

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16832

研究課題名（和文）新遺伝子導入法による遺伝性難聴治療モデルの開発-Dual Vector法の応用-

研究課題名（英文）Novel Development of Gene Delivery for Inner Ear -Dual Vector Method-

研究代表者

大道 亮太郎 (Omichi, Ryotaro)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：20771299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：蝸牛が成熟している生後4週目の野生型マウスに対し、RWM+CF法で2種類のAAVを内耳に導入した。AAV2、AAV9を用い注射後2週間目に聴性脳幹反応で聴毒性は認めなかった。免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による評価では内毛細胞への導入効率は96.92%、外毛細胞へは65.59%と他家の報告よりも高値であった。

AAV9同士、およびAAV2とAAV9の組み合わせでは、AAV9の感染率は単独と比較して低下していた。AAV2によるDual transductionは両毛細胞においてsingleと同様に高率に導入されており、遺伝子治療における高い有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性感音難聴は出生児500人に1人に認められ、そのうち50-60%は遺伝子変異が原因である。根治的治療の手段として遺伝子治療の基礎的・臨床的研究が必要である。難聴の遺伝子治療モデルの最大の課題は「塩基配列サイズが大きな遺伝子を高効率に導入する」ことである。当研究では病原性や細胞毒性が低いAAV2をベクターとして組みあわせて使うDual Vector法により、より大きな塩基配列サイズの遺伝子を有毛細胞に導入することを実現した。これは難聴の実臨床へむけた遺伝子治療モデルとして、難聴診療に大きな波及効果をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Two types of adeno-associated virus (AAV), AAV2 and AAV9, were introduced into the inner ear of 4-week-old wild-type mice with mature cochleae using the round window membrane and cochleostomy (RWM+CF) method. No ototoxicity was observed in auditory brainstem response (ABR) tests two weeks after injection. Immunostaining and confocal laser microscopy evaluation showed that the transduction efficiency was 96.92% for inner hair cells (IHCs) and 65.59% for outer hair cells (OHCs), which were higher than those reported in previous studies.

The transduction efficiency of AAV9 was lower when AAV9 was used alone compared to when it was combined with another AAV9 or AAV2. Dual transduction with AAV2 resulted in high transduction efficiency in both IHCs and OHCs, similar to that of single transduction, suggesting its high potential for gene therapy for hearing loss.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：遺伝子治療 感音難聴 遺伝性難聴 聴覚 内耳 有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

-感音難聴の臨床と遺伝子治療-

感音難聴は最も一般的な神経疾患の1つである。現在世界で4億6600万人が罹患しており、そのうち3億4000万人が小児である。2030年までに6億3000万人、2050年までに9億人が罹患すると推測されている。その病因は多岐にわたるが、騒音や加齢の要因をのぞくとそのほとんどが遺伝性難聴とサイトメガロウイルス胎内感染による難聴である。遺伝性難聴は新生児のうち500人に1人に発生し、すべての先天性感音難聴患者の50-60%をしめている。特に言語獲得期前の児にとって感音難聴はコミュニケーション能力の発達に大きな影響を与え、経済面および教育面に非常に不利な状況を招く(Omichi R et al. Hum Mol Genet 2019)。

過去10年で遺伝性難聴の検査は大きく進歩し、新生児聴覚スクリーニングにより先天性遺伝性難聴の早期発見が行えるようになった。また機器の進歩や各種データベースの増大により遺伝子検査をより正確に行えるようになってきた。さらにそれにより補聴器や人工内耳による治療介入が可能となった。しかしながら遺伝性難聴患者での補聴器や人工内耳によるききとりの質には限界があり、根治的治療の手段として遺伝子治療の開発が重要である。

難聴遺伝子治療においていくつかの課題が考えられる。そのうちの1つに遺伝性難聴の原因となる難聴遺伝子は比較的サイズが大きいということにある。現在遺伝子治療において最も使用されているベクターとしてAdeno-associated virus (以下AAV)がある。これは比較的病原性や免疫原性の少ない安全なベクターと考えられているが、その欠点として内包できる遺伝子サイズが4.7kbまでと小さく、対象と考えられる難聴遺伝子が大きいため治療が行えないジレンマがあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、成体マウスの内耳感覚細胞(外有毛細胞・内有毛細胞)に、AAVベクターの各血清型タイプを投与し、成熟した内耳への導入効率を検証することである。そして、2種類のベクターを同時投与する方法(Dual Vector法)により、配列の長い遺伝子を2つに分割して導入できるとしめすことである。当研究では独自の実験技術(RWM+CF法)を用いることで、成熟したマウス内耳への遺伝子導入が可能となる。また、Dual Vector法の難聴遺伝子治療への応用は、先に述べたように臨床的に遺伝性難聴の原因には、塩基配列が比較的長い遺伝子が多いと指摘されており、当研究の成果により遺伝子治療の実現への道が広がる。その根治療法開発の医学的波及効果は非常に大きい。

