

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09387

研究課題名(和文) 成熟内耳を標的としたGJB2変異型難聴への遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy for GJB2 related hearing loss targeting the mature mouse inner ear

研究代表者

飯塚 崇 (Iizuka, Takashi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：40372932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内耳遺伝子治療用にカプシド領域のアミノ酸を改良した新たなAAVベクターを開発し、同ベクターを成熟マウスの耳科手術で内耳外リンパ液への投与する手術手技の開発を試みた。投与方法の検討の結果、後半規管から前庭方向へ内径0.075 mmのフューズドシリカチューブを挿入し、10～12 µlのウイルス液を流速60～90 µl/hで内耳外リンパ液を還流させることにより効率よく内耳組織、特に蝸牛支持細胞へウイルスを到達させることが可能であった。同方法により蝸牛支持細胞へ高効率にCX26遺伝子を導入させ、成熟CX26欠損マウスの聴力を有意に回復させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性難聴は1600出生に一人と高頻度に発生するが、その根本的治療法はなく次世代の治療法開発が期待されている。本研究ではAAVベクター投与方法を改良し、ヒト臨床応用への対象として現実的である成熟マウスでの聴力回復を実現させる新たな遺伝子導入法が開発された。これにより遺伝子改変マウスを用いた内耳遺伝子治療の非臨床PoCの取得が可能となり、遺伝性難聴への遺伝子治療法を現実的な治療へと近づける学術的及び社会的意義のある研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new AAV vector with improved amino acids in the capsid region for inner ear gene therapy, and attempted to develop a surgical technique for administering this AAV vector to the endolymph in mature mice. As a result of examining the administration method, a fused silica tube with an inner diameter of 0.075 mm was inserted from the posterior semicircular canal to the vestibular direction, and 10-12 µl of the virus solution was perfused at a flow rate of 60-90 µl/h to perfuse the inner ear endolymph efficiently. It was possible to reach the tissue, especially the cochlear supporting cells. By the same method, CX26 gene was introduced into cochlear supporting cells with high efficiency, and we succeeded in significantly restoring the hearing of mature CX26-deficient mice.

研究分野：遺伝性難聴

キーワード：GJB2 遺伝性難聴

1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴は 1600 出生に一人と高頻度に発生するが、その根本的治療法はなく次世代の治療法開発が期待されている。コネキシン(CX)26 をコードする GJB2 遺伝子の変異は世界で最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子である。申請者飯塚はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた CX26 欠損マウス内耳への遺伝子治療実験により、CX26 欠損マウスにおける高度難聴を優位に回復させることに初めて成功した (Iizuka, Human Molecular Genetics, 2015)。しかし、この実験において聴力回復に成功したマウスは生後 0 日齢であり、ヒトの内耳では胎生期に相当する。当時の方法による遺伝子治療法では生後のヒト患者の内耳に相当する成熟マウス内耳での聴力回復には至らなかった。

2. 研究の目的

難聴モデルマウスの内耳をヒト患者内耳の外挿として内耳遺伝子治療を開発するためには新生マウスではなく成熟マウスへの投与によって聴力回復を実証する必要がある。本研究では AAV ベクターの成熟マウス内耳への投与方法を改良することにより、ヒト臨床応用を目指した難聴モデルマウスの聴力回復を実現させる新たな遺伝子導入法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

