

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462567

研究課題名(和文)難聴モデルマウス前庭の形態・機能評価と前庭を標的とした遺伝子導入の検討

研究課題名(英文) Morphological analysis and gene therapy targeted the vestibular organ with Connexin 26 related hereditary deafness

研究代表者

岡田 弘子 (OKADA, Hiroko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20433774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先天性高度難聴児は幼少児期に末梢平衡機能にも障害を伴う頻度が極めて高いことが知られている。本研究では難聴モデルマウス前庭、特に世界で最も高頻度に発生するGJB2変異難聴の遺伝子改変モデルマウスの形態・機能評価と前庭を標的とした遺伝子治療の効率的な投与方法の検討を行った。標的とするCX26変異難聴モデルの前庭組織の形態学的解析を行い、これらの難聴モデルに対し、正円窓経由・半規管経由の注入法で、GFPを発現するアデノ随伴ウイルスベクターを投与した。その結果、新たに行った半規管経由のウイルス液還流法により正円窓経由と同等またはそれ以上の前庭細胞への遺伝子導入効率が確認された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the morphological and functional development of the vestibular organ in Cx26 transgenic mice between 0 days after birth (P0) and P140, which was compared with that of littermate control mice (non-Tg). The gross structure of the inner ear in non-transgenic and transgenic mice revealed no hydrops, no defects, no degeneration in either the cochlea or the vestibule throughout the postnatal period. Light microscopic observations in the sensory epithelium revealed normally developed and matured utricle macula, saccular macula, and ampulla in the transgenic mice, which were very similar to those of the nontransgenic mouse. The present study clearly demonstrated that postnatal development and maturation in the vestibular organ were morphologically and functionally completed in Cx26 transgenic mice. Furthermore, we examined the gene transfer with adeno associated virus (AAV) via semicircular canal and successfully delivered AAV into the vestibular cells.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝性難聴 GJB2 コネキシン26 前庭 トランスジェニックマウス 遺伝子治療 アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴(GJB2 遺伝子)と前庭機能

先天性高度難聴の発症率は1,000人に1人の割合であり、その約半数は遺伝子の関与があるといわれている。遺伝性難聴の中でも最も頻度が高い原因遺伝子は、gap 結合蛋白であるコネキシン 26 をコードしている GJB2 遺伝子である。

先天性高度難聴児は幼少児期に末梢平衡機能にも障害を伴う頻度が極めて高いことが知られている (Shinjo et al. Acta Otolaryngol. 2007;Jul;127(7):736-47)。また、遺伝性・加齢性・薬剤性・ウイルス性などによる平衡機能障害においては、前庭有毛細胞の損失がみられることが報告されている (Tsuji et al. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 2000; 181: 26-31)。

コネキシン 26 は、蝸牛外側壁線維細胞とコルチ器支持細胞に発現するが、前庭器官(半規管・耳石器)にも免疫組織学的に存在していることが報告されている。

当研究室では、ヒトで証明された優性阻害効果を認める R75W 変異を有する Gjb2 マウスモデルおよび Gjb2 コンディショナルノックアウトマウスを作成・維持し、これまで研究に用いてきた(Kudo et al. Hum Mole Genet. 2003;(12):995-1004) (Inoshita et al, Neuroscience. 2008)。

これらのマウスを用いて前庭器官の形態学解析および前庭機能について評価することにより、難聴と平衡障害との関連が解明される可能性がある。

平衡機能障害と治療

現在、末梢平衡機能障害の治療としては一般に内服治療や理学療法が行われている一方、重症メニエール病等の難治性のめまいに対しては内リンパ嚢開放術や迷路破壊術など手術による治療が行われることがあるが、これらの手術治療においては聴力低下を合併

する場合やふらつきが残る場合があり治療効果も一定した結論を得ていない。

近年、難聴・前庭機障害の治療を目的とした遺伝子治療についてモデル動物を用いた様々な手法での検討が行われている。アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 遺伝子を過剰発現させることにより薬剤による前庭有毛細胞の損失が減少するといった報告 (Pfannenstiel et al. Audiol Neurootol 2009; 14: 254-266)や、有毛細胞発生の調節因子である Atoh-1 遺伝子を前庭有毛細胞に導入することにより、損失された前庭有毛細胞の再生がみられたという報告 (Staecker et al. Otol Neurotol 2007; 28: 223-231)がある。我々は現在まで難聴の治療を目的とした、出生直後での内耳への遺伝子導入法を開発 (**Iizuka et al. Hum Gene Ther 2008; 19: 384-390**)、同法にて GJB2 遺伝子を発現するウイルスベクターを作成し、蝸牛内にコネキシン 26 を発現させることに成功している。更にこの方法を発展させ、**前庭および半規管の有毛細胞、支持細胞に効率的かつ非侵襲的に遺伝子導入を行う方法を近年開発した (Okada et al. Otolology & Neurotology, 2012.33(4):655-9)**。この経験を基に、前庭に対する遺伝子治療を企画するに至った。

