem cells (hESCs)



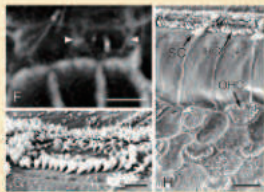
“Sheet of Hair cells”
“有毛細胞シート”



- ✦ 遺伝子治療  Gene therapy
- ✦ 薬剤治療  Drug therapy
- ✦ 細胞移植  Cell replacement therapy

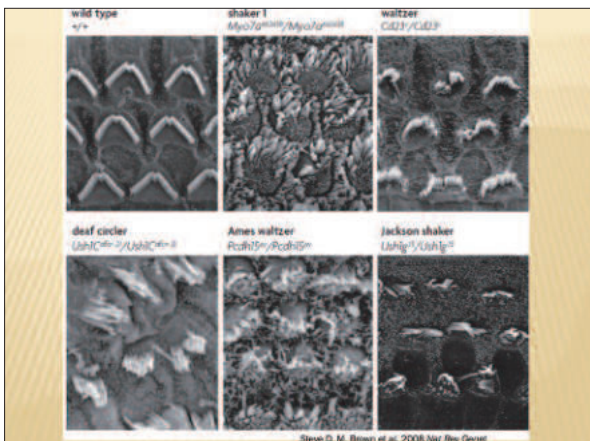
shaker2 mouse

- Myosin XVa mutation
- Homolog of human *DFNB3*
- Causes deafness and circling



Frank J. Probst et al. 1998 Science

Apical surface of an inner hair cell in a 1-month-old *sh2/sh2* mouse. Stereocilia were extremely short, and some were located away from the normal bundle site

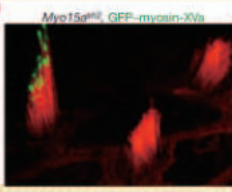


臨床上、対応が困難な難聴

- ✦ 突難
- ✦ 加齢性難聴
- ✦ 先天性難聴
- ✦ ムンプス難聴
- ✦ メニエル病
- ✦ 耳鳴

Project 1 先天性難聴への取り組み

- ✦ 今回開発したin vitroの系を疾病モデルに適用する
 - Aim 1: マウス難聴モデルからiPS細胞を作成し、有毛細胞様細胞へ分化させる



Inna A. Belyantseva et al. 2005 Nat Cell Biol

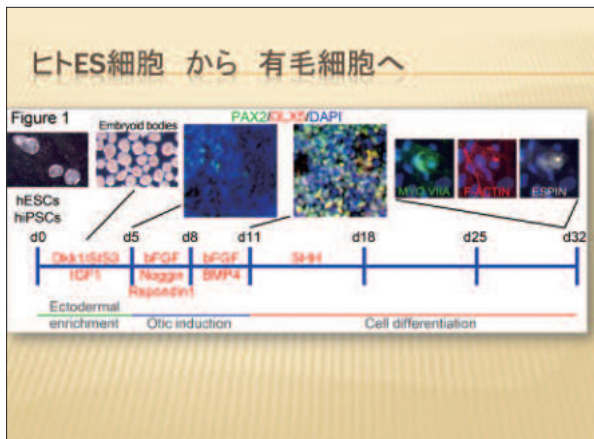
Restoration of the elongation and staircase organization of abnormally short hair cell stereocilia bundles in myosin XVa mutant mice (*shaker 2*) and whirlin mutant mice after gene gun mediated transfection of wild-type GFP-myosin XVa and GFP-whirlin, respectively (Belyantseva et al., 2005)

↓

This could be a good model of treatments for human hearing loss

Project 1

- ✦ 今回開発したin vitroの系を疾病モデルに適用する
 - Aim 1: マウス難聴モデルからiPS細胞を作成し、有毛細胞様細胞へ分化させる
 - Aim 2: ヒトES/iPS細胞から有毛細胞様細胞へ分化させるプロトコルを確立させる



Project 2

- ✦ 移植実験
 - ✦ Aim 1: マウス蝸牛に otic progenitor を移植する

- ✦ 毒性試験
- ✦ 保護試験
- ✦ 再生試験

The diagram illustrates the experimental workflow. Panel A shows supporting cells and sensory hair cells. Panel B shows the addition of a drug. Panel C shows the resulting cell structure.



Project 1

- ✦ 今回開発した in vitro 3D パーチャルバイオロジー

Project 1 aims to create hair cell-like cells from mouse ES/iPS cells. The process involves mouse ES/iPS cells, hair cell-like cells, and a final hair cell structure.

- ✦ Aim 3: 先天性難聴患者由来の iPS 細胞を作成し、有毛細胞様細胞へ分化させる
 - ✦ DFNB3 (Myosin 15)
 - ✦ DFNB1 (Connexin 26)

Project 3. Drug Screening 創薬への展開

- ✦ 有毛細胞再生・保護を促す薬剤のドラッグスクリーニング

Project 3 focuses on drug screening for hair cell regeneration and protection. The process involves drug screening, cell culture, and drug delivery.

- ✦ 遺伝子治療 Gene therapy
- ✦ 薬剤治療 Drug therapy
- ✦ 細胞移植 Cell replacement therapy

Acknowledgments

Stem Cells
Tzulu Amax-Células Madre-Cellules Souches

Stanford University Dept. of OHNS

Stefan Heller

Anthony Ricci

Kunwoo Shin

Anthony Peng

Marc Diensthuber

Kinuko Masaki

Veronika Starlinger

Saku Sinkkonen

Taha Jan

Byron Hartman

Support from NIDCD & California Institute for Regenerative Medicine (CIRM)

"With the right culture, I'll live forever"
"Si me cultivas, soid inmortel"

④ 遺伝性網膜疾患の 網羅的な病態解明への挑戦

国立病院機構 東京医療センター 感覚器センター 分子細胞生物学研究部 部長

岩 田 岳

岩田 本日は、われわれの研究の取り組みについて少し発表させていただきます。

これが眼球の構造です。皆さんご存じのように、光は外から入ってきて角膜を通過し水晶体を通過し、ここで光が収束されて網膜の中心部に光が届きます。ここに光を感じる視細胞というものが集中するようなかたちで存在して、ここで光が電気的なシグナルに変換されて脳につながります。閉鎖された気管ですが、非常に精巧に作られています。

ここでしっかりと屈折させて光量を調節させて、そして透明な状態を維持した組織を光が通過する。しかも網膜に達しても、この細胞が透明で光が視細胞にきちんと直角に当たる構造になっていて初めて機能するという、非常に精巧なものです。こういったものに対して再生するとか新たに作るというのは、「夢のまた夢」でしたが、最近の動向を見ると、再生医療の中でも眼科の分野が最も進んでいるということで、そういった話も含めて少し紹介したいと思います。

本日は、われわれの研究ではありませんが、眼科に関連する研究の紹介と、最後に私たちの実際の具体的な研究例を挙げて、iPS細胞を使った研究について報告させていただきたいと思います。

私は網膜をやっているのですが、網膜に絞らせていただきますが、このようなES細胞・iPS細胞から網膜細胞を作る、もしくは網膜の組織を作るということが、ほかの再生に比べてすごく速いペースで仕事が進んでいます。一つの理由としては、網膜は神経細胞で、神経細胞は比較的分化させやすい。放っておいても神経細胞になるというぐらい、神経細胞にはなりやすいということです。そういったことから、分化誘導がなされています。

そういう組織を作って、臨床試験に進もうとしているところですが。またiPS細胞そのもの、もしくはiPS細胞から分化誘導された細胞を使って薬をスクリーニングする。先ほどの3人の演者の方が言われていたような方法で、薬のスクリーニングにもどんどん利用されているということで、非常に利点があります。

やはり耳と同じように、目の患者さんから、「目を一部ください」とか、バイオプシー（生体組織診断）で「ちょっとください」ということが、目の場合には絶対できません。あえて間接的に、iPS細胞から網膜の細胞もしくは網膜の組織を再生して、それを実験に利用するというかたちがやはり今後主流になっていくでしょう。この価値の大きさは、マウスモデルを作るとか動物モデルを作るのに匹敵するぐらい、非常に大きなものであるとわれわれは感じています。

慶應大学の福田恵一先生が作られた手法ですが、患者さんが病院に来られて、リンパ球からiPS細胞を作る。そしてそれをわれわれの研究室で分化誘導してさまざまな細胞を作って、その機能解析をやって、薬とかを病院に還元するというそのサイクルが、すなわち理想的なサイクルではないかと考えます。これは山を登るかたちで、分化された細胞がiPS細胞という手法によって幹細胞になって、さらにほかの細胞へと分化誘導させられるという研究手法が編み出されたということなのです、これによりわれわれはいろいろな実験が可能になりました。

既に新聞などでご存じだと思いますが、網膜のいろんな細胞が作られています。これはロドプシンです。詳しく言うと杆体細胞かんたいが発現する、光を感じるロドプシンが発現している細胞があります。これは赤や緑のオプシン、青のオプシンを発現する細胞です。ここには網膜色素上皮

細胞が ES 細胞から分化誘導されるという報告が、2008年には既にされていました。

さらに笹井芳樹先生によって、マウスの ES 細胞から眼杯がほぼ完全な網膜の形で作られることが、2011年に発表されました。これはマウスでしたが、次にヒトで同様に組織が作られるということで、日本、それから一部アメリカですが、日米の非常に限られた研究グループによって、一気にこの辺の研究が進んでいったということです。特に日本での発展がすばらしいと思われま

す。その組織だけではなく、個別の細胞に分化誘導させて、その細胞だけを特に研究したいという場合、始まりは一緒ですが、特定の細胞に誘導をかけて、視細胞の、例えば Crx などを発現する細胞を作っていく。これは視細胞のマーカーですが、視細胞だけを作るような誘導をかけていくという手法です。

最近では、成育医療研究センターの東 範行先生のグループが、網膜神経節細胞を特異的に作っていくという手法で、iPS 細胞にこのような誘導をかけて、比較的均一な神経節細胞をかなり高い確率で大量に作成しています。それをまた、臨床や創薬に向けて使っていく手法も生み出されています。基礎研究者たちは、こうやってお互いにどんどん情報を交換し合って、利用し合って、さらにどんどん仕事が進んでいくということです。

これをまとめると、現在、全体の組織を作ることかなりできるようになっています。網膜全体を組織として作ることもできますし、網膜色素上皮細胞、杆体、錐体細胞、神経節細胞とか、細胞を個別に iPS 細胞もしくは ES 細胞から作ることも可能になり、眼科はどちらかという非常に進んでいて、材料が手に入りやすい状況にあると思います。特にわれわれはこういった細胞を使って機能病態解析をやっています。それぞれの変異やその病気の原因が根本的に何にあるのかということと、その細胞を使ってのスクリーニングもやっています。

先ほども梅澤先生からも話がありましたが、オクタセラピューティクスという会社が、スタルガルト病用もしくは加齢黄斑変性用ということで、ES 細胞から網膜色素上皮細胞をシート状に作成して、これをばらばらにして網膜下に入

れるということで、フェーズ II の段階に入っています。これには、米国、英国、韓国も参加しています。

これに対して理化学研究所の高橋政代先生らは、iPS 細胞から細胞をシート状で網膜下に入れるということをやっています。また、前臨床試験としては、ES 細胞などで作った視細胞を分離して、その視細胞を網膜に入れていき、そのとき、その細胞はただそこにとどまるのかというと、実はそれは細胞の中で自ら動いて、特定の正しい位置に動いていくというのを報告した論文が発表されています。

さらにこれは高橋先生のマウスの実験ですが、rd マウスというのがあります。このマウスに対して眼杯を作って、眼杯の網膜の層を、変性した網膜と色素上皮細胞の間に擦り込ませる。そういったかたちで接続が行われるかどうかを調べた結果、神経細胞はきちんと接続されて安定しているという研究報告が発表されています。このような研究が、のちに色素変性症とか網膜の変性症に対して、網膜そのものの層をそのまま入れてしまうという臨床試験が、多分、数年後には始まるのではないかと思います。

今までの話は、iPS 細胞や ES 細胞などを外部で作成して、それを網膜に戻したり眼球の中に戻すという話でしたが、もう一つの動きとしては、網膜内に存在する細胞の中で、再生能力を持っているものがあります。そういった内部に存在する再生能力のある細胞を活性化させて、治療に応用できないかという方向の実験もなされています。

これは、眼杯が作成される発生段階の様子を表しています。この際に網膜の最も先端の部分、シリアリー・マージナル・ゾーンという網膜の先端です、ちょうど網様体と網膜の間ぐらいのところ、この赤色の位置です。この赤い位置が網膜幹細胞として機能していることが、両生類や魚類では分かっています。そして、この黄色い部分から発生した細胞がどんどん分化して網膜へと変性していきます。こういった能力が両生類や魚類には存在します。

ところがそれが鳥類になると、その機能が非常に限定的になってきます。そして、哺乳類になるとほとんどそういった機能がなくなってしまいうということで、動物の進化が進むに従って

そういった再生能力がどんどんなくなっていく。これを何とか逆の方向にいけないかというのが、一つのアプローチです。また、この網膜の中に、ミューラー細胞というのがあります。これは発生段階では一番最後に表れる細胞で、神経と神経の間を埋めるようなかたちで膜の垂直方向にある存在で、体積的には非常に巨大なグリア細胞です。

このグリア細胞は、網膜に障害が起きたときに、いったん増殖を始めて、ある程度増殖してからほかのいろいろな細胞、神経細胞やグリア細胞に分化誘導される。しかも自然にそれが起こるといことが知られるようになりました。これはゼブラフィッシュという魚ですが、このミューラー細胞から傷害を受けるといったん増殖しますが、それがいろいろなものに分化していった、ゼブラフィッシュにおいては、それが杆体細胞や錐体細胞、水平細胞、双曲細胞、アマクリン細胞、ミューラー細胞、そして神経節細胞へと分化します。ゼブラフィッシュではほとんどの網膜を構成する細胞のすべてに分化誘導されるのに対して、これがニワトリになると、神経節細胞や、水平細胞、双曲細胞に限定されていき、最終的に哺乳類になると、これだけの細胞に限定されることになってきます。

やはりここで種の大きな差がありますが、これを何とか改善できないか。要するに、人間にこのゼブラフィッシュの機能を持たせることはできないかということを考えます。ゼブラフィッシュにおける網膜の再生のパスウェイがこれです。ここで詳しくは説明しませんが、増殖系をずっと見ていくと、ASCL1（アスコルワン）という遺伝子がありますが、この遺伝子が極めて重要なファクターで、この遺伝子から分化誘導がかかっていくことが、長い研究によって分かっています。このASCL1を高発現した場合に、哺乳類でも神経細胞を誘導することができないかという実験が行われました。

これがその実験です。ASCL1をマウス、哺乳類に遺伝子導入して、その結果双曲細胞を作ることができました。これはここまでですが、さらにこれらの遺伝子の組み合わせをうまくすることにより、またタイミングをずらすことにより双曲細胞以外の細胞に関しても、自分の細胞を使って再生できるようになってくるのではな

いかと考えています。

われわれは、遺伝子と網膜疾患に関する関係をこの十何年間ずっとやってきました。その中でも、本日は二つの病気について説明します。一つは緑内障という病気で、日本では失明率が一番高い病気です。この中でも遺伝性のもので、しかもOPTN（オプチュニューリン）という遺伝子異変によって起こる正常眼圧緑内障というケース、それからもう一つが加齢黄斑変性で、これは西欧人に非常に失明率が高い。先週もアメリカに行っていましたが、アイルランド人と話をすると失明率の25%が加齢黄斑変性ということで、非常に失明率の高い病気です。この二つについて説明します。

緑内障に関しては、ここにいる先生方については説明する必要は全くないと思いますが、これまでに幾つかの遺伝子が報告されています。この中で特にわれわれが注目しているのは、OPTNという遺伝子で、このOPTNの遺伝子変異が非常に再現性よく緑内障を起こすことが報告されています。そのほかには、染色体1番のミオシリン（MYOC）の遺伝子、チップ1B、WDR36です。この辺の遺伝子に関しては比較的再現性が高いということで、緑内障の場合はその遺伝子変異を入れれば、緑内障を再現できるということで非常にいいモデルとして利用されています。

OPTNは、2002年にマンソー・サルファラージーによって発見されました。いろいろな変異が報告されて、いろいろな論文が発表されていますが、結果的には50番目のアミノ酸置換が最も重篤になることが確認されています。われわれも岐阜大学との共同研究によって、3世代の家系を得ることができました。この方々のDNAでiPS細胞を作成して実験に利用させていただいています。

このOPTNというのは、細胞の機能としてはゴルジ体と言われていますが、細胞の膜にたんぱく質を分泌させるときに、細胞内の顆粒、細胞小胞顆粒を移動させるためのメカニズムの一つの遺伝子として発表されています。ここにゴルジ体があって、ミオシリンのフィラメントがありますが、このような構造を経て、OPTNはゴルジ体から小胞顆粒を細胞の膜へと移動させるという重要な役割があります。E50Kというのは、

ちょうどこの辺にあたるところで、こういった機能が失われることが分かっています。

もう一つ、OPTN の重要な機能としてはオートファジー機能で、細胞内のたんぱく質を集中的に分解させる機能です。これもやはりオートファゴゾームと言われる顆粒ですが、これの外側と内側に OPTN は存在しており、外側は先ほどの図と同じようにミオシン A と結合しながら、内側はユビキチン化されたたんぱく質と結合します。そして、これを最終的にライソゾームと融合させて内部のたんぱく質を分解させるという、基本的なところにも関与しています。緑内障とオートファジーの機能が最近注目されるようになったのは、OPTN という遺伝子変異が見つかったからです。

