(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-200923
(P2017-200923A)
(43)公開日　平成29年11月9日(2017.11.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 31/436	***(2006.01)***	A61K	31/436		2G045
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	111	4B063
A61P 27/16	***(2006.01)***	A61P	27/16		4C086
G01N 33/15	***(2006.01)***	G01N	33/15	Z	
G01N 33/48	***(2006.01)***	G01N	33/48	M	

審査請求 未請求　請求項の数 9　ＯＬ　（全 26 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-102712 (P2017-102712)
(22)出願日　平成29年5月24日 (2017.5.24)
(62)分割の表示　特願2016-570589 (P2016-570589)の分割
原出願日　平成28年1月13日 (2016.1.13)
(31)優先権主張番号　特願2015-7849 (P2015-7849)
(32)優先日　平成27年1月19日 (2015.1.19)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

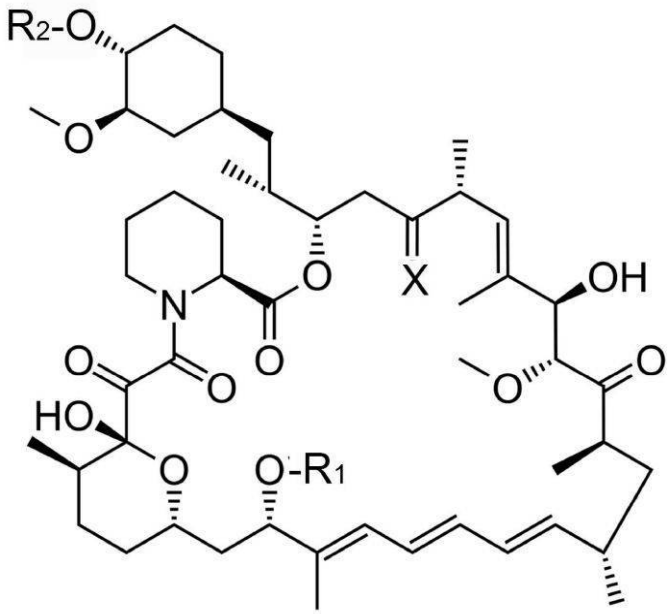
(71)出願人　899000079
学校法人慶應義塾
東京都港区三田２丁目１５番４５号
(74)代理人　110000176
一色国際特許業務法人
(72)発明者　細谷　誠
東京都新宿区信濃町３５番地　慶應義塾大学医学部内
(72)発明者　藤岡　正人
東京都新宿区信濃町３５番地　慶應義塾大学医学部内
(72)発明者　岡野　栄之
東京都新宿区信濃町３５番地　慶應義塾大学医学部内

最終頁に続く

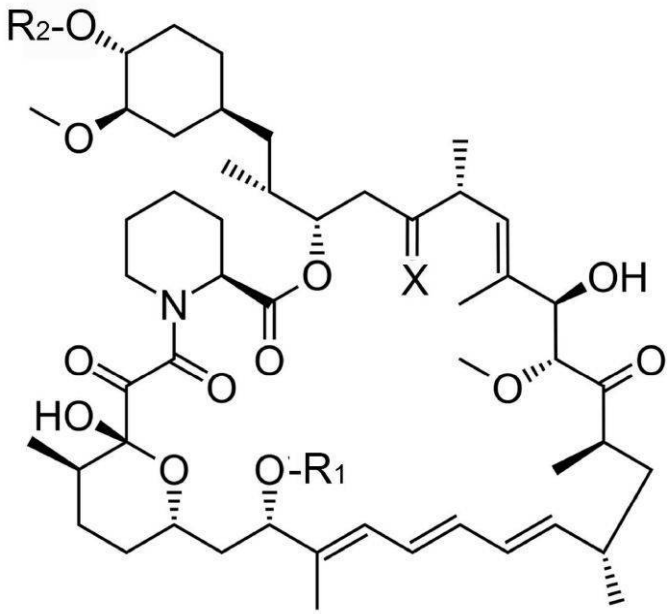
(54)【発明の名称】内耳性難聴治療薬

(57)【要約】　（修正有）
【課題】新規なアポトーシス抑制剤及び内耳性難聴治療薬の提供。
【解決手段】Ｃ1-6アルキルまたはＣ3-6アルキニル基、または、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－ＣＨ2－ＣＨ2－ＯＨ基、さらには、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）基等の置換基で置換されたラパマイシン誘導体を有効成分として含有する、アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記構造式ＩＩに示されるラパマイシン誘導体を有効成分として含有する、アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤。



（ＩＩ）
（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）
【請求項２】
前記アポトーシスに起因する内耳性難聴が、ペンドレッド症候群に由来する、請求項１に記載の薬剤。
【請求項３】
前記ラパマイシン誘導体がラパマイシンである、請求項１または２に記載の薬剤。
【請求項４】
下記構造式ＩＩに示されるラパマイシン誘導体を有効成分として含有する、アポトーシス抑制剤。



（ＩＩ）

（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

【請求項５】

内耳細胞のアポトーシスを抑制する、請求項４に記載のアポトーシス抑制剤。

【請求項６】

前記ラパマイシン誘導体がラパマイシンである、請求項４または５に記載のアポトーシス抑制剤。

【請求項７】

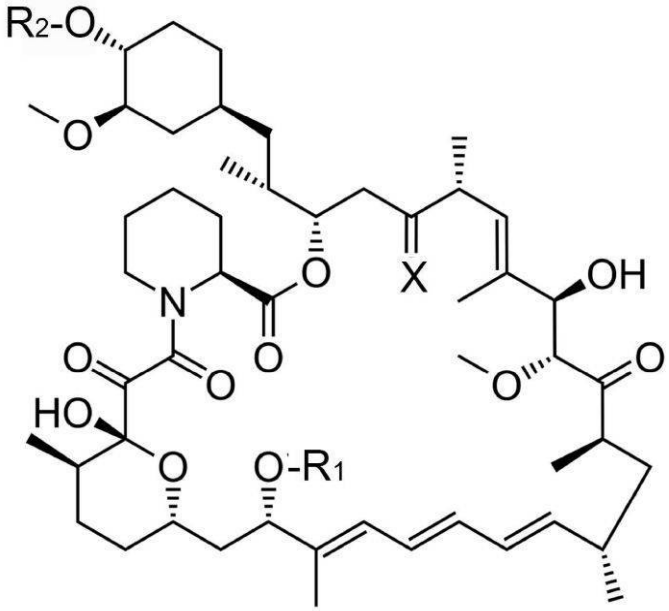
アポトーシスを調べる方法であって、

下記構造式（ＩＩ）に示される化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、

前記内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、

前記内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、

を含む方法。



（ＩＩ）

（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

【請求項８】

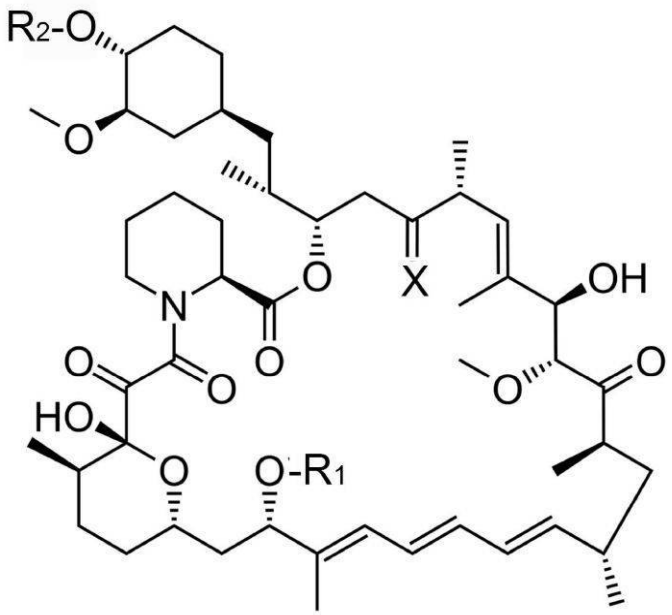
アポトーシス抑制物質のスクリーニング方法であって、

下記構造式（ＩＩ）に示される化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、

前記内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、

前記内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、

を含む方法。



（ＩＩ）

（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

【請求項９】

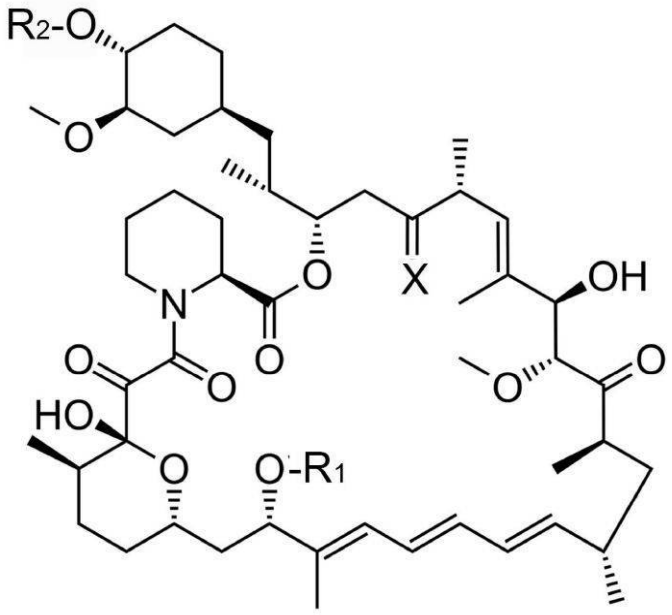
アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤のスクリーニング方法であって、

