

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462654

研究課題名(和文) 難聴モデルマウスへの低侵襲蝸牛内投与による聴力獲得

研究課題名(英文) Gjb2 gene transfer for Connexin26 associated hereditary deafness

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先天性難聴は1000出生に1人の割合で発症し、その半数以上は遺伝子変異を原因とする遺伝性難聴とされている。コネクシン26をコードするGjb2遺伝子は遺伝性難聴原因遺伝子の50%以上と最も高頻度に変異が検出されるが、未だ有効な根本的治療法や治療薬は存在しない。我々は遺伝性難聴において世界で最も頻度の高いコネクシン26の聴覚障害の治療法開発のため、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子治療の開発を行った。これにより遺伝子改変モデルの聴力を有意に改善させることに世界で初めて成功した。

研究成果の概要(英文)：Hearing loss is the most widespread sensory disorder, with an incidence of congenital genetic deafness of 1 in 1600 children. For many ethnic populations, the most prevalent form of genetic deafness is caused by recessive mutations in the gene gap junction protein, beta 2, 26 kDa (GJB2), which is also known as connexin 26 (Cx26). Despite this knowledge, existing treatment strategies do not completely recover speech perception. Here we used a gene delivery system to rescue hearing in a mouse model of Gjb2 deletion. Mice lacking Cx26 are characterized by profound deafness from birth and improper development of cochlear cells. Cochlear delivery of Gjb2 using an adeno-associated virus significantly improved the auditory responses and development of the cochlear structure. Using gene replacement to restore hearing in a new mouse model of Gjb2-related deafness may lead to the development of therapies for human hereditary deafness (Iizuka, Human Molecular Genetics, 2015).

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝性難聴 遺伝子治療 コネクシン

### 1. 研究開始当初の背景

補聴器を使用しても会話ができないほどの高度難聴者はわが国でも数十万人いると推測されている。高度感音難聴に対する治療は耳鼻咽喉科領域では最も重要なテーマであるが実際の治療はきわめて困難である。人の内耳を直接生検することや侵襲的な生理学的検査は困難であり、有用な動物モデルを用いての検討は発症機序の解明や根本的治療の確立に極めて重要である。現在、動物モデルは主にマウスが用いられているが、小動物であるため内耳への薬物投与は困難とされてきた。私はマウス内耳に侵襲を最低限に抑えて投与できる方法の開発に取り組んでおり、先天性難聴モデルから老人性難聴モデルまで対応できるように、出生直後から成熟するまでのマウス内耳への投与方法を確立した (Iizuka T et al. 2008、Okada H, Iizuka T et al. 2012)。

また、我々の検討では、先天性の遺伝性難聴モデルマウスでは出生直後は蝸牛コルチ器の形態変化は軽度であり、成長にともない高度になっていき、成熟する頃には有毛細胞が消失していく (Inoshita A, Iizuka T et al. 2008)。したがって、形態変化が軽度のうちの治療が効果的であると考えている。私は生後 24 時間以内のマウス蝸牛への遺伝子導入を低侵襲で可能にしており、同様の方法で薬剤・細胞等の投与も可能である。有毛細胞が消失したものには細胞治療が、細胞消失がなく形態変化が現れたり機能低下をきたしたものには遺伝子導入が効果的と考えている。この手技を用いてウイルスベクターによる遺伝子導入や薬物投与、ES 細胞、iPS 細胞などの細胞投与を難聴モデルマウスに投与し、その治療効果について検討を行う。また、この投与方法で老人性難聴マウスモデルへの応用も可能である。これらの結果は治療困難とされる高度感音難聴の治療への第一歩となると考えられる。

### 2. 研究の目的

高度感音難聴者は本邦でも 40 万人程度いると推定されているが、治療は困難である。動物モデルによる検討は病因や治療法の確立に極めて有用である。私は動物モデルとして主に用いられているマウスの内耳に出生直後から成体まで薬物の投与方法を確立し報告した。また、我々は遺伝性難聴モデルマウスを所有しており、この検討では出生後より蝸牛の形態変化が起り進行していく。よって、形態変化が少ない出生直後に治療を行える私の手技は非常に有用である。ウイルスベクター、iPS 細胞、ES 細胞、成長因子などを用いて遺伝性難聴モデルマウスの治療を行うことを目的とする。この研究は根治が困難とされる高度感音難聴の治療に結びつく可能性を持っている。