CX26 を発現するよう合成した AAV-CX26 を複数の投与方法により注入し、免疫染色を用いて遺伝子導入の範囲と効率を評価する。コントロールマウス(C57BL/6)、R75W 変異を有する Gjb2 マウス、Gjb2 コンディショナルノックアウトマウスの 3 群において、幼若・成熟・老齢のマウスへ、正円窓経由・半規管経由の注入法で、Gjb2 を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入する。遺伝子導入から 4~12 週間、聴性脳幹反応(ABR)によって安全性(侵襲)および有効性を評価したのち、蝸牛を取り出しホールマウント検体または凍結切片を作成する。上記で得られた検体はホールマウント組織として免疫染色(CX26 染色等)を施行し、共焦点顕微鏡による連続画像取得および三次元解析ソフトによる蝸牛全体の三次元構造構築による遺伝子導入効率の定量化を行い導入範囲および導入効果を評価する。詳細なタンパク質局在は凍結切片にて同様に解析する。Gjb2 遺伝子導入効果の指標としてギャップ結合プラークの形成変化を解析する。同解析では 1 細胞の細胞境界における最大プラークの長さを自動測定し、遺伝子導入によるプラーク長の変化を大量解析する技術を検討する。このギャップ結合プラークの回復を治療効果指標とした表現型解析を行い、最も効率の良い投与方法を選抜する。これらの検討により最も効率の良い導入法を確立し、当講座が所有する他の難聴モデルマウス(下記、CX26 優性阻害変異マウス、CX26-R75W トランスジェニックマウス等)や高齢 CX26 欠損マウスにおいても有効性・安全性を検討する。有毛細胞が消失したモデル動物、細胞消失がなく形態変化が現れたり機能障害があるモデル動物に遺伝子導入を同様にを行い有効性を比較検討する。

4. 研究成果

本研究では AAV ベクターの内耳への投与方法を改良することによりヒト臨床応用への対象として現実的である成熟マウスでの聴力回復を実現させる新たな遺伝子導入法を開発を行った。これまで AAV の蝸牛ギャップ結合形成細胞への最適血清型を同定するため各種 AAV 血清型に GJB2 遺伝子を搭載したベクターを作成した。最適な血清型の配列からカプシド領域の改変を進め、改良型の AAV ベクターを開発した。蝸牛器官培養において、従来型血清型に比べて導入効率および感染指向性に大きな相違が見られ、ギャップ結合形成細胞への感染効率が向上した。さらに蝸牛器官培養にて既存の血清型 AAV での in vitro 感染を行っ

た。これにより標的細胞への感染 効率の良いベクターを選抜した。蝸牛器官培養での結果を元に AAV ベクターの配列を比較し標的細胞である CX26 ギャップ結合形成細胞への効率の良いベクターを選抜した。AAV ベクターをマウス蝸牛に効率よく導入するための投与方法の検討を行った。全身麻酔下で外側半規管および後半規管に小孔を設けた。挿入するチューブは内径 0.05 mm と内径 0.075 mm のフューズドシリカチューブを比較検討した。内径 0.05 mm のチューブは外側半規管、後半規管ともに小孔から容易に外リンパ領域への挿入が可能であった。しかし内径が小さいため時折ウイルス液が詰まって流出しないことがあった。それに対し内径 0.075 mm のチューブでは全例において流出が止まることは見られなかった。内径 0.075 mm のチューブは 0.05 mm のチューブより外形が太いため半規管への挿入は困難であったが、歯科ドリルによる挿入径の調節と手技の練習により定常的な挿入が可能であり、液漏れも 0.05 mm チューブより少なかった。流速は 60 ~ 90 μ l / h での流入が最適であった。挿入方向に関して最も効率よく外リンパ液に還流されたのは後半規管から前庭方向への挿入であった。投与後の小孔は周辺の筋膜組織等で塞ぎ生体組織接着剤で液の漏出を防いだ。これらの検討の結果、後半規管から前庭方向へ内径 0.075 mm のフューズドシリカチューブを挿入し、10 ~ 12 μ l のウイルス液を流速 60 ~ 90 μ l / h で内耳外リンパ液を還流させることにより効率よく内耳組織、特に蝸牛支持細胞へウイルスを到達させることが可能となった。この方法により、蝸牛支持細胞へ高効率に CX26 遺伝子を導入させ、成熟 CX26 欠損マウスの聴力を有意に回復させることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神谷和作
2. 発表標題 遺伝性難聴への遺伝子治療ベクターおよび中分子医薬品の開発
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会・パネルディスカッション・AMED研究
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷 和作
2. 発表標題 内耳ギャップ結合遺伝子の加齢性難聴への関与
3. 学会等名 第30回 日本耳科学会総会・学術講演会テーマセッション
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神谷 和作 (Kamiya Kazusaku) (10374159)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------