下記構造式（ＩＩ）に示される化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、

前記内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、

前記内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、

を含む方法。



（ＩＩ）

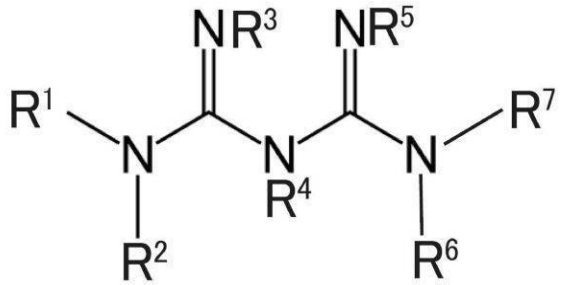
（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、内耳性難聴治療薬に関する。
【背景技術】
【０００２】
内耳において、蝸牛の中にある有毛細胞、ラセン神経節細胞が聴覚に重要な役割を果たしている。これらの細胞は、再生能力がないため、一度死んでしまうと治療効果が期待できない。このため、難聴の薬物治療は困難であるとされている。
【０００３】
従って、現在、難聴に使用されている治療薬には、内耳の循環障害や炎症によって生じる突発性難聴に対する、循環改善薬や抗炎症剤程度しか存在せず（例えば、特許文献１参照）、他の難聴に対する薬物の開発が期待されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【特許文献１】特許公開２００４－１２３７１３号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明は、新規なアポトーシス抑制剤及び内耳性難聴治療薬を提供することを目的としてなされた。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明の一実施態様は、下記構造式Ｉに示されるビグアナイド系化合物または下記構造式ＩＩに示されるラパマイシン誘導体を有効成分として含有する、アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤である。前記アポトーシスに起因する内耳性難聴が、ペンドレッド症候群に由来してもよい。前記ビグアナイド系化合物がメトホルミンであってもよい。前記ラパマイシン誘導体がラパマイシンであってもよい。
【０００７】
本発明のさらなる一実施態様は、下記構造式Ｉに示されるビグアナイド系化合物または下記構造式ＩＩに示されるラパマイシン誘導体を有効成分として含有する、アポトーシス抑制剤である。このアポトーシス抑制剤は内耳細胞のアポトーシスを抑制するものであってもよい。前記ビグアナイド系化合物がメトホルミンであってもよい。前記ラパマイシン誘導体がラパマイシンであってもよい。
【０００８】
本発明のさらなる一実施態様は、アポトーシスを調べる方法であって、下記構造式（Ｉ）または（ＩＩ）に示される化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、前記内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、前記内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、を含む方法である。
【０００９】
本発明のさらなる一実施態様は、アポトーシス抑制物質のスクリーニング方法であって、下記構造式（Ｉ）または（ＩＩ）に示される化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、前記内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、前記内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、を含む方法である。
【００１０】
本発明のさらなる一実施態様は、アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤のスクリーニング方法であって、下記構造式（Ｉ）または（ＩＩ）に示される化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、前記内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、前記内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、を含む方法である。
【００１１】

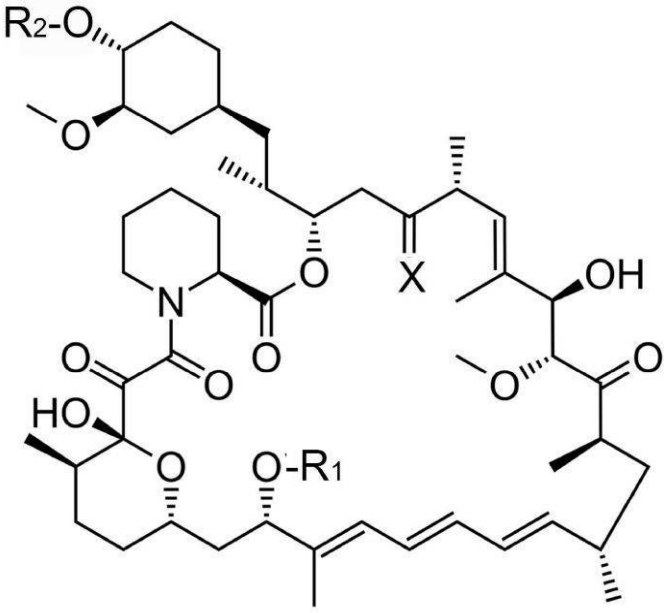
本発明のさらなる一実施態様は、アポトーシスに起因する内耳性難聴を有する患者を治療するための治療方法であって、前記患者に、有効量の下記構造式Ｉに示されるビグアナイド系化合物または下記構造式ＩＩに示されるラパマイシン誘導体を投与することを含む、治療方法である。前記ビグアナイド系化合物または前記ラパマイシン誘導体が鼓室内に投与されてもよい。前記アポトーシスに起因する内耳性難聴が、ペンドレッド症候群に由来してもよい。前記ビグアナイド系化合物がメトホルミンであってもよい。前記ラパマイシン誘導体がラパマイシンであってもよい。

【００１２】



（Ｉ）

（式中、R^1～R^7は、水素原子、ハロゲン原子、又は、それぞれハロゲン原子、シアノ基、C_{1-6}アルキル基、C_{1-6}アルコキシ基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{2-6}アルケニル基、C_{2-6}アルキニル基、及びフェニル基から選ばれる置換基を有していてもよい、C_{1-6}アルキル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{6-10}アリール基、５若しくは６員ヘテロアリール基、又は５若しくは６員の非芳香族系ヘテロ環式基、から独立に選択される。）



（ＩＩ）

（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】（Ａ）本発明の一実施例において、得られた内耳幹細胞の位相差顕微鏡写真である。（Ｂ）本発明の一実施例において、得られた内耳幹細胞を（ａ）抗ＰＡＸ２抗体、（ｂ）抗ＰＡＸ８抗体、（ｃ）抗ＳＯＸ２抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

【図２】本発明の一実施例（有毛細胞の分化誘導）において、内耳幹細胞を浮遊培養し、ＦＧＦ９およびＦＧＦ２０存在下で培養することによって、有毛細胞のマーカーであるエスピン、ミオシン７ａ、プレスチンが発現することを示した顕微鏡写真である。（左図；三重染色）エスピン、ミオシン７ａ、プレスチン（右上）ミオシン７ａ（右下）エスピンの抗体で、染色した。
【図３】本発明の一実施例（支持細胞の分化誘導）において、内耳幹細胞を浮遊培養し、ＦＧＦ９およびＦＧＦ２０存在下で培養することによって、支持細胞マーカーであるp27kip1、ISLET１が発現することを示した顕微鏡写真である。（左図；三重染色）p27kip1、ISLET１、プレスチン（右図；二重染色）ISLET１、プレスチンの抗体で、染色した。
【図４】本発明の一実施例（蝸牛神経節細胞の分化誘導）において、内耳幹細胞を浮遊培養し、ＦＧＦ９およびＦＧＦ２０存在下で培養することによって、蝸牛神経節グリア細胞のマーカーであるＧＦＡＰ、成熟神経細胞のマーカーであるカルビンジン及びベータＩＩＩチューブリンが発現することを示した顕微鏡写真である。ＧＦＡＰ、カルビンジン及びベータＩＩＩチューブリンの抗体で、三重染色をした。
【図５】本発明の一実施例（Periotic mesenchymal 細胞の分化誘導）において、内耳幹細胞をｂＦＧＦ存在下で培養することにより、Periotic mesenchymal 細胞のマーカーであるＳ１００、ＰＯＵ３Ｆ４、カルデスモン、ＴＢＸ１８が発現することを示した顕微鏡写真である。（上左）Ｓ１００、カルデスモン、ＴＢＸ１８（上右）ｃｘ２６、ＴＢＸ１８、ＰＯＵ３ｆ４の抗体で、三重染色をした。（下図）ｂＦＧＦ存在下で長期間培養したときの位相差顕微鏡写真である。
【図６】本発明の一実施例（内耳線維細胞及びペンドリン陽性細胞の分化誘導）において、Periotic mesenchymal 細胞をｂＦＧＦ存在下で培養した後、ｂＦＧＦ非存在下で培養することにより、蝸牛線維細胞、および蝸牛血管条細胞のマーカーである炭酸脱水素酵素、アクアポリン１、ナトリウムカリウムＡＴＰアーゼ、ビメンチン、コネキシン２６および３０が発現すること、Periotic mesenchymal 細胞をｂＦＧＦ存在下で培養した後、$NaHCO_3$存在下で培養することにより、ペンドリンが発現すること、を示した顕微鏡写真である。（上左）ＣＡＩＩとコネキシン２６（上中）ナトリウムカリウムＡＴＰアーゼとコネキシン２６（上右）アクアポリン１とコネキシン２６（下左）ビメンチンとコネキシン２６、の抗体で二重染色した。（下右）ＣＡＩＩとペンドリンの抗体で二重染色した。
【図７】本発明の一実施例において、ゲンタマイシン投与により内耳感覚上皮障害が誘導されたことを示した結果である。
【図８】本発明の一実施例において、ペンドレッド症候群患者ｉＰＳ細胞由来の内耳細胞において細胞内凝集体が形成されることを示す写真である。
【図９】本発明の一実施例において、ペンドレッド症候群患者ｉＰＳ細胞由来の内耳細胞の細胞生存率が、ストレス負荷時に低下することを示すグラフである。
【図１０】本発明の一実施例において、ラパマイシンが、図９に示した細胞生存率の低下を抑制することを示すグラフである。
【図１１】本発明の一実施例において、図９に示した細胞生存率の低下の原因であるアポトーシスを、ラパマイシンが抑制することを示すグラフである。
【図１２】本発明の一実施例において、メトホルミンが、図９に示した細胞生存率の低下を抑制することを示すグラフである。
【図１３】本発明の一実施例において、図９に示した細胞生存率の低下の原因であるアポトーシスを、メトホルミンが抑制することを示すグラフである。
【図１４】本発明の一参考例において、図９に示した細胞生存率の低下の原因であるアポトーシスを、カルペプチンが抑制できないことを示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現

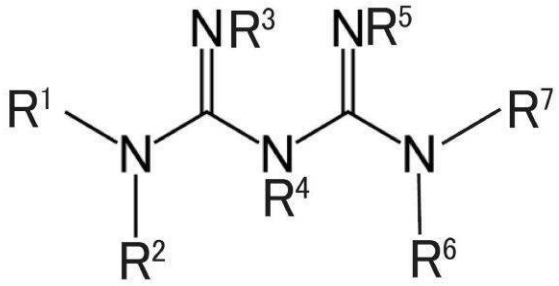
できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【００１５】

（１）アポトーシス抑制剤

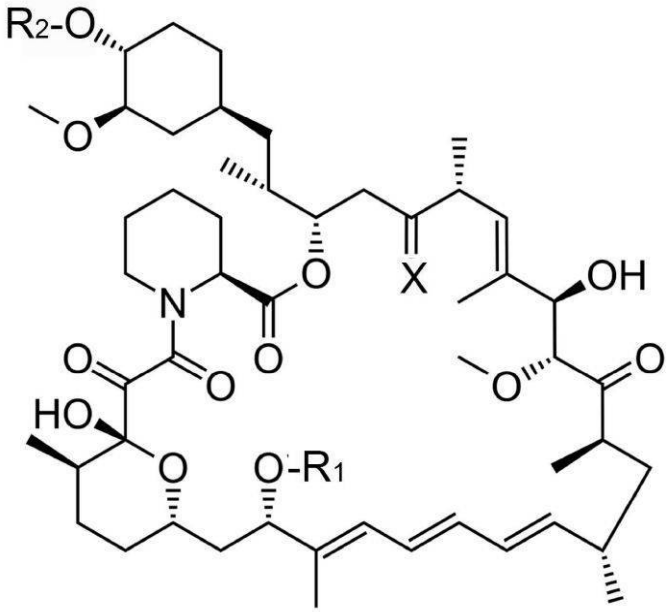
本発明は、ビグアナイド系化合物（下記構造式Ｉ）またはラパマイシン誘導体（下記構造式ＩＩ）またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、内耳細胞のアポトーシス抑制剤である。

