

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03089

研究課題名（和文）患者iPS細胞と疾患モデル動物による遺伝性難聴への内耳AAVゲノム編集治療の開発

研究課題名（英文）Development of inner ear AAV genome editing therapy for hereditary hearing loss using patient iPS cells and animal models

研究代表者

池田 勝久（Ikeda, Katsuhisa）

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：70159614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では遺伝性難聴に対するiPS細胞やゲノム編集技術を用いた蝸牛ギャップ結合の修復と内耳細胞治療の開発を行った。日本人に典型的なGJB2変異を持つ遺伝性難聴患者からiPS細胞や疾患モデル細胞が得られた。さらにGJB2典型変異を持つゲノム編集ノックインマウスの開発を進めた。またGJB2変異型難聴に特化した高効率ベクターの開発を進め、蝸牛上皮全般に遺伝子導入が可能な内耳細胞用カプシド改変型AAVベクターおよび特異的プロモーターを開発し特許出願した（特願2021-198101）。同ベクターが難聴遺伝子変異へのゲノム編集に有用であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は遺伝性難聴の分子病態・機序を解明する突破口を切り開き、根本的治療の実現化に正面から取り組むもので、画期的な技術を駆使している。これらの画期的な企画はこれまで全く創造されていない極めて独創性の高い研究である。この技術が臨床に適用されると、聴覚医学に新しい局面を迎えることができる。難聴に悩み、苦しむ数百万人の患者への大きな福音となり、国民生活の質的向上をもたらす極めて有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a fundamental treatment for hereditary hearing loss using iPS cells and genome editing technology to repair cochlear gap junctions and inner ear cell therapy. We established and induced differentiation of iPS cells from a Japanese patient with a typical GJB2 mutation, and obtained disease model cells. Furthermore, we developed a genome-edited knock-in mouse with a typical GJB2 mutation. We also developed a highly efficient vector specialized for GJB2 related hearing loss, and developed a capsid-modified AAV vector for inner ear cells capable of gene transfer to the entire cochlear epithelium and a specific multiple promoter, and filed a patent application (JP-Application 2021-198101). The vector was confirmed to be useful for genome editing to iPS derived cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：遺伝性難聴 GJB2変異型難聴モデル ゲノム編集 内耳AAVゲノム ips由来疾患モデル細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴は約 1,600 出生に 1 人と高頻度に発症し聴覚と言語発育の著しい障害を引き起こす極めて高度な QOL の低下をもたらす。特にコネキシン (CX) 26 をコードする GJB2 遺伝子の変異は日本人における遺伝性難聴の 20~30% を占めており世界中でも最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子であることが示されてきた。既に 60 以上の遺伝性難聴原因遺伝子が同定されており、最終的には 100 以上の難聴遺伝子の関与が推察されている。我々はヒト非症候性遺伝性難聴因子 Pou3f4 (Brn4) の遺伝子欠損マウスの作成に初めて成功しこの機能解析を報告した (Minowa, Ikeda, Science 1999)。この研究はヒト非症候性遺伝性難聴である DFN3 の一因が蝸牛線維細胞の変性にあることが証明されただけでなく、内リンパ電位の形成に線維細胞が不可欠であるという新しい病態機構を解明した。さらに申請者らは患者病態を再現した新規 CX26 欠損マウスを開発し、CX26 優性阻害変異マウスの分子的共通点を探索した。その結果「ギャップ結合複合体崩壊」という全く新しい生化学病態を発見した。(Kamiya & Ikeda, J Clin Invest, 2014) これにより新規薬剤開発や再生医療法開発のための全く新しい病態指標が示された。さらに申請者らは CX26 欠損マウスへのアデノ随伴ウイルスを用いた GJB2 遺伝子治療により同マウスの聴力を有意に改善させることに成功した (Iizuka, Kamiya & Minowa, Ikeda, Hum Mol Genet, 2015)。さらに申請者らは iPS 細胞から CX26 ギャップ結合複合体を形成する内耳感覚上皮を製造することに成功した (Fukunaga&Kamiya, Stem Cell Reports 2016/特許取得)。これらの成果により、世界で最も典型的である GJB2 変異型遺伝性難聴を標的とした根本的治療法開発への道が大きく広がった。

2. 研究の目的

本研究では蝸牛上皮全般への遺伝子導入が可能な独自開発の新型ベクターを用い、日本人の典型的 GJB2 変異を持つ患者 iPS 由来モデル細胞および対応する CX26 変異モデルマウス (GJB2-KO, GJB2-R75W-Tg, GJB2-KI) へのゲノム編集により遺伝子修復を行う内耳 AAV ゲノム編集治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではこれまで開発してきた以下の研究ツール・手法を複合的に組み合わせ、遺伝性難聴の最適治療戦略を検討する。

