

令和元年6月5日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04989

研究課題名(和文) ヒト遺伝性難聴に対する根本治療確立を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Establishment of fundamental treatment for human genetic hearing loss

研究代表者

蓑田 涼生 (Minoda, Ryosei)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：30284772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tet system制御ベクターとSlc26a4を標的としたshRNA(shRNA-pds)を組み込んだ応答ベクターを作製し、胎生11.5日のマウス耳胞内に遺伝子導入した。このマウスに対して、胎生期から生後までドキシサイクリンの投与を行った。コントロールにはドキシサイクリンの投与を行わない群を使用した。生後30日時点で聴覚機能評価を評価した。ドキシサイクリンを投与しなかった群は難聴を発症しなかったが、ドキシサイクリンを投与した群では難聴を発症した。Slc26a4遺伝子が発現する期間は胎生16.5日から生後6日までであるため、その時期に遺伝子が発現しないことで難聴が発症することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子補充治療においては本来の遺伝子発現の時期と部位への厳密な一致は必要ないことが示唆される。このことを明らかにするために今回申請者は、これまで確立してきたマウス耳胞への遺伝子導入技術とテトラサイクリン系抗生剤の投与にて遺伝子発現の調整が可能なTet systemを組み合わせることで、時期特異的な内耳遺伝子発現誘導マウスモデルを作製し研究を行った。本研究は、ヒト遺伝性難聴の主たる原因遺伝子であるSlc26a4をターゲットとして、機能欠失型変異による難聴に対する正常遺伝子補充治療の有効性とその限界を時間的・空間的視点から明らかにする一助となった。

研究成果の概要(英文)：Firstly, we constructed the plasmid vector which included Slc26a4 gene targeted short hairpin RNA with tet system. Then, that plasmid vector was injected and transferred into otocyst at embryonic day 11.5 according to our previous reported methods. Doxycycline was administrated via ingestion between embryonic day 16 to postnatal day 6. As control, no Doxycycline group were used. Auditory assessment showed that hearing loss was detected in the treated mice, but not in the non-treated mice at postnatal day 30. Our results suggested that Slc26a4 gene expression between embryonic day 16 to postnatal day 6 was crucial for hearing. In the future, we investigate the Slc26a4 gene expression timing which is necessary for hearing.

研究分野：胎生期遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 胎生期治療 Slc26a4遺伝子 Tet systemベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

先天性難聴の50%以上は遺伝子の関与によるものと推測されており、現在までに100以上の難聴原因遺伝子が同定されている。その治療として、補聴器、人工内耳が臨床の間では用いられており一定の成果は得られているが、より根本的な治療法の開発が切望されている。

遺伝子異常による先天性難聴は、内耳発生時期に原因遺伝子が適切な時期に正常に発現しないことにより、内耳の発生・発達が障害され、結果として形態・機能異常を生じることがその主たる病態である。そのため、機能欠失型変異が原因の遺伝性難聴に対する治療を考えた場合、“原因遺伝子の本来の発現開始時期”と“本来の遺伝子発現部位”に厳密に一致させて正常遺伝子を補充（以下“遺伝子補充治療”と記載）し、欠失した本来の遺伝子発現を回復されることが最も確実な治療法であると考えられる。しかし、遺伝子補充治療の臨床応用を考えた場合、時期・部位を完全に一致させた治療を行うことは、極めて困難である。遺伝子補充治療により治療可能な時期・部位にある程度の幅（許容範囲）があれば、治療実現へのハードルは著明に低下すると考えられる。

Choiらは、ヒト遺伝性難聴の原因遺伝子である Slc26a4 遺伝子の発現開始時期とその後の形態・機能異常出現の関係について、ドキシサイクリン投与で遺伝子発現の制御が可能な遺伝子改変マウスを用いて検討している（J Clin Invest 2011）。彼らの結果を機能欠失型変異による遺伝性難聴に対する遺伝子補充療法に当てはめて考えた場合、“本来の遺伝子発現開始時期”より早い時期であれば、いつ遺伝子補充治療を行ってもその後の難聴出現を防止できるが、その治療効果は“本来の遺伝子発現開始時期”より遅くなると急速に低下することを示唆していた。申請者らは、ヒト遺伝性難聴の原因遺伝子である Connexin (Cx)30 の欠失マウスを用いて、その胎生 11.5 日の内耳原基である耳胞に対して遺伝子補充治療を行うことにより難聴発症が防止できることを報告している（Miwa, Molecular Therapy 2013）。Cx30 の本来（正常）の遺伝子発現時期が胎生 14 日であることを考えると、申請者らの結果は、“本来の遺伝子発現開始時期”より早い時期に実際に遺伝子補充治療を行っても、有害な結果をもたらすことなしに治療可能であることを示している。

