

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18294

研究課題名（和文）ミトコンドリア遺伝子変異における難聴特異的iPSを用いた病態解明と新規創薬

研究課題名（英文）Pathophysiology and drug development using iPS technology specific to mitochondrial mutation-related deafness

研究代表者

荒井 慎平（Arai, Shinpei）

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：70836220

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）：アミノ配糖体に対する易受傷性を示す遺伝性難聴の原因としてミトコンドリア遺伝子1555A>G変異が同定されたが、その病態や有効な薬物治療は未だ見出されていない。人工多能性幹細胞（iPS細胞）は様々な細胞に分化できるため、iPS細胞を内耳細胞に分化誘導することにより難聴の表現型が解析可能となった。代表者の研究グループが独自開発した内耳へのiPS細胞分化誘導法（特許出願済/Fukunaga, Stem Cell Reports, 2017）を応用してミトコンドリア遺伝子1555A>G変異患者iPS由来疾患モデル細胞を樹立し、アミノ配糖体抗菌薬への易受傷性機序の解明と新規薬物治療薬の開発が具体化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はミトコンドリア遺伝子1555A>G変異による遺伝性難聴の分子病態・機序を解明する突破口を切り開き、根本的治療の現実化に正面から取り組むもので、画期的な技術を駆使している。これらの画期的な企画はこれまで全く創造されていない極めて独創性の高い研究である。この技術が臨床に適用されると、聴覚医学に新しい局面を迎えることができる。難聴に悩み、苦しむ数百万人の患者への大きな福音となり、国民生活の質的向上をもたらす極めて有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）：The mitochondrial gene 1555A>G mutation has been identified as the cause of hereditary hearing loss that shows susceptibility to aminoglycosides. However, the pathology and effective drug treatment have not yet been discovered. Since induced pluripotent stem cells (iPS cells) can differentiate into various cells, it has become possible to analyze the phenotype of hearing loss by inducing differentiation of iPS cells into inner ear cells, which are the target of hearing loss. By applying a method for inducing differentiation of iPS cells into the inner ear that the applicant's research group developed independently (patent pending/Fukunaga, Stem Cell Reports, 2017), we established disease model cells derived from iPS cells from patients with the mitochondrial gene 1555A>G mutation, and have clarified the mechanism of susceptibility to aminoglycoside antibiotics and developed a new drug treatment.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ミトコンドリア遺伝子 遺伝性難聴 疾患特異的iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴の分子メカニズムを解明するために、我々の研究室では疾患特異的動物モデルを開発してきた。ヒト非症候性遺伝性難聴因子 *Pou3f4*(Brn4)の遺伝子欠損マウスの作成に初めて成功しこの機能解析を報告した (Minowa, Ikeda, *Science* 1999)。さらに遺伝性難聴で最も頻度の高い難聴遺伝子である Cx26 の遺伝子改変モデルを初めて開発し (Kudo, *Hum Mol Genet*, 2003) コルチ器の形成不全、支持細胞の分化・機能発現が障害されていることを証明し (Inoshita, *Neuroscience*, 2008) (Anzai, *Plos One*, 2015) (Minekawa, *Neuroscience*, 2009) Cx26 欠損マウスへのアデノ随伴ウイルスを用いた GJB2 遺伝子治療により同マウスの聴力を有意に改善させる根本的治療法の開発に成功した (Iizuka, Kamiya & Minowa, Ikeda, *Hum Mol Genet*, 2015)。ミトコンドリア遺伝子疾患特異的疾患モデルとして確立している mito マウスの解析によって難聴を証明した (Nakada, Ikeda, *BBRC*, 2004)。疾患特異的 iPS 細胞を応用することで遺伝性難聴の病態機序を解明し、新規の治療薬を見出す研究が難聴研究のブレークスルーとなり得る。