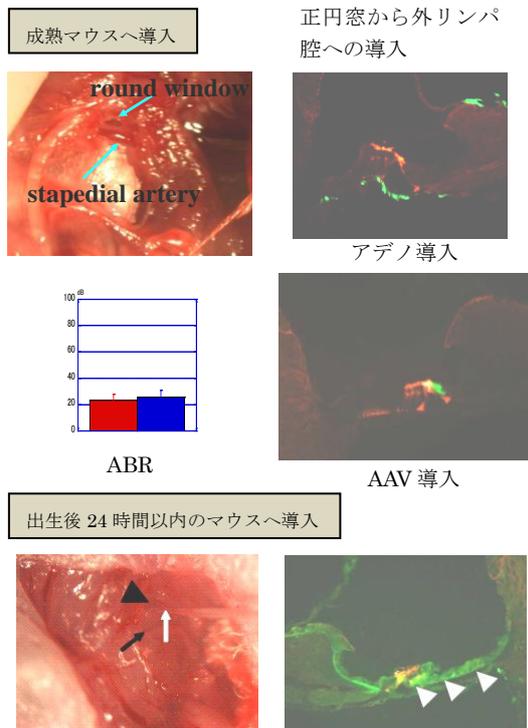
### 3. 研究の方法

ヒトの難聴モデルマウスにウイルスベクター、iPS 細胞、ES 細胞、成長因子の導入を行い、聴力の獲得を目標とする。そのためまず、野生型マウスに導入して侵襲、導入部位、導入効率について検討する。また、可及的早期の導入が望まれるため導入時期も比較し、最も早期で高効率の導入時期を確立する。次に我々の所有するヒトの先天性難聴で最も多いとされる *GJB2* 遺伝子のノックアウトマウスに正常マウス *Gjb2* 遺伝子をウイルスベクターを用いて導入する。正常マウス *Gjb2* 遺伝子は業者に依頼、作成済みであり、これをプラスミドに組み込み、ウイルスベクターを作成する。これをノックアウトマウスに導入し、コードしている Cx26 が発現していることを確認し、その形態変化、聴力変化を検討する。聴力獲得ができれば理想である。この手技を用いて iPS 細胞、ES 細胞、成長因子の導入も可能であり、様々な難聴モデルマウスに応用する。

#### 平成 25 年度：低侵襲で高効率な投与方法の確立と評価、ウイルスベクターの作成

1) 出生直後から成熟期まで様々な年齢の野生型マウスを用いて内耳にウイルスベクターを投与し、その形態変化と聴力変化を比較する。

低侵襲で投与する方法は確立しているが、ウイルスベクターの内耳毒性を見るため ABR による聴力の測定を手術前後で行う—Scope software of PowerLab system (model: PowerLab4/25, AD Instruments CastleHill, Australia) : 現有設備



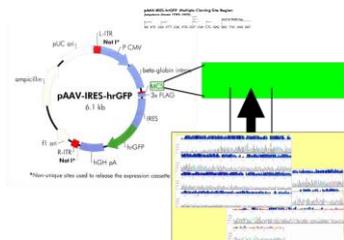
GFP を発現するウイルスベクターを用いた結果。先端約 10 μm のガラス管内にベクターを

入れ、正円窓膜経由に外リンパ腔に注入。成熟マウスへの投与ではアデノ随伴ウイルス (AAV) を正円窓から導入すると聴力低下なく内毛細胞に発現を認める。出生直後のマウスでは支持細胞を中心に GFP の遺伝子発現を認めた。

## 2) ウイルスベクターの作成

正常マウス *Gjb2* 遺伝子を発現する AAV を作成する。

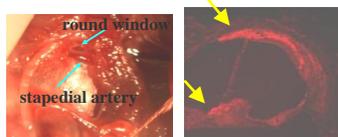
pAAV-IRES-hrGFP の multiple cloning site に制限酵素を用いて正常マウス *Gjb2* 遺伝子を挿入する。このプラスミドを AAV に組み込む。