2. 研究の目的

本研究ではヒトの非症候性遺伝性難聴の原因遺伝子で最も頻度の高い GJB2 遺伝子変異において、難聴と平衡機能の関連およびその治療法を探ることを目的とし、Gjb2 マウスモデルおよび Gjb2 コンディショナルノックアウトマウスを用いて次の研究項目を計画した。

(1)前庭器官の形態学的解析

コントロールマウス (C57BL/6)、R75W 変異を有する Gjb2 マウス、Gjb2 コンディショナルノックアウトマウスの3群において、幼

若・成熟・老齢での前庭器官の形態学的な差異を比較する。生後0日・7日・14日・49日・140日における各群のマウスの前庭器官を取り出し、光学顕微鏡・電子顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡により形態を観察する。

(2)前庭器官の機能的解析

コントロールマウス(C57BL/6)、R75W変異を有するGjb2マウス、Gjb2コンディショナルノックアウトマウスの3群において、幼若・成熟・老齢での前庭機能を評価する。生後0日・7日・14日・49日・140日の各群のマウスを、swimming test、circling behavior、head tilt およびロータロッドを用いた検査により評価する。

また、前庭器官の器官培養を行い、Ca²⁺イメージングシステムにおいて前庭組織の機能解析を行う予定である。

(3)上記の変性および機能障害部位周辺を標的とした新規治療法として、近年我々が開発した、

前庭へのウィルスベクターによる遺伝子導入法(Okada, *Otology & Neurotology*, 2012)を最適化し、新規の前庭を標的とした遺伝子治療法を確立する。

コントロールマウス(C57BL/6)、R75W変異を有するGjb2マウス、Gjb2コンディショナルノックアウトマウスの3群において、ウィルスベクターを用いた遺伝子導入を試みる。幼若・成熟・老齢のマウスへ、蝸牛管経由・正円窓経由・半規管経由の注入法で、GFPを発現するアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを注入する。その後聴覚機能検査(ABR)によって侵襲を評価したのち、前庭器官を取り出し標本を作成し免疫染色(Phalloidin染色およびGFP染色)を施行し、蛍光光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて導入範囲および導入効果を評価する。

3. 研究の方法

平成26年度

(1)コントロールマウス(C57BL/6)、Cx26-R75W変異を有するトランスジェニックマウス(Cx26-R75W+)、コンディショナルノックアウトマウス(Cx26cK0)の3群において、幼若・成熟・老齢の前庭組織を摘出し、光学顕微鏡・走査電子顕微鏡・透過電子顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡により有毛細胞不動毛の形態・支持細胞の形態学的解析を行う。さらにタンパク質局在の変化を解析するためパラフィン切片・凍結切片・ホルマウント組織の免疫蛍光染色を行い、gap結合の構成蛋白であるコネキシン26の局在について、発育過程での変化を解析する。

現在までにパラフィン切片・HE染色を用いた標本を光学顕微鏡で観察した限りでは各群間に明らかな形態的差異は認められなかった。

27年度はコネキシン26の局在を含めさらに検討を進めてゆく。

(2)コントロールマウス(C57BL/6)、R75W変異を有するGjb2マウス、Gjb2コンディショナルノックアウトマウスの3群において、幼若・成熟・老齢における前庭機能を、swimming test、circling behavior、head tilt およびロータロッドを用いた検査により評価・比較する。

平成27年度以降

(1) GFP発現するよう作成したウィルスベクターを複数の投与方法により注入し、免疫染色を用いて遺伝子導入の範囲と効率を評価する。

コントロールマウス(C57BL/6)、R75W変異を有するGjb2マウス、Gjb2コンディショナルノックアウトマウスの3群において、幼若・成熟・老齢のマウスへ、蝸牛壁経由・正円窓

經由・半規管經由の注入法で、GFP を発現するアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを注入する。その後聴覚機能検査(ABR)、前庭機能検査によって侵襲を評価したのち、前庭器官を取り出し凍結切片を作成し、免疫染色(Phalloidin 染色および GFP 染色)を施行し、蛍光光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて導入範囲および導入効果を評価する。