この OPTN は、マウスでインサイチュー (in situ) と言って、メッセンジャー RNA がどこに発現しているかを見ると、網膜全体に実際は発現していることがわかります。われわれは、網膜全体で発現するように、人間で知られている変異体とか人工的に作った変異体を幾つか入れてみた結果、やはり E50K が最も重篤な網膜変性を起こすことが分かりました。それを追求していった結果、この赤いドットはその変性たんぱく質が発現すると、どこで細胞死が起こっているかを示しています。青い部分は細胞死が起きている細胞で、こういった場所に集中していることが分かります。

さらにこのマウスの電顕像を見ると、外網状層が正常なものに比べて非常に薄くなっていて、上部の構造についてもかなりおかしくなっています。さらに網状層を免疫染色すると、たんぱく質が蓄積しているような様子が見られました。ということで、この辺を集中的に見ていこうということになりました。

これを再現するために、われわれは iPS 細胞をこの患者さんから作りました。結果的に、これは世界で初めて緑内障患者から作られた iPS 細胞ということになり、非常に注目されました。当時はこの細胞というのはそれほどできませんでしたが、さらにわれわれは、この iPS 細胞から一般的な神経細胞の誘導をかけました。これも世界で初めて緑内障患者さんから神経細胞を誘導させることになりました。

それで何が分かったかということですが、こ

れは OPTN が正常で、これは変異体だということです。明らかに細胞内での局在が凝集していることが、ここで分かると思います。さらに拡大して、緑色の部分が OPTN で、正常だと広範囲に発現していますが、局在が非常に集約されています。この原因は、ここにこのように沈殿していることです。これは iPS 細胞で、E50K を持っている患者さんと正常な患者さんです。

残念ながら iPS 細胞のレベルでは、OPTN はあまり発現しませんが、神経細胞に誘導させるとちゃんと発現します。しかも E50K を持っている人は、沈殿が多い。変異体は細胞内で沈殿しているのですが、何で沈殿しているかを調べるために、正常体と変異体が細胞内でどのようなたんぱく質と結合しているかを調べます。

このスライドの中で注目してもらいたいのは、正常なものはここにバンドが特異的にあるということです。これは OPTN、すなわち正常な OPTN は正常な OPTN と結合しているということです。これが変異体になると、全然違う TBK1 というカイネースに結合するということが分かりました。この変異体は、TBK1 と強く結合することによって沈殿することが分かりました。

そこで調べてみると、TBK1 には活性を阻害させる BX795 という薬が市販されていて、BX795 を実際細胞に入れて、沈殿をレスキューさせることができるかという実験をやってみました。これがその結果です。1 倍量、10 倍量と入れていくと、沈殿がなくなっていく。このように沈殿があったものがどんどんなくなっていったら、上澄み層に出ていきます。

もしかしたら、この BX795 が E50K の患者さんに役立つのではないかと。ただ、BX795 という薬は毒性があるかどうか全くわからなかったので、BX795 に類似する機能で、既に安全性が確認されているような薬がないかというのを、この 3 年間か 4 年間、われわれは聞いて回っていました。

ついに最近、FDA (アメリカ食品医薬品局) で既に承認されている薬の中で、BX795 と同じ性質を持っている薬があることが、わかりました。実はオーストラリアの人に教えていただき、それを早速手に入れようとしているところです。同じような効果があるようなら、この細胞、それ

からノックインマウスがあるのでそのノックインマウスで確認して、もしそれでうまくいけば、日本での治験を始めていこうと考えています。

この TBK1 というのは、実はほかのグループで、コピー・ナンバー・バリエーション (CNV) という、遺伝子が複数存在する人がいます。この遺伝子を複数持っている人たちは、なぜか正常眼圧緑内障になっているという報告が三つほど発表されています。これは OPTN と結合するたんぱく質との関係によるもので、明らかになった緑内障のパスウェイとしては初めてのことで、この辺りは、これから非常に面白くなっていくのではないかと思います。

二つ目は、加齢黄斑変性です。特に日本人の場合には、浸出型と言って、脈絡膜から血管新生が網膜へと突出してくる病態が非常に多い。欧米では、ドルーゼンというものが蓄積されて、色素上皮細胞が浮いた状態で、分子の透過性が低下して視細胞が障害されていくという萎縮型があります。特に日本人に多いこの遺伝子に関してわれわれは注目しています。

加齢黄斑変性は多因子疾患と言われるもので、いろいろな因子が関係していると言われていますが、特に遺伝子に関しての関与が非常に強いです。これは、数万人規模で患者と健常者の全ゲノム関連解析というものをやった結果です。この X 軸は染色体 1 番から 22 番、そしてこの縦軸はピーチを表していて、ログ係数になっていて、「0.05」でピーチが低い、相関性があるということです。非常にピーチの低い 2 ヶ所が、染色体 1 番と 10 番に存在するということが既に分かっています。

特に日本人の場合に、われわれがやる染色体 10 番のところに強く相関して、この領域は ARMS2 と HTRA1 という二つの遺伝子の間に相関しています。この 5 年間ぐらい、アメリカを中心としてどちらの遺伝子が本当に関与しているか激しい議論がありました。それに対して、われわれが今年の 1 月頃に出した論文によって、恐らく決着がついたのではないかと考えています。

この二つの遺伝子は、染色体 10 番の ARMS2 のエクソン 1 番と 2 番、HTRA1 のエクソン 1 番、そしてこの後ろに 8 番までありますが、この短い領域に強く相関しています。この間を全部サンガーシーケンス、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)

とシーケンスによって、226 人の白内障に対して加齢黄斑変性 228 人を解析すると、大きなインサクションとデリション、つまりわれわれが「インデル」と呼んでいる大きな核酸の変化がここに存在するということが分かりました。

従って、滲出型加齢黄斑変性の原因は、この赤い部分にあります。まず遺伝子がどこに発現しているのを見ると、視細胞に発現しています。でも、視細胞で転写されて内接と外接に移動している。そのようなたんぱく質であることが分かります。

このインデルというシーケンスを持つと、色素上皮細胞では正常な配列とインデルの間では転写活性は変わりません。しかし、神経細胞由来の細胞を使うと、軒並みインデルを持っていると、どんと転写が上がっていくことが分かりました。これを患者さんの iPS 細胞で確認すると、赤い印が付いているのが加齢黄斑変性の患者ですが、やはり高いレベルを持っている人たちが加齢黄斑変性になっています。ある程度の閾値を超えると加齢黄斑変性になっていることが、この iPS 細胞のレベルでも分かりました。

これの転写領域をいろいろ調べてみると、普通の方はこのように抑制因子がこの 2 ヶ所に付いていますが、一方それがインデルを持っている人では、全く同じ配列で、ここに促進因子が新たに付いているということが分かりました。それをわれわれは同定して、論文にしました。

さらにこの遺伝子が高発現されるとどうなるかということ、実際この遺伝子 HTRA1 を高発現するマウスと、全く変異なしでただ正常体を高発現させるマウスを作ると、人間と同様、血管新生が出てくるマウスが作られました。これはすなわち HTRA1 の活性を阻害すればいいだろうということで、現在、こういった研究から HTRA1 を阻害する薬の開発もやっています。

ということで、本日は、ES 細胞・iPS 細胞の最近の網膜の利用のされ方を紹介して、また、網膜内の内在性の幹細胞を使って再生させるという試み、そしてわれわれの具体的な話として、正常眼圧内緑内障と加齢黄斑変性について話しました。これは特にいろいろな先生方にご協力いただいていた研究であるとともに、たくさんの方の研究者、それからファンディングでご支援いただきました。ご清聴どうもありがとうございます。

ございました。

角田 どうもありがとうございました。フロアから質問はありませんか。一つだけ、こういったiPS細胞等を使って疾患の原因の究明とか薬剤に対する感受性とかを調べる方向が、これから非常に重要になっていくと思います。先ほど成育医療センターで神経節細胞の軸索ができたというニュースが非常に話題になり、要するにそれだけ実際の組織と同じような形で完全に分化させるのが、iPS細胞からでも非常に難しい。ある程度の近いものができて、完全なものではないということだと思いますが、薬に対する感受性を調べるのに、どの程度完全に分化させて本当の生体の機能に一致したような組織に分化させる必要があるのか、先ほどのOPTNの話ですが、どの程度だったら妥協できるのでしょうか。

岩田 もちろん完全なものが欲しいわけですが、そこに至らなくても大体の感覚的なものは得ら

れると思います。例えば、われわれが分化誘導したあのレベルの神経細胞であっても、やはり実際、その遺伝子変容を別の細胞に入れたときと同じような効果が見られています。ある程度は実験できるということは分かりますが、もちろん最終的には、多分、動物モデルで確認することは必要になってくるかもしれません。

角田 機能の一面を捉えて注目すれば、それで十分だということですね。

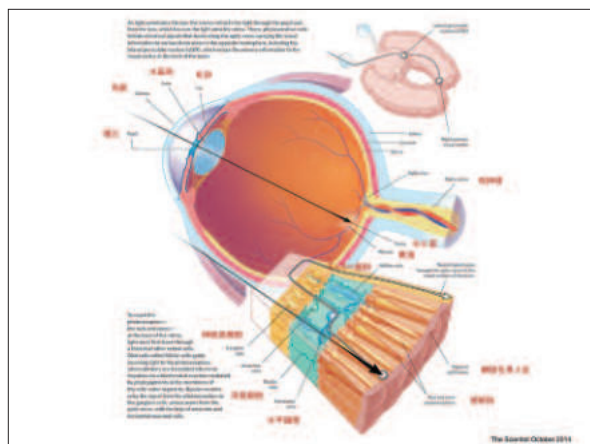
岩田 生体内できちんと機能しているということが、多分重要だと思います。でも、スクリーニングにはそれほど必要ではないと思っています。

角田 ほかによろしいでしょうか。眼科の研究としては、実際の移植以前にこういった基礎的な研究が、これから非常に大きく注目される領域ではないかと思っていますので、ますますいい成果を期待しています。どうもありがとうございました。

1



2

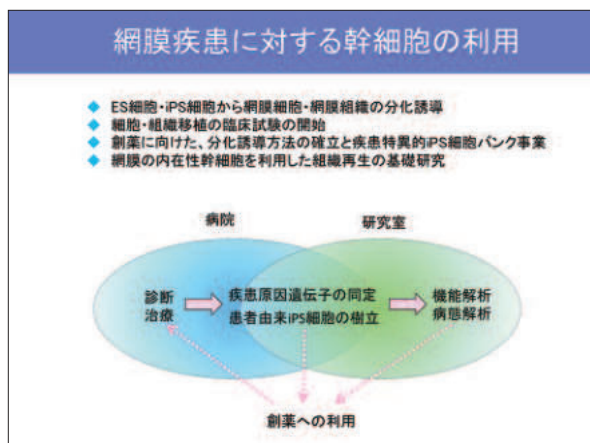


3

遺伝性網膜疾患に対する幹細胞の利用

- ES細胞・iPS細胞から網膜組織・各種網膜細胞への分化誘導
 - 1) 細胞移植・組織移植への利用
 - 2) 患者由来iPS細胞を利用した病態解析
 - 3) 創業に向けた利用
- 内在性幹細胞による網膜再生現象とその応用
- 遺伝性網膜疾患の病態解明への応用
 - 1) 正常眼圧緑内障原因遺伝子オプチヌリン
 - 2) 加齢黄斑変性感受性遺伝子HTRA1

4



ES・iPS細胞から特定細胞の分化誘導

多能性幹細胞

分化誘導

iPS細胞誘導

血液・皮膚の細胞

分化細胞

From C.H. Waddington

細胞: 神経幹細胞・ドーパミン神経細胞・エナメル芽細胞・心筋細胞・赤血球・軟骨細胞・肺胞細胞・膵島細胞
 立体組織: 網膜・大脳皮質・毛包・内耳・腎組織・肝臓・腸・甲状腺

特定の網膜神経細胞の分化誘導

視細胞

網膜神経節細胞

桿体錐体層

Genozko-Cordano et al. Nature Biotech, 2013

Imoto et al. Scientific Reports, 2015

分化誘導細胞の移植

臨床試験

前臨床試験

Schwartz et al. Lancet (2002)

Awatramani et al. Stem Cell Reports (2014)

理化学研究所
厚生労働省
日本てんとう虫研究会
てんとう虫研究会

理化学研究所ホームページより

網膜の内在性幹細胞

OMC (Olfactory Mucosa Cell) (嗅細胞由来)

OMC-like Body (毛様体)

両生類・魚類

成体でも毛様体近縁部に前駆細胞が維持される

鳥類

短期間毛様体近縁部に前駆細胞が維持される

哺乳類

毛様体近縁部は失われる

脊椎動物の眼の発生

眼杯

眼胞

網膜の幹細胞

Mitchell et al., Int. J. Dev. Biol., 2004

幹細胞から網膜細胞・組織への分化誘導

幹細胞から網膜細胞・組織への分化誘導

網膜細胞への分化誘導

網膜色素上皮層

網膜組織への分化誘導

ヒトES細胞由来網膜組織

Genozko et al. Nature, 2013

Miyake et al. Cell Stem Cell, 2012

ES/iPS細胞からの分化誘導が可能に

分化誘導細胞の移植
 変異を持つ細胞を用いた病態解析
 薬剤スクリーニング

遺伝性網膜疾患に対する幹細胞の利用

ES細胞・iPS細胞から網膜組織・各種網膜細胞への分化誘導

- 1) 細胞移植・組織移植への利用
- 2) 患者由来iPS細胞を利用した病態解析
- 3) 創薬に向けた利用

内在性幹細胞による網膜再生現象とその応用

遺伝性網膜疾患の病態解明への応用

- 1) 正常眼圧緑内障原因遺伝子オプチニューリン
- 2) 加齢黄斑変性感受性遺伝子HTRA1

ミュラー細胞の分化能

Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina

ミュラー細胞

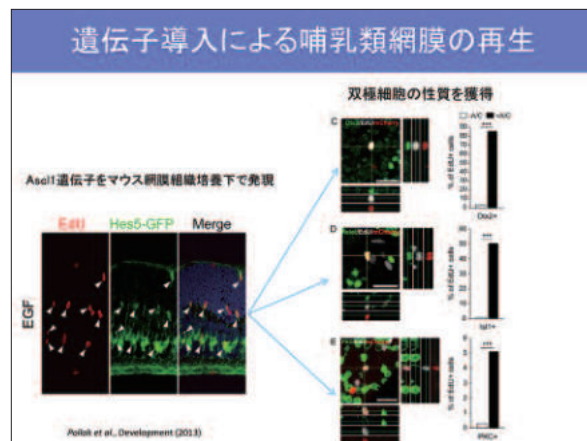
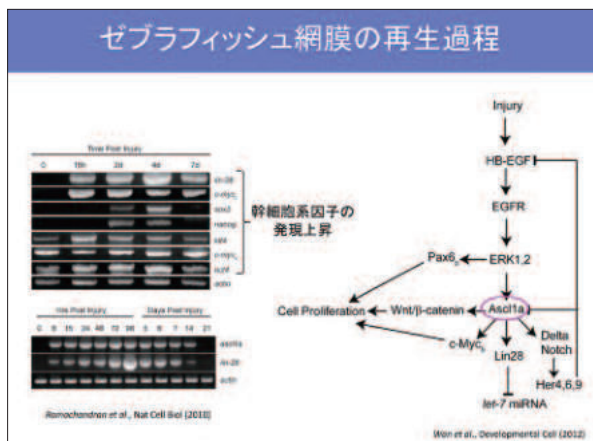
網膜への移植によって前駆細胞化する

Richter and Reh, Nature Biotech., 2001

Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina

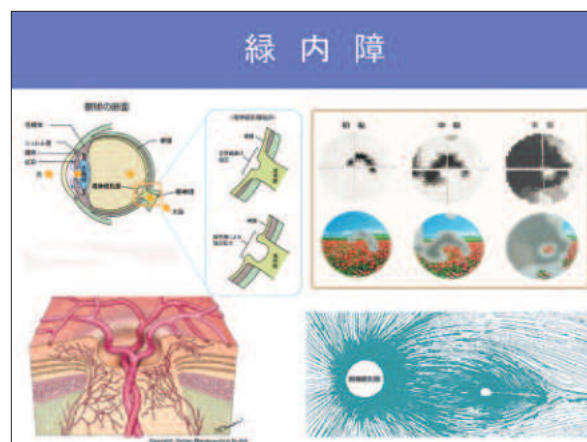
Stimulation of neural regeneration in the mouse retina

Winkler, Department of Retinal Neurobiology and Ocular Pathology, University of Bonn, Germany



遺伝性網膜疾患に対する幹細胞の利用

- ES細胞・iPS細胞から網膜組織・各種網膜細胞への分化誘導
 - 1) 細胞移植・組織移植への利用
 - 2) 患者由来iPS細胞を利用した病態解析
 - 3) 創薬に向けた利用
- 内在性幹細胞による網膜再生現象とその応用
- 遺伝性網膜疾患の病態解明への応用
 - 1) 正常眼圧緑内障原因遺伝子オプテニューリン
 - 2) 加齢黄斑変性感受性遺伝子HTRA1



家族性の緑内障と遺伝子

Table. Chromosomal Locations of Genes Associated With Glaucoma

Chromosome Location	Condition	Gene (Name)	Inheritance Pattern
1q27	Early-onset adult-onset POAG	GLC1A (MPD3)	Early-onset; AD
1p36	Congenital glaucoma	GLC3F	AR
3q21	Congenital glaucoma	GLC3A (DPH1B)	AR
3q21-q4	Adult-onset POAG	GLC1F	AD
3q27	Adult-onset POAG	GLC1C	AD
4q25	Regier syndrome	REG1 (PVC2)	AD
5q22	Adult-onset POAG	GLC1G (KFSB2)	AD; complex
6p25	Hemiplegia	HR23F (FDR2)	AD
7q31	Adult-onset POAG	GLC1F	AD
10q25-q28	Pigment dispersion syndrome	GRG1	AD
6q23	Adult-onset POAG	GLC1D	AD
9q22	Early-onset POAG	GLC1J	AD
9q24	Glaucoma associated with nail-patella syndrome	116K18	AD
10p15-p14	Adult-onset POAG, low-tension glaucoma	GLC1E (OPTN)	AD
11p	Neurofibromas	6603	AD
11p15	Acrofia	ANK (PKR8)	AD
11q13	Neurofibromas	1903	AD
11q23	Neurofibromas	48R	AR
13q14	Regier syndrome	REG2	AR
14q11	Adult-onset POAG	Lama-5/10	Complex
15q11-q13	Adult-onset POAG	GLC1I	Complex
22q12	Early-onset POAG	GLC1K	AD

Abbreviations: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; POAG, primary open-angle glaucoma.