2. 研究の目的

内耳を標的とした遺伝性難聴では実際の生体試料をヒトから得ることは困難であるため、疾患の発症機構解明や創薬研究が制限されている。疾患特異的 iPS 細胞作製技術を導入することで患者由来の体細胞から幹細胞を経由し標的細胞へ分化させ、疾患モデルを作成することが可能となった。疾患特異的 iPS 細胞を用いてミトコンドリア遺伝子 155A>G 変異による遺伝性難聴の病態解析と創薬研究に応用することは遺伝性難聴の治療のブレークスルーとなる。近年の化合物合成・創薬技術の発展が目覚ましいことから、本研究の疾患モデル細胞が開発されれば、薬剤選抜の条件が整い、内耳への新規薬剤が今後5年以内に開発できることも期待できる。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア遺伝子1555A>G変異患者の臨床データ集積と血液採取

順天堂医院での遺伝子検査により診断されたミトコンドリア遺伝子1555A>G変異難聴患者より臨床データを分類。本学倫理委員会の承認およびインフォームド・コンセントの後、患者血液を収集。

(2) iPS細胞の樹立

血液細胞へエピソーマルプラスミドでの遺伝子導入(OCT3/4,SOX2,KLF4,L-MYC,LIN28,p53-shRNA)を行いiPS細胞を樹立。文科省「疾患特異的iPS細胞を用いた難病研究」岡野拠点にて赤松らが確立した手順に準ずる。我々の研究グループが既報したiPS細胞から内耳前駆細胞への分化誘導 (Fukunaga, *Stem Cell Reports*, 2017) とiPS細胞から内耳有毛細胞への分化誘導法 (Oshima, *Cell*, 2010) を改良し、iPS細胞より内耳発達過程の様々な分化度の細胞を作出する。同方法ではiPS細胞の浮遊培養後に接着培養を行い分化制御因子としてDkk1, SIS3, IGF-1(D/S/I)添加培養、その後のbFGF添加後に鶏杯卵形嚢細胞との共培養により分化誘導を行う。

(3) iPS細胞由来の内耳細胞の表現型の解析

正常 iPS 細胞由来の内耳細胞との形態・機能の比較解析による疾患特異的な病態を検討する。分化誘導した有毛細胞、支持細胞、線維細胞を用いて、アミノ配糖体の添加による細胞死、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生能などを評価する。細胞死のパターンとして、アポトーシスとオートファジーをそれぞれに特異的な分子マーカーによって判別する。ミトコンドリア膜電位感受性蛍光物質を

負荷して、上記の3種類の内耳細胞でのアミノ配糖体によるミトコンドリア膜電位への影響を調べる。同様にこれらの3種類の内耳細胞で産生されるATP量を生化学的に測定し、アミノ配糖体の影響を調べる。また、内耳細胞の変異率（ヘテロプラスミー）とアミノ配糖体の上記の細胞機能への影響の関連を調べる。

