

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791623

研究課題名(和文) マウス胎児耳胞への遺伝子導入による遺伝性難聴(コネキシン 30)の治療法開発

研究課題名(英文) Gene therapy of congenital hereditary hearing loss with embryonic gene transfer into the otocyst

研究代表者

三輪 徹 (MIWA TORU)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70535591

研究成果の概要(和文)：EGFP が付加された Cx30 プラスミドを購入し、正常マウス耳胞(E11.5)へ Cx30 遺伝子を注入し、エレクトロポレーション法により遺伝子導入した。E18.5、P30 の時点で蝸牛を摘出し、凍結切片を作成し、蝸牛へ Cx30 遺伝子が導入されていることを確認した。また、エレクトロポレーション法による遺伝子導入後の蝸牛の聴覚機能・形態を ABR、サーフェスプレパレーションにて確認し、遺伝子導入による異常が生じないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：A plamid consisting EGFP-conjugated Cx30 was transferred into the inner ear cells of the normal mice with electroporation. It was revealed that no morphological and functional changes occurred in the mice post Cx30 gene transfer into the otocyst of the normal mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴の50%以上は遺伝子異常が原因であり、これまで多くの原因遺伝子が同定されている。しかし、未だ原因に即した遺伝性難聴の治療法は存在せず、対症的に補聴器装用または人工内耳埋め込み手術が行われているのが現状である。これらは有効な治療法ではあるがその効果には限界があり、その

障害は患者の社会参加、自立の妨げとなっており、より原因に焦点を合わせた治療法の開発が切望されており、遺伝子治療は、そのための有望な1つの手段になりうると考えられる。

遺伝性難聴を遺伝子治療にて治すためには、異常な形質の出現前に何らかの遺伝子操作を行う必要がある。すなわち、生殖細胞も

しくは異常形質の出現前の胎児又は新生児に1)正常遺伝子を導入することにより機能障害(loss of function)を補う、2)変異遺伝子より作られる異常蛋白による dominant negative 効果を抑える、のいずれかの方法を採る必要がある。国の指針によりヒトの生殖細胞の遺伝子操作は禁止されているため、将来の臨床応用も考慮して体細胞への遺伝子導入、すなわち胎生期内耳への遺伝子導入を行い、1)による治療法の開発を目指すこととした。

哺乳類、特にマウスは分子生物学的実験モデルとして極めて重要であるにも関わらず、内耳原基である耳胞は、子宮壁を通して直視することは不可能であり、またサイズも小さいことから、in vivo での胎児耳胞への遺伝子導入実験についての研究は殆どなく、これまでに論文として発表されているのは Bedrosian¹⁾、Gubbles²⁾の2編のみである。一方、当教室准教授である蓑田も、これまでにマウス耳胞へのベクター投与方法を既に確立しており、Annual Midwinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology(2002, Florida, USA)³⁾などの学会において報告している。これまで蓑田はウイルスベクター(アデノ随伴ウイルスベクター)を用いてマウス耳胞への遺伝子導入を行ってきたが、アデノ随伴ウイルスベクターの作成が容易でないことが研究上の大きな問題であった。しかし、最近 Gubbles らはエレクトロポレーション法を用いた正常マウス胎仔耳胞への遺伝子導入により、正常な有毛細胞とは別に機能を持った蝸牛有毛細胞が新生されることを in vivo の実験系を用いて報告している。そこで今回我々も、遺伝子導入の手段をウイルスベクターからエレクトロポレーション法に換え実験を行うこととした。

本研究に用いるのは、Connexin30(Cx30)のノックアウトマウスである。Cx30は、細胞接着構造である Gap junction の構成蛋白質の一つであり、これをコードする遺伝子の異常はヒト遺伝性難聴の原因であり⁴⁾、その病態は蝸牛内電位の形成不良であることが報告されている⁵⁾。Cx30 ノックアウトマウスは Dr.Willecke らにより作成されており、我々は Cx30 ノックアウトマウスの凍結胚の供与を受けていた。

2. 研究の目的

「胎生期内耳(耳胞)へ正常な遺伝子を導入することにより、遺伝子欠失による難聴の発現は抑制可能である」という仮説を立て、このことをヒトの遺伝子難聴モデルであるコネキシン 30(Cx30)ノックアウトマウスを用いて検証することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス cDNA ライブラリーより、クローニングキットを用いて Cx30 をクローニングし、Flag で標識した Cx30 プラスミドベクターを作製する。

(2) 熊本大学生命資源研究・支援センターにおいて、Dr.Willecke より供与された Cx30 ノックアウトマウスの凍結胚より、胚の融解、胚移植を行い、産子を作成する。

(3) 作出した Cx30 ノックアウトマウスが難聴マウスであることを聴性脳幹反応(Auditory Brain Response: ABR)を用いて確認する。

(4) Cx30 プラスミドを正常マウス耳胞(Embryonic day 11.5: E11.5)へ投与後、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、その導入パターンを確認する。

(5) Cx30 プラスミドを E11.5 の Cx30

ノックアウトマウスの耳胞へ導入後、産子の内耳機能・形態を評価する。

正常マウス耳胞への遺伝子導入

(1) Cx30プラスミドを正常マウス耳胞(E11.5)へ投与後、Gubbleaらの方法に従い、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行う。