Janey L. Wiggs, JAMA Ophthalmology (2007)

開放隅角緑内障の原因遺伝子 Optineurin (OPTN)の発見

Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma Caused by Mutations in Optineurin

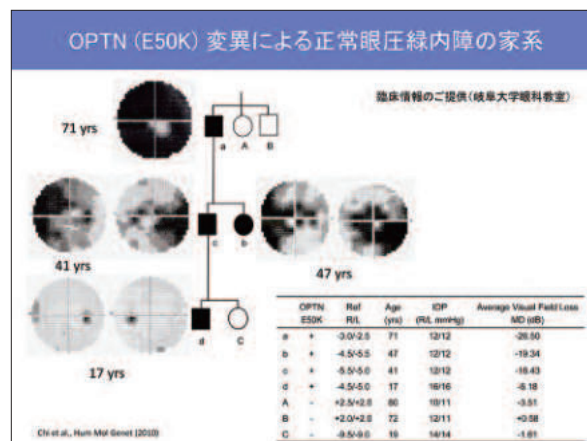
Yatebeh Rezaie,¹ Anne Child,^{2,3} Roger Hitchings,³ Glen Brice,^{2,3} Lauri Miller,⁴ Miguel Coca-Prados,⁵ Elise Héon,⁶ Theodore Krupin,⁷ Robert Ritch,⁸ Donald Kreutzer,⁴ R. Pitts Crick,⁹ Mansoor Sarfaraz^{1*}

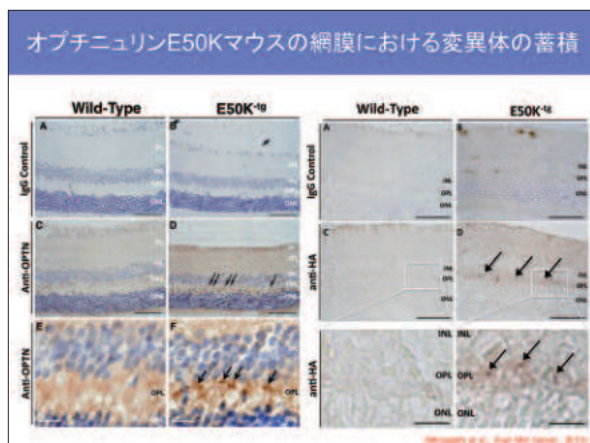
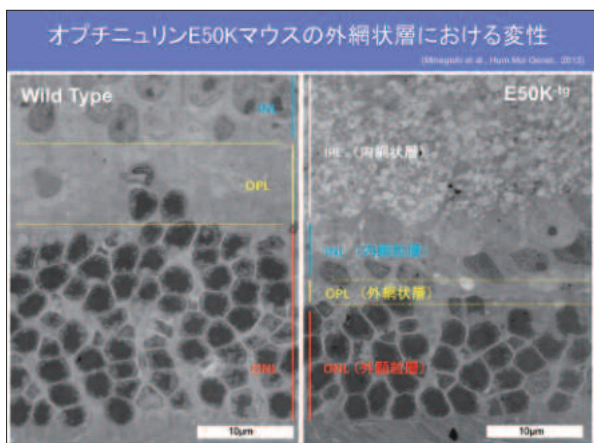
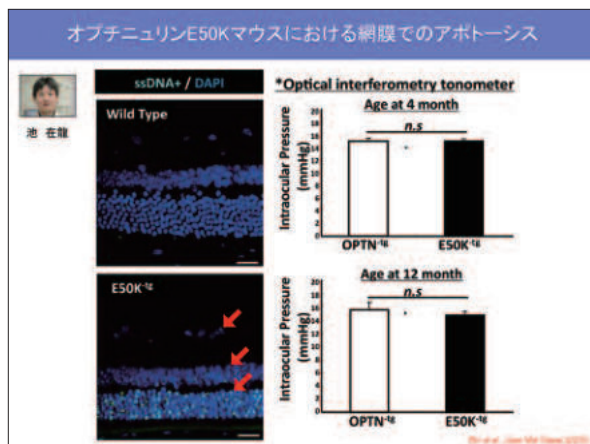
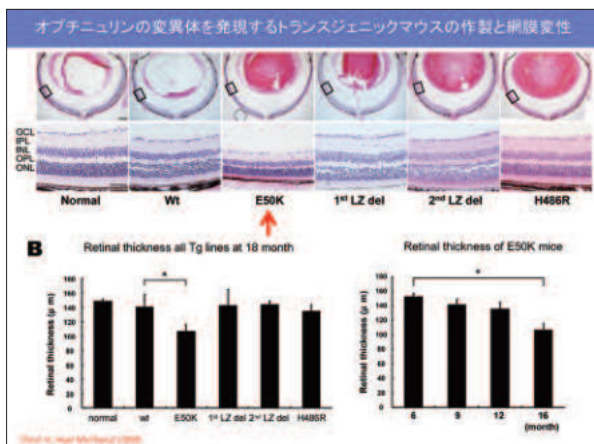
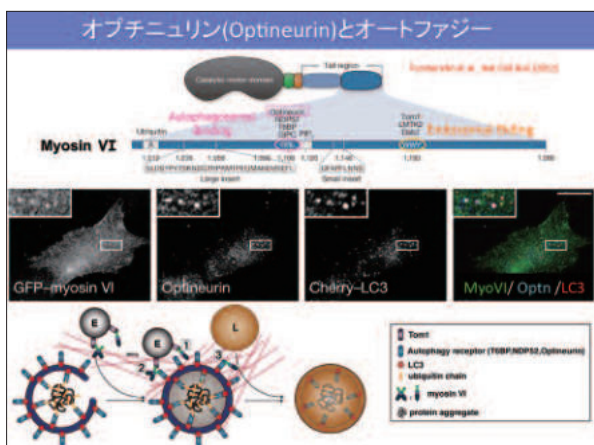
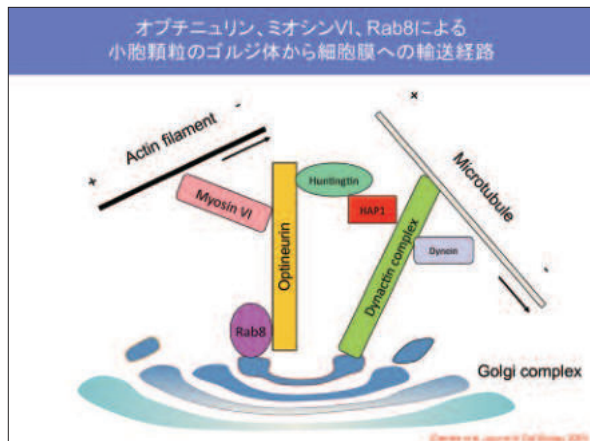
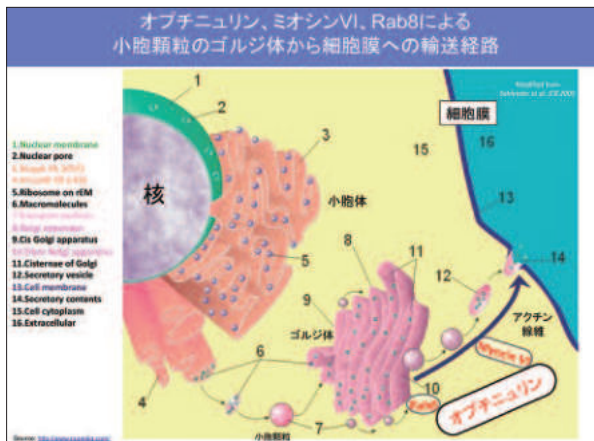
Primary open-angle glaucoma (POAG) affects 33 million individuals worldwide and is a leading cause of blindness. In a study of 54 families with autosomal dominantly inherited adult-onset POAG, we identified the causative gene on chromosome 10p14 and designated it *OPTN* (for "optineurin"). Sequence alterations in *OPTN* were found in 16.7% of families with hereditary POAG, including individuals with normal intraocular pressure. The *OPTN* gene codes for a conserved 66-kilodalton protein of unknown function that has been implicated in the tumor necrosis factor- α signaling pathway and that interacts with diverse proteins including Huntingtin, Ras-associated protein RAB6, and transcription factor IIA. Optineurin is expressed in trabecular meshwork, nonpigmented ciliary epithelium, retina, and brain, and we speculate that it plays a neuroprotective role.

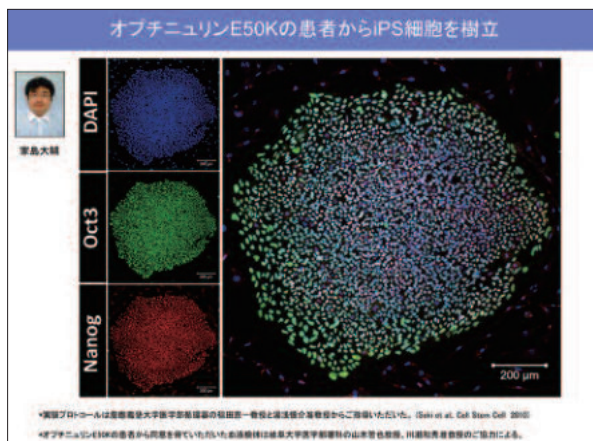
開放隅角緑内障におけるOPTN遺伝子変異

論文筆頭著者	緑内障の原因遺伝子変異
Rezaie et al.	P16A, E50K, K66R, E92V, H228Y, 2-bp insertion, A466S, R545Q
Aung et al.	E50K (Glutamic acid > Lysine)
Funayama et al.	H26D
Fuse et al.	H26D, R545Q
Leung et al.	E103D, H486R
Willoughby et al.	H486R
Weisschuh et al.	A336G, A377T
Yao, et al.	V161M, I407T
Hauser et al.	E50K

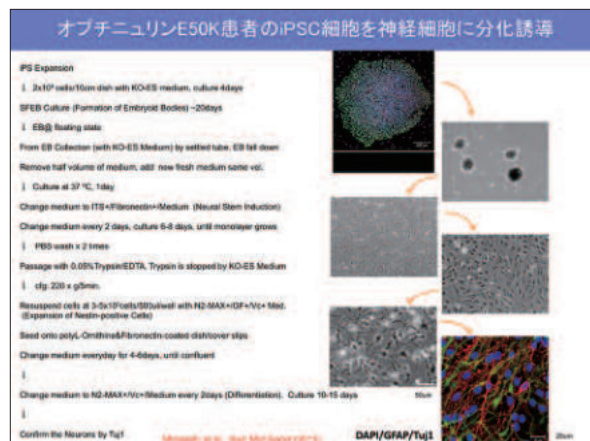
Mansoor Sarfaraz, Mechanisms of the glaucoma, Humana Press (2008)



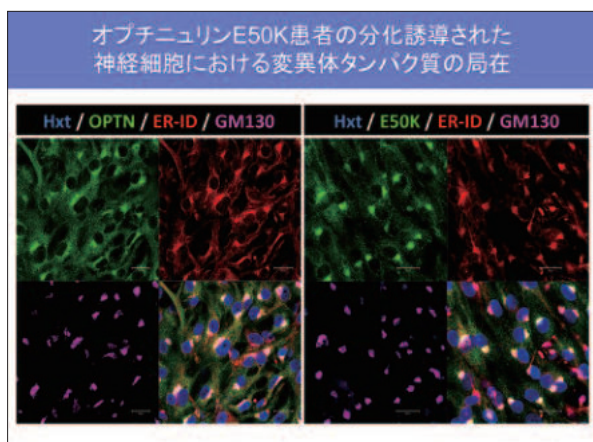




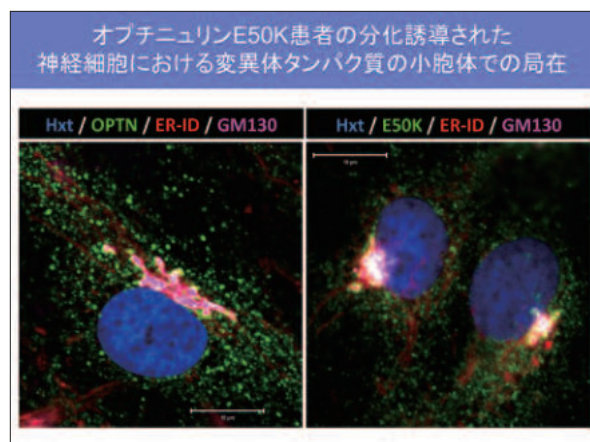
31



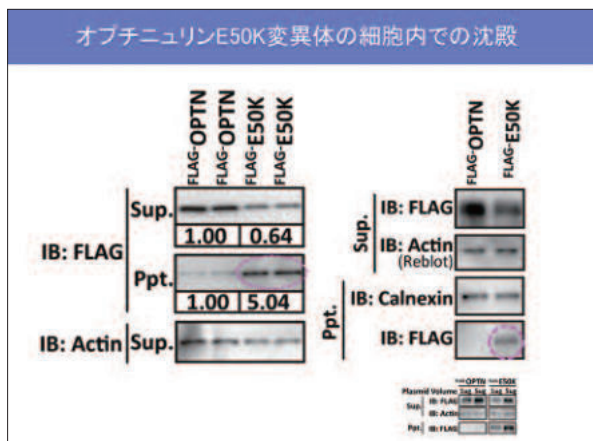
32



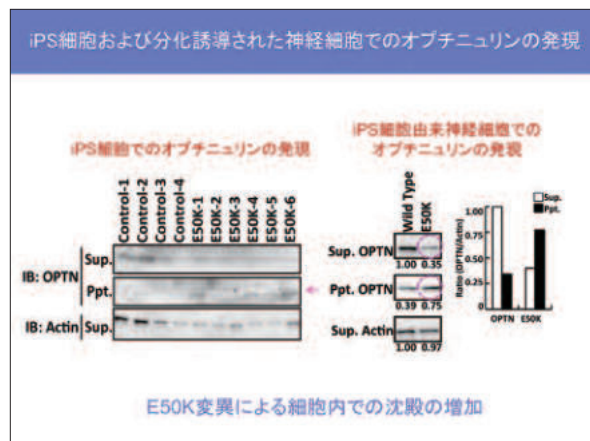
33



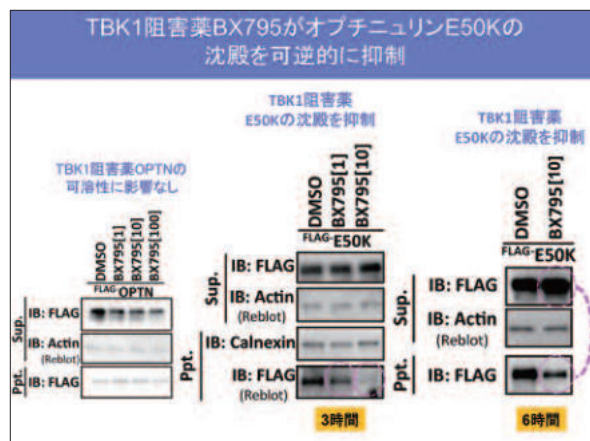
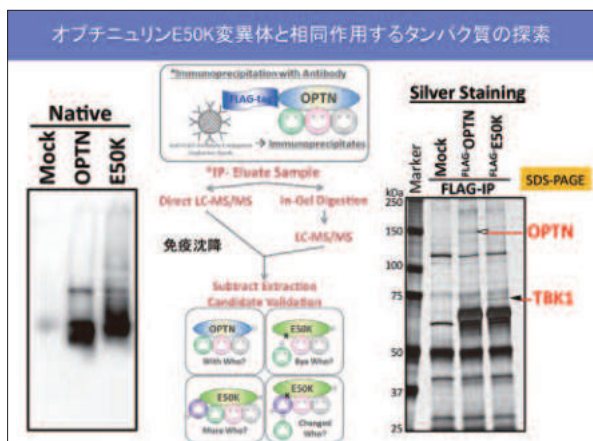
34



35



36



TBK1コピーナンババリエーションと緑内障

Glaucoma Davis et al., *IOVS* (2011)

Copy Number Variations and Primary Open-Angle Glaucoma

Lea K. Davis,^{1,2} Kacie J. Meyer,^{2,3} Emily I. Schadtler,³ John S. Beck,⁴ Danielle S. Rault,⁵ A. Jason Grunbaum,⁶ Todd E. Scheetz,^{6,8} Terry A. Braun,^{5,6} John H. Finger,⁷ Wallace L. M. Alward,⁸ Young H. Kwon,⁹ James C. Folk,⁶ Stephen R. Russell,⁶ Thomas H. Wassink,^{5,6} Val C. Sheffield,^{5,6} and Edwin M. Stone^{1,6}

Human Molecular Genetics, 2011, Vol. 20, No. 12, 2482-2494
doi:10.1093/hmg/ddp123
Advance Access published on March 28, 2011

Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma

John H. Finger¹, Alan L. Robin^{4,6,8}, Jennifer L. Stone⁴, Ben R. Roos⁵, Lea K. Davis¹, Todd E. Scheetz¹, Steve R. Bennett¹, Thomas H. Wassink⁷, Young H. Kwon⁵, Wallace L.M. Alward¹, Robert F. Mullins¹, Val C. Sheffield^{1,8} and Edwin M. Stone^{1,8}

¹Department of Ophthalmology and Visual Sciences, ²Department of Psychiatry and ³Department of Pediatrics, Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA, USA and ⁴Glaucoma Specialists, Baltimore, MD, USA, ⁵Department of Ophthalmology and ⁶International Health, School of Medicine and ⁷Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA, ⁸Department of Ophthalmology, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA and ⁹Howard Hughes Medical Institute, Iowa City, IA, USA [Finger et al., *Hum Mol Gen*, 2012]

Confirmation of TBK1 duplication in normal tension glaucoma
Kawase et al., *Exp Eye Res* (2012)

加齢黄斑変性のリスク要因

多因子疾患

環境
生活習慣
加齢

喫煙、食事(高脂肪)

遺伝
ARMS2-HTRA1, CFH etc.