(1) 遺伝性難聴モデルおよびゲノム編集難聴モデルマウスの作製

日本人の GJB2 変異型難聴の約 8 割を占める三大 GJB2 変異型 (c.235delC, p.V37I, p.G45E/Y136X) のモデル動物を作製する。野生型のマウス ES 細胞にゲノム編集を施し、Gjb2 遺伝子に上記変異をホモで持つノックイン ES 細胞を樹立する。これを胚盤胞へと移植してキメラマウスを作製し、さらに交配を重ねてノックインマウスを得る。

(2) iPS 細胞の樹立

聴力解析と遺伝子診断から典型的 GJB2 変異型難聴患者を選抜する。同患者らからインフォームド・コンセントの後、患者血液を採取し、センダイウイルスでの初期化因子の遺伝子導入により iPS 細胞を樹立する。

(3) 遺伝性難聴モデル内耳細胞の製造

iPS/ES 細胞からギャップ結合構成細胞への分化誘導法は我々が独自に開発した方法 (Fukunaga&Kamiya, Stem Cell Reports, 2016/特許取得) をもとに行う。培養条件の詳細な検討を行い、定量 PCR ならびに免疫染色による CX26 の発現量、プラークのサイズなどを指標として最適条件を確立する。

(4) ゲノム編集技術による遺伝性難聴モデル内耳細胞の遺伝子修復

本研究では CRISPR / Cas9 system (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins) を利用して変異型 GJB2 遺伝子のゲノム編集により GJB2 変異モデルのギャップ結合複合体を正常に修復する。分化誘導した GJB2 変異 iPS/ES 由来内耳細胞に Cas9 および gRNA を発現する改変型 AAV ベクターを感染させ、CX26 変異難聴モデルでギャップ結合プラークであるタンパク質の複合体が劇的に分断される発症機構 (Kamiya, J Clin invest, 2014) を指標として修復効果を評価する。またマウス内耳への効率的な投与方法を開発し、同ベクターを内耳に投与してギャップ結合修復効果ならびに聴力回復効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 遺伝性難聴モデルおよびゲノム編集難聴モデルマウスの作製

マウス ES 細胞の Gjb2 遺伝子に対し、ゲノム編集により三大 GJB2 変異型 (c.235delC, p.V37I, p.G45E/Y136X) をホモで持つ 3 種類のノックイン ES 細胞株を樹立した。現在、この ES 細胞株

からキメラマウスの作出を進めている。マウス iPS/ES 細胞から内耳細胞を分化誘導する手法について、以前に開発した手法に改良を試み、Activin/Nodal/TGF- β 阻害剤の増量による分化効率の向上に成功した (Fukunaga, Front Cell Dev Biol, 2021)。改良された手法を用いて Gjb2 変異ノックイン ES 細胞から難聴モデル細胞を製造しギャップ結合の比較解析を行った結果、変異型によって異なる異常を示した。これらは GJB2 変異型難聴の新たな疾患モデル細胞として、in vitro での病態解明や治療法開発への活用が期待できる。

(2) 遺伝性難聴モデル内耳細胞の製造

三大 GJB2 変異型を持つ難聴患者より iPS 細胞の樹立を行った。既に樹立していた c.235delC、p.V37I に加え p.G45E/Y136X 変異患者由来の iPS 細胞も樹立した (Fukunaga&Kamiya, Stem Cell Research, 2021)。これにより日本人の GJB2 変異型難聴の約 8 割を占める変異型を網羅した。また難聴と網膜色素変性を併発するアッシャー症候群の患者から USH2A 遺伝子に変異を有する iPS 細胞を樹立した (Ukaji&Kamiya, Stem Cell Research, 2023)。これまで確立した分化誘導法の改良によりヒト iPS 細胞から CX26 および CX30 によるギャップ結合を形成する内耳細胞シートを開発し、更なる条件検討によりギャップ結合複合体を形成する高分化型の細胞シートを作製した。この手法を用いて重度難聴変異である c.235delC の iPS 細胞から誘導した内耳細胞ではギャップ結合プラークの形成不全ならびに物質透過能力の大幅な低下が認められ、難聴モデル細胞としての有用性が確認された (Fukunaga&Kamiya, Human Molecular Genetics, 2021)。

