

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09383

研究課題名(和文) ゲノム編集を用いた新規的内耳遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文) Investigation for gene transfer therapy in inner ears

研究代表者

坂口 博史 (SAKAGUCHI, HIROFUMI)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・研究員

研究者番号：00515223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：感音難聴に対する分子標的医療の開発を目指した研究を行った。まずエレクトロポレーション法により内耳の感覚細胞に対する遺伝子導入が可能であることを示した。また、治療対象となる内耳性難聴についてモデルマウスを作成し、分子病態および原因遺伝子の発現と機能を解析した。その結果、Dia1が有毛細胞のシナプスおよび有毛細胞の不動毛におけるアクチン代謝を制御していること、筋ジストロフィーが蝸牛神経の軸索形成の髄鞘化不全をきたし難聴を生じうること、NOX3が蝸牛内でのROS産生を介して加齢性、騒音性、薬剤性など様々な内耳障害に関与することを明らかにした。これらの分子は将来的に内耳分子標的治療の候補になりえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感音難聴は人口比5%に達する頻度の高い疾患でありながら、未だ根治的な治療はなく、その克服にむけた新規治療法の開発に期待が寄せられている。特に感音難聴の成因としては内耳性難聴が多く、本研究により遺伝性難聴、症候群性難聴、加齢性難聴、騒音性難聴、薬剤性難聴など様々な内耳性難聴に関わる遺伝子の働きが明らかになったことで、これらの遺伝子が感音難聴治療の新たなターゲットであることが示された。また胎生期の内耳への遺伝子導入効率が検証されたことで、今後の感音難聴に対する分子標的治療など内耳病変に対する新しい治療的アプローチの可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We studied gene transfer methods to inner ears using electroporation technique into mouse embryos. We successfully confirmed exogenous gene expression in the inner ear cells, including hair cells and supporting cells. We also studied molecular pathogenesis and gene expression patterns of dia1, large, POMGnT1 and Nox3 genes which are known to be related to certain types of sensorineural deafness, including hereditary, sound-induced, drug-induced and age-related hearing loss. Our investigation suggested that these genes are excellent candidate for molecular-target therapy to inner ear using gene transfer methods.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：inner ear hearing dia1 nox3 muscular dystrophy

## 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は人口比 5%に達する頻度の高い疾患でありながら、未だ根治的な治療はなく、その克服にむけた新規治療法の開発に期待が寄せられている。本研究は、遺伝子導入やゲノム編集技術などの遺伝子改変技術を内耳疾患への治療に応用し、感音難聴に対する新規的な治療法を開拓するための基礎的知見を得ることを目標として遂行した。

## 2. 研究の目的

内耳の遺伝子治療は、解剖学的複雑さや導入効率の低さなどの点でハードルが高いものの、可能となれば感音難聴の克服にむけたブレークスルーを生じうる研究領域である。これまでも、遺伝性難聴モデルマウスへの遺伝子導入で一定の機能改善が得られたとする報告が散見される。本研究では、将来的な臨床応用にむけた手がかりを得るため、内耳への遺伝子導入に関する知識的基盤を構築し、さらに遺伝子導入を含む内耳への分子標的治療のターゲットとなり得る種々の感音難聴に関する分子病態を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) エレクトロポレーション法を用いて妊娠マウスの胎児耳胞に対して遺伝子導入を行い、各種条件のもとで内耳感覚上皮細胞への遺伝子導入効率を検証した。さらにゲノム編集を用いた遺伝子導入を利用した新たな難聴治療のターゲットとして遺伝子点変異による遺伝性難聴、遺伝性症候群性疾患における感音難聴、および進行性難聴の主たる原因になると考えられている活性酸素(reactive oxygen species: ROS)関連感音難聴を候補として、モデルマウスを用いてその病態ならびに遺伝子発現に関する解析を行なった。

2) 遺伝子点変異による遺伝性難聴のターゲット分子として *Dia1* 変異により生じる遺伝性難聴 *DFNA1* に着目し、モデルマウスを用いて分子局在と機能解析を行った。

3) 遺伝性症候群性疾患による感音難聴のターゲットとして筋ジストロフィーによる難聴の検証を行った。2種類の糖鎖転移酵素の機能欠失モデルマウスを用いた聴覚および神経微細構造の解析、ならびにヒト筋ジストロフィー患者の聴覚解析により、筋ジストロフィーにおける聴覚障害とそのメカニズムを検証した。

4) ROS 産生を行う NADPH オキシダーゼ (*Nox*) ファミリーのうち、特に内耳において主体的な役割を果たすことが知られている *Nox3* の局在と機能について、レポーターならびに機能欠失マウスモデルを用いて解析した。

