

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791938

研究課題名（和文） 低侵襲蝸牛内投与による難聴モデルマウスの聴力獲得

研究課題名（英文） The strategy to gain hearing ability of the deaf model mouse by injecting into the cochlea.

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

研究成果の概要（和文）：高度感音難聴に対する治療はきわめて困難である。我々の検討では、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変性は軽度であり、成長に伴い変性が進んでいくので変性が軽度のうちの治療が効果的である。我々は出生直後のマウス蝸牛への遺伝子導入を低侵襲に内リンパ腔への遺伝子発現を認め、報告した。我々のこの投与法で遺伝子欠損マウスにその遺伝子を組み込んだウイルスベクターを導入し検討した。出生直後の遺伝性難聴モデルマウスに欠失遺伝子を導入し、遺伝子の発現に成功し聴力改善に成功した。

研究成果の概要（英文）：Hereditary deafness affects about 1 in 2,000 children and mutations in the gap junction beta 2 protein (*GJB2*) gene, coding the gap junction, are the major cause in various ethnic groups, which require normal gene transfer in the early developmental stage to prevent deafness. Mice present an ideal model for inner ear gene therapy. In order to establish the fundamental therapy of congenital deafness, we generated targeted disruption of mouse *Gjb2* gene using Cre recombinase controlled by P0. Using this animal model, we examined the potential of gene therapy in the inner ear, using the homozygous mutant mice and the heterozygous mutant mice. Adeno-associated virus vectors (AAV) carrying *Gjb2* gene were injected into the scala tympani through the round window of the cochlea of the homozygous mutant adult mice. The expression of Cx26 was observed in the fibrocytes of the spiral ligament and spiral limbus, but was not seen in the supporting cells and failed to improve the hearing ability. However, we succeed in gene introduction to the supporting cells of neonatal mice without hearing loss using AAV. The present study will present the preliminary data regarding introduction of the virus vector into the *Gjb2* knockout mouse at the neonatal stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：難聴モデルマウス 遺伝子導入 ウイルスベクター 遺伝子治療

### 1. 研究開始当初の背景

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。我々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きた。

また、我々が検討した結果、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変性は軽度であり、成長に伴い変性が進んでいく(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(Iizuka T et al. 2008)、同様の方法で薬剤・細胞等の投与も可能である。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遺伝性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

我々は過去の報告にはない生後24時間以内のマウス蝸牛への遺伝子導入をアデノ随伴ベクターを用いて低侵襲に注入できる外リンパ腔への投与で内リンパ腔への遺伝子発現を認め、これを報告した。我々のこの投与方法では十分にしかも聴力を下げることなく低侵襲で内リンパ腔へ導入効率を高く投与できる。これは様々な

内耳疾患モデルマウスに応用でき、将来のヒトの内耳への薬物投与・遺伝子導入に貢献するものである。

### 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、成長因子などの導入を行い、聴力の獲得を目標とする。そのためまず、野生型マウスにこれらを導入し、導入による侵襲、導入部位、導入効率についてそれぞれ検討する。また、マウスが成熟していく過程で可及的早期の導入が望まれることもあり導入時期も比較し、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、コードしているコネキシン26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。

### 4. 研究成果

マウスGjb2遺伝子を組み込んだAAVを作成し、Gjb2ノックアウトマウスの蝸牛に導入した。凍結切片を作成し免疫染色にて検討したところらせん板縁とらせん靱帯にCx26の発現を認めた。比較としてベクターを導入していないGjb2ノックアウトマウスを用いたものは発現を認めなかった。成体の遺伝性難聴モデルマウスに欠失遺伝子を導入し、遺伝子の発現に成功した。

その後、出生直後のマウスに導入した。以前に報告したように出生24時間以内のマウスの耳後部切開を置き、

蝸牛を露出、プーラーでひいて先端の直径を  $10\mu\text{m}$  としたガラス管を蝸牛壁または正円窓に刺して直接ウイルスベクターを注入した。2 か月後に ABR にて聴力評価して蝸牛を摘出。形態変化も評価した。ABR にて有意な聴力改善を認めた。また、免疫染色にて蝸牛支持細胞に Cx26 の発現を認め、HE 染色では基底回転、第 2 回転でのコルチトンネルの作成を認めた。コルチ器の高さもコントロールに比べ優位に高かった。