【００１６】



（Ｉ）

（式中、R^1～R^7は、水素原子、ハロゲン原子、又は、それぞれハロゲン原子、シアノ基、C_{1-6}アルキル基、C_{1-6}アルコキシ基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{2-6}アルケニル基、C_{2-6}アルキニル基、及びフェニル基から選ばれる置換基を有していてもよい、C_{1-6}アルキル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{6-10}アリール基、５若しくは６員ヘテロアリール基、又は５若しくは６員の非芳香族系ヘテロ環式基、から独立に選択される。）



（ＩＩ）

（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

アポトーシス抑制の対象とする内耳細胞は特に限定されず、アポトーシスを起こしやすい内耳細胞が好ましく、アポトーシスに起因する内耳性難聴に罹患した動物由来であるこ

とがさらに好ましい。内耳性難聴は、アポトーシスに起因する内耳性難聴であれば特に限定されず、例えば、ペンドレッド症候群による難聴、老人性難聴などが例示できる。また、アポトーシス抑制の対象とする内耳細胞は、生物個体の体内に存在する細胞であっても、培養細胞であってもよい。生物個体の種は特に限定されないが、脊椎動物が好ましく、ヒトが最も好ましい。培養細胞は、樹立された細胞株であっても、初代培養細胞であっても、幹細胞から分化させた内耳細胞であってもよい。幹細胞から内耳細胞への分化誘導法の詳細は、後述する。

【００１７】

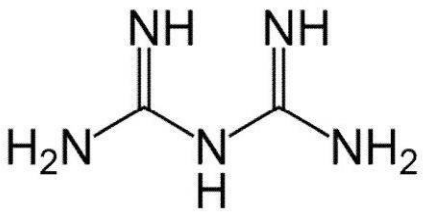
このように、本発明のアポトーシス抑制剤は、内耳細胞に用いることができることから、アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤として有用である。治療の対象となる内耳性難聴は、アポトーシスに起因する内耳性難聴であれば特に限定されず、例えば、ペンドレッド症候群による難聴、老人性難聴などが例示できる。ここで、治療とは、上記難聴を回復すること、上記難聴の進行を止めること、上記難聴の予防をすることのいずれをも含むものとする。

【００１８】

（２）ビグアナイド系化合物

ビグアナイドとは、グアニジン２分子が窒素原子を共有して連なった、下記構造（ＩＩＩ）を有する化合物である。

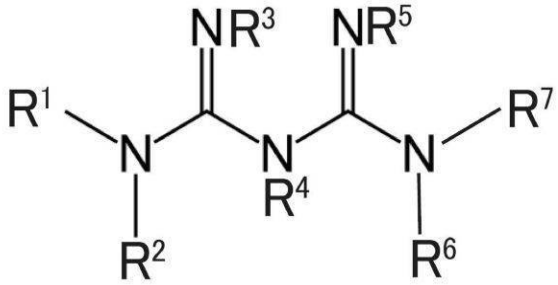
【００１９】



（ＩＩＩ）

本明細書において、ビグアナイド系化合物は、ビグアナイドおよびビグアナイドの水素が置換された化合物の総称をいうものとする。置換基としては、特に限定されず、水素原子、ハロゲン原子、C_{1-6}アルキル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{6-10}アリール基、５若しくは６員ヘテロアリール基、５若しくは６員の非芳香族系ヘテロ環式基（C_{1-6}アルキル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{6-10}アリール基、５若しくは６員ヘテロアリール基、５若しくは６員の非芳香族系ヘテロ環式基は、ハロゲン原子、シアノ基、C_{1-6}アルキル基、C_{1-6}アルコキシ基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{2-6}アルケニル基、C_{2-6}アルキニル基、及びフェニル基から選ばれる置換基を有していてもよい）などが例示できる。すなわち、ビグアナイド系化合物は、以下の構造式に示される化合物を含む。

【００２０】



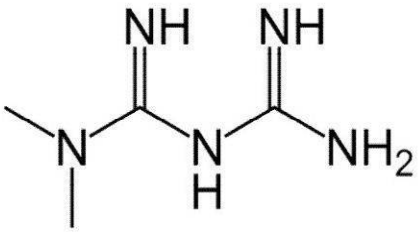
（Ｉ）

（式中、R^1～R^7は、水素原子、ハロゲン原子、又は、それぞれハロゲン原子、シアノ基、C_{1-6}アルキル基、C_{1-6}アルコキシ基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{3-8}シクロア

ルキル基、C_{2-6}アルケニル基、C_{2-6}アルキニル基、及びフェニル基から選ばれる置換基を有していてもよい、C_{1-6}アルキル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{6-10}アリール基、５若しくは６員ヘテロアリール基、又は５若しくは６員の非芳香族系ヘテロ環式基、から独立に選択されるが、全てが水素原子ではない。）

なお、最も好ましい化合物は、下記構造式ＩＶを有するメトホルミンである。

【００２１】

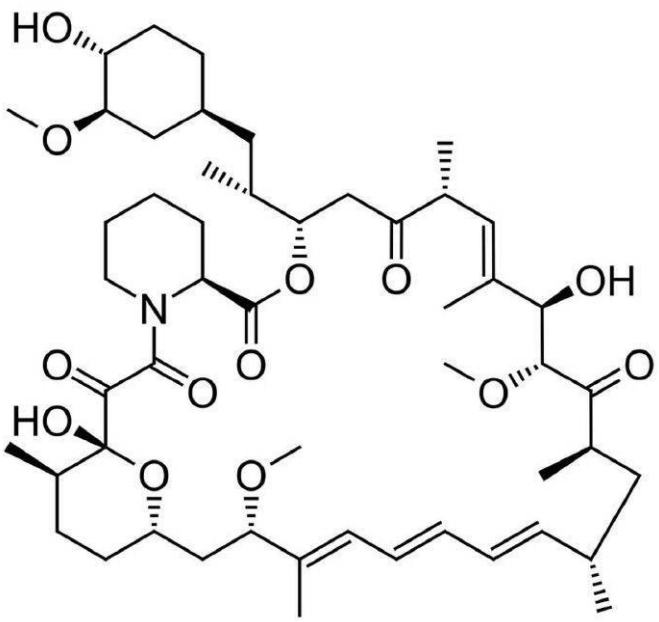


（ＩＶ）

（３）ラパマイシン誘導体

ラパマイシンは、以下の構造式Ｖを有する化合物である。

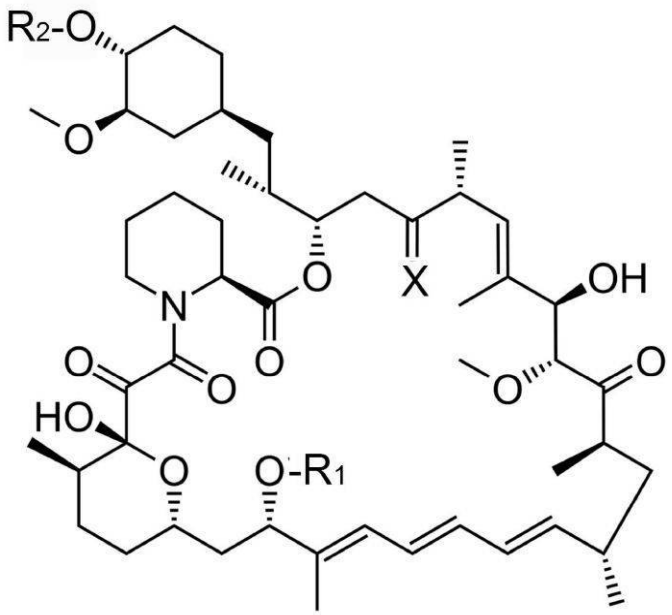
【００２２】



（Ｖ）

本明細書において、ラパマイシン誘導体は、以下の構造式に示される化合物を含む。

【００２３】



（ＩＩ）

（式中、R_1は、C_{1-6}アルキルまたはC_{3-6}アルキニルであり、R_2は、Ｈ、－ＣＨ２－ＯＨまたは－CH_2－CH_2－ＯＨであり、そしてＸは、＝Ｏ、（Ｈ，Ｈ）または（Ｈ，ＯＨ）である。）

例えば、ラパマイシン誘導体には、（１）４０－Ｏ－置換ラパマイシン誘導体（例えば、４０－Ｏ－アルキル－ラパマイシン誘導体（４０－Ｏ－ヒドロキシアルキル－ラパマイシン誘導体や４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）－エチル－ラパマイシンなど））、（２）３２－デオキソ－ラパマイシンとその誘導体、および３２－ヒドロキシ－ラパマイシンとその誘導体、（３）１６－Ｏ－置換ラパマイシン誘導体（例えば１６－ペント－２－イニルオキシ－３２－デオキソラパマイシン、１６－ペント－２－イニルオキシ－３２（ＳまたはＲ）－ジヒドロ－ラパマイシン、１６－ペント－２－イニルオキシ－３２（ＳまたはＲ）－ジヒドロ－４０－Ｏ－（２－ヒドロキシエチル）－ラパマイシン）、（４）４０位の酸素基にてアシル化されるラパマイシン誘導体（例えば、４０－［３－ヒドロキシ－２－（ヒドロキシ－メチル）－２－プロピオン酸メチル］－ラパマイシン（ＣＣＩ７７９としても公知））、（５）ヘテロシクリルにより４０位にて置換されるラパマイシン誘導体（例えば、４０－エピ－（テトラゾリル）－ラパマイシン（ＡＢＴ５７８としても公知））、（６）例えばＷＯ９８０２４４１またはＷＯ０１１４３８７に記載の、いわゆるラパログ（例えば、４０－Ｏ－ホスホ－含有ラパマイシン誘導体（４０－Ｏ－ジメチルホスフィニル－ラパマイシン（ＡＰ２３５７３を含む）など））、（７）４０－Ｏ－アルコキシ－アルキル－ラパマイシン誘導体（例えば、商品名バイオリムス（バイオリムスＡ９として開示される化合物（４０－Ｏ－（２－エトキシ）－エチル－ラパマイシンを含む）、および商品名ＴＡＦＡ－９３、ＡＰ２３４６４、ＡＰ２３６７５またはＡＰ２３８４１として開示される化合物）が含まれるが、（８）ラパマイシンが最も好ましい。