## 4. 研究成果

1) 妊娠マウスを用いて胎仔の耳胞への遺伝子導入手法の確立ならびに内耳感覚上皮細胞への遺伝子導入効率の向上のため各種条件のタイトレーションを行なった。遺伝子導入効率の確認には CMV プロモーター下に EGFP を発現するレポーターコンストラクトを用いて、胎児の耳胞内にプロモーターを注入しエレクトロポレーションにより遺伝子導入を行なった。胎生 12 日目の耳胞に対して遺伝子導入を行い、生後 1 日目に EGFP の発現を検証した結果、感覚上皮細胞に EGFP の発現を得られ、生後 1 日目の内耳において感覚上皮に含まれる有毛細胞ならびに支持細胞のうち約 5%の細胞で EGFP 発現が陽性であることを確認でき

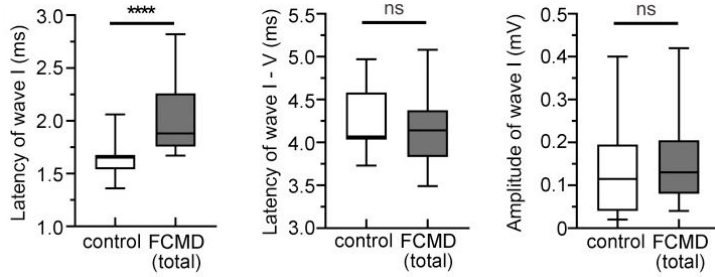
た。これらの結果から、エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入は感覚上皮を含む内耳の細胞機能の改変に利用できる可能性があることが示唆された。

2) 遺伝子点変異による遺伝性難聴のターゲット分子として Dia1 に着目し検証した。Dia1 は diaphanous-related formin ファミリーに属する分子であり、アクチン重合を促進することで様々な細胞活動に関与していることが知られている。近年では Dia1 の 1 塩基変異により常染色体優性遺伝形式の難聴が生じ、特に活性型の Dia1 変異は進行性難聴を生じることが報告されている。一方で変異型 Dia1 が細胞内のどの部位に局在し、どのような機能を果たすかに関しては知られていなかった。本研究においては、トランスジェニックマウスを用いることで、内在性の Dia1 と変異により恒常的活性型になった Dia1 の内耳蝸牛内での局在を明らかにした。内在性の Dia1 と変異型 Dia1 は生後早期からコルチ器とラセン神経節に局在し、成熟過程で徐々に有毛細胞と支持細胞で構成される頂側結合に集積することが判明した。Dia1 変異体を発現するトランスジェニックマウスは、野生型マウスに比べて騒音暴露による蝸牛の脆弱性が亢進しており、特に蝸牛神経のシナプス障害と不動毛の微細形態障害が顕著であった。また、AcGFP で標識した変異型 Dia1 のノックインマウスにおいては、変異型 Dia1 が頂側結合と不動毛頂部に特に強く集積することが判明した。同様に変異型 Dia1 は MDCK 細胞において微絨毛に強く局在していた。Dia1 変異体を発現するトランスジェニックマウスでは、加齢により頂側結合のアクチン環の形成が障害され、不動毛の形態異常や有毛細胞の脱落が見られた。これらの結果から、Dia1 は頂側結合と不動毛の微細構造の発生と維持に深く関わっており、蝸牛および有毛細胞の形態および機能を維持していることが示された。また Dia1 変異により生じることが知られている遺伝性難聴 DFNA1 では潜在的な有毛細胞の脆弱性が存在することで進行性難聴を生じ、ゲノム編集による遺伝子治療の新たな分子ターゲットになりうると考えられた。

3) 遺伝性症候群性疾患による感音難聴のターゲットとして筋ジストロフィーによる難聴の検証を行った。筋ジストロフィーは進行性の骨格筋変性と様々な神経症状をきたす神経筋疾患であり、そのうち ジストログリカンの糖鎖修飾不全に起因する一群のサブタイプはジストログリカノパチーと呼ばれ、骨格筋症状以外にも幅広い症状をきたしうることが知られている。近年、ジストログリカノパチーの病因遺伝子について解明が進んできたが、感音難聴とジストログリカノパチーとの関与に関する包括的な研究はこれまで報告がなかった。我々はジストログリカノパチーの原因分子として知られる POMGnT1 および Large の 2 種類の糖転移酵素の機能欠失モデルマウスを用いて、これらのモデルマウスが軽度から中等度の感音難聴を呈することを示した。これら 2 種類のモデルマウスにおいては、いずれも聴性脳幹反応 (auditory brain stem response: ABR) の I 波が遅延し、蝸牛神経末梢側の髄鞘形成不全が伴っていた。蝸牛神経末梢側には糖鎖修飾された ジストログリカン-ラミニン複合体が豊富に局在することが知られており、POMGnT1 および Large の欠失は同部位での複合体形成を阻害することによって蝸牛神経の変性をきたすと考えられた。さらに、ヒトにおいて福山型筋ジストロフィーの患者の聴力を ABR で用いて調べたところ、同様に I 波の遅延がみられ、潜在的な難聴を持つことが示唆された。これらの結果から、ジストログリカノパチーにおいては蝸牛神経末梢側においてシュワン細胞による髄鞘化が阻害され感音難聴が生じることが示唆された。