#### 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)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ikeda K, Ono N, Iizuka T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kusunoki T: Bacteriologic evaluation of sinus aspirates taken by balloon catheter devices in chronic rhinosinusitis: preliminary study. *ORL*. 73(5): 271-4, 2011.
2. Okada H, Iizuka T, Mochizuki H, Nihira T, Kamiya K, Inoshita A, Kasagi H, Kasai M, Ikeda K: Gene transfer targeting mouse vestibule using adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Otol Neurotol*, 33(4): 655-9, 2012.
3. Iizuka T, Furukawa M, Ishii H, Kasai M, Hayashi C, Arai H, Ikeda K: Giant cell tumor of the temporal bone with direct invasion into the middle ear and skull base: a case report. *Case Reports of Otolaryngology*, 2012;2012:690148. Epub 2012 Apr 3.
4. Kusunoki T, Ito S, Iizuka T, Ono N, Ikeda K: A case of retropharyngeal abscess with spondylitis causing tetraplegia. *Clinics and Practice*, 52(2): 123-4, 2012.
5. Iizuka T, Nagaya K, Sasaki D, Haruyama T, Kojima M, Isogai H, Yoshikawa H, Ikeda K. Atypical Lemierre syndrome, thrombophlebitis of the facial vein. *Am J Em Med*, 2012 Oct 4. pii: S0735-6757(12)00400-7. doi: 10.1016/j.ajem.2012.08.006. [Epub ahead of print]
6. Iizuka T, Kusunoki T, Ono N, Ikeda K. Mumps virus infection with laryngeal edema and thoracic wall phlegmonous inflammation in an adult. *BMJ Case Rep*. 2013 Feb 18;2013. doi:pii: bcr2012007829. 10.1136/bcr-2012-007829.
7. 薬剤性肝障害にて死亡した急性浸潤型副鼻腔真菌症例. 飯塚崇, 岡田弘子, 畠将晃, 村

田潤子, 池田勝久. 耳鼻臨床 105(5): 437-440, 2012.

8. 咽喉頭部に皮疹を認め、両側顔面神経麻痺を呈した水痘帯状疱疹ヘルペス感染症の 1 例. 深野崇之, 深江治郎, 高梨雅史, 飯塚崇, 服部信孝. 神経内科 74(4):427-429, 2011.

9. GJB2 遺伝性難聴者の平衡機能の解析. 笠井美里, 林千江里, 飯塚崇, 井下綾子, 神谷和作, 岡田弘子, 中島幸則, 加我君孝, 池田勝久. 頭頸部自律神経 25: 24-28, 2011.

10. 頸静脈孔傍神経節腫と鑑別困難であった頸静脈孔髄膜腫例. 林千江里, 古川正幸, 春山琢男, 奈良林修, 飯塚崇, 池田勝久. 耳鼻臨床 104(8): 553-557, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

1. Inner Ear Biology  
“Intracochlear injection of adeno-associated virus vector carrying Gjb2 gene to a mouse model created by a conditional knockout of Gjb2 gene”  
2011 年 9 月 18~21 日  
ポルトガル、リスボン
2. Association for Research in Otolaryngology  
“Intracochlear injection of adeno-associated virus vector carrying Gjb2 gene to a mouse model created by a conditional knockout of Gjb2 gene”  
2012 年 2 月
3. 日本耳鼻咽喉科学会・学術講演会  
「G1b2 コンディショナルノックアウトマウスへの遺伝子導入による聴力獲得」  
2012 年 5 月 10~12 日  
新潟
4. 日本耳科学会・学術講演会  
パネルディスカッション「耳科学基礎研究の新展開」  
「G1b2 コンディショナルノックアウトマウスへの遺伝子導入による聴力獲得」  
2012 年 10 月 4~6 日  
名古屋
5. Association for Research in

Otolaryngology

“Hearing improvement by gene therapy in  
a mouse model created by a conditional  
knockout of Gjb2 gene, preliminary study”

2013年2月16～20日

アメリカ合衆国、ボルチモア

## 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

### (3) 連携研究者

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・講師

研究者番号：10374159