様々な要因がリスク因子となり発症する

Chakravarthy et al. *BMC Ophthalmol* 2010;10:31

日本人患者の全ゲノム相関解析 (GWAS)

浄出型加齢黄斑変性

ポリープ状網脈絡血管症

日本人においても、Wet-AMDやPCVの患者と10番染色体の変異、さらには10q26のタグSNPsであるrs10490924と連鎖不平衡を共有する領域は、ARMS2-Htra1の2遺伝子にまたがり、この領域の変異が疾患に関与している可能性が報告されている。

赤堀正和
Goto A, Akahori M et al. *JOOHJ* (2010)

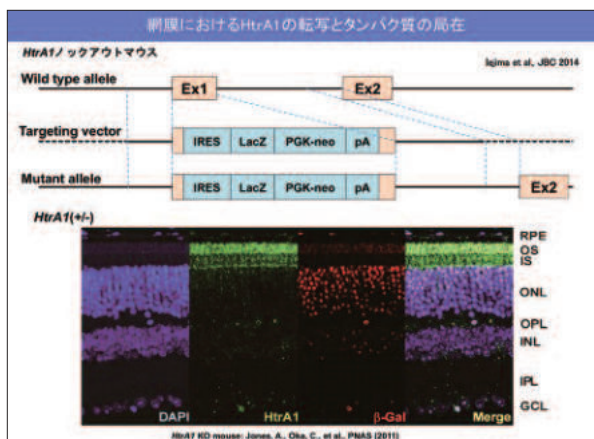
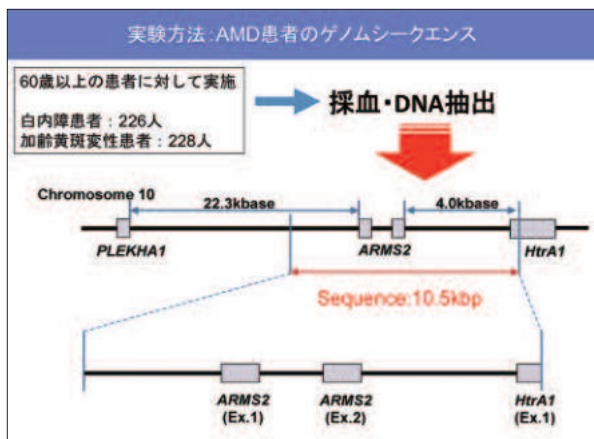
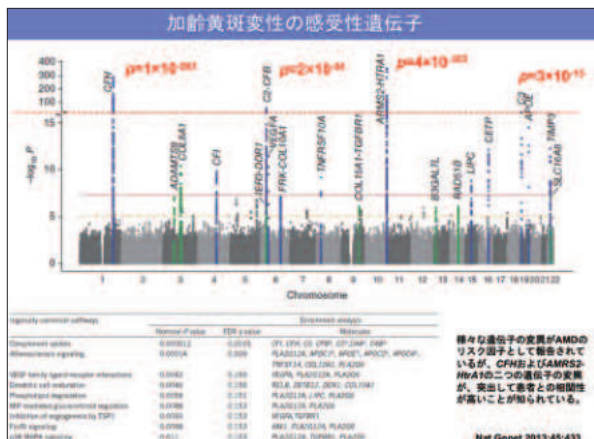
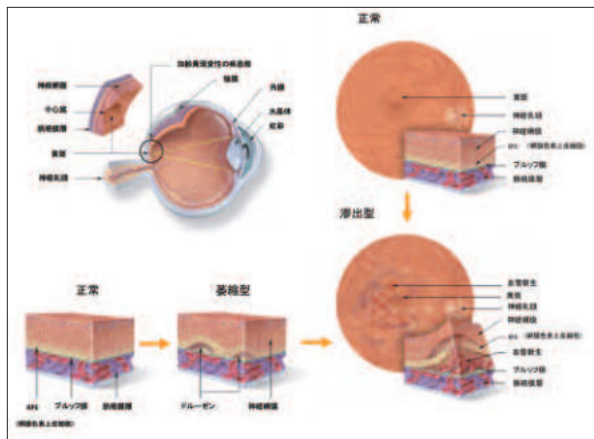
ARMS2-HTRA1遺伝子領域の塩基配列

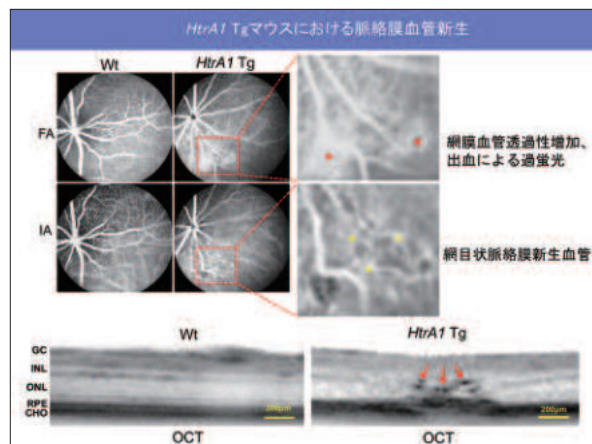
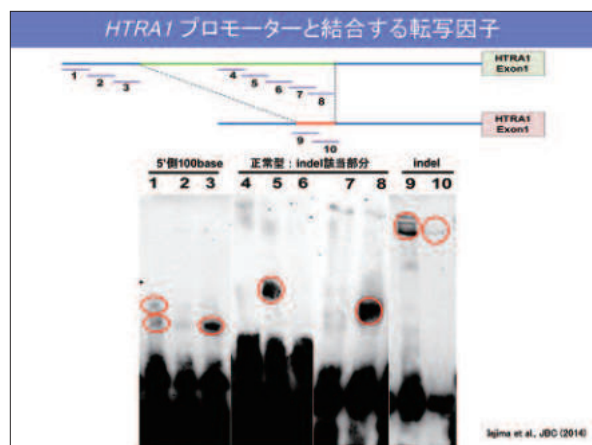
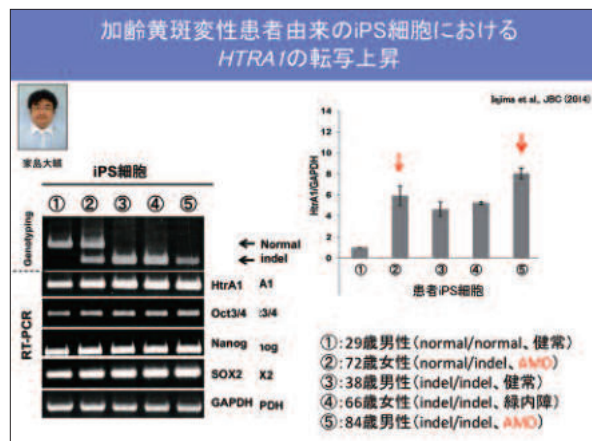
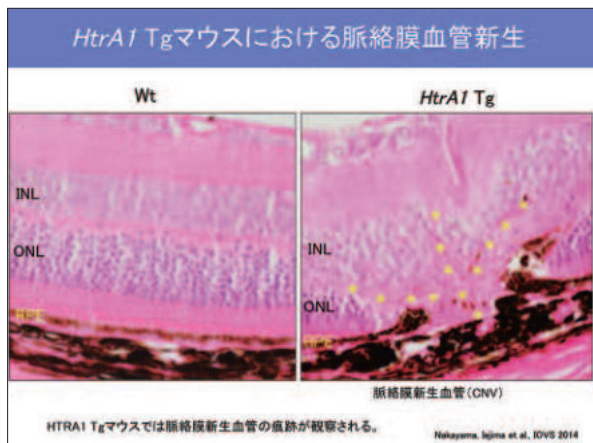
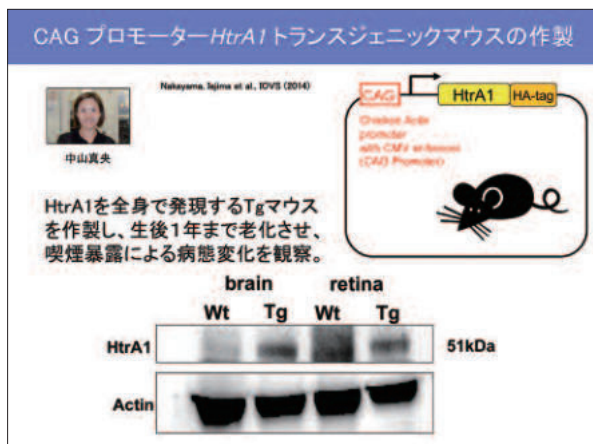
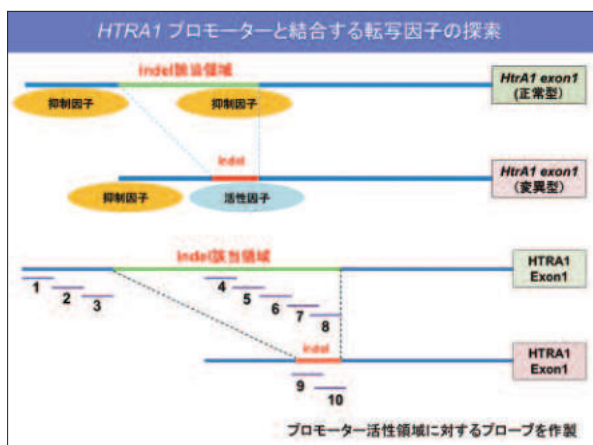
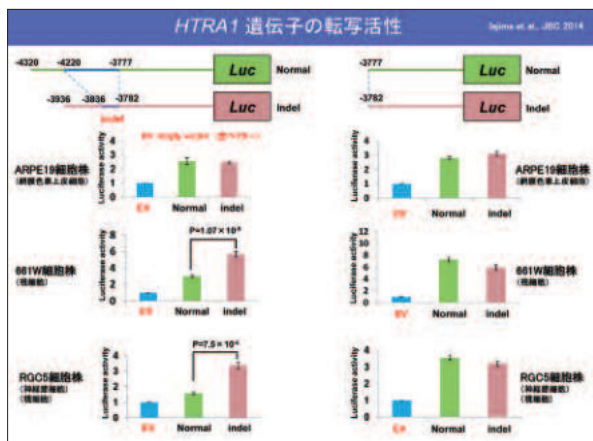
塩基配列の挿入と欠損
insertion/deletion (indel) 領域

510base
443base (59base)
3777base

ARMS2 (Ex.1)
ARMS2 (Ex.2)
Htra1 (Ex.1)

Normal
AMD
Normal
AMD
Normal
AMD
Normal
AMD





- ### 総括
- ES細胞・iPS細胞から各種網膜細胞・網膜組織への分化誘導
 - 1) 細胞移植・組織移植への利用
 - 2) 患者由来iPS細胞を利用した病態解析
 - 3) 創薬に向けた利用
 - 内在性幹細胞による網膜再生現象とその応用
 - 1) 動物種による再生能力の違い
 - 2) ミューラー細胞と再生能力
 - 3) 哺乳類における再生能力の促進
 - 遺伝性網膜疾患の病態解明への応用
 - 1) 正常眼圧緑内障原因遺伝子オプテニューリン
 - 2) 加齢黄斑変性感受性遺伝子HTRA1

共同研究者

田中靖彦 東京医療センター
 三宅養三 東京医療センター眼科・感覚器センター
 宇治幸隆 東京医療センター眼科・感覚器センター
 野田 徹 東京医療センター眼科・感覚器センター
 角田和繁 東京医療センター眼科・感覚器センター
 尾羽澤 実 東京医療センター眼科・感覚器センター
 藤波 芳 東京医療センター眼科・感覚器センター
 春畑裕二 東京医療センター眼科
 寺内直樹 東京医療センター眼科
 渡辺 健 東京医療センター眼科
 吉村長久 京都大学
 田中 稔 田中稔眼科(順天堂大学浦安病院)
 溝田 淳 帝京大学
 篠田 啓 帝京大学
 山本哲也 岐阜大学
 川瀬和秀 岐阜大学
 林 孝彰 東京慈恵会医科大学
 國吉一樹 近畿大学
 近藤峰雄 三重大学
 上野真治 名古屋大学
 池尾一穂 国立遺伝学研究所
 吉武和敏 国立遺伝学研究所
 門間則和 国立遺伝学研究所
 古野正朗 理化学研究所
 松本直道 横浜市立大学
 岡 千緒 奈良先端大学院大学
 亀井淳三 星薬科大学
 松田文彦 京都大学
 福田恵一 慶應義塾大学
 湯浅慎介 慶應義塾大学
 谷戸正樹 島根大学
 Slava Tomarev National Eye Institute
 中矢直樹 National Eye Institute



家島大輔 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 中山真央 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 峯岸ゆり子 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 須賀晶子 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 赤堀正和 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 池 在龍 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 岡本はる 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 後藤麻子 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 原田綾乃 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 川村雄一 感覚器センター分子細胞生物学研究部
 板橋 剛 感覚器センター分子細胞生物学研究部

文部科学省基盤研究B、C
 文部科学省セルイノベーションプロジェクト
 厚生労働省 障害対策総合研究事業
 厚生労働省 難治性疾患克服研究事業
 厚生労働省 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
 厚生労働省 難治性疾患実用化研究事業

⑤ 幹細胞・iPS 細胞を用いた内耳性難聴の研究 ～新規治療法の開発に向けて～

慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

藤 岡 正 人

藤岡 今回、「幹細胞・iPS 細胞を用いた感覚器研究」というお題でお話しする機会を頂きまして、関係者の皆さまに感謝申し上げます。

先ほど五島先生からもご紹介いただきましたが、私は耳鼻科医の息子で耳鼻科医でして、研究するにしても、研究室にこもったものになるよりは、何とか患者さんにお返しできるような薬を作りたいと、そういうことばかり考えています。ですので今日の話も「幹細胞・iPS 細胞を用いた創薬研究」に絞ってお話ししようと思えます。

テーマは二つです。一つ目はマウスの前庭の内耳幹細胞から採ってきた細胞での創薬研究。有毛細胞を再生する、内耳再生医療のカテゴリーに入る薬の話です。もう一つは最近はやりの疾患 iPS 細胞研究で、遺伝子が原因で徐々に進む進行性の難聴は多くありますが、その中で今回ペンドレッド症候群という病気の患者さんから採血して、iPS 細胞を作って耳の細胞を作って原因を探して、治療薬を探しているという話をしようと思えます。

どちらも研究標的はこちらにある蝸牛という臓器です。蝸牛は耳の奥にある側頭骨という骨の一番奥に埋もれた、水で満たされた部屋です。先ほどの大島先生の絵にもありましたが、非常によくできた形の器官でして、外から入った音が低音だと上のほうが、高音だと下のほうにある部分が振動します。この水と水の間にある板が振動します。これは4キロヘルツの音を入れたモルモットの蝸牛の中の絵です。

黄色の部分の一番上にあるのがコルチ器とよばれる臓器で、この上にある有毛細胞という細胞があり、有毛細胞の上には毛があります。音が入ってくるとコルチ器が震え、そうするとこの毛に力がかかる。内有毛細胞では、毛に外力

がかかると、この毛がイオンの通り道とつながっているのです、イオンが入って電気が出る。かくして音の信号が神経の電気信号に変換されるという構造になっています。

外側にある3列は少し変わっていて、毛があるところまでは一緒ですが、毛に力がかかると細胞自体が伸縮することが知られています。従って、振動があるところに限って伸縮の上下動が加わるので、全体として音の信号が増幅されます。これは、哺乳類しか持っていない非常に精緻な構造で、蝸牛は、音を電気に換えることと、音を増幅することの両方を担っています。

次のこの写真は、コルチ器を走査電子顕微鏡で上から見たものです。1列の内有毛細胞、3列の外有毛細胞がきれいに整然と配列しています。横から見ると、有毛細胞はその下に支持細胞と呼ばれる細胞で支えられていて、支持細胞は手を伸ばしています。この手は有毛細胞と有毛細胞の間に必ずのびていて、隣の電気信号が間違っ

