

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18816

研究課題名（和文）患者由来iPS細胞を用いたEYA4遺伝子変異難聴の病態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of EYA4 gene mutation hearing loss using patient-derived iPS cells

研究代表者

松崎 佐栄子 (Saeko, Matsuzaki)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：70573400

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）：EYA4遺伝子変異患者4症例および健常者の血液検体からiPS細胞を樹立し、内耳細胞へ誘導して、EYA4タンパク発現を症例ごとに検討したところ、健常者由来の内耳細胞では核にのみEYA4の発現が見られたのに対し、患者由来内耳細胞においては細胞質においてもEYA4の発現が高率で見られた。また、核におけるEYA4の発現も健常者由来内耳細胞よりも強い傾向を認め、この傾向は実際の患者の難聴の程度と正の相関を示していた。また各種のストレス物質を内耳細胞の培養上清に添加することで細胞ストレスを与え、細胞の生存率について検討を行い、特に酸化ストレスに対する脆弱性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EYA4遺伝子変異患者4症例および健常者の血液検体から誘導した内耳細胞を比較検討することで、内耳細胞内のEYA4タンパクの発現型に差異があること、またEYA4遺伝子変異難聴（DFNA10）では酸化ストレスの脆弱性が見られることなどが解明された。生体から内耳細胞を採取することは難しいが、疾患特異的iPS細胞研究という手法を用いることで、直接的に検討することが可能となった。今回の研究により、再生医療以外のiPS細胞の活用方法を示すことができた。また、本疾患に酸化ストレスの脆弱性が見られたことから、本疾患の治療薬開発の可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We derived iPS cells from blood samples of 4 cases of EYA4 gene mutation patients and healthy subjects and induced into inner ear cells. The differences of EYA4 protein expression in each case were examined. EYA4 protein expression was observed at a high rate in the cytoplasm of patient-derived inner ear cells, and EYA4 expression in the nucleus also tended to be stronger than that of healthy human-derived inner ear cells. This tendency became stronger as the degree of deafness in the actual patient was heavier. In addition, various stress substances were added to the culture supernatant of inner ear cells to give cell stress, and the survival rate of the cells was examined, and the vulnerability to oxidative stress was particularly confirmed.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：EYA4遺伝子 遺伝性難聴 常染色体優性遺伝 進行性感音難聴

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

**EYA4 遺伝子は4種類の EYA ファミリー遺伝子の一つで 10番目に発見された常染色体優性非症候性難聴 (autosomal-dominant non-syndromic hearing loss、通常 DFNA10 と表記)**

の原因遺伝子として 1996 年に同定された。EYA4 遺伝子は 639 塩基からなる EYA4 タンパクをエンコードし、

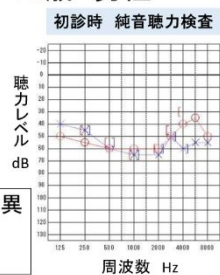
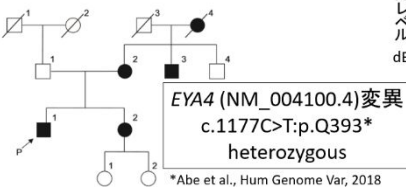
**EYA4 タンパクは SIX ファミリーと共に耳、眼を含む中枢神経、顔面の初期発生前に発現する転写調節因子として働く。**ヒトの EYA4 遺伝子変異難聴は、20-30 歳代から始まる進行性感音難聴を特徴とするが、

Eya4 ノックアウトマウスは出生直後からの重度難聴で滲出性中耳炎を伴うと報告されており (Wayne, S. et al. Hum Mol Genet. 2001)、ヒトの **EYA4 遺伝子変異難聴とは表現型が異なるため、進行性難聴の病態を齧歯類モデルで検討するのは難しいと考えられた。**また霊長類であるコモンマーモセットでは遺伝子改変が可能であることが報告されているが、**遺伝子改変霊長類モデルを用いた検討は現時点では費用、時間の面から難しい。**