遺伝子補充治療における遺伝子導入部位とその治療効果の関係については、Liら（PLoS Genet 2013）の研究結果が有用な情報を与えてくれる。彼らは、内リンパ嚢にのみ Slc26a4 を発現する遺伝子改変マウスを作製し検討を行い、このマウスは内耳の形態・機能異常が無いことを報告している。Slc26a4 は本来、正常において内リンパ嚢を含む内耳内に広く分布することから、遺伝子補充治療によっても治療可能なことが示唆される。

## 2. 研究の目的

遺伝子補充治療においては本来の遺伝子発現の時期と部位への厳密な一致は必要ないことが示唆されるが、その詳細については全く不明である。このことを明らかにするためには、胎生期から出生後の内耳に対して、任意の時期と部位に遺伝子導入を行う実験が必要である。しかし、胎生期内耳に対しては、解剖学的問題により直接 in vivo でアクセスできるのは胎生 11.5 日のみであり、外部からの遺伝子導入には限界がある。前述の Choi らが用いたような遺伝子改変マウスは、この目的のためには極めて有効なモデルとなりうるが、高額な作製費用と長期作製期間を要するという大きな問題がある。そこで今回は、申請者がこれまで確立してきたマウス耳胞への遺伝子導入技術（Miwa, Molecular Therapy 2013）とテトラサイクリン系抗生剤の投与にて遺伝子発現の調整が可能な Tetracycline-regulated (Tet) system を組み合わせることにより、新たに時期特異的な内

耳遺伝子発現誘導マウスモデルを作製し研究を行うこととした。また、部位特異的遺伝子発現については組織特異的なプロモーターを用いることにより実現する。

前述の如く、申請者はこれまでに、Cx30 欠失マウス耳胞をターゲットとして遺伝子補充治療を行うことにより難聴の出現が防止できることを報告している (Miwa, Molecular Therapy 2013)。しかし、この検討における最長観察期間は生後 30 日までであった。この遺伝子補充治療の有効性の時間的限界について知ることは重要であるため、本研究においては、遺伝子補充治療の長期効果についても検討を行う。

本研究は、ヒト遺伝性難聴の主たる原因遺伝子である Cx26、Cx30、Slc26a4 をターゲットとして、機能欠失型変異による難聴に対する正常遺伝子補充治療の有効性とその限界を時間的・空間的視点から明らかにし、ヒト遺伝性難聴治療法開発実現への一助となることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### 研究 1: 遺伝子補充治療で治療可能な時期の検討

マウス耳胞に対して Tet system ベクターを導入し、ドキシサイクリン投与による目的遺伝子の時間的発現制御が可能なマウスモデルを作製し、実験を行う。

#### 研究 2: 遺伝子補充治療の長期効果

申請者の過去の方法に従い Cx30 欠失マウス耳胞に遺伝子導入を行い検討する。

#### 研究 3: 遺伝子導入部位と治療効果についての検討

Tet system 制御ベクターに組織特異的なプロモーターを組み込み、ドキシサイクリン投与による組織特異的遺伝子発現が可能なマウスモデルを作製し実験を行う。

### 4. 研究成果

#### 研究 1: 遺伝子補充治療で治療可能な時期 (以下、時間的治療可能域と記載) の検討

Tet system 制御ベクターと Slc26a4 を標的とした shRNA(shRNA-pds)を組み込んだ応答ベクターが同一ベクターに搭載された Knockout Single Vector Inducible RNAi System (Takara) を作製した。この Tet system ベクターを胎生 11.5 日のマウス耳胞内に投与し、エレクトロポレーション法にて耳胞へ導入した (以下、shRNA 発現誘導マウスモデルと記載)。このマウスに対して、胎生 11 日から生後 6 日まで 胎生 16 日から生後 6 日までドキシサイクリンの投与を行い、コントロールにはドキシサイクリンの投与を行わない群を使用した。耳胞への Tet system ベクター導入後、胎生 18.5 日に帝王切開を行い、胎仔を出産させ、生後 30 日時点で聴覚機能評価 (聴性脳幹反応検査) を評価した。ドキシサイクリンを投与しなかった群は難聴を発症しなかったが、ドキシサイクリンを投与した 群では難聴を発症した (図 1)。Slc26a4 遺伝子が発現する期間は胎生 16.5 日から生後 6 日までであるため、その時期に遺伝子が発現しないことで難聴が発症することが考えられた。