て入ってくるのを防ぐ役割をしています。非常に精緻な、機能と相関した構造を持っているのが、われわれヒトを含む哺乳類のコルチ器の特徴です。この有毛細胞、もし増え過ぎたらこのような機能を果たさなくなると困ると思いついて見えてしまいますが、実際ヒトを含めた哺乳類の有毛細胞は再生しません。これが、内耳に原因のある感音難聴が、一度固定すると治らない原因の一つであると考えられています。

感音難聴は身障者の10%、聾啞は30万人、補聴器が必要だろうと思われるようなところまで入れると600万人ぐらいいます。65歳以上の3割から4割が加齢性難聴という報告もあります。最も多い先天奇形でもあり、1,000人に1人ぐらゐの割合で難聴の方が生まれると言われてい

です。一度固定すると治らないので、進行しないことが大事です。進行を予防するような薬がないか、あるいは一度悪くなってしまったものに関しては、毛が生えてくれればいいので、再生医療が望まれる分野ではないかと思えます。

そこで、今日お話しするのはこの二つで、有毛細胞の再生の話と、遺伝性難聴で進行性の難聴を少しでも食い止める薬を作れないかという話です。本研究は、慶應大学の耳鼻咽喉科教室と生理学教室（岡野栄之教授）の、2003年からの十数年来のタイアップの研究です。ハーバード大学のアルバート・エッジ先生の研究室、東京医療センターの松永先生の研究室と非常に密な共同研究をさせていただいています。それから、寄付金、資金、いろいろサポートいただいて進められている研究です。

さっそく前半からお話しします。くどいようですが、成体哺乳類の有毛細胞というのは、蝸牛に関してはどんな原因であれ、一度やられてしまうと戻ってきません。したがって再生医療のターゲットになるわけですが、よく見ると傷ついている有毛細胞のそばに、まだ細胞が残っています。そこでわれわれが最初に研究を始めるときに、この残った細胞を使えばいいのではないかという話から始まりました。

先ほどの絵をもう一度出します。外有毛細胞はこのように周りに必ず支持細胞に囲まれています。支持細胞は下のほうにあって手を出しています。ですから、上の有毛細胞が死んでも隣接する下の支持細胞から作ればいいのではないか。細胞移植でちょうどダメージを受けたところに細胞を補うというのはなかなか難しいと思われませんが、隣の細胞が有毛細胞になってくれれば、死んだ細胞の真下から補われるので、構造も一緒にある程度再生できるのではないかという安直な発想で実験を始めました。

有毛細胞を作りたいと考えるのであれば、そもそも有毛細胞はどうやってできるのだろうかというところから考えるのが、この手の研究の筋なのだそうです。この絵はお母さんのお腹の中の13日目ぐらいのマウスの耳の絵です。最初はコルチ器というところにいろいろな細胞になる、内有毛細胞にも外有毛細胞にもなる性質を持った細胞がありますが、発生の過程ではここから有毛細胞が出てきます。面白いことにこのタイ

ミングで出てきた有毛細胞は隣の細胞に、「おまえは支持細胞になれ。有毛細胞になるな」という信号を出して、コミュニケーションをすることが知られています。

このコミュニケーションに使われているのが、ノッチシグナルと呼ばれているシグナルです。ノッチシグナルは体の部位によっていろいろな意味を持ちますが、このコンテキストでは、少なくとも有毛細胞が隣接細胞に、「支持細胞になれ」という意味で出す。従って、結果的には最終的に有毛細胞の隣に必ず支持細胞ができます。

ここでもう一つ、私が10年ぐらい前に最初に実験したときのもう一つの思い付きは、では哺乳類の蝸牛での有毛細胞は何で再生しないのか。もしかしたら、ダメージを受けたときに、なぜか分からないが、たまたまこのノッチシグナルが上がってしまっているのではないかと考えて、研究を始めました。

これが最初の頃にやった実験です。横軸が時間軸、縦軸がノッチシグナルの活性だと思ってください。大きな音をかけて、耳の有毛細胞を壊すと、壊したあとにノッチシグナルが跳ね上がります。3日未満で大体同じ元のレベルに戻ってくるのが分かりました。であれば、このノッチシグナルを抑えることができればいいのではないか。残存した細胞は、もしかしてこのノッチシグナルのために有毛細胞になれないのではないかという仮説を考えて、薬を探すことになりました。

込み入っているのですが、ここまでを整理すると、もともとノッチシグナルは有毛細胞から隣の支持細胞に、支持細胞になる運命づけをするシグナルです。これが障害を受けたあとには、一過性に上がるのがわかりました。ですから、これを抑えるような薬を探して、このシグナルを抑えることで隣の細胞を有毛細胞に変えてやろう、薬剤によって有毛細胞を再生させてやろうという発想のもとで薬を探すことから始めました。

「内耳幹細胞」とスライドでは書いていますが、幹細胞は試験管の中で増えるので、均一な細胞を大量調整することができます。この実験では Math1-nGFP という有毛細胞が緑に光るネズミの前庭から採って増やした細胞を用いました。この研究は、私が留学しているときに韓国人のサンジュウン先生と、当時まだ学生だった

細谷 誠先生の仕事です。

増やした細胞を小分けにして、それぞれにいろいろな薬をさまざまな濃度でかけてみる。放っておけばいろいろな細胞になりますが、有毛細胞になれば緑色になります。緑色の細胞をカウントしてみると、ほかに試した薬が幾つかありましたが、LY411575 という薬がほかに試したものよりもはるかに低濃度で有毛細胞を増やしています。

この LY411575 という薬は、イーライリリー社が抗アルツハイマー病の内服薬として開発しましたが、副作用が強くて途中で開発中止になってしまった経緯を持つ薬です。

先ほどは前庭の幹細胞の話でしたので、蝸牛でも有毛細胞のマーカーを持つ細胞が増えること、あるいは培養細胞で有毛細胞が増えることを確認しました。

それから薬を使っても有毛細胞が本当に必要などころに生きてくれなければ困ります。これを次に確認しました。とあるトランスジェニックマウスを用いて、このマウスの内耳においてある薬を使うと、有毛細胞はこのようにぱらぱらと死んでいきます。この器官培養系に LY411575 をかけると、細胞がなくなっているところで細胞がちゃんと増えてくる。つまり必要などころ、本来の正しい場所で有毛細胞が誘導される薬であることが確認できました。

ここまで来たら個体レベルでの実験をやろうということで、ネズミに大きな音をかけて難聴を作って、LY411575 を 5 日間経口投与する実験をしました。そうすると、上が比較群で下が薬剤投薬群ですが、ご覧のように外有毛細胞の領域で有毛細胞が増えています。電子顕微鏡で見ると、一部少し形が変わった細胞もありますが、おおむね形態的には正常の細胞と近い形の細胞が採れています。

聴力を測ると、この投薬のネズミで10デシベル程度改善するので、「再生医療はもう間近などころに見えているのではないか」と言われたのですが、実はこの効果を得るための量を飲ませると、半分ぐらいのネズミが下痢と免疫不全で死んでしまい、安全性が課題であるということになりました。

そこで、私の慶應義塾大学の先輩である水足邦雄先生に、「耳に打てばいいのではないか」と

いう安直な実験をハーバード大でお願いしました。耳の後ろから手術でアプローチするのですが、このように内耳の入口の窓が見えてきます。ここに LY411575 を置いてみると、右が投薬群、左が対照群、緑色が有毛細胞ですが、周波数を問わず、ご覧のように有毛細胞が増えているのがお分かりになるとと思います。

この有毛細胞の増加は支持細胞の減少数とほぼ一致していて、支持細胞が有毛細胞になったのでしょうか。聴力も改善していて、大体10デシベル未満ぐらいです。局所投与であれば特に副作用もなく全数生存し、下痢や感染あるいは局所の腫瘍形成もありませんでした。

内耳幹細胞を用いた研究の一つ目ということでここまでお話しましたが、幹細胞を用いた薬剤スクリーニングで有毛細胞を分化誘導する薬を見つけ、「分化誘導療法」としての再生医療を、ネズミで可能にしたという話でした。

「ネズミで見つけた」と言うと、「私に打ってください」という患者さんが見えますが、この薬の開発は非常に時間がかかっています。2013年に水足先生が論文文化しましたが、現在のところは米国で修飾化合物試験と安全性試験をしています。このところがある程度まとまってから、国内ではコモンマーモセットという霊長類を用いた研究を行って、効果があれば臨床研究のフェーズⅠ、Ⅱ、Ⅲへと入っていくとされていて、患者さんのもとに届くのはまだまだ時間がかかります。ですが、夢のある話として実現していこうと思っています。

後半では疾患特異的 iPS 細胞の話をしてします。「iPS 細胞を用いた医療」と書きましたが、iPS 細胞研究の一つの利点は、ES 細胞の今までの知見あるいは知っていることが応用できることかと思っています。「再生医療あるいは薬剤開発への応用」と書きましたが、ここに内耳の研究も入れたい。

当科でのヒト iPS 細胞の樹立は、10mL から 20mL の採血からはじめて、そこに初期化プラスミドを入れて、あとで抜ける、つまりゲノムに傷を付けないようにして iPS 細胞を作るスタイルを採っています。

今大学院生で頑張ってくれている細谷先生が、この iPS 細胞から効率よく内耳の幹細胞、そし

て耳の細胞を作る実験を進めています。蝸牛の中の細胞であれば、血管条の中間細胞を除くほとんどの細胞が作れる状態です。iPS細胞に関してはただプラスミドを入れただけでは実際のところはiPS細胞にはならないので、継代して形が問題ないこと、万能性を獲得するために入れたプラスミドがちゃんと抜けてくれていること、内耳の細胞をちゃんと誘導すること、それから先ほどあったように、プルリポテンシー（分化多能性）です。少なくとも3胚葉を作る、ES細胞と同様の性質を有すること。ここまで確認してから実験に入ります。

先ほどはコルチ器の話をしました。コルチ器は音を電気に換えるところです。この電気を脳に伝えるらせん神経節、あるいはこういった細胞の電気活動に必要な電位差、電気をたくわえるバッテリーのような役割を果たす外側壁のらせんじん帯細胞、血管条、これらのさまざまな細胞がそれぞれの役割分担を果たして有機的に協調することで、蝸牛という臓器は音を電気信号に換えています。ですから、研究するうえではすべての細胞を作れるという状態になることが非常に大事です。

これは、内耳幹細胞に相当する耳胞様の細胞で、初期の耳胞のマーカを一通り発現しています。この細胞は幹細胞で、増えます。増えるので試験管内で大量に用意することができます。ごらんの有毛細胞様細胞は有毛細胞のマーカを出している比較的未分化なものですが、この細胞に分化誘導をかけて、少し外側に傾けてやると、ミオシン、プレスチン、エスピンといった成熟した有毛細胞だけが発現するようなマーカを持つ細胞が作れます。

「アイランド」と我々と呼んでいます。これらの感覚細胞は島のように集まります。緑色はミオシンⅦaという有毛細胞の骨格タンパクですが、よく見ますと、先ほどの電子顕微鏡の絵であったようなV字に近い毛の配列を見ることができます。

支持細胞、神経節細胞、外側壁らせんじん帯のⅠ型、Ⅲ型といった線維細胞、それから外らせん溝様細胞、血管条の辺縁細胞は、マーカもそうですが、こういった敷石状の構造を取るところまで確認しています。中でも非常に効率よく作れるのがこの外らせん溝様細胞で、蝸牛

でペンドリンを極めて強く発現する細胞です。我々の方法ですと一面ほぼペンドリン強陽性の細胞を採れます。

神経変性疾患のES細胞、iPS細胞研究では、従来より誘導効率が低く、欲しい細胞が少ないためなかなか思い通りの実験ができないという問題点がありましたが、この系であれば色々な実験ができます。フラスコいっぱいの耳の細胞を用いることも可能になっています。この実験系を使って、ペンドレット症候群の患者さんからiPS細胞を樹立して、病気の細胞で何が起きているか、どんな治療薬があるかという研究を現在進めています。

遺伝性疾患あるいは遺伝子病の医学・医療は、現在大きな変革点を迎えていると言われています。一つには、次世代シーケンサーの登場によって、遺伝子配列が非常に素早く読めるようになったということです。もう一つは、やはり治療を受けられる病へと少しずつ変わりつつあるということかと思えます。

これは邦題「小さな命が呼ぶとき」という映画の1シーンです。ある製薬会社の重役のお子さんが、ポンペ病という病気にかかったと宣告されます。この病気は遺伝性の疾患で、平均寿命が9年という重篤な病気です。ポンペ病はライソゾームというところの酵素が欠けている病気ですが、そこでこの主人公は天才科学者と手を結んで、彼は一生懸命お金を集めて、酵素を補充する治療を編み出します。それを自分の娘に点滴して治療を進めているという、うそのような本当の話です。ジェンザイム社から出ているマイオザイムという薬が、ポンペ病に対する特効薬として承認されています。

このように遺伝子のほうから原因が分かっている、今までだと遺伝子診断をして「こういう病気です」と医者の方から説明する、そういう医療でしたが、そこから、「こういう原因があるから、こういう治療がある」という方向へと、これから遺伝子の疾患の領域はシフトしていこうと考えています。

ペンドレッド症候群は、*SLC26A4*という遺伝子にコードされるペンドリントタンパクに変異があることで起きる進行性の先天性の難聴、甲状腺腫を合併する病気です。1価の陰イオンと重炭酸を交換するペンドリンというイオン交換チ

チャンネルの異常で病気を生じますが、進行性の難聴を起こします。

難聴の研究者の立場からすると、一つ非常に厄介な点があります。この症候群はモデルマウスがいません。ですから、先ほどのようなマウスを使った創薬研究のアプローチができません。SLC26A4 を完全になくしてしまったネズミでは、ヒトと同じような奇形が非常に強く出てしまうため、生まれつき難聴になってしまい、進行性の難聴を見ることはできません。かといって、患者さんでよくある変異を入れてもネズミは全く難聴になりません。こういうときに疾患 iPS 細胞、患者さんの細胞を使って病気の細胞を見るというのが期待されている一つのアプローチです。

実験デザインですが、健常者由来の iPS 細胞とペンドレッド症候群の患者さんから樹立した iPS 細胞の両者から蝸牛のペンドリン強陽性細胞を誘導して、患者さん由来の細胞でいったい何が起こっているかを検討しました。対象症例は3歳女児、6歳女児、32歳女性、3人とも進行性の難聴です。真ん中の6歳女児は日本人に一番多い H723R という変異を持っています。下の32歳女性は、1歳のときに難聴を指摘されていて、徐々に進行しています。こういうものを何とか食い止める薬を見つけないということです。

iPS 細胞を作り、きちんと iPS 細胞になっていることを確認したのちに、実際に患者さんの内耳の病気の細胞を樹立しました。左が健常人から、右が患者さんの病気の細胞です。何が違うのかということです。お分かりになりますか？細谷先生がくまなくいろいろ調べてくれて、よく見ると病気の方の耳の細胞は、正常な方と比べてペンドリンタンパクがちょっとごわごわしています。細胞内で溶けきれずに析出して凝集体を作っていることが分かりました。正常でこの凝集体を持っている細胞と比べると、病気の方は8倍か9倍多くなっています。

そうするとペンドレッド症候群の進行性難聴は、恐らくこれが原因で起きるのではないかと。アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患でも同様の所見を見るので、病気の原因ではないかと我々は疑いました。さらに、この凝集体は細胞質に限局していて、いろいろなマーカーと染色してみると、タンパクのリサ

イクル回路であるユビキチン／プロテアソーム系であるとか、オートファジーの系の回路でどうも詰まっているらしい。であれば細胞内でのタンパクのリサイクルを促進する薬のスクリーニングをやってみようと思うにいたりました。

既に市販されている使える薬を使って、安全性が分かっている既存薬の中から探すという試みを行いました。まずペンドレッド症候群の方の耳の細胞を調べましたが、実はこの細胞は細胞ストレスに非常に弱いということが分かりました。酸化ストレスあるいはプロテアソーム阻害といったいろいろなストレスを受けると、細胞生存率が正常の方からの細胞と比べて著しく下がっていることが分かります。

リサイクルの系ということでしたので、リサイクルを促進するような薬をいろいろ試していくと、まずラパマイシンという薬がヒットしました。これが障害を受けた状態で、こちらがラパマイシンをさらに添加した状態ですが、細胞生存率が改善しているのがお分かりになると思います。残念ながらこの薬は副作用が非常に強くて、患者さんにずっと飲んでもらうことができない薬です。

もう少しマイルドな薬で、メトホルミンという薬を試しました。メトホルミンはオートファジーを促進する既存薬の中では最も安全性が高く、古くから国内外で使われていて、小児でも長期使用の適応が通っている薬です。この薬剤を患者さん由来の iPS 細胞から作ったペンドレッド症候群の耳の細胞にかけてみると、「症例1」、「症例2」、「症例3」ともに薬剤に反応して細胞生存率が改善しているのが分かります。さらにこの細胞生存の改善はアポトーシスの抑制を介して起こしている、細胞死を防いでいるということが分かりました。

以上のデータをまとめると、ペンドレッド症候群の患者さんから作った疾患細胞は神経変性疾患に似て、変異ペンドリンが細胞内に析出した異常凝集を伴っている状態でした。これは、タンパク質のリサイクル回路が目詰まっているような状態で、この細胞は細胞ストレスに非常に弱いのですが、リサイクルを促進するという発想でオートファジーの活性促進をすると、細胞死が抑制されました。治療候補剤として、メトホルミンがおそらく安全性が高く、小児適応

