

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16858

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスの内耳局所投与による前庭器官を標的とした遺伝子治療法開発

研究課題名(英文) Development of a gene therapy targeting the vestibular organs by local administration of adeno-associated virus in the inner ear.

研究代表者

岡田 弘子(Hiroko, Okada)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性高度難聴児は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。難聴原因因子のコネキシン26(CX26)は、聴覚器だけでなく前庭器官(半規管・耳石器)にも局在する。本課題では、前庭器官と蝸牛を共に標的としたGjb2遺伝子治療ベクターの投与方法の開発および遺伝子治療後の前庭器官の機能的解析により、前庭へのアデノ随伴ウイルス(AAV)による遺伝子導入法を最適化した。内耳器官培養にて選抜したAAVを用いてGFP遺伝子を半規管経由で局所投与し、マウス半規管に小孔を設け、微小チューブを挿入しウイルス液の持続的な注入を行ったところ、前庭および半規管膨大部への感染が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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おり著しく患者のQOLが低下するためその治療法の確立が強く求められている。前庭器官と蝸牛を共に標的としたGjb2遺伝子治療ベクターの投与方法の開発は低侵襲な治療法であり、その治療法の確立は学術的および社会的意義は高いといえる。

研究成果の概要(英文)：The Gjb2 gene, which encodes connexin 26 (CX26), a gap junction protein, is the most frequent causative gene in hereditary hearing loss. CX26 is expressed in the outer cochlear wall fiber cells and Corticoid supporting cells, but is also expressed in the vestibular organs. In this project, we will develop a method of administering Gjb2 gene therapy vectors targeting both vestibular organs and the cochlea, and analyze the function of vestibular organs after gene therapy to optimize gene transfer methods using adeno-associated viruses (AAV) into the vestibule. To administrate the AAV to the vestibular epithelial cells, we made a small hole in the semicircular canal, injected virus solution via microtube. After a certain period of time, AAV infections of the vestibular and semicircular canal areas were confirmed.

研究分野：遺伝性難聴

キーワード：遺伝性難聴 コネキシン26 アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

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おり著しく患者の QOL が低下するためその治療法の確立が強く求められている。なかでも、**アデノ随伴ウイルスを用いた Gjb2 遺伝子治療は、低侵襲な治療のため、新たな治療法として期待が高まっている。**

2. 研究の目的

先天性難聴の根本的原因として遺伝子変異がその半数以上に寄与する。また先天性の難聴者は平衡機能の障害を持ち合わせることも知られている。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、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、申請者らがこれまで前庭機能を解析した Gjb2 優性阻害変異マウス (Okada, J Otol Rhinol, 2015) 等の遺伝子改変難聴モデルを用いて次の研究項目 **1.前庭器官と蝸牛を共に標的とした Gjb2 遺伝子 治療ベクターの投与方法の開発、2.遺伝子治療後の前庭器官の機能的解析これらの解析を行うことにより、研究代表者が開発した前庭へのアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入法(Okada, Otol & Neurotol, 2012)を最適化し、前庭を標的とした遺伝子治療法を確立す**

3. 研究の方法

生後コントロールマウス (C57BL/6)、R75W 変異を有する Gjb2 マウス、Gjb2 欠損マウスの 3 群において、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入を試みた。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した。その後聴覚機能検査 (ABR) によって侵襲を評価したのち、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した。遺伝子治療後の前庭器官の形態学的解析。各モデルマウスの遺伝子導入後の前庭器官の形態学的な差異を比較した。遺伝子導入後、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した。各モデルマウスにおいて、遺伝子導入後の前庭機能を評価した。遺伝子導入後に各群のマウスを平衡機能検査により評価した。Gjb2 を発現するよう作成したアデノ随伴ウイ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した。幼若・成熟・老齢のマウスへ、正円窓経由・半規管経由の注入法で、Gjb2 を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入した。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 (Cx26 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した。Gjb2 遺伝子導入効果の指標として、ギャップ結合 プラークの形成変化を解析した。細胞境界における最大プラークの長さを測定し、遺伝子導入によるプラーク長の変化を解析した。このギャップ結合プラークの回復を治療効果指標とした表現型解析を行い、最も効率の良い投与方法を選抜した。前年度に選抜された遺伝子導入法により、幼若・成熟・老齢における前庭機能を評価・比較した。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った。これらの機能評価により、機能回復のために最も効率的な前庭器官への遺伝子導入法を開発した。

