

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09742

研究課題名（和文）ヒト遺伝性内耳疾患に対する遺伝子治療確立を見据えた基礎研究

研究課題名（英文）Basic research for the establishment of human embryonic gene therapy

研究代表者

三輪 徹 (Miwa, Toru)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70535591

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）：Slc26a4-PA-Tet systemベクターを作成し、Slc26a4欠損マウス耳胞（胎生11.5日）に対してエレクトロポレーションを行うことでPA-Tet systemベクターを導入した。青色光照射とドキシサイクリン経口投与により目的遺伝子の時間的発現制御が可能なモデルマウスを作製した。導入箇所は内リンパ嚢に局限し、聴力はRescueされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PA-Tet system制御ベクターに組織特異的なプロモーターを組み込み、青色光照射とドキシサイクリン経口投与による組織特異的遺伝子発現が可能なモデルマウスを作製し、異所性過剰発現実験を通して、遺伝子発現部位と内耳の機能・形態異常発現の関係について多角的検討を行うことができた。

研究成果の概要（英文）：We generated the Slc26a4-PA-Tet system vector and transferred the PA-Tet system vector by electroporating Slc26a4-deficient mouse inner ear (embryonic day 11.5). We constructed a model mouse in which the temporal expression control. The transduced location was confined to the endolymphatic sac, and hearing of this mice was rescued.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：遺伝子治療 Slc26a4 Connexin30

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

先天性の難聴・前庭障害(以下、内耳疾患とする)の半数以上は遺伝子が関与すると推測されている。その治療として補聴器や人工内耳、前庭リハビリテーションが臨床の場では用いられており一定の成果は得られているが、より根本的な治療法開発が切望されている。遺伝子異常による先天性内耳疾患は、内耳が発生する時期に、遺伝子が適切な時期に正常発現しないことで内耳の発生/発達が障害され、結果、形態・機能異常を生じることが主たる病態である。そのため、遺伝子欠失による内耳疾患に対する治療を考えた際、「原因遺伝子が本来、発現を開始する時期」と「本来の遺伝子発現部位」を厳密に一致させて正常遺伝子を補充(以下、遺伝子補充治療とする)し、欠失した本来の遺伝子発現を回復させることが確実な治療法であると考えられる。しかし、遺伝子補充治療の臨床応用を考えた場合、時期・部位を完全に一致させた治療を行うことは、極めて困難である。遺伝子補充治療により治療可能な時期・部位にある程度の幅である許容範囲があれば、治療実現への可能性が遥かに向上すると考える。

遺伝子補充治療では、これまでの研究から本来の遺伝子発現の時期と部位への厳密な一致は必要ないことが示唆されているが、その詳細については未確立である。このことを明らかにするためには、胎生期から出生後の内耳に対して、任意の時期と部位に発現遺伝子を変化させる実験が必要である。遺伝子改変マウスは、極めて有効なモデルとなるが、作製するために高額で長期間がかかるという大きな問題があった。そこで、これまで確立してきたマウス耳胞への遺伝子導入技術 (Miwa et al., Molecular therapy 2013) とテトラサイクリン系抗生剤の投与にて遺伝子発現の調整が可能な Tetracycline-regulated (Tet) system を組み合わせ、時期特異的な内耳遺伝子発現誘導マウスモデルを作製し研究を行ったが、発現誘導の制御性に乏しく、任意の時期に発現遺伝子を変化させることができなかった。そこで、今回はマウス生体外からの「青色光照射」により効率良く遺伝子オン・オフが可能である PA-Tet(Photo-activatable-Tet)システム(Yamada et al., Cell Rep 2018、Kawano et al., Nat Chemi Bio 2016)を用いることとした。本システムは光受容体遺伝子 Cry2 遺伝子およびそれと二量体を形成する遺伝子である CIB1 遺伝子を Tet ベクターに組み込み、光量依存的に遺伝子発現を制御できるシステムであり、さらに、光量とテトラサイクリン系抗生剤を調整することで発現レベルをより精密に制御できるシステムである。また、部位特異的な遺伝子発現については組織特異的なプロモーターを用いることにより実現する。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト遺伝性難聴の主たる原因遺伝子である *Gjb6*、*Slc26a4* をターゲットとして、機能欠失型変異による難聴に対する正常遺伝子補充治療の有効性とその限界を時間的・空間的視点から明らかにし、ヒト遺伝性難聴治療法開発実現への一助となることを目指す。

### 3 . 研究の方法

ターゲット遺伝子として、遺伝性難聴の原因遺伝子として頻度の高い *Gjb6* 遺伝子、そして過去の研究結果との整合性を確認するために *Slc26a4* 遺伝子を用いる。正常マウスにおけるこれら遺伝子の発現開始時期はすべて今回遺伝子導入を行う胎生 11.5 日より遅いことが知られていることから、これら遺伝子の正常遺伝子発現開始前にその発現を制御する Tet system ベクターの導入が完了していることになる。過去の方法に従い、マウス耳胞 (胎生 11.5 日) に対してエレクトロポレーションを行うことで PA-Tet system ベクターを導入し、青色光照射とドキシサイクリン経口投与により目的遺伝子の時間的発現制御が可能なモデルマウスを作製する。発現抑制・過剰発現実験を通して、難聴原因遺伝子の発現開始時期と機能・形態異常発現の関係について多角的検討を行い、治療可能時期を明らかにする。遺伝子補充治療において、蝸牛内のすべての部位における発現が蝸牛機能の維持に本当に不可欠であるのか、また、これらの部位以外の異所性発現は蝸牛機能に有害な作用を及ぼすのかどうかについて検討する。PA-Tet system 制御ベクターに組織特異的なプロモーターを組み込み、青色光照射とドキシサイクリン経口投与による組織特異的遺伝子発現が可能なモデルマウスを作製し、異所性過剰発現実験を通して、遺伝子発現部位と内耳の機能・形態異常発現の関係について多角的検討を行う。遺伝子補充治療を行ったマウスについて、その長期治療効果について検討を行う。これらを通して、遺伝子補充治療の時期、遺伝子導入部位と治療効果の関係について解明を目指す。

### 4 . 研究成果

*Slc26a4*-PA-Tet system ベクターを In fusion 法で作成し (図 1)、*Slc26a4* 欠損マウス耳胞 (胎生 11.5 日) に対してエレクトロポレーションを行うことで PA-Tet system ベクターを導入した。青色照射を胎児に照射するための腹部装着リングを開発した。マウス胎児を 9-0 ナイロン糸で固定し、腹部装着リングは生体用バンドを購入し固定した。青色光照射とドキシサイクリン経口投与により目的遺伝子の時間的発現制御が可能なモデルマウスを作製した。導入箇所は内リンパ嚢に局限し、聴力は Rescue された (データ未発表)。

*Gjb6* に関しては、*Gjb6*-PA-tet system ベクターを作成したものの、Cx30 ノックアウトマウスの肺パスツレラ感染にてクリーン化するのに時間を要し現在実験中である。



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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miwa Toru, Ohta Kunimasa, Ito Naofumi, Hattori Satoko, Miyakawa Tsuyoshi, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Song Wen-Jie, Minoda Ryosei	4. 巻 13
2. 論文標題 Tsukushi is essential for the development of the inner ear	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00570-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Miwa Toru, Okano Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Inner Ear Macrophages and Autoimmune/Autoinflammatory Mechanisms in the Pathophysiology of Inner Ear Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2022.861992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Miwa Toru, Ito Naofumi, Ohta Kunimasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Tsukushi is essential for the formation of the posterior semicircular canal that detects gait performance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 581 ~ 594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12079-021-00627-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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