(2)前庭有毛細胞および支持細胞を中心に前庭器官培養を行い、Ca²⁺イメージングシステムにおいて前庭組織の機能解析を行う。

4. 研究成果

先天性高度難聴の発症率は1,000人に1人の割合であり、その約半数は遺伝子の関与があるといわれている。遺伝性難聴の中でも最も頻度が高い原因遺伝子は、ギャップ結合蛋白であるコネキシン 26 をコードしている GJB2 遺伝子である。先天性高度難聴児は幼少児期に末梢平衡機能にも障害を伴う頻度が極めて高いことが知られている。我々は現在まで難聴の治療を目的とした、出生直後での内耳への遺伝子導入法を開発、同法にて GJB2 遺伝子を発現するウイルスベクターを作成し、蝸牛内に正常なコネキシン 26 を発現させることに成功している。更にこの方法を発展させ、前庭および半規管の有毛細胞、支持細胞に効率的かつ非侵襲的に遺伝子導入を行う方法を近年開発した(Okada et al. *Otology & Neurotology*, 2012.33(4):655-9)。この方法を基に、難聴モデルマウス前庭、特に世界で最も高頻度に発生する GJB2 変異難聴の遺伝子改変モデルマウスの形態・機能評価と前庭を標的とした遺伝子治療の効率的な投与方法の検討を行った。

これまでヒトで証明された優性阻害効果を認める R75W 変異を有する Gjb2 マウスモデルおよび Gjb2 コンディショナルノックアウト

マウスを作成・維持し、これまで特に前庭に關与する病態を解析してきた。これらの結果を耳科学の専門誌にて報告した(Okada, *J Otol Rhinol*, *J Otol Rhinol*, 2015, S1, 37-40)。これらの難聴モデルに対し、正円窓經由・半規管經由の注入法で、GFP を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを投与した。その結果、これまで報告してきた正円窓經由のウイルス投与と同様に、新たに行った半規管經由のウイルス液遺流法により正円窓經由と同等またはそれ以上の前庭細胞へのウイルス感染効率が確認された。

これらの成果により、難聴に伴う平衡機能の異常に対する新たな治療法としてアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療の可能性が示された。

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 16 件)

Furukawa, M., Hayashi, C., Narabayashi, O., Kasai, M., Okada, H., Haruyama, T., Minekawa, A., Iizuka, T., and Ikeda, K. (2016)

Surgical Management of Myringosclerosis over an Entire Perforated Tympanic Membrane by Simple Underlay Myringoplasty.

International journal of otolaryngology 2894932 査読有

Fukunaga, I., Fujimoto, A., Hatakeyama, K., Aoki, T., Nishikawa, A., Noda, T., Minowa, O., Kurebayashi, N., Ikeda, K., and Kamiya, K. (2016) In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca²⁺ Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea.

Stem cell reports 7, 1023-1036 査読有

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

Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama and Katsuhisa Ikeda. (2015) Connexin26 regulates assembly and maintenance of cochlear gap junction macromolecular complex for normal hearing. *AIP Conference Proceedings* **1703**, 30018;30011-30013 査読有

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

〔学会発表〕(計 47 件)

神谷和作、内耳ギャップ結合を標的にした細胞治療・遺伝子治療法の開発、第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月 7 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

神谷和作、池田勝久、GJB2 変異型遺伝性難聴への細胞治療法・遺伝子治療法の開発、第 61 回日本聴覚医学会総会、2016 年 10 月 21 日、盛岡グランドホテル(岩手県・盛岡市)

Fukunaga I, Iizuka T, Hatakeyama K, Fujimoto A, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K. Gene therapy and cell therapy targeting cochlear gap junction formation for

GJB2-associated hearing loss、53rd Workshop Inner Ear Biology、2016 年 9 月 20 日、モンペリエ(フランス)

Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga、Restoration of Cochlear Gap Junction for GJB2 Associated Hearing Loss、ARO 39th MidWinter Meeting、2016 年 2 月 22 日、サンディエゴ(アメリカ)

岡田弘子、手術により聴力改善した Treacher Collins 症候群の 1 症例、第 25 回日本耳科学会、2015 年 10 月 8 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 弘子 (OKADA, Hiroko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20433774

(2) 研究分担者

神谷 和作 (KAMIYA, Kazusaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10374159

飯塚 崇 (IIZUKA, Takashi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：40372932