【００２４】

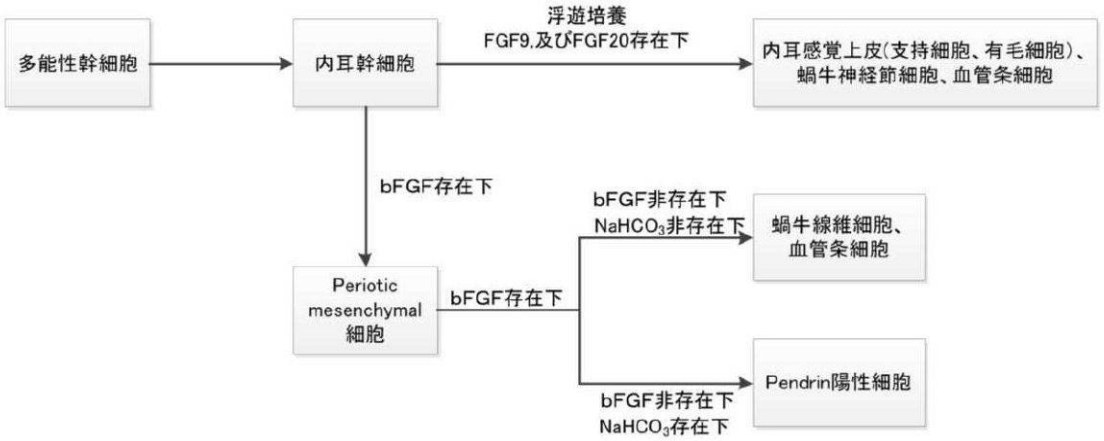
（４）幹細胞から内耳細胞への分化誘導

以下、幹細胞から内耳細胞への分化誘導法（以下、内耳細胞誘導法とも称する）を述べる。幹細胞は特に限定されないが、多能性幹細胞や内耳幹細胞が例示できる。以下、多能性幹細胞を例として、内耳細胞誘導法を詳述する。

【００２５】

この内耳細胞誘導法は、以下の流れに沿って行うことができる。

【００２６】



［１］多能性幹細胞から内耳幹細胞への分化誘導

多能性幹細胞から内耳幹細胞への誘導方法においては、

第１工程：多能性幹細胞をROCK阻害剤存在下で培養する工程

第２工程：ROCK阻害剤非存在下で培養する工程

第３工程：無血清培地で培養する工程

第４工程：増殖因子含有無血清培地で培養する工程

第５工程：単一細胞に解離する工程

を、この順で行う。なお、工程間には、本法には本質的ではない工程が挿入されてもかまわない。

【００２７】

多能性幹細胞は分化多能性（multipotencyまたはpluripotency）を有する細胞であれば特に限定されず、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）や人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）、Ｍｕｓｅ細胞などが例示できるが、万能性（totipotency）を有する細胞が特に好ましい。

【００２８】

ROCK（Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ）阻害剤も特に限定されず、例えば、Y-27632、Fasudil hydrochloride、K-115(リパスジル塩酸塩水和物)、DE-104などが例示できる。ROCK阻害剤の濃度は、適宜最適濃度を容易に決定できるが、０．０５％～０．２％が好ましく、０．１％がより好ましい。

【００２９】

第１工程及び第２工程で用いる培地は、多能性幹細胞が維持できる培地であれば特に限定されず、ｍＴｅＳＲ１が例示できる。第１工程は、１～３日間行うことが好ましく、１～２日間行うことがより好ましい。第２工程は、１～３日間行うことが好ましく、１～２日間行うことがより好ましい。

【００３０】

第２工程において、ROCK阻害剤非存在下の意味は、ROCK阻害剤が実質的に非存在であればよく、効果がないレベルの濃度で含まれていてもよい。

【００３１】

第３工程で用いる無血清培地は、DMEM/F12+B27+N2+GlutaMax+Nonessential aminoacidなどが例示できる。第３工程の培養は、２～６日間行うことが好ましく、２～４日間行うことがより好ましく、３日間行うことが最も好ましい。

【００３２】

第４工程で用いる無血清培地は、DMEM/F12+B27+N2+GlutaMax+Nonessential aminoacidなどが例示できるが、第３工程で用いる無血清培地と同じものを用いることが好ましい。増殖因子は、ｂＦＧＦ、ＦＧＦ３、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１９からなる群のうち、少なくとも一つの増殖因子を添加すればよいが、全部添加することが好ましい。それぞれの好ましい濃度は、10～50ng/ml、10～50 ng/ml、10～50 ng/ml、10～50 ng/mlである。また、培養の前期にＢＭＰ４の存在化で培養し、後期にＢＭＰ４の非存在下で培養することが好ましい。前期に添加するＢＭＰ４の濃度は、5～50ng/mlが好ましい。後期の培養で、ＢＭＰ

４非存在下の意味は、ＢＭＰ４が実質的に非存在であればよく、効果がないレベルの濃度で含まれていてもよい。前期の培養は、２～６日間行うことが好ましく、２～４日間行うことがより好ましく、３日間行うことが最も好ましい。また、後期の培養は、２～６日間行うことが好ましく、２～４日間行うことがより好ましく、３日間行うことが最も好ましい。このようにして得られた内耳幹細胞は、内耳幹細胞への分化能を有する。

【００３３】

第５工程として、第４工程で得られた細胞塊を解離し、単一細胞にする。単一細胞に解離する方法は特に限定されず、例えばトリプシンやアクターゼを用いることができる。酵素や物理的処理（ピペッティングなど）で解離した後、未分化細胞や細胞塊を除去するため、ナイロンメッシュ等を用いて、単一細胞に解離した細胞を選択し、残存する細胞塊を除去するのが好ましい。

【００３４】

また、内耳幹細胞を培養するには、コーティング剤でコートした培養皿を用い、幹細胞能の維持のために低酸素条件において細胞を培養する（第６工程）。用いるコーティング剤は特に限定されないが、poly-0-fibronectineが最も好ましい。培養する幹細胞は、第４工程で得られたものであっても第５工程で出られたものであってもよい。本工程で用いる血清入培地は、ＤＭＥＭやＦ１２などが例示できるが、血清（例えばＦＢＳなど）以外にもＮ２及びＢ２７を含有したＤＭＥＭ／Ｆ１２が最も好ましい。また、本工程の低酸素条件では、酸素濃度は、４％～１０％が好ましく、４％～６％がより好ましく、４％が最も好ましい。培養に添加する増殖因子は、ｂＦＧＦ、ＥＧＦ、ＩＧＦ１からなる群のうち、少なくとも一つの増殖因子を添加すればよいが、全部添加することが好ましい。それぞれの好ましい濃度は、10～30ng/ml、10～30ng/ml、10～50ng/ml、である。

【００３５】

［２］内耳幹細胞から内耳感覚上皮(支持細胞、有毛細胞)、蝸牛神経節細胞及び血管条細胞への分化誘導

内耳幹細胞から内耳感覚上皮、蝸牛神経節細胞及び血管条細胞への誘導方法においては、

第１工程：前記内耳幹細胞を浮遊培養する工程と、

第２工程：ＦＧＦ９およびＦＧＦ２０存在下で培養する工程と

をこの順で行う。なお、工程間には、本法には本質的ではない工程が挿入されてもかまわない。

【００３６】

第１工程において、内耳幹細胞を浮遊培養する。具体的には、まず、第５工程と同様にして、内耳幹細胞を単一細胞に解離する。解離した細胞の培養は浮遊状態で行い、そのため、培養皿は、非接着状態で培養できる浮遊培養用のディッシュを用いる。例えば、細菌培養用プラスティックディッシュなどの、非接着培養用ディッシュを用いればよい。ここで、浮遊培養とは、目的の細胞や細胞塊を培養器の底面に接着させずに培養することを意味し、接着培養とは、目的の細胞や細胞塊を培養器の底面に接着させて培養することを意味する。ここで、培養中、細胞や細胞塊が培養器の底面に接着するとは、細胞や細胞塊が、ＥＣＭなどに含まれる細胞基質接着分子を通じて、培養器底面と接着している状態を意味し、培養液を軽く揺らしても細胞や細胞塊が培養液中に浮かんでこない状態を言う。一方、培養中、細胞や細胞塊が培養器の底面に接着しないとは、細胞や細胞塊が、ＥＣＭなどに含まれる細胞-基質接着分子を通じて培養器底面と接着していない状態を意味し、たとえ底面に触れていても培養液を軽く揺らすと細胞や細胞塊が培養液中に浮かんでくるような状態を言う。接着培養の際は、細胞の基質への接着を促進するために、プラスティックディッシュの底表面を化学処理したり、接着を促進する接着用コーティング剤（ゼラチン、ポリリジン、寒天など）でコートしたりすることが好ましい。浮遊培養の際は、プラスティックディッシュの底表面は処理しないか、細胞の気質への接着を阻止するための接着阻止用コーティング剤（ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）など）でコートしたりすることが好ましい。なお、接着培養であっても、目的の細胞が接着するまでに時

間がかかり、ある程度の時間、浮遊状態にある場合があるが、時間がかかってもその細胞が最終的に接着する場合は、接着培養に含めることとする。浮遊培養に用いる培地は特に限定されず、ＤＭＥＭやＦ１２などが例示できるが、血清（例えばＦＢＳなど）、Ｎ２、Ｂ２７、及び増殖因子などの外部因子を含有した培地が好ましく、その培地としてＤＭＥＭ／Ｆ１２を用いるのが最も好ましい。添加する外部因子としては、ｂＦＧＦ、ＥＧＦ、ＩＧＦ１、Ｗｎｔ３ａ、ＦＧＦ９、ＦＧＦ２０、Heparin、ＴＧＦβ阻害薬からなる群のうち、少なくとも一つの増殖因子を含めばよいが、増殖因子とヘパリンを含むことが好ましく、全部含むことがより好ましい。それぞれの好ましい濃度は、10～50、10～50、10～100、10～50、10～100、10～100、1～50 ng/mlであるが、特に限定されない。この浮遊培養は、３～７日間行うことが好ましく、４～６日間行うことがより好ましく、５日間行うことが最も好ましい。