(3) ゲノム編集技術による遺伝性難聴モデル内耳細胞の遺伝子修復

これまで AAV を用いたギャップ結合修復と聴力回復が試みられてきたが、既存の AAV では成体の難聴モデルマウスに対する治療効果が得られなかった。そこで本課題では GJB2 変異型難聴に特化した高効率ベクターの開発を進め、蝸牛上皮全般に遺伝子導入が可能な内耳細胞用カプシド改変型 AAV ベクターを開発し特許出願した (特願 2021-198101)。この AAV ベクターに正常 GJB2 遺伝子を搭載し、重度難聴変異である c.235delC の難聴モデル細胞に感染させたところ、CX26 と CX30 からなるギャップ結合プラークが修復された。これはギャップ結合プラークの形成不全が AAV を用いた遺伝子治療により修復できることを示しており、ヒトの疾患モデル細胞を用いた非臨床 POC である。

上述の GJB2 三大変異はいずれも劣性遺伝であり遺伝子補充療法が有効である。一方、同じ GJB2 変異でも p.R75W のような優性阻害変異は遺伝子補充では治療できない。そこでゲノム編集による治療法の開発を試みた。内耳細胞用カプシド改変型 AAV ベクターに一塩基エディターである Adenine Base Editor (ABE)、Cas9、および gRNA を搭載した All-in-one ベクターを構築した。本ベクターは GJB2 優性阻害型変異 (GJB2 p.R75W) を発現した HeLa (HeLa/CX26 R75W) に対して変異箇所を修復し、ギャップ結合プラークの生理機能を回復した。さらに難聴モデルマウス (GJB2 p.R75W-Tg) の蝸牛組織に本ベクターを感染させたところ、断片化していた内耳支持細胞のギャップ結合プラークが正常型に修復された (論文投稿準備中)。さらに日本人の三大 GJB2 変異型のうち、軽度難聴変異である p.V37I の患者由来 iPS 細胞に対してゲノム編集治療を実施した結果、変異箇所を特異的に編集し、約 14-20% が野生型へ修復された。以上より、GJB2 変異型難聴のゲノム編集による治療可能性を示す in vitro および ex vivo の非臨床 POC データが得られた。

以上より、本研究では日本人の GJB2 変異型難聴の約 8 割に対応する遺伝性難聴モデル細胞を作出し、機能解析により疾患モデル細胞としての有用性を示した。さらに GJB2 変異型難聴の治療に特化した新規の AAV ベクターを開発し、遺伝子補充療法ならびにゲノム編集治療により患者 iPS 細胞由来の難聴モデル細胞と難聴モデルマウスに対する治療効果を示す非臨床 POC を得るに至った。本成果は世界最大の遺伝性難聴型でありながらこれまで根本的治療法が存在しなかった GJB2 変異型難聴の治療法開発に向けた大きな前進であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 3件）

1. 著者名 Murakoshi Michio, Koike Yuhi, Koyama Shin, Usami Shinichi, Kamiya Kazusaku, Ikeda Katsuhisa, Haga Yoichi, Tsumoto Kohei, Nakamura Hiroyuki, Hirasawa Noriyasu, Ishihara Kenji, Wada Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effects of salicylate derivatives on localization of p.H723R allele product of SLC26A4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 928 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.03.009	査読の有無 無
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 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 166
2. 論文標題 Association Between Earwax Determinant Genotypes and Acquired Middle Ear Cholesteatoma in a Japanese Population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Otolaryngology?Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
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 無
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 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Cheng Chen, Kyoko Shirai, Atsushi Kawano, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling Gap junction beta 2 gene-related deafness with human iPS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1429-1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab097	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 -

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Cheng Chen, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Akito Koike, Katsuhisa Ikeda, Kazusaku Kamiya	4. 巻 21
2. 論文標題 Activin/Nodal/TGF- Pathway Inhibitor Accelerates BMP4-Induced Cochlear Gap Junction Formation During in vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.602197	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 -

1. 著者名 Ichiro Fukunaga, Yoko Oe, Keiko Danzaki, Sayaka Ohta, Cheng Chen, Madoka Iizumi, Takahiro Shiga, Rina Matsuoka, Takashi Anzai, Remi Hibiya-Motegi, Shori Tajima, Katsuhisa Ikeda, Wado Akamatsu, Kazusaku Kamiya	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of two iPSC lines from siblings of a homozygous patient with hearing loss and a heterozygous carrier with normal hearing carrying p. G45E/Y136X mutation in GJB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102290	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 -

〔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	美野輪 治 (Minowa Osamu) (00181967)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (32620)	
研究分担者	神谷 和作 (Kamiya Kazusaku) (10374159)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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