(2) 蝸牛を実体顕微鏡下に摘出、脱灰を行った後、凍結切片を作成し、Flagに対する抗体を用いた免疫染色を行い、Cx30の導入を経時的に確認する。

Cx30ノックアウトマウス耳胞への遺伝子導入

(1) Cx30プラスミドをE11.5のCx30ノックアウトマウス耳胞へ導入する。コントロールとしては、FlagプラスミドをCx30のノックアウトマウスへ導入する。

(2) 生後1か月後に、聴力閾値と有毛細胞の数、蝸牛表面形態について、未処置のCx30ノックアウトマウスと比較、統計学的解析を行い、遺伝子導入の効果を明らかにする。

・聴覚機能評価：ザイラジン・ケタミンで麻酔後、ABRを用いて聴力閾値の測定を行う。

・免疫組織化学：実体顕微鏡下に蝸牛を摘出し、サーフェスプレパレーションにて有毛細胞のカウントを行う。

・走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope: SEM)：蝸牛の表面形態について評価する。SEMは熊本大学工学部に現有しているものを用いる。

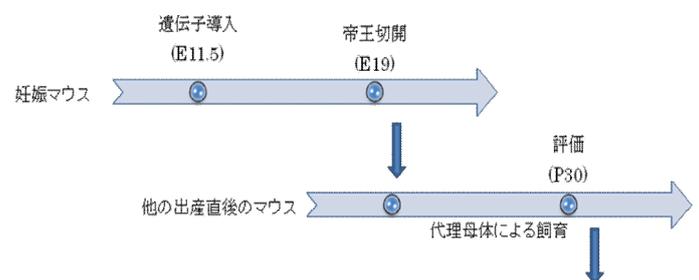
マウス耳胞への遺伝子導入・出産の方法

(1) E11.5の胎児を持つ妊娠マウスをザ

イラジン・ケタミンで麻酔後開腹を行い、子宮を体外へ引き出し、透明の手術ステージの上に母体とともに置く。

(2) ステージの下方より、ファイバー光源で照らしながら、1母体あたり3-4児の耳胞へ、シリコンチューブに接続したガラス管を用いて約100nlの遺伝子を注入し、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行う。この際、ベクターを注入した胎児の位置を記録しておき、帝王切開時の遺伝子導入した胎児の特定のための資料とする。遺伝子導入後腹部を縫合閉鎖する。

(3) 出産の前日、すなわちE19に、妊娠マウスを帝王切開し、子宮内から遺伝子導入した胎児のみを摘出し、他の出産後の母体にその後1か月哺乳・飼育させる。



4. 研究成果

EGFPが付加されたCx30プラスミドをGene Copipea社より購入し、正常マウス耳胞(E11.5)へCx30遺伝子を注入し、エレクトロポレーション法により遺伝子導入した。E18.5(図1)、P30(図2)の時点で蝸牛を摘出し、凍結切片を作成し、蝸牛へCx30遺伝子が導入されていることを確認した。また、エレクトロポレーション法による遺伝子導入後の蝸牛の聴覚機能・形態をABR、サーフェスプレパレーションにて確認し、遺伝子導入による異常が生じないことを確認した。

図 1 : E18.5 蝸牛 凍結切片、
緑 : Cx30 プラスミド発現部位(bar:100 μ m)

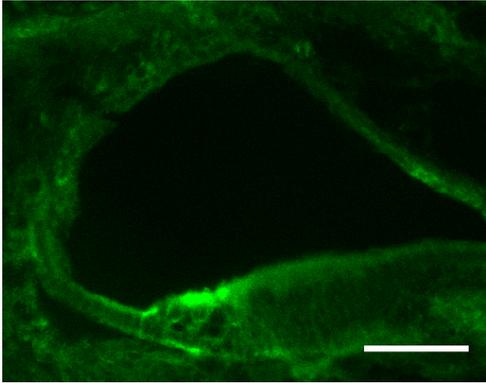
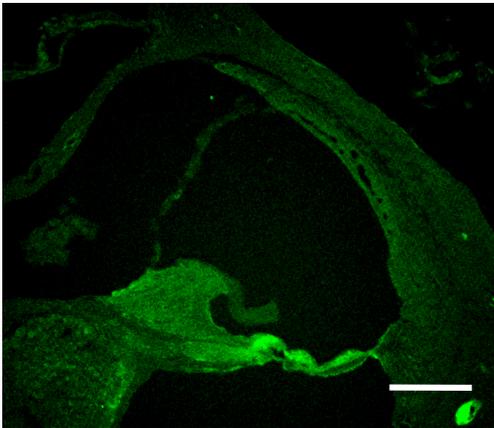


図 2 : P30 蝸牛 凍結切片、
緑 : Cx30 プラスミド発現部位(bar:100 μ m)



また、Cx30 ノックアウトマウス凍結胚より、
産子を作出し、Cx30 ノックアウトマウスが難
聴であることを ABR を用いて確認した。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ①三輪 徹、蓑田 涼生、林田 桃子、湯本
英二、ポリアルギニンによる胎生期内耳
(耳胞)への蛋白質導入法、第 20 回日本耳
科学会、2010 年 10 月 7~9、愛媛、松山市
道後ひめぎんホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 徹 (MIWA TORU)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師

研究者番号 : 70535591