### EYA4 遺伝子変異症例 40歳 男性

- 発症時期不詳 26歳時の健診で指摘
- 36歳から補聴器着用
- 初診時 右 60.0dB、左 63.8dB (4分法)



### 2. 研究の目的

そこで、本研究では EYA4 遺伝子変異による **難聴の進行を抑制する新規治療法の探索**を目標に、**iPS 技術を用いて病態解明と治療効果のある薬剤の初期スクリーニングを行うこと**を目標とした。

EYA4 遺伝子変異患者 4 例から疾患特異的 hiPS 細胞を樹立し、ヒト ES/iPS 細胞からの内耳細胞誘導法を適用して **EYA4**

**遺伝子変異患者由来内耳細胞**を作成し、本研究ではこの内耳細胞を用いて細胞レベルでの **EYA4** **遺伝子変異難聴の病態生理および治療標的を患者内耳細胞で直接的に検討した。**

### 3. 研究の方法

EYA4 遺伝子変異患者由来ヒト疾患特異的 iPS 細胞から作成した内耳細胞と、健常者由来ヒト iPS 細胞から作成した内耳細胞において、EYA4 タンパクの局在および発現強度を検討した。次に、各種のストレス物質を細胞上清に添加し、EYA4 遺伝子変異患者由来内耳細胞の特定のストレスに脆弱性を持つかを検討した。特定のストレスに脆弱性を持つ傾向が見られれば、その脆弱性を改善させる薬剤が治療薬となりうる。そこで、次に治療薬となりうる物質を in vitro で患者由来内耳細胞に添加し、薬剤の効果を検討した。

### 当院通院中の EYA4 遺伝子変異難聴 4 症例

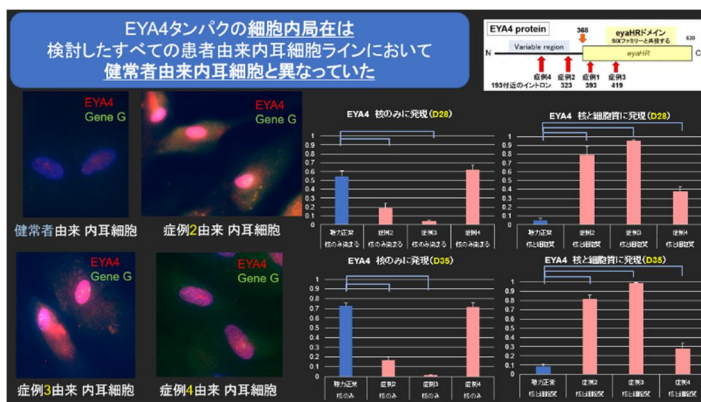
全症例から iPS 細胞を樹立した

症例	性別	初診時年齢	経過観察期間	心疾患	聴力圏	EYA4 新規変異		初診時純音聴力	最高語音明瞭度 (良聴耳)
						EYA4 遺伝子変異	初診時純音聴力		
1	男性	40	6年2か月	あり* 軽度MR	谷型→水平型	ナンセンス変異	61.9dB	95%	
2	女性	45	3年8か月	なし	水平型	フレームシフト	71.3 dB	80%	
3	女性	37	3年7か月	なし	低音障害型	ミスセンス変異	46.9 dB	95%	
4	男性	53	2年3か月	精査中	高音漸傾型	スプライシング異常疑い	53.8 dB	75%	