もある既存薬で、オートファジーの促進剤としては一番現実的な薬だと思います。これを治療薬として同定することができました。

残念ながら、動物のモデルがないので、この場合はもう患者さんに臨床研究というかたちで行うしかない。できれば本年度中にも、東京医療センターの単施設試験、あるいはその先は多施設試験に向かって検討を進められたらと考えています。

まとめですが、前半の話は、マウスの内耳の幹細胞を用いて、薬剤スクリーニングで選んだ薬で有毛細胞の再生ができそうだ。ネズミの話で、先は長いけどできそうだという話です。後半は、疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝性難聴の研究で、ペンドレッド症候群という本邦 4 千人ぐらいの疾患ですが、この病気での病態の解明、新しい治療薬の候補というものを見つけることができました。

この二つの研究の違いが、iPS 登場前と iPS 登場後の一つの大きな違いではないかとわれわれは話しています。つまり、ネズミの研究と違って iPS 研究では患者さんの細胞を使って何が起きているか見つけて、薬の候補を見つけてくるので、臨床現場に返せるのが非常にはやく、いろいろなことがスピーディーになっていくのではないかと。これが、この10年ぐらいの研究の進歩ではないかなと考えています。

最後に、こういった研究は1人でできるようなものではありません。私は分からないとすぐ人に聞いたり頼んだりするもので、いろいろな方を巻き込んでここまで来られました。生理学教室の岡野栄之教授、留学先のハーバード大学のアルバート・エッジ教授、そして私が大学院で最初に研究を教わった、現在慈恵医大の岡野ジェイムズ洋尚教授に、まず感謝を申し上げます。それからさまざまな共同研究者の方からいろいろなアドバイスを頂きました。チャールズ・リベルマン先生、東京医療センターの松永先生からは患者さんのこと、この病気をまず始めたところから非常にお世話になっています。最初の仕事は、水足邦雄先生がまとめられて、後半は細谷先生が今まとめるところかと思っています。最後にこれらの研究を全部後ろからごらんになって、「やるの?」と言いつつも、寛大に進

めさせてくれた耳鼻咽喉科の小川 郁教授にこの場を借りて感謝します。ご清聴ありがとうございました。

五島 藤岡先生、大変分かりやすいお話を頂き、夢のある話をありがとうございました。それでは会場のほうから質問がありますか。もしないようなら、私が聞きもらしたかもしれませんが、メトホルミンというのはもともと何の薬ですか。

藤岡 メトホルミンは、基本的には糖尿病の薬で、糖を抑えるのではなく糖の消費を上げるような薬です。いろいろな作用があるみたいで最近注目されています。

五島 偶然的に、ペンドレッド症候群の方で、糖尿病でメトホルミンを飲んでいる方がいるということはないんですね。

藤岡 それがあれば一番いいんですけど。

五島 いなかったんですね。分かりました。ありがとうございます。加我先生。

加我 研究で、よい薬を探すというのは大変な判断ではないかと思っています。iPS 細胞を使った中で、今の糖尿病の薬もそうですが、先ほどアルツハイマーの薬もありました。たくさん薬をどんどん試すわけにもなかなかいかないと思いますが、どういうロジックで考えて進めていくのでしょうか。


藤岡 「大規模なスクリーニングと小規模なスクリーニング」という言い方を製薬会社はしますが、一つのやり方は、先生がおっしゃったよう、何も考えずに3万とかいう薬を片端から調べていく。簡単に結果を見るアッセイ系があれば、そのアプローチはいいと思いますが、iPS 研究は正直に言えばお金がすごいかかるので、現在の時点では、私個人としては大規模に行くよりは何かの発想のもとに選んでいくのが現実的ではないかと思っています。

今回の研究に関しては、オートファジーのマーカーとプロテアソームのマーカー、異常ペンドリンの発現が重なっていたので、これはリサイクルの中で何かをやっているんだろうという発想から、リサイクル系にかかわる薬のスクリーニングをかけてきました。前半に関しては有毛細胞ができる過程に関与しているものでなければ、有毛細胞を作ることはできないだろうと思いますので、そういう発想で選びました。

1

**幹細胞・iPS細胞を用いた内耳性難聴の研究
～新規治療法の開発に向けて～**

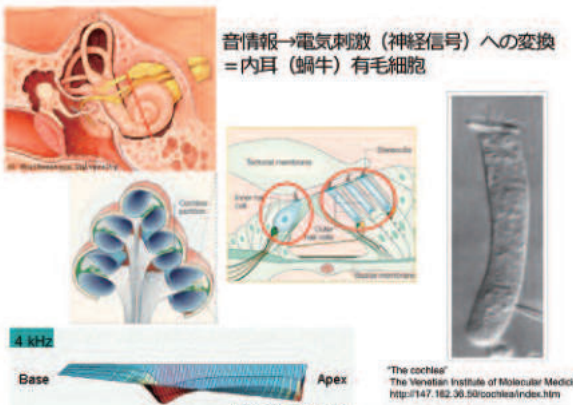
慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 藤岡 正人



第10回修習者シンポジウム
2015.03.06 NHO東京医療センター

3

音情報→電気刺激(神経信号)への変換
=内耳(蝸牛)有毛細胞

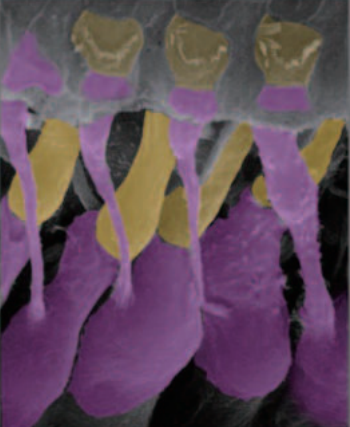


東北大 脳神経科学センターより
http://web.tku.ac.jp/brain/wakaba/FEM_BN1.html

5

有毛細胞

支持細胞



7

幹細胞やiPS細胞を用いた創薬研究



①マウス前庭由来内耳幹細胞で選んだ“有毛細胞分化誘導剤”による内耳再生医療(動物実験)

②ヒト疾患特異的iPS細胞で判ったPendred症候群の病態と遺伝性難聴治療剤の発見(本年度より臨床研究)

2

幹細胞やiPS細胞を用いた創薬研究

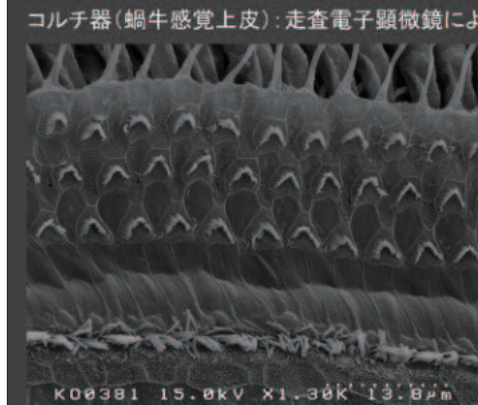


①マウス前庭由来内耳幹細胞で選んだ“有毛細胞分化誘導剤”による内耳再生医療(動物実験)

②ヒト疾患特異的iPS細胞で判ったPendred症候群の病態と遺伝性難聴治療剤の発見(本年度より臨床研究)

4

コルチ器(蝸牛感覚上皮): 走査電子顕微鏡による観察



外有毛細胞(3列)

内有毛細胞(1列)

K00381 15.0kV X1.30k 13.0um


6

感音難聴

身体障害者認定の約10%
高度難聴(聾啞) 30万人
中等度を含めると600万人
65才以上の人口の30~40%
最も多い先天奇形(先天性難聴)

一度固定するとなおらない

進行の予防が重要(再生医療が望まれる)

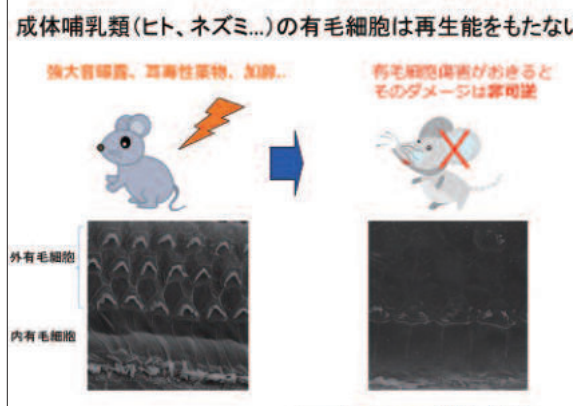


8

成体哺乳類(ヒト、ネズミ...)の有毛細胞は再生能をもたない

強大な音曝露、耳毒性薬物、加齢...

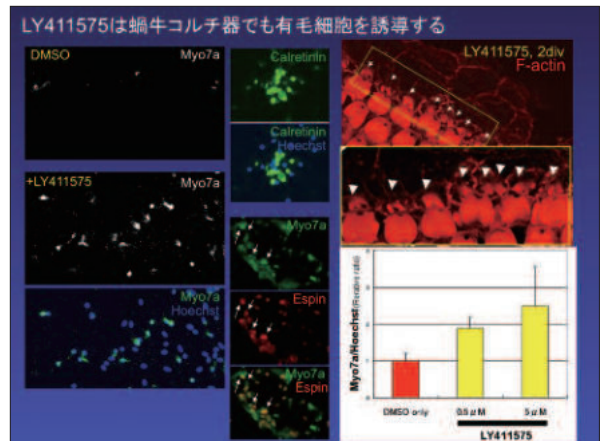
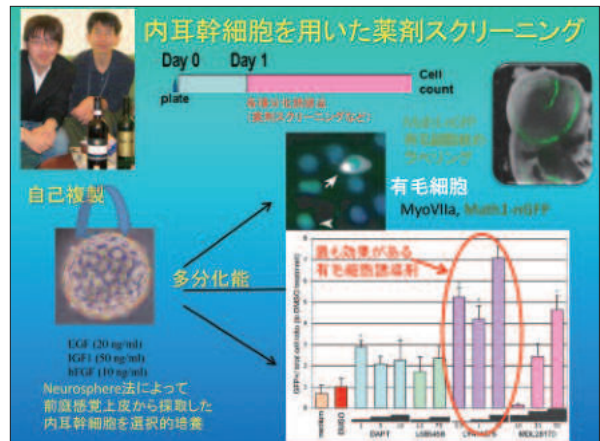
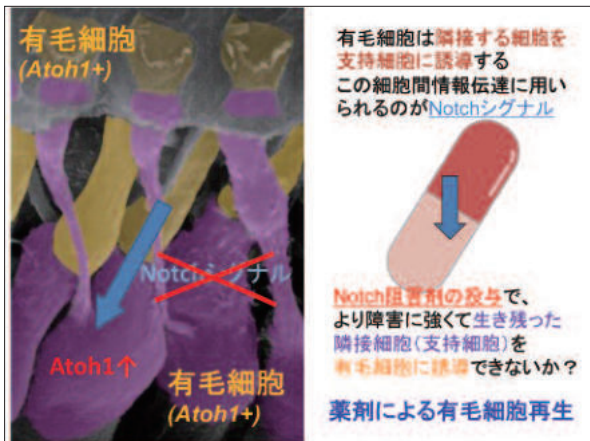
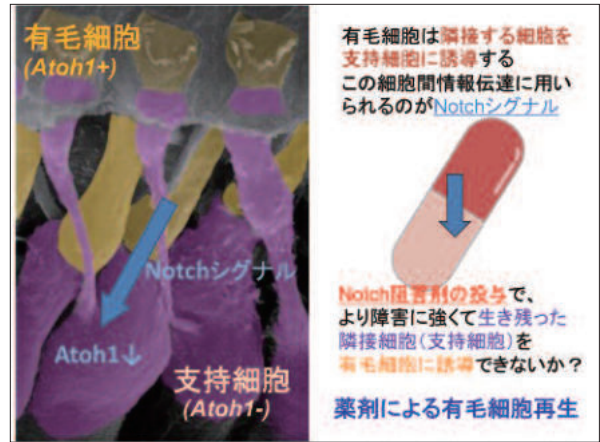
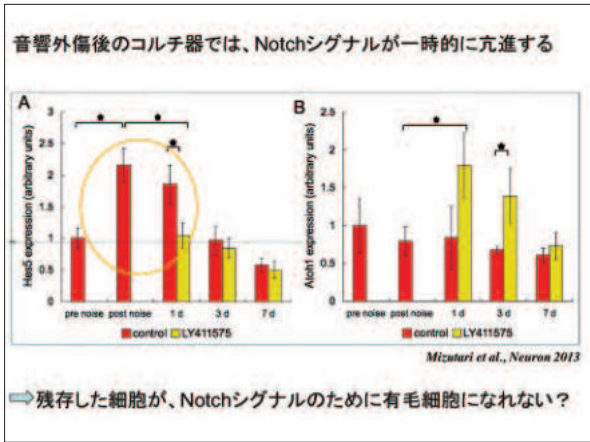
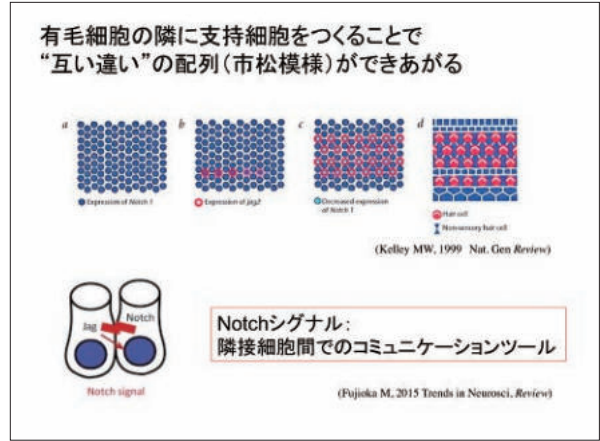
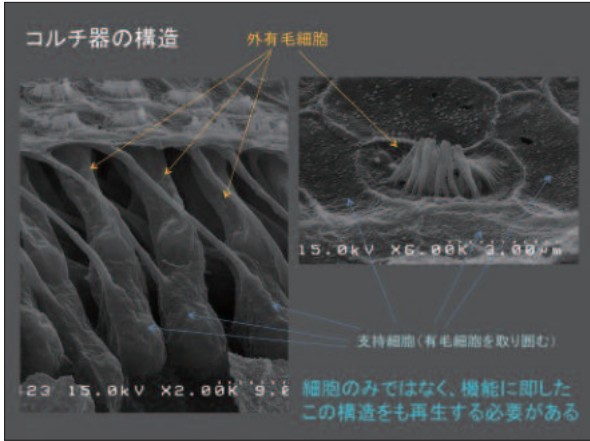
有毛細胞傷害がおきるとそのダメージは不可逆