【００３７】

その後、培地を追加して、さらに浮遊培養を続ける。この培養は、３～７日間行うことが好ましく、４～６日間行うことがより好ましく、５日間行うことが最も好ましい。追加する培地は特に限定されず、ＤＭＥＭやＦ１２などが例示できるが、血清（例えばＦＢＳなど）、Ｎ２、Ｂ２７、及び増殖因子などの外部因子を含有した培地が好ましく、その培地としてＤＭＥＭ／Ｆ１２を用いるのが最も好ましいが、外部因子以外は、最初の浮遊培養で用いた培地と同一のものを用いるのが好ましい。添加する外部因子としては、ｂＦＧＦ、ＥＧＦ、ＩＧＦ１からなる群のうち、少なくとも一つの増殖因子を含めばよいが、全部含むことがより好ましい。それぞれの好ましい濃度は、10～30ng/ml、10～30ng/ml、10～50ng/ml、である。

【００３８】

ここで、形成されたスフェアを壊さないようにして回収し、同じ培地で接着培養を行う。１時間～２日後、好ましくは１時間～３６時間後、最好ましくは翌日に、培地を、血清（例えばＦＢＳなど）、Ｎ２、Ｂ２７、及び増殖因子などの外部因子を含有した新たな培地に交換する。今回、添加する外部因子としては、Ｔ３及び／又はＩＧＦ１とするのが好ましく、外部因子以外は、最初の浮遊培養で用いた培地と同一のものを用いるのが好ましい。それぞれの好ましい濃度は、10～100、1～50 ng/mlである。この培地を用いて、培養を続けることによって、有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経節細胞及び血管条細胞を分化させることができる。この培養は、３日以上行うことが好ましく、５日以上行うことがより好ましい。この間、培地交換のみ行えばよい。

【００３９】

［３］内耳幹細胞から、Periotic mesenchymal 細胞を経由して、蝸牛線維細胞、血管条細胞、ペンドリン陽性細胞へと至る分化誘導

内耳幹細胞からPeriotic mesenchymal 細胞への誘導方法においては、内耳幹細胞をｂＦＧＦ含有培地で培養する工程を含む。なお、この方法に、本発明には本質的ではない工程が挿入されてもかまわない。

【００４０】

ここで用いる培地は特に限定されず、ＤＭＥＭやＦ１２などが例示できるが、血清（例えばＦＢＳなど）及びｂＦＧＦを含有した培地が好ましく、その培地としてＤＭＥＭを用いるのが最も好ましい。ｂＦＧＦの好ましい濃度は、1～50 ng/mlである。この培養は、7日間以上行うことが好ましく、10日間以上行うことがより好ましく、１４日間以上行うことが最も好ましく、培養後、線維細胞状の構造を有するPeriotic mesenchymal細胞が得られる。

【００４１】

培地からｂＦＧＦを除去した新しい培地で、さらに培養を続けると、蝸牛線維細胞や血管条細胞が得られる。この培養は、７日間以上行うことが好ましく、１０日間以上行うことがより好ましく、１４日間以上行うことが最も好ましい。

【００４２】

また、ｂＦＧＦを除去した新しい培地に、$NaHCO_3$を添加して培養することによって、ペ

ンドリン陽性細胞が得られる。$NaHCO_3$の好ましい濃度は、０．３％～１％である。この培養は、７日間以上行うことが好ましく、１０日間以上行うことがより好ましく、１４日間以上行うことが最も好ましい。

【００４３】

（５）アポトーシス抑制剤の使用方法

（１）に記載したアポトーシス抑制剤は、in vivoでもin vitroでも使用できる。

【００４４】

in vivoで使用する場合、アポトーシス抑制剤は、投与方法に関連して、例えば以下のように剤型化可能である。

【００４５】

まず、有効成分の他、必要に応じて、一般に用いられる各種成分をさらに含み得るものであり、例えば、1種以上の医薬的に許容され得る賦形剤、崩壊剤、希釈剤、滑沢剤、着香剤、着色剤、甘味剤、矯味剤、懸濁化剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、補助剤、防腐剤、緩衝剤、結合剤、安定剤、コーティング剤などを含み得る。

【００４６】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状などに応じた適当な投与経路を選択する。本発明に係る薬剤は、経口経路、非経口経路のいずれによっても投与できるが、経口経路が好ましい。非経口経路としては、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内、鼓室内などへの投与を挙げることができる。さらに、経粘膜投与または経皮投与を実施することができる。

【００４７】

剤形は、特に限定されず、種々の剤形、例えば、経口投与のためには、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、乳剤、懸濁液、溶液剤、酒精剤、シロップ剤、エキス剤、エリキシル剤とすることができる。非経口剤としては、例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤などの注射剤；経皮投与または貼付剤、軟膏またはローション；口腔内投与のための舌下剤、口腔貼付剤；ならびに経鼻投与のためのエアゾール剤；坐剤とすることができるが、これらには限定されない。これらの製剤は、製剤工程において通常用いられる公知の方法により製造することができる。また本発明に係る薬剤は、持続性または徐放性剤形であってもよい。

【００４８】

薬剤に含有される有効成分の量は、該有効成分の用量範囲や投薬の回数などにより適宜決定できる。

【００４９】

用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無など）、および担当医師の判断など応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば大人一日あたり約１００ｍｇ～３０００ｍｇ程度、好ましくは約２２５０ｍｇ以下、より好ましくは約７５０ｍｇ以下、小児一日あたり約１００ｍｇ～２０００ｍｇ程度、好ましくは約１５００ｍｇ以下、より好ましくは約７５０ｍｇ以下である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は1日1回～数回に分けて投与することができる。

【００５０】

一方、in vitroでは、例えば細胞培養に用いる培地に添加し、その培地を、内耳細胞の細胞培養に用いることで、その内耳細胞のアポトーシスを抑制することができる。培地に添加する際のアポトーシス抑制剤の濃度は特に限定されないが、ラパマイシン誘導体０．１ｎＭ-１．０ｎＭ、ビグアナイド系化合物１ｍＭ-１０ｍＭが好ましい。

【００５１】

（６）アポトーシスに起因する内耳性難聴の治療方法

本発明の、アポトーシスに起因する内耳性難聴の治療方法は、アポトーシスに起因する内耳性難聴に罹患した患者に、ビグアナイド系化合物及び/またはラパマイシン誘導体を

投与する工程を含む。ビグアナイド系化合物及びラパマイシン誘導体は、（２）及び（３）の記載に準じる。また、ビグアナイド系化合物やラパマイシン誘導体を投与する方法は、（５）で記載した、アポトーシス抑制剤をin vivoで使用する方法に準じる。

【００５２】

（７）アポトーシスを調べる方法

本発明のアポトーシスを調べる方法は、ビグアナイド系化合物及び/またはラパマイシン誘導体をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、を含む。ビグアナイド系化合物及びラパマイシン誘導体は、（２）及び（３）の記載に準じる。

【００５３】

このビグアナイド系化合物は、メトホルミンやラパマイシンをシード化合物として合成したリード化合物であってもよく、ラパマイシン誘導体は、ラパマイシンをシード化合物として合成したリード化合物であってもよい。

【００５４】

ここで用いる内耳細胞は（１）の記載に準じる。

【００５５】

内耳細胞にアポトーシスを誘導する方法は、公知の方法を用いることができ、例えば、エポキソミシン（Epoxomicin）処理（例えば、０．５μＭエポキソミシンで２４時間処理）等が挙げられる。

【００５６】

こうして内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる方法は、公知の方法を用いることができ、例えば、アポトーシスが生じて細胞膜外に移動したホスファチジルセリンをAnnexin Vを用いて検出する方法、7-AAD（7-amino-actinomycin D）が細胞膜を透過できるようになるのを検出する方法、カスパーゼの阻害剤であるSR-VAD-FMK（sulforhodamine-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone）を蛍光標識して活性カスパーゼの存在を検出する方法、断片化したＤＮＡを検出する方法、などが挙げられる。

【００５７】

（８）アポトーシス抑制物質のスクリーニング方法

本発明のアポトーシス抑制物質のスクリーニング方法は、アポトーシス抑制物質の候補である下記構造式に示されるビグアナイド系化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、を含む。各工程の詳細は、（５）及び（７）に準じる。

【００５８】

これらの工程と平行して、同じ内耳細胞に上記化合物を投与しないで、同様にアポトーシスを誘導し、生じるアポトーシスを調べる。化合物を投与した場合と化合物を投与しない場合とで、アポトーシスを起こした細胞の割合を比較し、化合物を投与した場合にアポトーシスが抑制されるような化合物をアポトーシス抑制物質として特定する。

【００５９】

（９）アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤のスクリーニング方法

本発明の薬剤のスクリーニング方法は、薬剤の候補である下記構造式に示されるビグアナイド系化合物をin vitroで内耳細胞に投与する工程と、内耳細胞にアポトーシスを誘導する工程と、内耳細胞に生じるアポトーシスを調べる工程と、を含む。各工程の詳細は、（５）及び（７）に準じる。その後、アポトーシス抑制物質を特定し、アポトーシスに起因する内耳性難聴を治療するための薬剤とする。アポトーシス抑制物質を特定する方法は、（８）に準じる。

【実施例】

【００６０】

本実施例では、アポトーシスに起因する内耳性難聴の一例としてペンドレッド症候群を挙げたが、内耳性難聴はこの疾患に限定されるものではない。

【００６１】

（１）ペンドレッド症候群患者由来のｉＰＳ細胞の内耳細胞への誘導
（１－１）ペンドレッド症候群（Pendred syndrome）患者由来のｉＰＳ細胞の樹立
ペンドレッド症候群患者の末梢血から分離した単核球に対し、OCT3/41，SOX2，KLF4，LIN28，L-MYC，p53shRNA発現ベクターを導入して初期化を行った。以下、その詳細を記す。

【００６２】
まず、患者末梢血検体からの単核球の分離およびエレクトロポーレーションによる発現ベクターの導入は下記の方法で行った。ＢＤ社製バキュテイナ採血管（ＡＣＤ溶液入り）に約８　ｍｌの血液を加え混和し、これと等量のＰＢＳを加えて混和した。「血液＋ＰＢＳ」と等量のFicollに対して、「血液＋ＰＢＳ」をFicollの上に重層した。400G x 30分、25℃で遠心後、白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、ＰＢＳ１２ｍｌ加え、再度２００Ｇｘ１０分、２５℃で遠心した。上清を吸引して除いたのち、ＫＢＭ-５０２を適当量加えて懸濁し、細胞数を計測した。３ｘ１０^{6}個の細胞を１５ｍｌチューブに分注し２００ｇｘ１０分、２５℃で遠心した。上清を除去後、初期化因子発現ベクターを含む培養液に細胞を懸濁して、Nucleofector II Device でエレクトロポーレーションを実施後、ＣＤ３４抗体を含む血球培地ＫＢＭ-５０２に懸濁して、マウス由来フィーダー細胞上に播種した。なお、初期化因子発現ベクターはpCE-hOCT3/4(0.63 μg)、pCE-hSK(0.63 μg)、pCE-hUL(0.63 μg)、pCE-mp53DD(0.63μg)、pCXB-EBNA1(0.50 μg)を混合して細胞に導入した。

