

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09702

研究課題名(和文) ミオシン6のミスセンス変異ヘテロ型で生じる進行性難聴の遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy for progressive hearing loss caused by a heterozygous Myosin VI missense mutation.

研究代表者

関 優太 (SEKI, Yuta)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・研究員

研究者番号：10615636

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)：我々は難聴発症原因遺伝子であるミオシン6遺伝子(Myosin VI)の突然変異アレルが変異部位および遺伝子変異の種類で異なることを見出した。本研究は、ヘテロ接合で生じる進行性難聴の発症時期および重篤化の差異をデータ蓄積により補完し、調査したミスセンス変異ヘテロマウスは欠損変異ヘテロマウスよりも早期に進行性難聴が発症することを明らかとした。また、ホモ接合体における行動解析を実施し、ミスセンス変異型のホモ接合体は、未だ不明瞭の前庭有毛細胞の病態を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難聴治療の方法として、音を増幅する、音の伝達を強化する、神経を直接刺激する聴覚装置の着用が挙げられるが、ノイズの多い環境下での感度および自然音の感知に対し、完全であるとは言い難い。近年、遺伝性疾患の治療のための有望な戦略として登場したAAVベクターを介した遺伝子治療が加速しており、本研究の成果は、Myosin VIの突然変異で生じる進行性難聴発症に対する遺伝子治療時期の決定および治療効果検証のための基礎データとして提供できる。

研究成果の概要(英文)：We found that mutant alleles of the myosin 6 gene (Myosin VI), the gene responsible for hearing loss, differed by mutation site and type of mutation. This study clarified differences in the onset and severity of progressive hearing loss in heterozygotes. In addition, we found that missense mutant heterozygous mice develop progressive hearing loss earlier than null mutant heterozygous mice. Behavioral analysis in homozygotes suggested that missense mutant homozygotes may have an obscure vestibular hair cell pathology.

研究分野：実験動物学

キーワード：進行性難聴 モデルマウス ミオシン6 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

難聴は世界中で最も一般的な感覚障害であり、2050年までに25億人近くが何らかの聴覚障害をもつと予想されている(WHO)。その発症要因は騒音による中耳・内耳障害、感染症との合併症、加齢などが挙げられるが、遺伝的要因の影響も強く、約50%は遺伝子異常によって発症することが推定されており、早期診断、予防および治療法の確立が急務である。近年、ヒト難聴の原因遺伝子同定は、次世代シーケンサー等を含む高度な塩基配列決定技術の普及により、難聴を引き起こす変異アレルの情報が急速に拡大し、アレルごとに発症時期および病態レベルの差異が生じることが明らかとなっている。これらの情報は、遺伝子診断のみならず、難聴の遺伝子治療に不可欠であり (Zhang *et al.* *Front Cell Neurosci* 2018)、これまでに、遺伝性疾患患者に対するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを介した遺伝子治療がいくつか承認され、難聴の遺伝子治療については、モデルマウスを用いた内耳に対する AAV のセロタイプの評価や AAV の導入手法の開発が加速している (Emptoz *et al.* *PNAS* 2017, Landegger *et al.* *Nat Biotechnol.* 2017)。

本研究の標的分子であるミオシン 6 遺伝子 (*Myo6*) は、ヒトおよびマウスの顕性 (優性) ・ 潜性 (劣性) 難聴原因遺伝子の 1 つであり、モータドメインを始めとした様々な領域で突然変異が報告されている。潜性 (DFNB37) の患者は欠失・機能不全変異アレルをホモに持ち、先天性の重度難聴を発症する。一方、顕性 (DNNA22) の患者は機能獲得や機能低下、または発現量低下によるハプロ不全によって共通して進行性難聴を発症する。 *Myo6* 変異を起因として進行性難聴を発症する患者の難聴発症時期と症状の重篤化は、変異部位、遺伝的背景効果および環境要因が関与することから多種多様である。研究代表者はこれまでにいくつかの *Myo6* 変異マウスの表現型を調査し、マウス進行性難聴を発症させる *Myo6* 変異アレルが、患者同様に難聴発症時期および病態進行速度に差異を生じさせることを見出した。また一方で、遺伝子治療でミスセンス変異アレルを有毛細胞から除去することが可能となれば、難聴発症の遅延および病態悪化を防止できることが予想された。

2. 研究の目的

本研究は、進行性難聴を引き起こす *Myo6* ミスセンス変異をターゲットに、CRISPR-Cas の発現システムが搭載された AAV ベクターを用いて内耳有毛細胞のゲノム編集を実施する遺伝子治療で難聴発症予防および病態の進行を防止することを目指すものである。しかしながら、新型コロナウイルス感染症がまん延したことによる大幅な研究活動の制限、コンペティターによる論文が先行したこと、遺伝子治療の詳細な時期決定のための基礎データ蓄積を重点目的とし、聴力データの蓄積と未だ不明瞭な点が残る変異マウスの行動異常に着目し、オープンフィールドテストによる行動解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) 聴力テスト