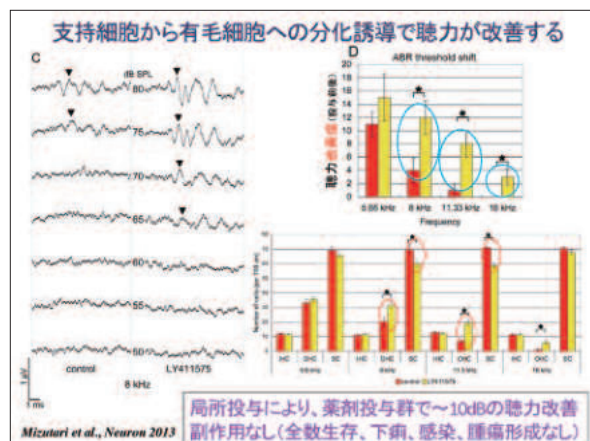
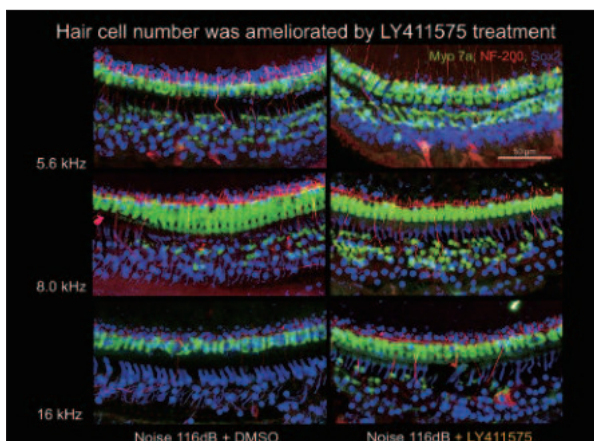
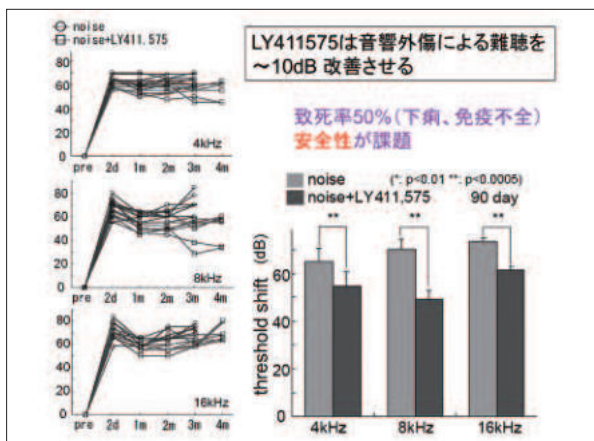
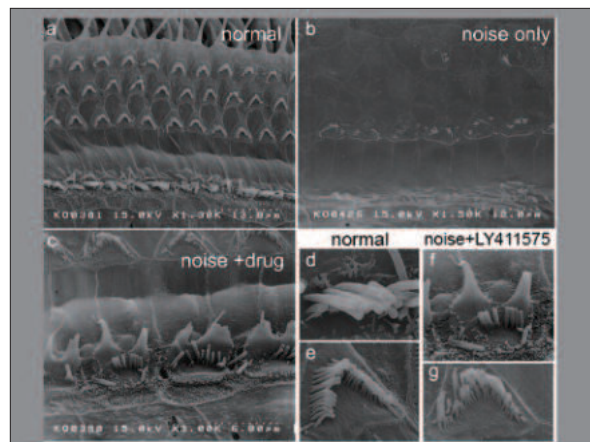
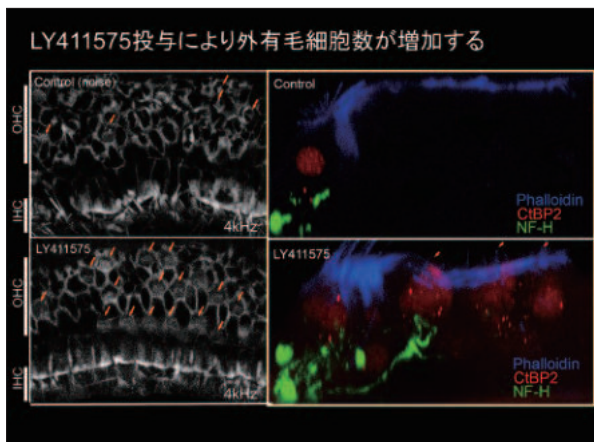
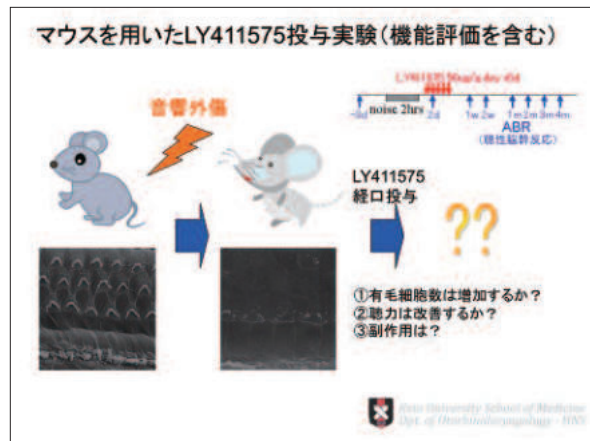
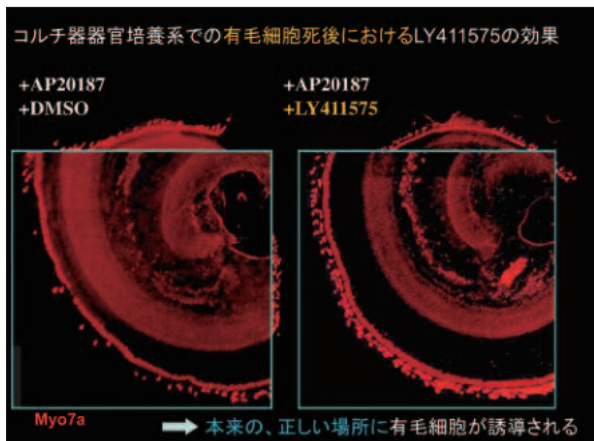


外有毛細胞

内有毛細胞

再生医療のターゲット





薬剤を用いて生き残った神経細胞(支持細胞)を有毛細胞に転化させることで、感音難聴を改善



“有毛細胞分化誘導療法”の可能性

感音難聴(内耳性難聴)に対する薬物治療での再生医療

幹細胞やiPS細胞を用いた創薬研究



①マウス胚由来内耳神経細胞で遺伝子改変した有毛細胞分化誘導剤による内耳再生医療(動物実験)

②ヒト疾患特異的iPS細胞で判ったPatched症候群の発症と遺伝性聴覚障害の発見(本年度より臨床研究)

hiPS細胞 (ヒト人工多能性幹細胞)

4遺伝子導入(山中因子) 2007 Yamanaka et al.

ウイルスを使用しない樹立法 2012 Okita et al.

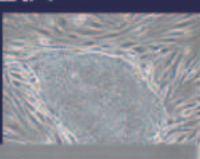
OCT3/4 SOX2 KLF4 LIN28 L-MYC p53shRNA (episomal plasmid)

採血1本で万能細胞を作れる → その人の、身体中の細胞が得られる



iPS細胞株の選択

- ①継代による形態の維持
- ②プラスミド非残存の確認
- ③内耳誘導効率の確認



PAX8 PAX2 SOX2

蝸牛有毛細胞分化誘導療法の“橋渡し研究”ロードマップ

基礎研究・幹細胞での薬剤探索 2004-2007

in vitro 再生実験 2005-2009

マウス in vivo 2006-2012 (2013, Neuron論文)

安全性試験 in vitro 安全性 in vivo 安全性 毒物学評価 (米国) 2013

Safety Trials

Phase I (海外) 2016年-?

Phase II~III 2017年-?

臨床応用

γ-secretase 阻害剤による有毛細胞再生

小笠原生薬コンソーシアム センター創設 (国内) 2014-16(予定)

薬物で難聴改善

ヒトiPS細胞を用いた医療

再生医療への応用

- 神経細胞 → パーキンソン病 脊髄損傷 脳疾患
- 心筋細胞 → 心筋梗塞
- 膵臓β-細胞 → 糖尿病
- 赤血球 白血球 → 白血病 免疫不全症 再生不良性貧血
- 骨髄細胞 → 骨髄移植
- 筋肉 → 筋ジストロフィー
- 内耳(蝸牛・前庭) → 難聴 平衡障害

薬剤開発への応用

ヒトES/iPS細胞からの内耳細胞の作成とその医用応用

未分化な細胞を選択 コロニー化

リンパ球

OCT3/4, SOX2 KLF4, LIN28 L-MYC, p53shRNA

初期化遺伝子導入

hiPS細胞

ヒト内耳前駆細胞

神経節細胞

有毛細胞

支持細胞

血管内皮細胞

蝸牛線維細胞

耳蝸線維細胞 傍耳蝸間葉細胞(上皮系)(間葉系)

外らせん溝

Hosoya et al., in preparation

三胚葉分化能の確認

iPS細胞 → 胚芽体形成1週間 → 接着培養 2-3週間

AFP 内胚葉

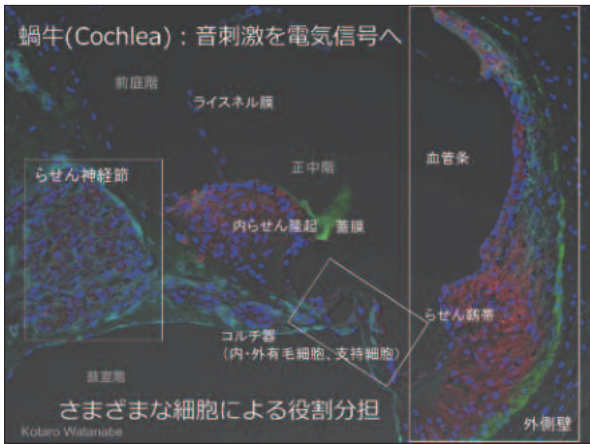
α-SMA 中胚葉

β-III-tubulin 外胚葉

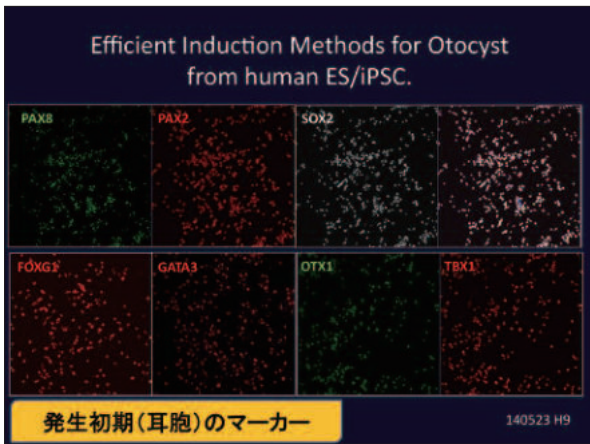
POSI T410M #12

→ ライン毎に三胚葉分化能を確認

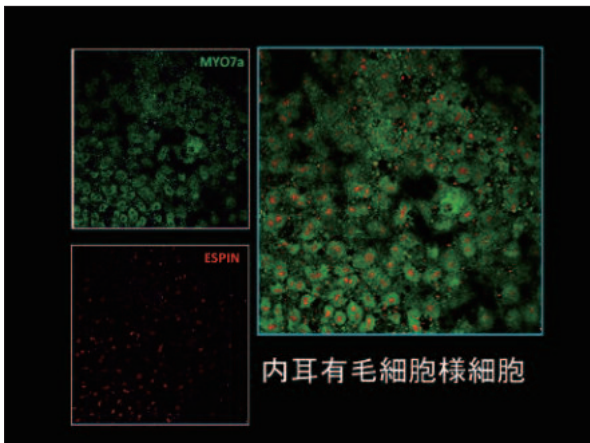
33



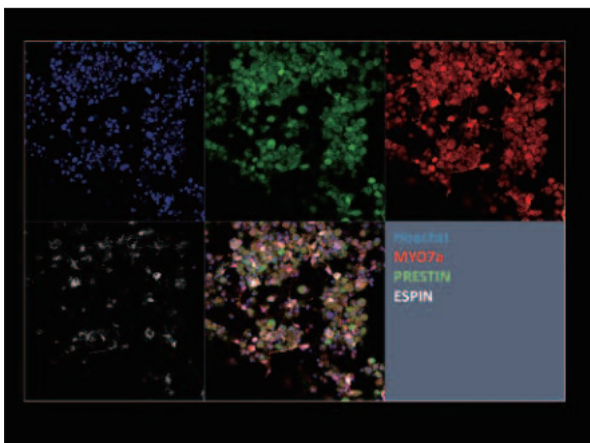
35



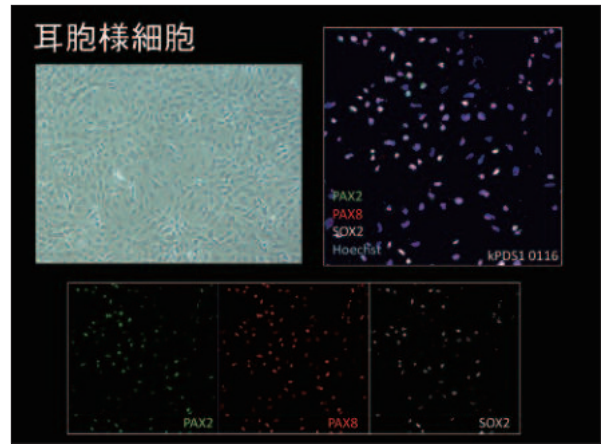
37



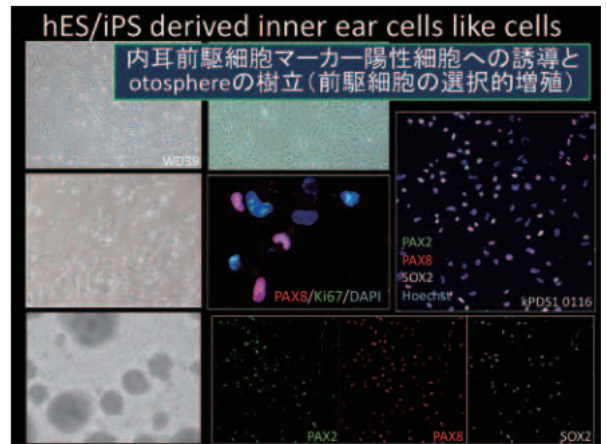
39



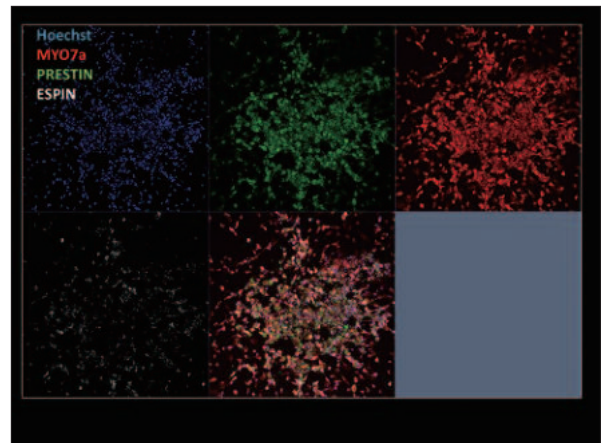
34



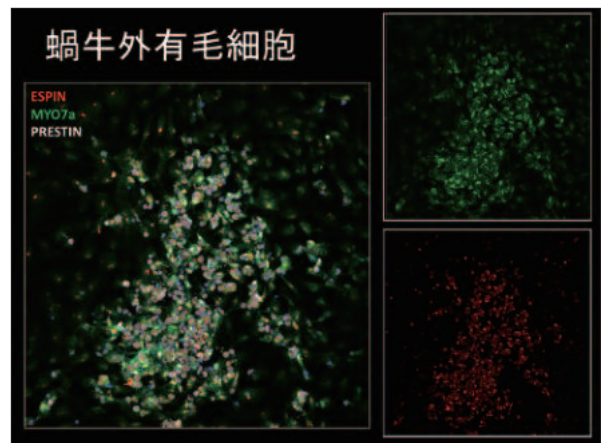
36

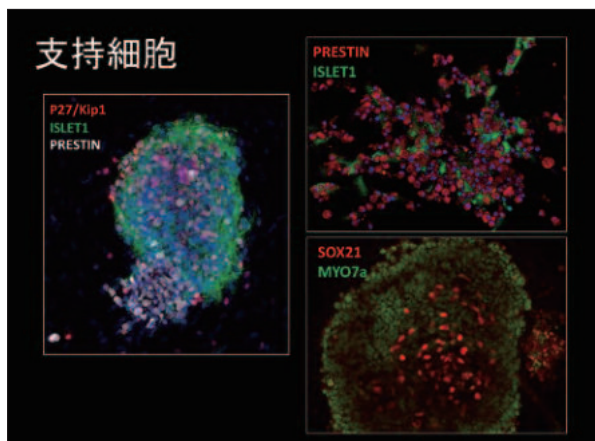


38

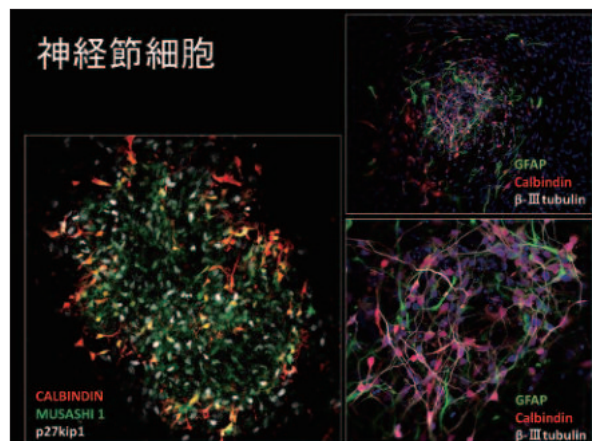


40

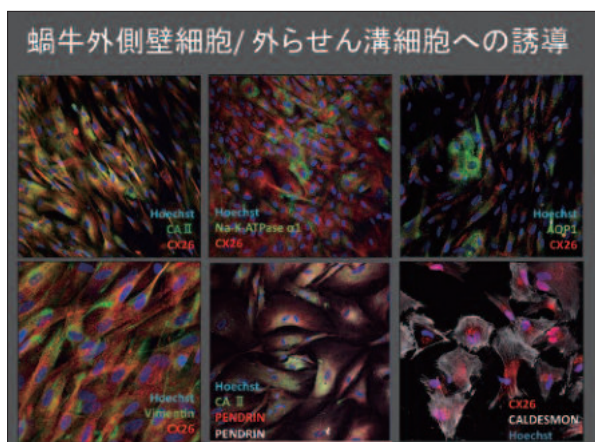




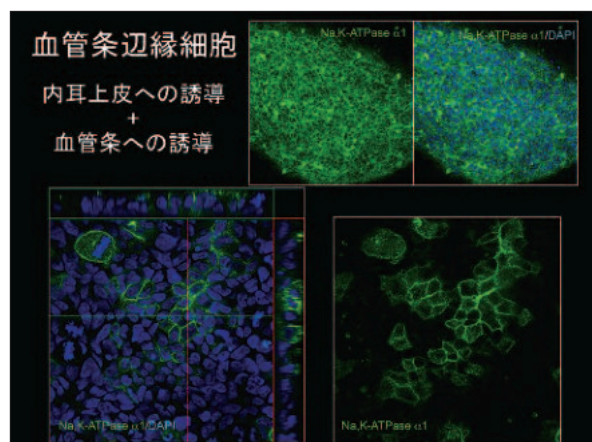
43



44



45



46

極めて効率的な外らせん溝細胞 (蝸牛PENDRIN陽性細胞) への分化誘導法

ほぼ100%のPENDRIN陽性細胞を誘導することが可能な超効率的誘導法

↑

IPS細胞由来神経細胞を用いた神経変性疾患では、従来誘導効率の低さが課題であった

↓

PENDRINの誘導に関しては正常群および疾患群ともにほぼ100%の高効率で標的細胞を得られ、ヒト由来の正常および異常たんぱくソースとしての利用が可能

[H723R #16 由来]

47

極めて効率的な外らせん溝細胞 (蝸牛PENDRIN陽性細胞) への分化誘導法

ほぼ100%のPENDRIN陽性細胞を誘導することが可能な超効率的誘導法

↑

IPS細胞由来神経細胞を用いた神経変性疾患では、従来誘導効率の低さが課題であった

↓

T75フラスコ単位での培養も可能

正常および異常たんぱくソースとしての利用が可能

[H723R #16 由来]