【００６３】
フィーダー細胞上に播種後３週間でｉＰＳ細胞コロニーを得ることが出来、シングルコロニーからそれぞれの患者由来のｉＰＳ細胞株を樹立した。樹立したｉＰＳ細胞株に対しては、未分化マーカーの発現、三胚葉分化能、核型の確認を行いｉＰＳ細胞としての質を確認した。

【００６４】
未分化マーカーの確認においては、蛍光抗体染色は、細胞培養ディッシュ上に、固定したｉＰＳ細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、マウスOCT3/4抗体、ウサギ抗NANOG抗体、ラット抗SSEA3抗体、マウス抗SSEA4抗体、マウス抗TRA1-60抗体、マウス抗TRA1-81抗体を加えた（それぞれ、５００倍、１０００倍、３００倍、５００倍、５００倍、５００倍）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し各々の発現を確認した
三胚様分化能は以下の方法で確認を行った。フィーダー細胞上で培養したｉＰＳ細胞を解離液を用いてフィーダー細胞から分離後、低吸着プレート(Corning超低接着表面（Ultra-Low Attachment）プレート)上で１週間浮遊培養し胚葉体を形成した。1週間後、形成された胚葉体を回収し、poly-O-fibronectine でコートしたウエルに播種した。播種された胚葉体を３週間継続培養し、分化させた。播種後３週間で、三胚様分化能を蛍光抗体染色で確認した。蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、マウス抗β-3 tubulin抗体（外胚葉マーカー）、マウス抗ＳＭＡ抗体（中胚葉マーカー）、マウス抗ＡＦＰ抗体（内胚葉マーカー）を加えた（それぞれ、２５０倍、１５０倍、２５０倍）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し各々の発現を確認した。

【００６５】
なお、核型はGバンド分染法を用いて行い、各々のラインで正常核型が維持されていることを確認した。

【００６６】
（１－２）iPS細胞から内耳幹細胞への分化誘導
［分化誘導方法］
Ｄａｙ　０
１）１ウエル(６ウエル・プレート)をMatri Gelコーティングした。

【００６７】

２）コンフルエントなFeeder-FreeヒトiPS細胞をアクターゼ処理し、ディッシュから剥離した。

【００６８】

３）PBSで希釈後遠心し、細胞を回収した。

【００６９】

４）上澄みをすて、ROCK阻害剤(Y27632)（10μmol/L）を加えたmTeSR1に細胞を懸濁した。

【００７０】

５）ナイロンメッシュで単一細胞に解離した細胞だけを得て、血球板で細胞数を数えた。

【００７１】

６）前記１）でMatri Gelコーティングしたウエルに、Y27632含有mTeSR1を加えた。

【００７２】

７）１ウエルあたり$2.0\times10^{4}/cm^{2}$となるように解離した細胞を加えた。

【００７３】

Ｄａｙ　１

ROCK阻害剤を含まないmTeSR1に培地交換した。

【００７４】

Ｄａｙ　２

無血清培地（DMEM/F12+B27+N2+GlutaMax+Nonessential aminoacid）に培地交換した。以後、Ｄａｙ４まで、毎日培地交換した。

【００７５】

Ｄａｙ　５

無血清培地（DMEM/F12+B27+N2+GlutaMax+Nonessential aminoacid+bFGF, FGF3, FGF10, FGF19+BMP4（25ng/ml、25 ng/ml、25 ng/ml、25ng/ml、10ng/ml））に培地交換した。以後、Ｄａｙ７まで、毎日培地交換した。

【００７６】

Ｄａｙ　８

無血清培地（DMEM/F12+B27+N2+GlutaMax+Nonessential aminoacid +bFGF, FGF3, FGF10, FGF19（25ng/ml、25 ng/ml、25 ng/ml、25ng/ml））に培地交換した。以後ＤＡＹ１０まで、毎日培地交換した。

【００７７】

Ｄａｙ　１１

新鮮な無血清培地（DMEM/F12+B27+N2+GlutaMax+Nonessential aminoacid+bFGF,FGF3, FGF10,FGF19）に培地交換した

Ｄａｙ　１２

細胞をアクターゼ処理後、遠心して細胞を回収し、DMEM/F12+N2+B27培地+bFGF、FGF3、FGF10、FGF19（25ng/ml、25 ng/ml、25 ng/ml、25ng/ml）で懸濁した。ナイロンメッシュで単一細胞に解離した細胞を集め、poly-O-fibronectine コートしたウエルに播種した。培養は、低酸素条件下で（$O_2$４％、$CO_2$５％）で行った。以後、３日ごとに、培地をDMEM/F12+N2+B27培地+bFGF、EGF、IGF1（20ng/ml、20 ng/ml、50 ng/ml）に交換し、約６日ごとに継代した。

【００７８】

こうしてえられた内耳幹細胞を増殖させ、コンフルエントになったディッシュを、位相差顕微鏡で撮影した（図１Ａ）。

【００７９】

［抗体染色］

得られた細胞について、内耳幹細胞のマーカーである抗ＰＡＸ２抗体、抗ＰＡＸ８抗体、抗ＳＯＸ２抗体を用いて蛍光抗体染色を行った。蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ウサギ抗ＰＡＸ２抗体、マウス抗ＰＡＸ

８抗体、ヤギ抗ＳＯＸ２抗体を加えた（それぞれ、５０倍、１００倍、１００倍希釈）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察した。ポジティブコントロールとして、ヘキストで核染色を行った。

【００８０】

［結果］

図１Ｂに示すように、約８０％の細胞が、内耳幹細胞のマーカーを発現しており、この内耳幹細胞分化誘導方法が、極めて効率が高いことを示す。

【００８１】

（１－３）内耳幹細胞から有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経節細胞への分化誘導

［分化誘導方法］

（１－２）で作製した内耳幹細胞をアクターゼ処理して細胞をディッシュから剥離し、遠心して細胞を回収した。DMEM/F12+N2+B27培地+bFGF、EGF、IGF1、Wnt3a、FGF9、FGF20、Heparin、(+TGFβ阻害薬)（各因子の濃度は25ng/ml、25ng/ml、50ng/ml，20ng/ml，50ng/ml，50ng/ml，10ng/ml）を加え、低吸着プレート(Corning超低接着表面（Ultra-Low Attachment）プレート)上で浮遊培養した（約２００００細胞/well（９６well））。１日後、スフェア（細胞塊）の形成が観察され始めた。浮遊培養後５日目に培地DMEM/F12+N2+B2+bFGF、EGF、IGF1（各因子の濃度は25ng/ml、25ng/ml、50ng/ml)を等量追加した。

【００８２】

浮遊培養後１０日目にスフェアを壊さないように回収し、poly-0-fibronectine コートしたプレートに移し、接着培養した（スフェア5-10個程度）。翌日にDMEM/F12+N2+B27培地+T3、IGF1（各因子の濃度は60ng/ml，10ng/ml）に培地交換し、その後は、３日に１度で培地交換した。接着培養５日後から、有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経節細胞が得られた。

【００８３】

［抗体染色］

蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ウサギ抗ミオシンＶＩＩａ抗体、マウス抗エスピン抗体、ヤギ抗プレスチン抗体を加えた（それぞれ、２００倍、１００倍、５０倍希釈）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察した。

【００８４】

得られた細胞について、有毛細胞のマーカーであるエスピン、ミオシン７ａ、プレスチンについて、それぞれの抗体を用いて蛍光抗体染色を行った（図２）。また、神経細胞のマーカーであるislet1、有毛細胞のマーカーであるp27/Kip1、有毛細胞のマーカーであるプレスチンについて、それぞれの抗体を用いて蛍光抗体染色を行った（図３）。また、蝸牛神経節グリア細胞のマーカーであるＧＦＡＰ、成熟神経細胞のマーカーであるカルビンジン及びベータＩＩＩチューブリンについて、それぞれの抗体を用いて蛍光抗体染色を行った（図４）。

【００８５】

［結果］

図２～３に示すように、有毛細胞マーカーである、ミオシン７ａ、エスピン、プレスチン陽性細胞、および支持細胞マーカーであるp27kip1、ISLET１発現細胞が誘導されることが確認された。また、図４に示すように、同時に蝸牛神経細胞のマーカーである、カルビンジン陽性細胞とそれに付随するグリアが発現するＧＦＡＰを発現する細胞が得られた。このように、本方法では、内耳感覚上皮細胞を構成する主要細胞である有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経節細胞が立体上に生体内と同様の配列をもって誘導されてくる。

【００８６】

（１－４）Periotic mesenchymal 細胞、蝸牛線維細胞及び血管条細胞、ペンドリン陽性細胞の分化誘導

（１－２）で得られた内耳幹細胞をPOMC medium（DMEM500ml(D5796)、1M HEPES 5ml、FBS 30ml、bFGF(10ng/ml)2.0ml）に培地交換をして、通常酸素下で培養したところ、培養