Myo6 変異マウス (ミスセンス変異および欠損変異) のヘテロ個体の聴力レベルは、三種混合麻酔下で保温 (37°C) し、4, 8, 16 および 32 kHz の音域において聴性脳幹反応 (Auditory brainstem response : ABR) を測定し、閾値を決定することにより評価した。また、歪成分耳音響放射 (Distortion product otoacoustic emissions : DPOAE) の 8, 11.3, 16, 22.6 および 32 kHz の各音域における音圧レベル (L2 = 55 および L1 = 65 dB) で外有毛細胞機能を調査した。

(2) オープンフィールドテスト

野生型、*Myo6* ミスセンス変異ホモおよびヘテロに加え、欠損変異マウスの行動を調査するため、オープンフィールド 50 cm × 40 cm × 50 cm (W × H × L) で、総行動時間 (秒)、総行動距離 (cm)、平均行動速度 (cm/秒)、方向転換 (回)、旋回 (回)、立ち上がり (回) および立ち上がり時間 (秒) の項目を記録し比較した。

4. 研究成果

(1) *Myo6* 変異アレルヘテロ接合体マウスの聴力データ

学術論文掲載に至った欠損ヘテロの聴力データ (Seki *et al.* *Neuroscience* 2021) および蓄積した 2 種のミスセンス変異型のそれぞれのヘテロ個体の聴力データを比較した結果、共通して加齢に伴う ABR 閾値の上昇や DPOAE 振幅の減少が認められた。特にミスセンス変異型の 2 種は欠損マウスヘテロよりも早期に重篤化することが明らかとなり、マウス進行性難聴を発症させる個々の変異アレルは患者と同様に難聴発症時期と病態進行速度に差異が生じることが判明した。既に、ヒト難聴発症の原因となる MYO6 ミスセンス変異を模倣した変異アレルのゲノム編集による遺伝子治療は一定の成果を得ており (Wang *et al.* *Hear Res* 2019, Xue *et al.* *Mol Ther* 2022, Xiao *et al.* *Sci Transl Med* 2022)、本研究により明確化した聴力レベルの重篤化の情報は、成熟した有毛細胞を標的とした治療時期の決定、変異アレル破壊および遺伝子発現の補完などに活用されることが期待される。

(2) *Myo6* 変異を起因とした行動異常

未だ不明瞭なミスセンス変異ホモ個体の前庭機能異常に起因する行動異常を明らかにすることを目的に、オープンフィールドテストを実施した結果、1ヶ月齢の欠損マウスで明確に認められる行動時間および距離の延長、旋回行動回数の増加などは認められなかった(図1)。しかし