4．研究成果

初年度は、半規管からのアデノ随伴ウイルス（AAV）の投与法の検討を行った。マウス Gjb2 遺伝子を搭載した AAV を後半規管に設けた小孔に、微細チューブを挿入する方法を検討した。従来の正円窓投与は 0.5 μ L 程度の投与量であったが半規管投与では約 5 μ L のウイルス液を投与し閉創することが可能であり、またこのときの手術による聴力低下は見られなかった。さらに研究代表者らが開発した前庭へのアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入法（Okada, Otol & Neurotol, 2012）を最適化し、前庭を標的とした遺伝子治療法を確立を試みた。上述した同様の方法で半規管からのアデノ随伴ウイルス（AAV）の投与法の検討を試み、マウス Gjb2 遺伝子を搭載した AAV を後半規管に設けた小孔に、微細チューブを挿入する方法を検討した。従来の正円窓投与は 0.5 μ L 程度の微量の投与量であったが半規管投与では約 5~10 μ L のウイルス液を投与でき、効果的な遺伝子治療を実施できる可能性が示唆された。さらに、この際、手術による聴力低下は見られなかった。さらに AAV のカプシド領域の改変により新たなベクターの開発を行った。現在、平衡器官への遺伝子導入効率の高いベクターを選抜している。さらなる AAV 導入量の増加のために、内耳上皮細胞への感染効率の良いカプシド改変型 AAV を用いて GFP 遺伝子を半規管経由で局所投与し、前庭上皮細胞への遺伝子導入を行った。後半規管 と外側半規管に 80-100 μ m 程度の小孔を設け、微小チューブを挿入して 10~14 μ l の AAV 液を後半規管から前庭方向に挿入してシリンジポンプにて持続的な注入を行った。一定期間後にこれらの個体の内耳を摘出し、前庭および半規管膨大部への感染が確認された。以上から従来の方法と比較して、聴力低下を起さずに、AAV 導入量を各段に増加させる術式を提案することが可能になった。

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 Hara Satoshi, Kusunoki Takeshi, Nakagawa Hiroshi, Toyoda Yu, Nojiri Shuko, Kamiya Kazusaku, Furukawa Masayuki, Takata Yusuke, Okada Hiroko, Anzai Takashi, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Association Between Earwax-Determinant Genotypes and Acquired Middle Ear Cholesteatoma in a Japanese Population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otolaryngology Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/01945998211000374	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 Ikeda K, Ito S, Hibiya R, Homma H, Ono N, Okada H, Kidokoro Y, Shiozawa A, Kusunoki T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Postoperative Management of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Impact of High-Dose Corticosteroid Nasal Spray.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Arch Otorhinolaryngol	6. 最初と最後の頁 101-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0038-1668515.	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 Tajima S, Anzai T, Matsuoka R, Okada H, Ide T, Fujimaki M, Kaya S, Ito S, Ikeda K.	4. 巻 7307290
2. 論文標題 Parapharyngeal Abscesses Caused by Group G Streptococcus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Rep Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 1-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/7307290.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 弘子, 古川 正幸, 高田 雄介, 池田 勝久
2. 発表標題 耳垢腺癌の1症例
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田 雄介, 安齋 崇, 原 聡, 岡田 弘子, 田島 勝利, 池田 勝久
2. 発表標題 先天性真珠腫の顕微鏡下耳科手術3症例
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 勝久, 大庭 亜由子, 伊藤 伸, 岡田 弘子, 安齋 崇
2. 発表標題 慢性浸潤性真菌性鼻副鼻腔炎の血清学的抗原マーカーを用いた非侵襲的な早期診断
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

〔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

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