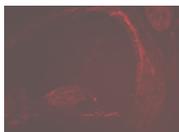
平成 26 年度 : 難聴モデルマウスへの遺伝子導入による聴力獲得への戦略。

1) 難聴モデルマウスに十分な麻酔をし上記方法にてウイルスベクターを導入する。

Adult の *Gjb2* ノックアウトマウスの内耳に *Gjb2* 遺伝子を発現する AAV を導入する。



*Gjb2* ノックアウトマウスに *Gjb2* 遺伝子の発現により **Cx26 の発現を認める。**

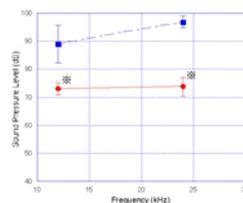
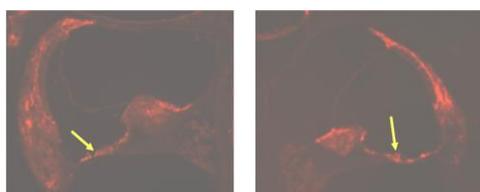


AAV を導入していないノックアウトマウスでは Cx26 の発現はない。

次に出生直後の *Gjb2* ノックアウトマウスの内耳に *Gjb2* 遺伝子を発現する AAV を導入する。

2 ヶ月後に ABR にて聴力検査を行い内耳を摘出して Cx26 の免疫染色と形態変化を観察する。

### 導入法



● : 遺伝子導入側  
■ : 対側

\*\*p < 0.05

*Gjb2* ノックアウトマウスの蝸牛支持細胞に Cx26 の発現を認めた。

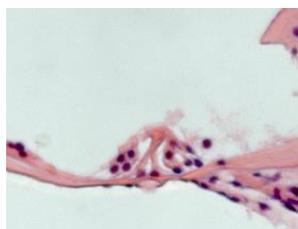
ABR で導入側は対側と比較して有意に聴力が良い



ヘテロマウス



ホモマウス



HE 染色 : 遺伝子導入したホモマウスで未熟ではあるがコルチトンネルの形成とコルチ器の形成が認められる。

遺伝子導入したホモマウス

2) 導入後のマウスの聴力検査 (ABR、DPOAE) と組織学的検査 (光顕、電顕、免疫染色) を行う

生理学的検査と形態学的検査を詳細に行い、評価を行う。Cx26 の発現、聴力の改善が不十分のときは AAV の serotype を現在の 1 から他のものに変更する。予備実験として serotype2 は 1 より蝸牛への導入効率が低かったことは確認している。また、研究協力者の神谷は lenti ウイルスベクター製作も可能であり、これで Cx26 を発現させるようなベクターを作成し、同様の方法で導入することも可能である。さらに、現在は出生直後に遺伝子導入をしているが、さらに幼弱期の加療が必要である可能性もあり、胎生期の導入 (Bedrosian JC et al. *Mol Ther.* 2006) に切り替えることも考えているが、胎生期の導入では侵襲が大きく死亡率が高くなる。

出生後 14 日までにコルチ器の形態は成熟マウスと同様になり、生後 14 日までに ATP や IP3 などの成長因子がギャップ結合を通過してコルチ器に行き渡ることがコルチ器の形成に必要であり、一度コルチ器が完成すればその後は Cx30 で形成されたギャップ結合でも生理機能は保たれるのではないかと考えている。AAV の発現は 6 ヶ月間は安定していると考えられているのでこの仮説が正しければ問題はないはずである。しかし、その後の変化があるのかは確認が必要であり、導入後 6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月後の評価も行う。

## 平成27年度：導入法の確立、サルへの導入、他の難聴マウスモデルへの応用

前年度までの結果を総合して最も効率の良い導入法を確立した後、さらにサルで安全性を検討する。また、他の難聴マウスモデルへ応用として有毛細胞が消失したものには細胞治療を、細胞消失がなく形態変化が現れたり、機能障害があるものには遺伝子導入を同様におこなっていく。