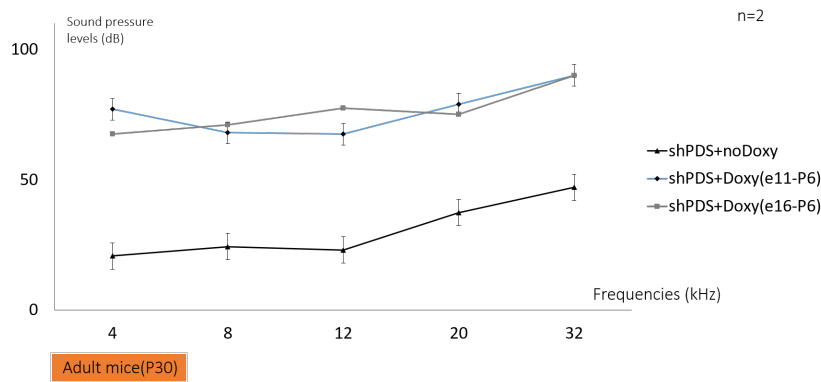


図 1: Tet system ベクターを導入後、ドキシサイクリンを投与しない群では難聴を発症しなかったが、胎生 11 日から生後 6 日まで、あるいは胎生 16 日から生後 6 日までドキシサイクリンを投与した群では難聴を発症した。shRDS : Slc26a4 を標的とした shRNA

### 研究 2 : 遺伝子補充治療の長期効果

申請者らの過去の報告 ( Miwa, Molecular Therapy 2013 ) と同様の方法を用いて Cx30 欠失マウス耳胞への正常 Cx30 遺伝子導入を行う前に正常マウス耳胞へ eGFP を導入し。その後継時的に目的遺伝子の発現について免疫染色法 ( 図 2 )、Western blot 法 ( 図 3 ) にて確認した。

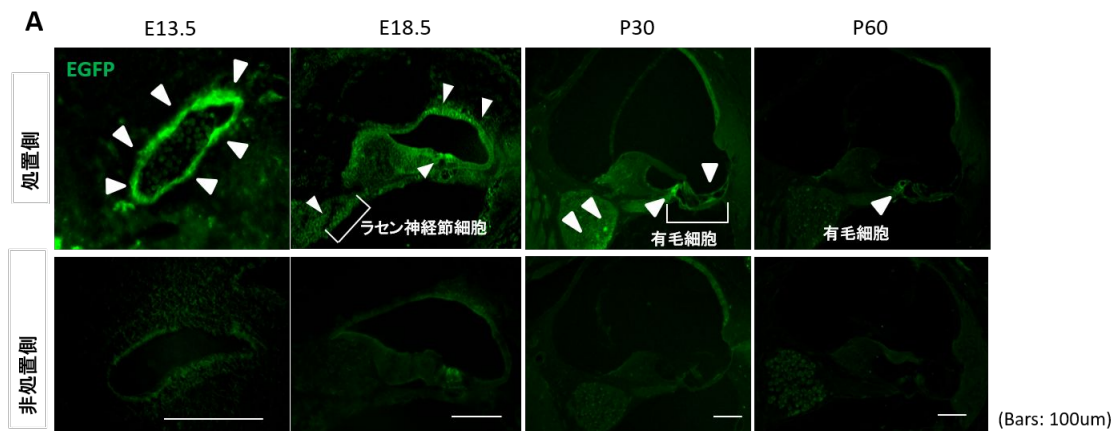


図 2 : 正常マウス耳胞に eGFP 遺伝子を導入し、eGFP 発現を継時的に観察したところ、生後 60 日まで発現が確認できた。

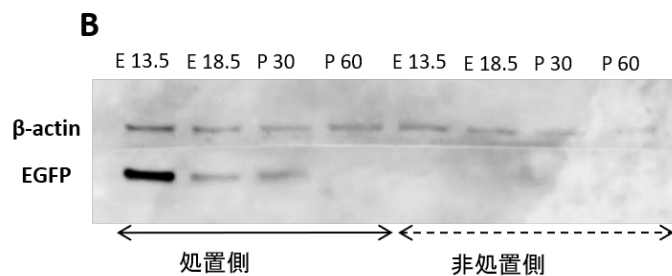


図 3 : 正常マウス耳胞に eGFP 遺伝子を導入し、eGFP 発現を Western blot 法にて確認したところ、生後 60 日には発現をほとんど認めなくなった。

研究 3 については、時間的、人力的制約により達成できなかった。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
〔学会発表〕(計 0 件)  
〔図書〕(計 0 件)  
〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：村上 大造  
ローマ字氏名：MURAKAMI, Daizo

研究協力者氏名：熊井 良彦  
ローマ字氏名：KUMAI, Yoshihiko

研究協力者氏名：伊勢 桃子  
ローマ字氏名：ISE, Momoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。