3. 研究の方法

生後4週齢のC3H/FeJマウスにケタミン(100mg/kg)とキシラジン(10mg/kg)を腹腔内投与して麻酔した。手術中は加熱パッドで体温を維持した。左耳介後部を剃毛し、消毒した。側頭骨に到達するため、耳介後部に切開を加えた。外耳道壁に沿って深く顔面神経を確認した。顔面神経と胸鎖乳突筋を露出させた後、筋肉の一部を切開し、顔面神経腹側の蝸牛骨胞を露出させた。蝸牛骨胞の背側に後半規管を露出させた。0.5~1.0mm径の耳科用ドリルで蝸牛骨胞に小さな穴を開け、その後鉗子で十分に広げ、鐙骨動脈と正円窓を視認できるようにした。また、0.5mm径のダイヤモンドドリルで後半規管にも穴を開け、ゆっくりと外リンパ液が流出することで開窓が確認された。外リンパの流出が弱まるまで5~10分待った後、2.5%ファストグリーン色素(を含む1.0

mL の AAV ベクターをホウケイ酸ガラスピペットに充填した。二重注入試験では、各 AAV ベクターを 0.5 mL ずつ同一のガラスピペットに充填し、2 種類のベクターを 1:1 の割合で混合した。ピペットはマイクロピペットマニピュレーターで手動制御した。正円窓の中央を静かに穿刺し、AAV を蝸牛鼓室階に 5 分間かけて注入した（1 回の注入につき 30~40 nL）。緑色の液体が PSSC の開窓部から流出するのを確認することで、注入の成功を確認した。ピペットを抜いた後、液漏れを防ぐために RWM の穿刺部を小さな筋肉片で素早く塞いだ。骨胞と後半規管の骨欠損部は、小さな筋肉片と組織接着剤で塞いだ。手術時間は 30~50 分であった。すべての手順が終了すると、マウスを寝具とともに加熱パッド上に置き、回復させた。術後 3 日間、ブプレノルフィン(0.05 mg/kg)とフルニキシメグルミン(2.5 mg/kg)で疼痛管理を行った。術後少なくとも 5 日間、毎日注意深く回復を観察した。

注射後 2 週間の時点で、ケタミン(100mg/kg)とキシラジン(10mg/kg)を腹腔内投与して全身麻酔をかけたうえで ABR を施行した。施行中はヒーティングパッド上において体温を一定にするように心がけた。クリック、8k、16k、24k、32kHz を 10-90dB SPL の範囲で 5dB 毎に測定した。測定後は二酸化炭素による安楽死を行い、側頭骨を採取して 4%パラホルムアルデヒドで固定した。EGFP および mCherry については自然発光を検出、有毛細胞は Myosin7A 抗体を用いて染色した。マウント剤にはシングルベクター実験では ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI、デュアルベクター実験では ProLong Diamond Antifade Mountant を使用した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を使用した。蛍光色素を検出することで、AAV が感染し、遺伝子導入ができているかを判定する。細胞数のカウントには、感覚上皮を Apex、Middle、Base の 3 領域に分けて Image J Cell Counter を用いた。統計学的解析には Prism 8 Graph Pad を用いた。

4 . 研究成果

5 種類の AAV 血清型 (AAV1、AAV2、AAV8、AAV9、Anc80) をマウスの内耳に導入し、それぞれの導入効率を比較した。その結果、AAV2 が内有毛細胞と外有毛細胞の両方で最も高い導入効率を示し、特に内有毛細胞では 97% という非常に高い効率を達成した。

さらに、AAV2 を用いたデュアルベクター実験を行ったが、単独導入の場合と比べて導入効率に差は見られなかった。これは、AAV2 を用いた遺伝子治療において、複数の遺伝子を同時に導入する必要がある場合でも、効率的な治療が可能であることを示唆している。また、AAV2 を導入したマウスの聴覚機能と有毛細胞の生存率を調べた結果、AAV2 の導入による聴覚機能への悪影響や有毛細胞への毒性は認められなかった。このことから、AAV2 は内耳の遺伝子治療において安全なベクターであると考えられる。

以上の結果から、AAV2 は内耳の有毛細胞に対して高い導入効率と安全性を持ち、単独または複数の遺伝子を導入する必要がある遺伝子治療において優れたベクター候補であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------