### 4. 研究成果

先天性難聴は1000出生に1人の割合で発症し、その半数以上は遺伝子変異を原因とする遺伝性難聴とされている。コネキシン26をコードするGjb2遺伝子は遺伝性難聴原因遺伝子の50%以上と最も高頻度に変異が検出されるが、未だ有効な根本的治療法や治療薬は存在しない。我々は二種のCx26遺伝子改変難聴モデルを用いて、Cx26遺伝子の変異によりギャップ結合プラークのタンパク質複合体が劇的に崩壊し、機能補完が期待された正常なCx30のタンパク質レベルも有意に減少させることを証明した。これによりCx26がギャップ結合プラーク(GJP)複合体を安定化させるというこれまで報告されていない機能を有することが明らかとなった(Kamiya, 2014, Journal of Clinical Investigation, 2014, 124(4):1598-1607)。さらに我々はこのGJPを遺伝子治療にて修復し、Cx26欠損難聴モデルマウスの聴力を有意に改善させる遺伝子治療法の開発を試みた。アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子治療の検討では崩壊したギャップ結合複合体が安定化することをコネキシン26欠損マウスにより確認した。生後0日齢の蝸牛内にコネキシン26を搭載したAAVを投与したところ、コネキシン26欠損モデルの聴力を有意に改善させることに世界で初めて成功した。この成果は英国遺伝学雑誌 Human Molecular Genetics にて発表された。(Iizuka, Human Molecular Genetics, 2015, 24, 3651-3661)

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

① Iizuka, T., Kamiya, K., Gotoh, S., Sugitani, Y., Suzuki, M., Noda, T., Minowa, O., and Ikeda, K. (2015)

Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness.

Human molecular genetics **24**, 3651-3661

査読有

DOI: 10.1093/hmg/ddv109

② Hiroko Okada, Kazusaku Kamiya, Takashi Iizuka and Katsuhisa Ikeda.

(2015)

Postnatal Development and Maturation of the Vestibular Organ in Dominant-Negative Connexin 26 Transgenic Mouse.

J Otol Rhinol **S1**, 37-40

査読有

DOI: 10.4172/2324-8785.S1-009

③ Kamiya, K., Yum, S. W., Kurebayashi, N., Muraki, M., Ogawa, K., Karasawa, K., Miwa, A., Guo, X., Gotoh, S., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Ito-Kawashima, S., Iizuka, T., Sakurai, T., Noda, T., Minowa, O., and Ikeda, K. (2014)

Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires connexin 26.

J Clin Invest **124**, 1598-1607

査読有

DOI: 10.1172/JCI67621

[学会発表] (計38件)

① GJB2 変異遺伝性難聴に対する細胞治療・遺伝子治療法の開発

神谷和作

第15回日本再生医療学会総会

2016年3月17日

大阪市

② Restoration of Cochlear Gap Junction for GJB2 Associated Hearing Loss

Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga

Association for Research in Otolaryngology (ARO), 39th Annual MidWinter Meeting

2016年2月22日

サンディエゴ(アメリカ)

③ Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Ayumi Fujimoto, Atena Nishikawa, Takashi Anzai, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda

Cochlear gap junction plaque, stabilized macromolecular complex composed of specific connexins

52nd Inner Ear Biology Workshop

2015年9月13日

ローマ(イタリア)

④ Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Osamu Minowa, Megumi Funakubo, Katsuhisa Ikeda

The activation of stem cell homing factors highly induce the cochlear invasion of bone marrow mesenchymal stem cells.

Association for Research in Otolaryngology (ARO), 37th MidWinter Meeting

2014年2月24日

ボルチモア(アメリカ)

⑤神谷和作 美野輪治 池田勝久  
Cell therapy for hereditary deafness with  
bone marrow mesenchymal stem cell and  
the activation of stem cell homing.  
国際幹細胞学会 (ISSCR)  
2013年11月24日  
フィレンツェ(イタリア)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯塚 崇 (IIZUKA, Takashi)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：40372932

### (2) 研究分担者

池田 勝久 (IKEDA, Katsuhisa)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70159614

神谷 和作 (KAMIYA, Kazusaku)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：10374159

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：