聴力は4分法両耳平均 \*Abe et al., Hum Genome Var, 2018

#### 4. 研究成果

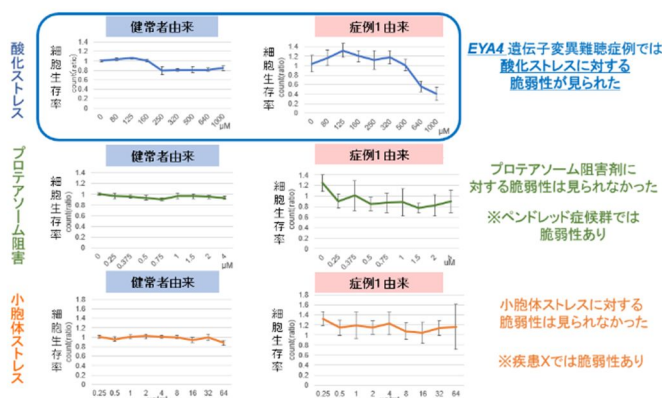
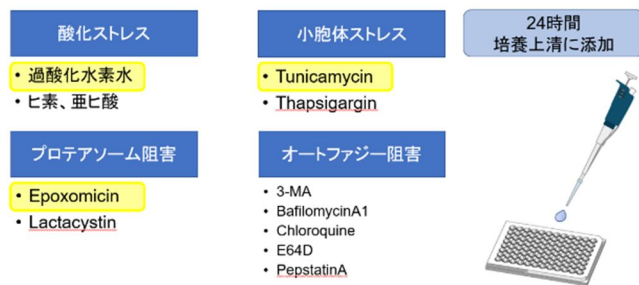
初年度は、当研究室で確立した内耳細胞誘導法を用いて *EYA4* 遺伝子変異患者 4 症例および健常者の血液検体から iPS 細胞を樹立し、内耳細胞へ誘導した。さらに *EYA4* 遺伝子変異患者由来、および健常者由来内耳細胞における *EYA4* タンパク発現の症例ごとの相違を検討



したところ、健常者由来の内耳細胞では核にのみ *EYA4* の発現が見られたのに対し、患者由来内耳細胞においては細胞質においても *EYA4* の発現が高率で見られ、核における *EYA4* の発現も健常者由来内耳細胞よりも強いという傾向が見られた。この傾向は、実際の患者の聴力と相関が見られ、難聴の程度が重いほど、細胞内の核および細胞質で *EYA4* タンパクの発現が強いという結果が得られた。続いて、各種の細胞ストレス物質を内耳細胞の培養

#### 細胞ストレス物質に対する反応

上清に添加することで細胞ストレスを与え、細胞の生存率について検討を行い、特に酸化ストレスに対する脆弱性を認めた(第29回日本耳科学会総会・学術講演会ヤングアワードセッションにて発表)。最終年度は *EYA4* 遺伝子変異難聴患者由来内耳細胞の酸化ストレスに対する脆弱性を改善させる薬剤を検討するため、抗酸化物質のライブラリを作成した。過去の文献や企業のライブラリから、約420種を選択し、細胞実験に適切な濃度にし、溶剤別に96wellの細胞培養プレートに配置した。今後、患者由来内耳細胞と今年度で作成した抗酸化物質ライブラリを用いて、本疾患の治療薬となりうる物質を検討する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松崎佐栄子、松永達雄、務台英樹、奈良清光、井上沙聡、細谷誠、藤岡 正人、小川郁
2. 発表標題 Alport症候群9家系におけるサブタイプ別聴覚および聴力経過の検討
3. 学会等名 第65回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡 正人, 松崎 佐栄子, 細谷 誠
2. 発表標題 加齢性難聴原因遺伝子EYA4 を標的とした疾患iPS創薬研究
3. 学会等名 第6回橋渡し研究戦略的推進プログラムシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎 佐栄子、藤岡 正人、細谷 誠、小川 郁
2. 発表標題 EYA4遺伝子変異4症例から樹立したiPS細胞由来内耳細胞と難聴の表現型についての検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saeko Matsuzaki, Makoto Hosoya, Masato Fujioka, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 Examination of EYA4 gene mutation related hearing loss using the common marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> ) cochlea and patient-derived induced pluripotent stem cell (iPS cells)
3. 学会等名 56th Inner Ear Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎 佐栄子、藤岡 正人、細谷 誠、小川 郁
2. 発表標題 EYA4遺伝子変異4症例から樹立したiPS細胞由来内耳細胞のストレス脆弱性の検討
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会ヤングアワードセッション
4. 発表年 2019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