48

Pendred症候群由来iPS細胞の樹立と疾患細胞の病態解析、治療薬スクリーニング



遺伝性疾患、遺伝子病のパラダイムシフト:
『診断されるだけの不治の病』から『根拠のある治療を受けられる病』へ

『小さな命が呼ぶとき』(Extraordinary Measures)

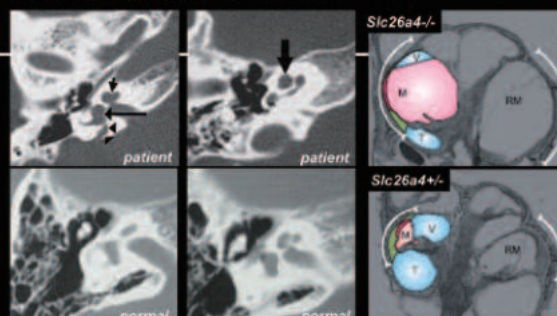
ポンベ病に対する“特効薬”：マイオザイム(ジェンザイム社)の出現

PENDRED症候群

先天性難聴と10才以後に発症する甲状腺腫を合併する常染色体劣性遺伝性疾患で、進行性難聴の発症時期や程度は多様
およそ半数にSLC26A4遺伝子変異(PENDRIN変異)が認められる
日本国内に約4000人

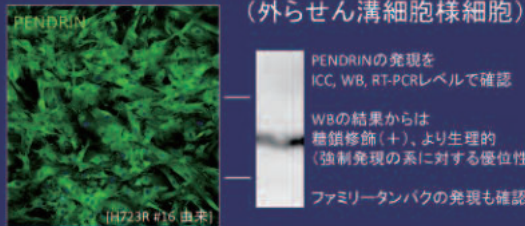

Pendred症候群における内耳奇形



進行性難聴はマウスで再現できない！
H723R ヒト型 *Slc26A4*ノックイン：難聴にならない
*Slc26A4*ノックアウト：生直後からの重度難聴と内リンパ水腫

ヒトiPS細胞由来蝸牛PENDRIN陽性細胞 (外らせん溝細胞様細胞)

PENDRINの発現を ICC, WB, RT-PCRレベルで確認
WBの結果からは糖鎖修飾(+), より生理的(強制発現の系に対する優位性)
ファミリータンパクの発現も確認

500bp
200bp

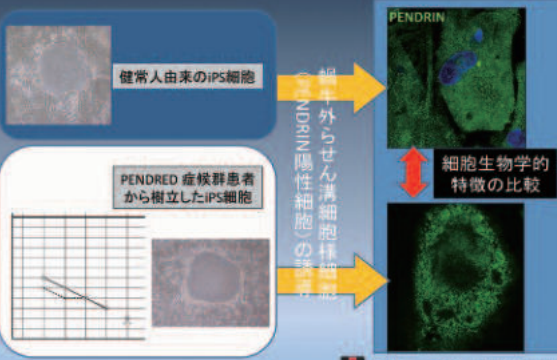
SLC26A2(AE2)
SLC26A3(AE3)
SLC26A9(AE9)
SLC26A3
SLC26A4
SLC26A6
SLC26A7
SLC26A8
SLC26A9
SLC26A11
GAPDH

疾患特異的iPS細胞研究: 研究デザイン

健康人由来のiPS細胞 → 蝸牛外らせん溝細胞様細胞 (PENDRIN陽性細胞) の誘導

PENDRED症候群患者から樹立したiPS細胞 → 蝸牛外らせん溝細胞様細胞 (PENDRIN陽性細胞) の誘導

細胞生物学的特徴の比較



Osaka University, School of Medicine, Dept. of Neurosurgery, 570-8528

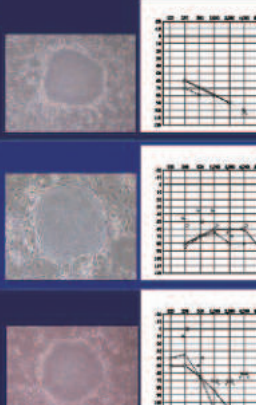
対象患者と聴力像

症例1: 3歳女児
SLC26A4 T410M/T410M 変異
1歳で難聴を指摘

症例2: 6歳女児
SLC26A4 H723R/H723R 変異
3歳で難聴を指摘

症例3: 32歳女性
SLC26A4 M147V/H723R 変異
1歳で難聴を指摘

3症例とも進行性難聴



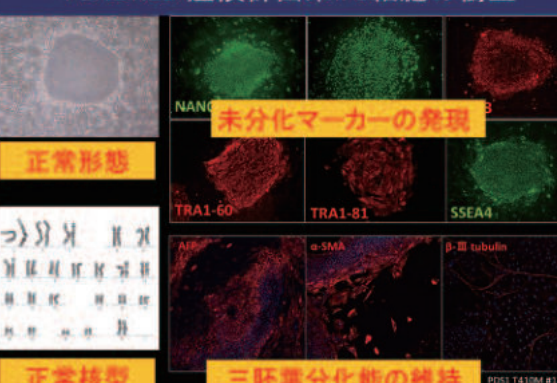
PENDRED 症候群由来iPS細胞の樹立

正常形態

未分化マーカーの発現 (NANOG, TRA1-60, TRA1-81, SSEA4)

正常核型

三胚葉分化能の維持 (AFP, α-SMA, β-tubulin)

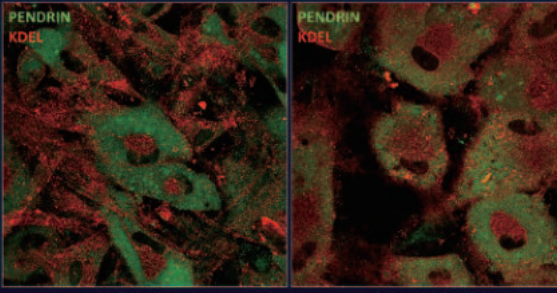


POST T410M #12

iPS細胞由来外らせん溝様細胞

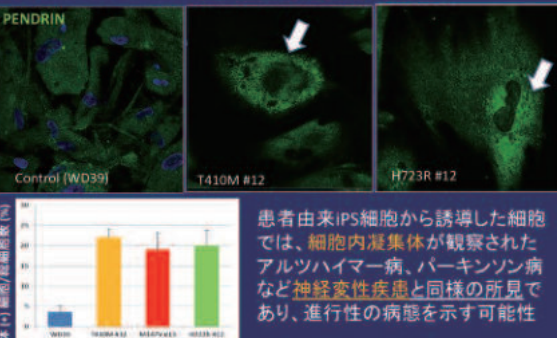
PENDRIN KDEL (健康人由来)

PENDRIN KDEL (H723R患者由来)



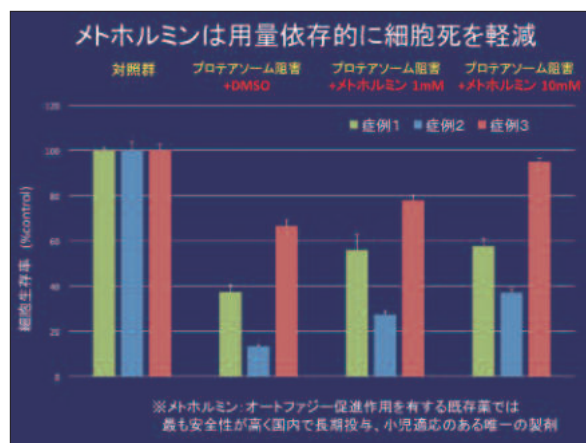
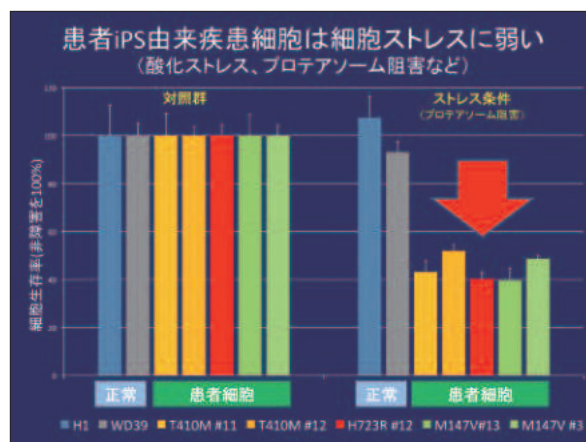
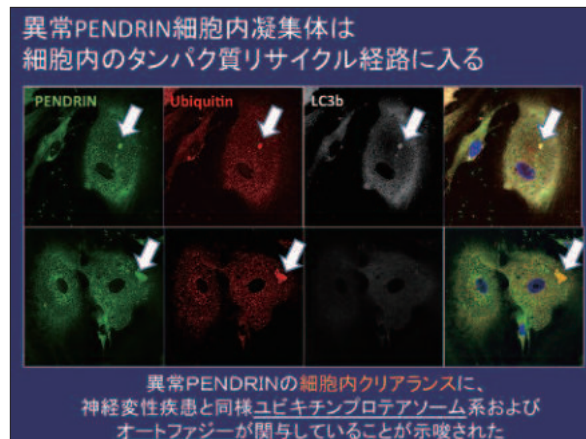
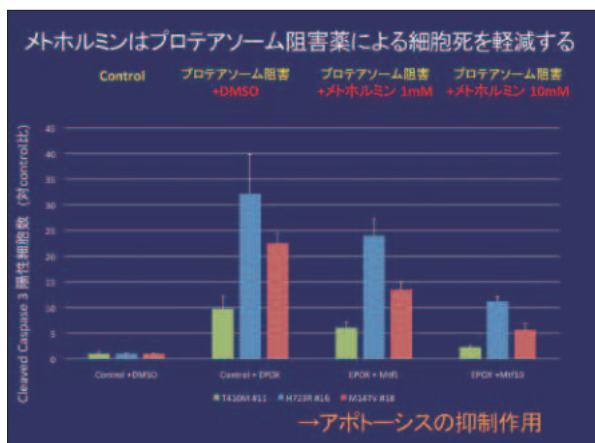
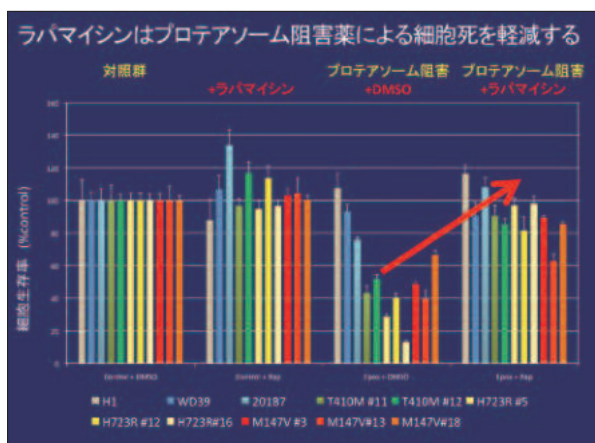
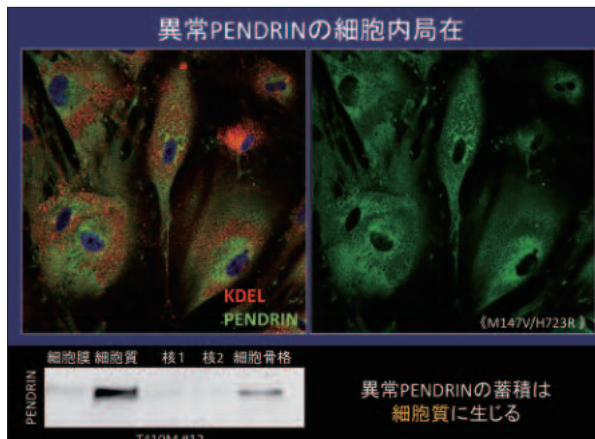
患者由来内耳外らせん溝様細胞では異常PENDRINが細胞内に凝集体を形成

患者由来iPS細胞から誘導した細胞では、細胞内凝集体が観察されたアルツハイマー病、パーキンソン病など神経変性疾患と同様の所見であり、進行性の病態を示す可能性



凝集体(+)細胞/総細胞数 (%)

細胞	凝集体(+)細胞/総細胞数 (%)
正常	~5
健康人由来	~95
患者細胞	~90
健康人由来	~95



PENDRED症候群疾患iPS研究からわかったこと

[新規病態生理]
 PENDRED症候群の疾患細胞は**神経変性疾患**に似て、**変異PENDINGタンパクの細胞内異常凝集**を伴っていた。

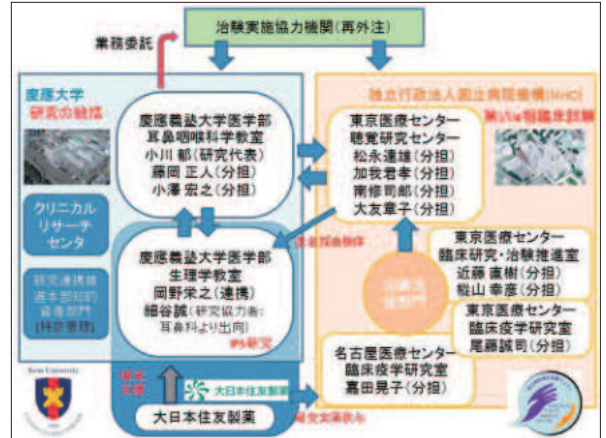
[創薬スクリーニング]
 疾患由来蝸牛外らせん溝様細胞は**細胞ストレスに弱く**、**タンパクのリサイクル経路**である**オートファジー**活性促進により細胞死が抑えられた

治療候補薬: **メトホルミン** (安全性が高く小児適応もある既存薬)



臨床研究(案)

- オープンラベル単施設小規模探索的臨床研究(第I/IIa相当)
- 施設:NHO東京医療センター
- 対象:
 - ①臨床情報と遺伝子検査からPendred症候群と診断が確定し
 - ②軽度~中等度の難聴があり
 - ③すでに聴力経過を観察している症例
- 症例数: 4~8例
- 実薬群: メトグルコ®(大日本住友製薬) 250mg錠_3T3x
- 比較対照はhistorical control または 薬剤非投与観察群 または 同一患者のhistory
- Visitは1ヶ月毎で2年間の観察
- 主要目的(primary endpoint):
Pendred症候群患者にも安全に本薬剤が投与できることが確認
- 副次目的(secondary endpoint):
 - ①同一患者における急性増悪の頻度(回/年)の減少
 - ②観察期間に難聴の進行があった症例数(%)の減少
 - ③対照群と比較した際の難聴の進行度(平均値)の有意改善
- 探索目的(exploratory endpoint):
甲状腺腫発症ないし甲状腺サイズ増大の抑制



まとめ

- 1) 耳科手術での薬剤局所投与による蝸牛有毛細胞再生
内耳幹細胞での薬剤スクリーニングで選んだNotch阻害剤
LY411575により、支持細胞からの有毛細胞分化誘導療法が
感音難聴に対する再生医療となりうる可能性が示された
- 2) 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝性難聴の病態解明
PENDRED症候群由来iPS細胞を用いた疾患細胞では
変異による異常タンパクの“リサイクル不全”が明らかになり
進行性難聴のあたらしい治療標的が見出された。

Keio University School of Medicine
Dept. of Otorhinolaryngology-ENT

ご静聴ありがとうございました

あ と が き

第10回感覚器シンポジウム「幹細胞・iPS細胞を用いた感覚器研究の最前線」が、平成27年3月6日（金）に、昨年が続いて《市民公開講座》を兼ねて開催された。大変盛況であり、特に内容の素晴らしさに驚きの声が多く聞かれた。昨年の第9回感覚器シンポジウムは、東京医療センター・感覚器センター設立10周年記念として、《市民公開講座》を兼ねて平成26年3月14日（金）に開催された。本年は次の10年に向けての第一歩となる年で、その意味で大変素晴らしいスタートを切ることができた。

平成26年10月25日（土）に、感覚器センター10周年記念講演・式典を開催したため、平成26年度の感覚器シンポジウムを別途に行うか、今回は取りやめるかの議論が10周年終了後の11月の会議で行われたが、開催する事ですぐに意見が一致した。そこで急遽日時を3月6日（金）、場所を外来棟3階大会議室と決め、活動を開始した。プログラムの作成を松永先生にお願いし、講演者の先生方に講演を依頼した。演者の先生方の都合を伺うことなく企画を行ったため、多少不安の残るスタートであったが、皆様のご協力と努力により、非常に内容の充実したシンポジウムとなった。いずれの研究も世界の最先端を走っている、話題性のある研究であるだけでなく、臨床应用到手の届く位置にまで来ている研究であることが、聴衆に感銘を与えた由縁と思われる。

講演をいただいた梅澤明弘先生、中村雅也先生、大島一男先生、岩田岳先生、藤岡正人先生に御礼申し上げます。また、企画して頂いた松永先生、支援していただいた感覚器センターの先生方、そしてシンポジウムを陰で支えていただいた吉川亜希様、増田知実様に御礼申し上げます。

国立病院機構 東京医療センター
院長 武 田 純 三

第10回 臨床研究(感覚器)センター
感覚器シンポジウム
東京医療センター 臨床研究(感覚器)センター 記録集 No.9
監修 松永 達雄

発行/平成27年 8月20日

発行人/武田 純三

発行所/独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター
臨床研究(感覚器)センター

〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1
TEL:03-3411-0111(代表)
03-3411-0379(事務室直通)
FAX:03-3411-0185

印刷所/株式会社 学術社



東京医療センターと臨床研究(感覚器)センター