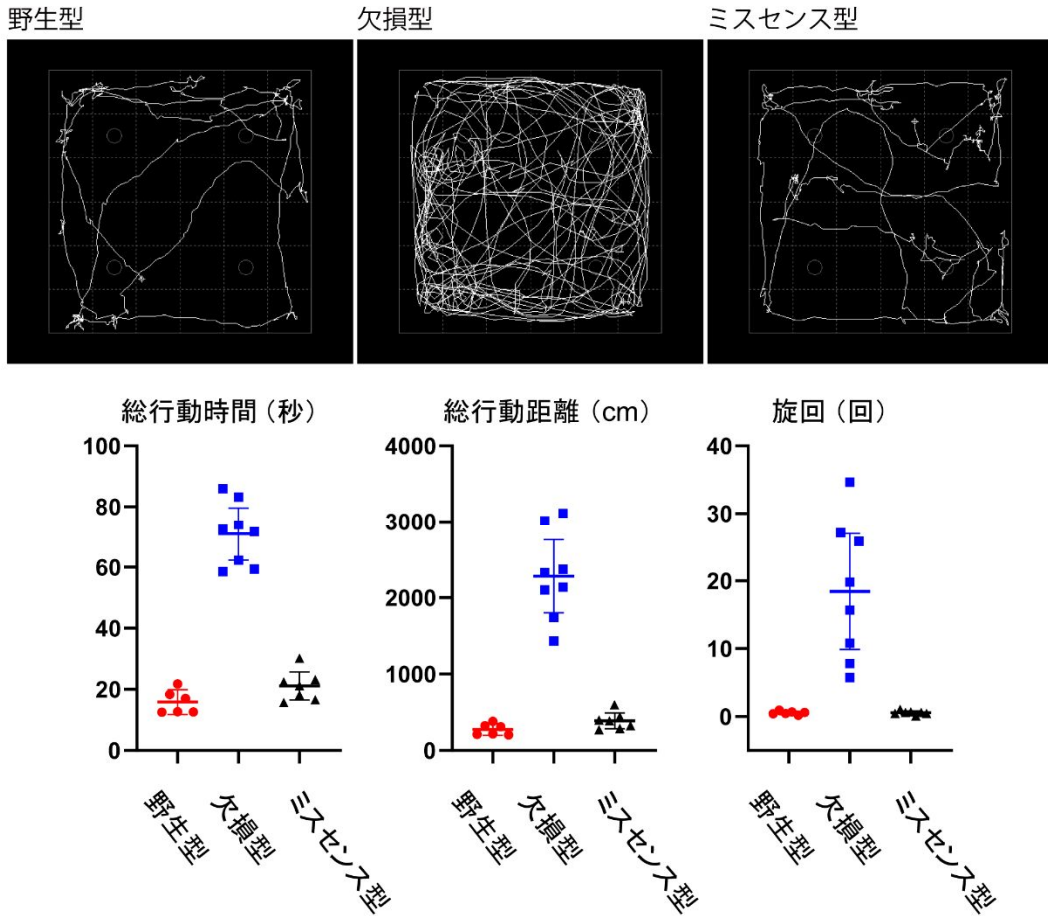


図1. 1ヶ月齢における野生型(左)、欠損型(中)およびミスセンス型(右)のオープンフィールドテスト(上段). 総行動時間、総行動距離および旋回行動の比較(下段).

ながら、加齢に伴い首振り行動など野生型とは異なる行動異常が目視レベルで容易に確認できるようになったため、これらの表現型がオープンフィールドテストにおける方向転換および立ち上がりといった項目に焦点を当てることで検出できる可能性が推察された。そこで、1、4 および6ヶ月齢で調査した結果、目視レベルで確認できた表現型は、方向転換、立ち上がりなどの回数、または立ち上がり時間といった予測項目に対し、方向転換および立ち上がりの回数でわずかに上昇した数値を示したが、明確な差異を示す値ではなく(図2)、より高精度のトラッキングシステムによる観察が必要であることが考えられた。これらの結果は、ホモ個体の解析ではあるものの、ミスセンス変異を持つホモ個体は欠損型ホモよりも軽微な異常を前庭器官で生じていることが推察され、加齢に伴う重篤化を示すことが示唆された。従って、*Myo6* の突然変異は変異部位や遺伝子変異の種類によって多様な発症パターンを示し、聴感覚をつかさどる蝸牛の有毛細胞だけではなく、モデルマウスにおいては、平衡感覚をつかさどる前庭の有毛細胞においても未だ捕捉できていない病態が存在し、遺伝子治療の進展により治療効果における1つの指標となる可能性が推察された。

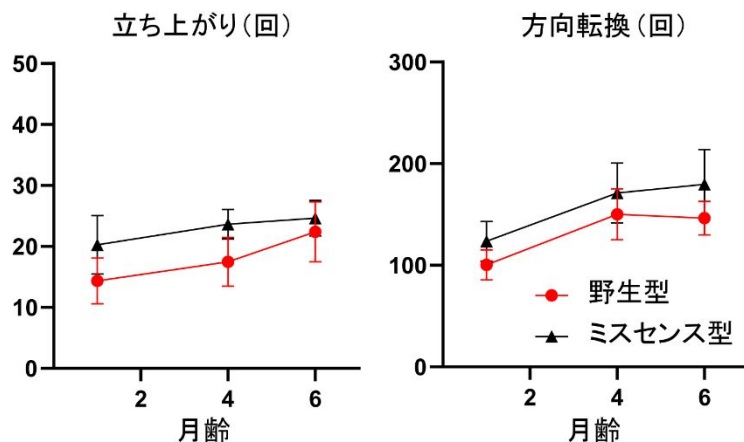


図2. 1、4および6ヶ月齢における野生型およびミスセンス型の立ち上がりおよび方向転換の回数比較.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Seki Yuta, Shitara Hiroshi, Ishii Rie, Ouchi Takafumi, Yasuda Shumpei P. Kikkawa Yoshiaki	4. 巻 478
2. 論文標題 Myosin VI Haploinsufficiency Reduced Hearing Ability in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 100 ~ 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2021.09.023	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seki Y, Shitara H, Ishii R, Ouchi T, Yasuda SP, Kikkawa Y
2. 発表標題 Myosin VI haploinsufficiency reduced hearing ability in mice.
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference.（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 吉川欣亮、関優太、安田俊平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 バイオインダストリー協会	5. 総ページ数 5
3. 書名 B&I バイオサイエンスとインダストリー	

1. 著者名 関優太、吉川欣亮	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 9
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

難聴プロジェクトホームページ
<https://www.igakuken.or.jp/mammal/>

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
---------	---------