１０日目位からPeriotic mesenchymal細胞が観察された。その後培養を続けると、２週間後に線維細胞状の構造となった。（図５）
線維細胞状の細胞形態になった細胞の培地をFBS(10%)+DMEM培地に培地交換し、さらに２週間程度培養すると、蝸牛線維細胞、血管条細胞が得られた。（図６）
また、FBS(10%)+DMEM培地に$NaHCO_3$（０．３７５％）を添加した培地を用いることによって、ペンドリン陽性細胞が得られた。（図６）
［抗体染色］
蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ウサギ抗Ｓ１００抗体およびＰＯＵ３Ｆ４抗体、マウス抗カルデスモン抗体、ヤギ抗ＴＢＸ１８抗体を加えた（それぞれ、３倍、１００倍、１００倍、５０倍希釈）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使って標識し、蛍光顕微鏡で観察した。
【００８７】
図５に示すように、Periotic mesenchymal 細胞のマーカーであるＳ１００、ＰＯＵ３Ｆ４、カルデスモン、ＴＢＸ18の発現を認める細胞が誘導されていることが確認された。
【００８８】
それぞれの誘導法で細胞誘導を行った後、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ウサギ抗炭酸脱水素酵素II抗体、抗アクアポリン１抗体、抗ナトリウムカリウムＡＴＰアーゼ抗体およびビメンチン抗体、マウス抗コネキシン２６、コネキシン３０抗体、ヤギ抗ペンドリン抗体を加えた（すべて１００倍希釈）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察した。
【００８９】
図６に示すように、蝸牛線維細胞、および蝸牛血管条細胞に発現する炭酸脱水素酵素、アクアポリン１、ナトリウムカリウムＡＴＰアーゼ、ビメンチン、コネキシン２６および３０が発現していることから、これらの細胞が誘導されていることを確認した。また、ペンドリンが発現していることから、ペンドリン陽性細胞が誘導されていることを確認した。
【００９０】
（１－５）分化誘導された内耳感覚上皮細胞に対する、内耳毒性の知られているゲンタマイシンの投与
この方法によって誘導された内耳感覚上皮細胞に対して、８０倍希釈したゲンタマイシン注射薬を１０日間投与した。本薬剤の投与によりコントロール群に比較して優位に細胞数が減少しており、ゲンタマイシン投与による細胞毒性が生体と同様におこることが示された。
【００９１】
（２）ペンドレッド症候群患者ｉＰＳ細胞由来の内耳細胞における細胞内凝集体の形成
［抗体染色］
蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、マウス抗ユビキチン抗体、ウサギ抗ＬＣ３抗体を加えた（それぞれ、100倍、100倍、100倍希釈）。その後、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察した。
【００９２】
［結果］
図８に示すように、ペンドレッド症候群患者由来の内耳細胞では、ペンドリンが凝集体を形成し、その凝集体に、ユビキチン及びＬＣ３ｂが共存する。このように、この細胞内凝集体は、ユビキチンプロテアソーム系及びオートファジーの両方で処理される。
【００９３】
（３）ペンドレッド症候群患者ｉＰＳ細胞由来の内耳細胞のストレスに対する脆弱性
［細胞生存率の測定］
患者ｉＰＳ細胞および健常者由来ｉＰＳ／ＥＳ細胞から上記方法でペンドリン陽性細胞を誘導した。誘導した細胞に対してエポキソミシン（Ｅｐｏｘｏｍｉｃｉｎ）（０．５μ

M）存在下で２４時間培養し、細胞ストレスを負荷した。
【００９４】
蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、ウサギ抗Cleaved Caspase 3抗体を加えた（それぞれ、１００倍、３００倍）。その後、核染色をHoechst33258（１０００倍希釈）で行い、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使って標識した。得られた蛍光を、蛍光顕微鏡で観察し、視野内のペンドリン陽性かつCleaved caspase 3陰性細胞数をカウントした。
【００９５】
［結果］
図９に示すように、ペンドレッド症候群患者由来の内耳細胞は、正常細胞よりストレスに弱く、負荷を与えたときの細胞生存率が低下している。
【００９６】
（４）ラパマイシンによる、上記内耳細胞の細胞生存率低下の抑制
［細胞生存率の測定］
患者ｉＰＳ細胞および健常者由来ｉＰＳ／ＥＳ細胞から上記方法でペンドリン陽性細胞を誘導した。誘導した細胞に対して、各群に対して以下のような操作を行った。ラパマイシン投与群では、３日間ラパマイシン投与を行った。細胞ストレス＋ラパマイシン投与群では、ラパマイシン（０．２ｎＭ）負荷２日間後、ラパマイシンと同時に、細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。一方、細胞ストレス群では、ＤＭＳＯを２日間投与したのちに、エポキソミシン（０．５μＭ）のみを２４時間負荷した。
【００９７】
蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、ウサギ抗Cleaved Caspase 3抗体を加えた（それぞれ、１００倍、３００倍）。その後、核染色をHoechst33258（１０００倍希釈）で行い、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し、視野内のペンドリン陽性かつCleaved caspase 3陰性細胞数をカウントした。
【００９８】
［結果］
図１０に示すように、ラパマイシンは、ペンドレッド症候群患者由来の内耳細胞に負荷を与えたときの細胞生存率低下を抑制する。
【００９９】
（５）ラパマイシンによる、上記内耳細胞のアポトーシスの抑制
［Caspase 3陽性細胞の測定］
患者ｉＰＳ細胞および健常者由来ｉＰＳ／ＥＳ細胞から上記方法でペンドリン陽性細胞を誘導した。誘導した細胞に対して、各群に対して以下のような操作を行った。ラパマイシン投与群では、３日間ラパマイシン投与を行った。細胞ストレス＋ラパマイシン投与群では、ラパマイシン（０．２ｎＭ）２日間投与後、ラパマイシンと同時に、細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。一方、細胞ストレス群では、ＤＭＳＯを２日間投与したのちに、エポキソミシン（０．５μＭ）のみを２４時間負荷した。
【０１００】
蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、ウサギ抗Cleaved Caspase 3抗体を加えた（それぞれ、１００倍、３００倍）。その後、核染色をHoechst33258（１０００倍希釈）で行い、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し、視野内のペンドリン陽性かつCleaved caspase 3陽性細胞数をカウントした。
【０１０１】
［結果］
図１１に示すように、ペンドレッド症候群患者由来の内耳細胞に負荷を与えたときの細

胞生存率低下はアポトーシスが原因であり、ラパマイシンは、そのアポトーシスを抑制する。

【０１０２】

（６）メトホルミンによる、上記内耳細胞の細胞生存率低下の抑制

［細胞生存率の測定］

患者ｉＰＳ細胞および健常者由来ｉＰＳ／ＥＳ細胞から上記方法でペンドリン陽性細胞を誘導した。誘導した細胞に対して、各群に対して以下のような操作を行った。ラパマイシン投与群では、３日間ラパマイシン（０．２ｎＭ）投与を行った。細胞ストレス＋ラパマイシン投与群では、ラパマイシン（０．２ｎＭ）２日間投与後、ラパマイシンと同時に、細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。細胞ストレス群では、ＤＭＳＯを２日間投与したのちに、エポキソミシン（０．５μＭ）のみを２４時間負荷した。メトホルミン投与群ではそれぞれ１ｍＭ、１０ｍＭのメトホルミンを２日間投与後、メトホルミンと同時に細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、ウサギ抗Cleaved Caspase 3抗体を加えた（それぞれ、１００倍、３００倍）。その後、核染色をHoechst33258（１０００倍希釈）で行い、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し、視野内のペンドリン陽性かつCleaved caspase 3陰性細胞数をカウントした。

【０１０３】

［結果］

図１２に示すように、メトホルミンは、ペンドレッド症候群患者由来の内耳細胞に負荷を与えたときの細胞生存率低下を抑制する。

【０１０４】

（７）メトホルミンによる、上記内耳細胞のアポトーシスの抑制

［細胞生存率の測定］

患者ｉＰＳ細胞および健常者由来ｉＰＳ／ＥＳ細胞から上記方法でペンドリン陽性細胞を誘導した。誘導した細胞に対して、各群に対して以下のような操作を行った。ラパマイシン投与群では、３日間ラパマイシン投与を行った。細胞ストレス＋ラパマイシン投与群では、ラパマイシン（０．２ｎＭ）２日間投与後、ラパマイシンと同時に、細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。細胞ストレス群では、ＤＭＳＯを２日間投与したのちに、エポキソミシン（０．５μＭ）のみを２４時間負荷した。メトホルミン投与群ではそれぞれ１ｍＭ、１０ｍＭのメトホルミンを２日間投与後、メトホルミンと同時に細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、ウサギ抗Cleaved Caspase 3抗体を加えた（それぞれ、１００倍、３００倍）。その後、核染色をHoechst33258（１０００倍希釈）で行い、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し、視野内のペンドリン陽性かつCleaved caspase 3陽性細胞数をカウントした。

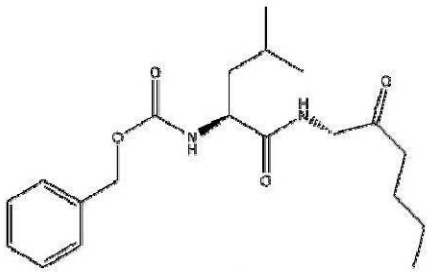
【０１０５】

［結果］

図１３に示すように、メトホルミンは、ペンドレッド症候群患者由来の内耳細胞に負荷を与えたときのアポトーシスを抑制する。

【０１０６】

（８）[参考例]カルペプチン（下記構造式ＶＩ）は上記内耳細胞のアポトーシスを抑制できない



（ＶＩ）

［細胞生存率の測定］

患者ｉＰＳ細胞および健常者由来ｉＰＳ／ＥＳ細胞から上記方法でペンドリン陽性細胞を誘導した。誘導した細胞に対して、各群に対して以下のような操作を行った。カルペプチン投与群では、３日間カルペプチン投与を行った。細胞ストレス＋カルペプチン投与群では、カルペプチン（５０μＭ）２日間投与後、カルペプチンと同時に、細胞ストレスとしてエポキソミシン（０．５μＭ）を２４時間負荷した。一方、細胞ストレス群では、ＤＭＳＯを２日間投与したのちに、エポキソミシン（０．５μＭ）のみを２４時間負荷した。

【０１０７】

蛍光抗体染色は、スライド上に固定した細胞に対して、抗原賦活化操作を行ったのち、ヤギ抗ペンドリン抗体、ウサギ抗Cleaved Caspase 3抗体を加えた（それぞれ、１００倍、３００倍）。その後、核染色をHoechst33258（1000倍希釈）で行い、それぞれの動物種ＩｇＧに特異的な蛍光２次抗体を使い標識し、蛍光顕微鏡で観察し、視野内のペンドリン陽性かつCleaved caspase 3陰性細胞数をカウントした。

【０１０８】

［結果］

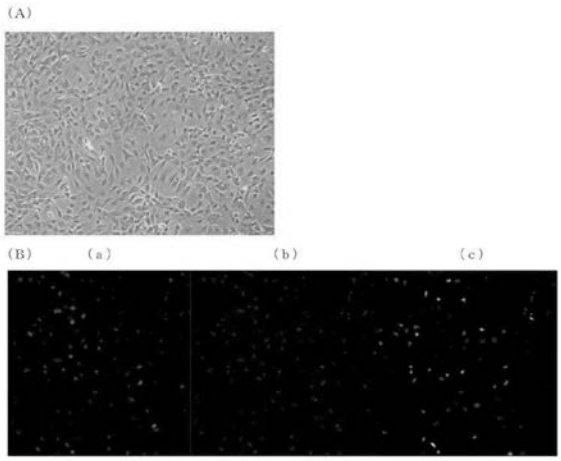
カルペプチンは、カルパイン阻害剤の一種であり、神経変性疾患などにおける神経細胞のアポトーシスを抑制することが知られている。しかしながら、図１４に示すように、ペンドレッド症候群患者ｉＰＳ細胞由来の内耳細胞のアポトーシスを抑制することができない。このことは、他の細胞に対してアポトーシス抑制活性があったとしても、内耳細胞のアポトーシスを抑制することができるかどうかは不明であることを示す。