【図 1: 福山型筋ジストロフィーにおける難聴】

ABR の I 波潜時が延長するが振幅および V 波潜時は延長しない

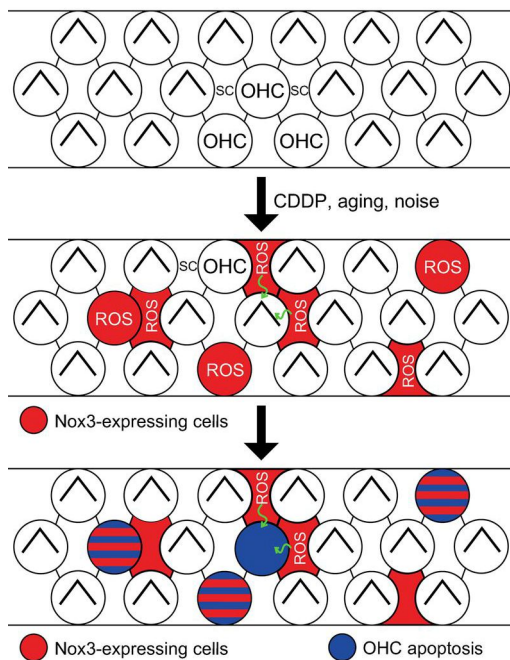


(FCMD: 福山型筋ジストロフィー)

4) ROS は NADPH オキシダーゼ (Nox) により産生され、様々な感音難聴の成因に関わることが知られている。Nox ファミリーのうち特に Nox3 は、内耳において耳石形成や難聴の発症に関わることが以前から知られていたが、同分子の内耳における発現や機能については一致した見解が得られていなかった。我々は Nox3 プロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するノックインマウスを作成し、さらに Cre リコンビナーゼ存在下に標識物質である Tomato を発現するマウスを用いて Nox3 の蝸牛内局在を解析した。その結果、Nox3 は蝸牛支持細胞、内外有毛細胞、蝸牛神経節細胞を含む様々な細胞において発現することが判明した。Nox3 の発現は内耳傷害性のあるシスプラチンの投与、加齢、騒音暴露によって増加した。さらに同モデルマウスの聴覚機能の解析から、蝸牛基底回転の支持細胞と外有毛細胞における Nox3 の発現増加が ROS 関連の感音難聴の主な原因であることが示された。また、Nox3 の関与はシスプラチン誘導性難聴で最も強く、ついで加齢性、騒音暴露の順に強く関与することが判明した。これらの結果から、Nox3 の抑制は ROS 関連感音難聴の治療に新たなアプローチをもたらすと考えられた。

【図 2 : ROS による難聴発症の機序】

シスプラチン、加齢、騒音暴露により外有毛細胞と支持細胞における ROS 産生が亢進し、ROS による細胞傷害機序を介して外有毛細胞のアポトーシスが生じる



(CDDP: シスプラチン、aging: 加齢、noise: 騒音暴露、OHC: 外有毛細胞、SC: 支持細胞)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morioka S, Sakaguchi H, Mohri H, Taniguchi-Ikeda M, Kanagawa M, Suzuki T, Miyagoe-Suzuki Y, Toda T, Saito N, Ueyama T	4. 巻 16(5)
2. 論文標題 Congenital hearing impairment associated with peripheral cochlear nerve dysmyelination in glycosylation-deficient muscular dystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1008826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008826.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninoyu Y, Sakaguchi H, Chen L, Suzuki T, Hirano S, Hisa Y, Saito N, Ueyama T	4. 巻 11(7)
2. 論文標題 The integrity of cochlear hair cells is established and maintained through the localization of Dia1 at apical junctional complexes and stereocilia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 536-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-020-02743-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mohri H, Ninoyu Y, Sakaguchi H, Hirano S, Saito N, Ueyama T	4. 巻 JN-RM-2672-20
2. 論文標題 Nox3-derived superoxide in cochleae induces sensorineural hearing loss.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-020-02743-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀧 正勝 (Taki Masakatsu)  (30453111)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	上山 健彦  (Ueyama Takehiko)  (80346254)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関