(4) 候補薬剤のスクリーニング

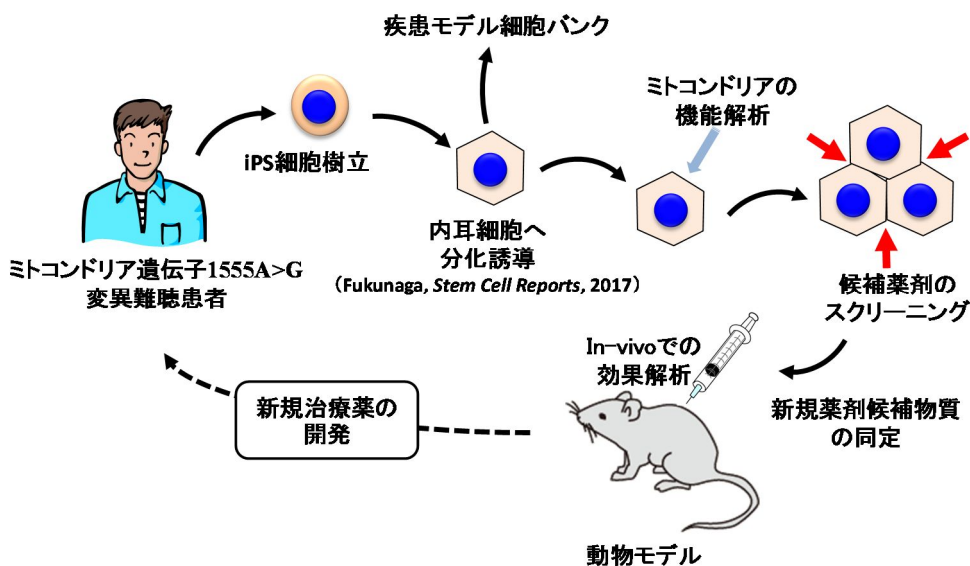
予備実験にて、iPS細胞から分化誘導した内耳線維細胞のミトコンドリア膜電位がアミノ配糖体投与によって低下することが判明した。このin-vitro実験系を用いて、ミトコンドリア膜電位の低下を抑制する化合物をスクリーニングして候補薬剤を探索する。

(5) 動物モデル（mito マウス）による薬効の評価（協力研究者：神谷、大学院生1名）

ミトコンドリア遺伝子疾患特異的疾患モデルとして確立しているmitoマウスに候補薬剤を投与して難聴の予防効果を検証する。

4. 研究成果

アミノ配糖体に対する易受傷性を示す遺伝性難聴の原因としてミトコンドリア遺伝子1555A>G変異が同定された。しかしながら、その病態や有効な薬物治療は未だ見出されていない。人工多能性幹細胞（iPS細胞）は様々な細胞に分化できるため、iPS細胞を難聴の標的である内耳細胞に分化誘導することにより難聴の表現型が解析可能となった。申請者の研究グループが独自開発した内耳へのiPS細胞分化誘導法（特許出願済/Fukunaga, *Stem Cell Reports*, 2017）を応用してミトコンドリア遺伝子1555A>G変異患者iPS由来疾患モデル細胞を樹立し、アミノ配糖体抗菌薬への易受傷性機序の解明と新規薬物治療薬の開発が具体化した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 賀屋 勝太、楠 威志、本間 博友、城所 淑信、荒井 慎平	4. 巻 1
2. 論文標題 鼻性頭蓋内合併症を疑い施行された鼻内視鏡手術により診断された未治療の下垂体腺腫の一例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 111～115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24805/jiaio.1.2_111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoda Atsunobu, Kobayashi Yuko, Tou Miri, Sonoda Kenji, Arai Shinpei, Anzai Takashi, Matsumoto Fumihiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Emergency videoendoscopic endonasal tracheal intubation for severe upper airway stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.amjoto.2020.102779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Arai Shinpei, Ito Shin, Anzai Takashi, Onagi Hiroko, Tsuyama Sho, Fukumura Yuki, Saito Tsuyoshi, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 114
2. 論文標題 A Case of Glomangiopericytoma with a CTNNB1 Mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Practica Oto-Rhino-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 195～201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5631/jibirin.114.195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 陽、松本 文彦、石川 数馬、荒井 慎平、小島 崇史、大峽 慎一
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌における免疫チェックポイント阻害薬がもたらす生存率への影響
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角田 篤信, 陶 美梨, 園田 健二, 芳川 瑛久, 荒井 慎平
2. 発表標題 当科におけるリティンパの使用経験
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井 慎平, 伊藤 伸, 安齋 崇, 池田 勝久
2. 発表標題 分子病理学的検討により診断を確定した Glomangiopericytoma の 1 例
3. 学会等名 第82回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒井 慎平, 楠 威志, 本間 博友, 城所 淑信, 賀屋 勝太, 池田 勝久
2. 発表標題 乾癬性関節炎の関与が考えられた難治性口腔・咽頭炎症例
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------