【産業上の利用可能性】

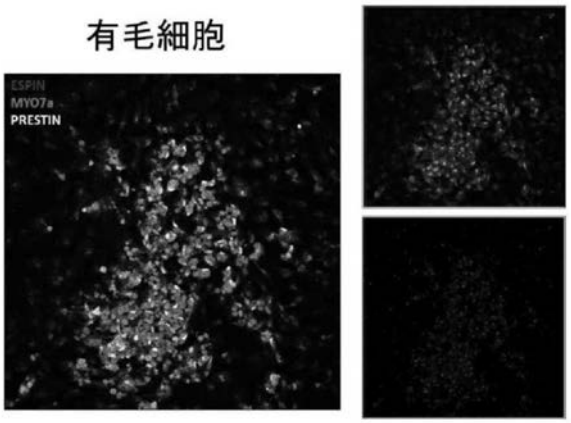
【０１０９】

本発明によって、新規なアポトーシス抑制剤及び内耳性難聴治療薬を提供することができるようになった。

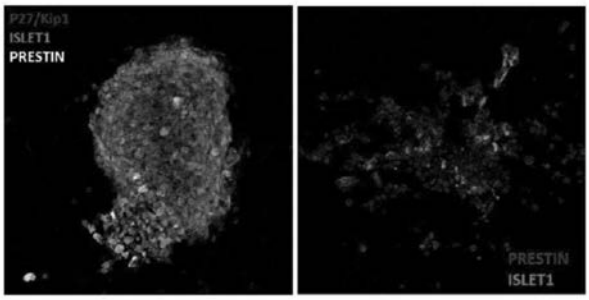
【図１】



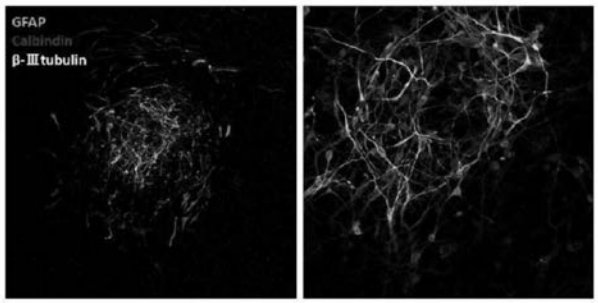
【図２】



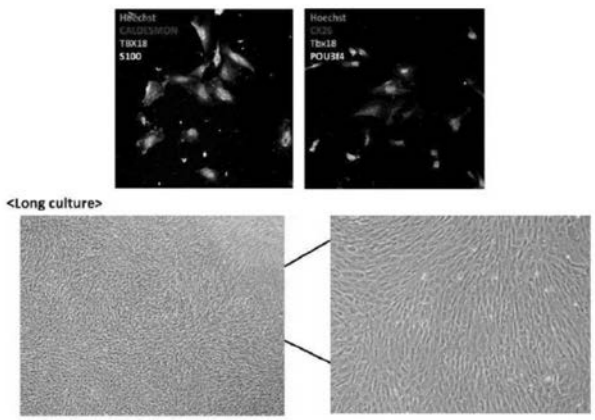
【図３】



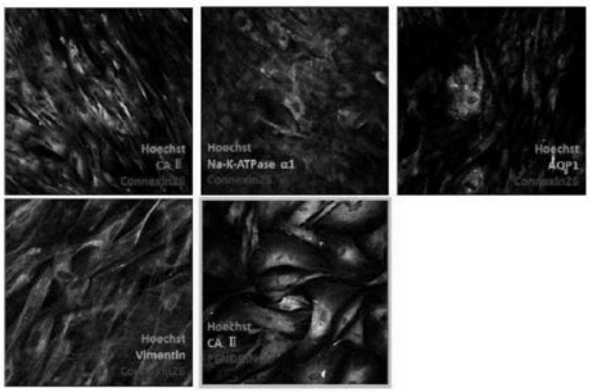
【図４】



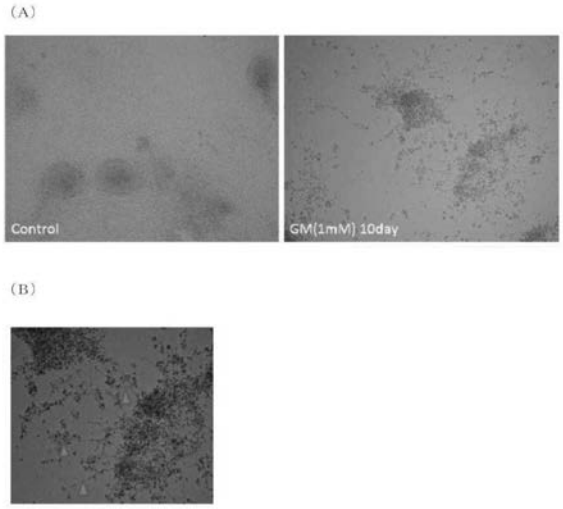
【図５】



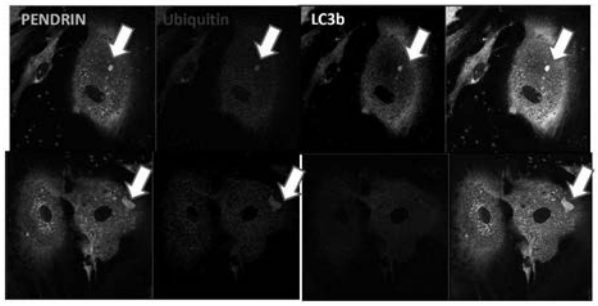
【図６】



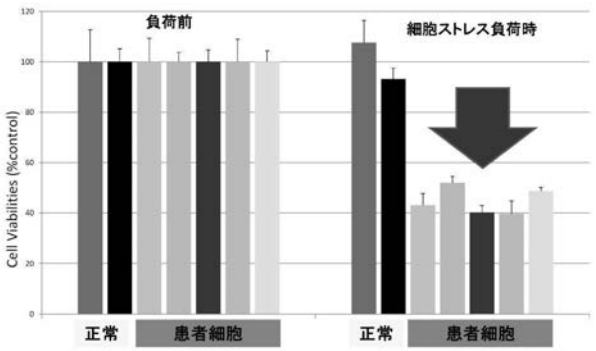
【図７】



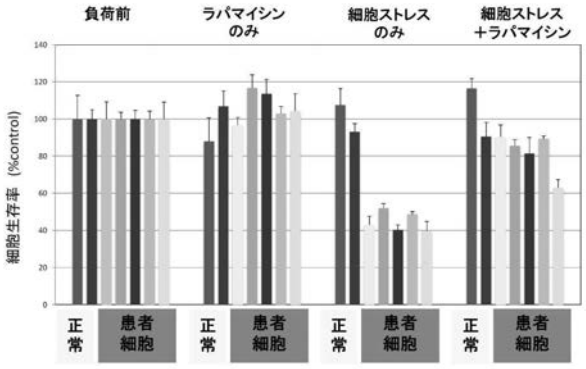
【図８】



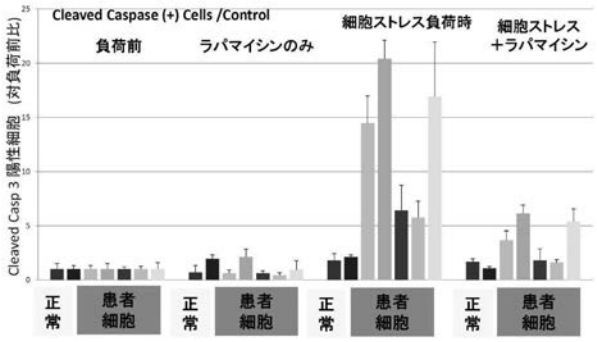
【図９】



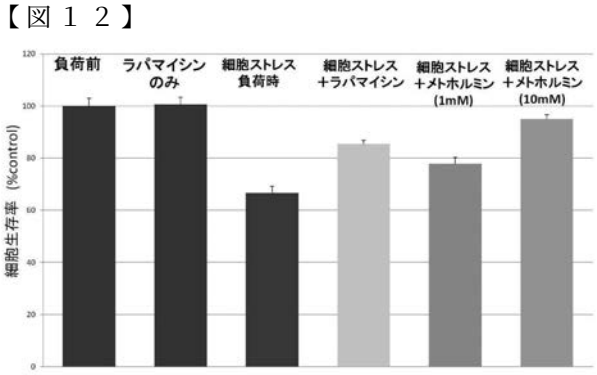
【図１０】



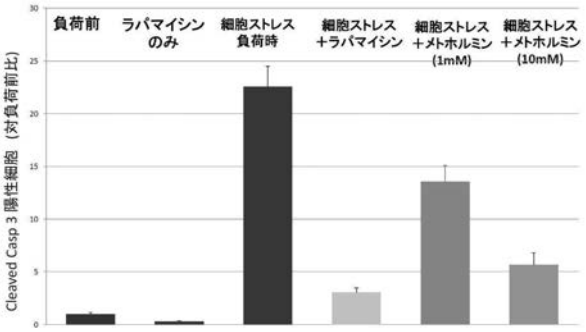
【図１１】



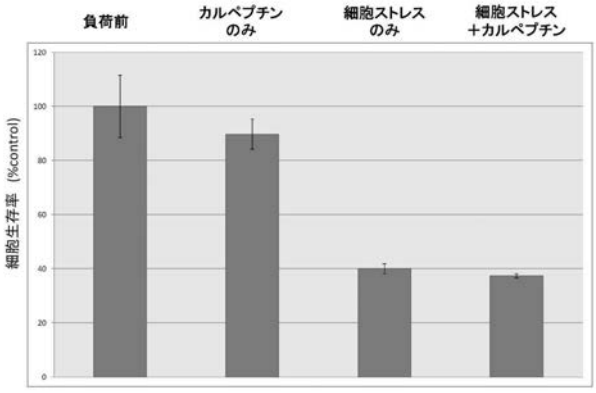
【図１２】



【図１３】



【図１４】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　33/50	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50 Ｚ	
Ｃ１２Ｑ　1/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/02	

(72)発明者　小川　郁
東京都新宿区信濃町３５番地　慶應義塾大学医学部内
(72)発明者　松永　達雄
東京都目黒区東が丘２－５－１　国立病院機構東京医療センター内

Ｆターム(参考) 2G045 AA24 BB20 BB24 FB03
4B063 QA18 QQ91 QR77 QS31 QX01
4C086 AA01 AA02 CB22 MA01 MA04 NA14 ZA34 ZC02