

20010775

別添2

厚生科学研究研究費補助金

感覚器及び免疫アレルギー等研究事業

虚血性細胞障害メカニズムの基づいた難聴の治療に関する研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 暁 清文

平成14 (2002) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

虚血性細胞障害メカニズムの基づいた難聴の治療に関する研究----- 1  
 暁 清文

II. 分担研究報告

GDNFアデノウイルスを作成に関する研究----- 3  
 秦 龍二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 6

虚血性細胞障害メカニズムの基づいた難聴の治療に関する研究

主任研究者 晁 清文 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科教室教授

研究要旨

感音性難聴に対し現存する治療手段には限界があり、難聴者福祉に十分に対応できているとは言い難い状況にある。感音性難聴の原因として、我々は内耳虚血が難聴発症の最も重要な背景因子であると推察している。本研究では、一過性内耳虚血の動物モデルを用い、近年急速に進展した脳虚血に対する新しい知見をもとに、虚血性内耳障害の病態を反映した新たな治療法開発を目的としている。そこで平成13年度は、1)神経栄養因子の一つであるGDNFと、2)脳虚血障害時に現在最も効果があると認められている低体温療法について虚血性内耳障害に対する効果を検討した。その結果、GDNFアデノウイルスや低体温療法により、内耳虚血後の聴力閾値上昇が抑制され、組織学的にも進行性のコルチ器における内毛細胞脱落数の減少が認められた。以上のことより、GDNFアデノウイルスによる遺伝子治療や低体温療法は虚血性内耳障害の治療として優れた方法である可能性が示唆された。

分担研究者氏名 秦龍二  
所属機関 愛媛大学医学部  
職名 助教授

A. 研究目的

感音性難聴に対し現存する治療手段には限界があり、難聴者福祉に十分に対応できているとは言い難い状況にある。感音性難聴の原因として、我々は内耳虚血が難聴発症の最も重要な背景因子であると推察している。本研究では、一過性内耳虚血の動物モデルを用い、近年急速に進展した脳虚血に対する新しい知見をもとに、虚血性内耳障害の病態を反映した新たな治療法開発を目的としている。そこで平成13年度は、1)神経栄養因子の一つであるGDNFを投与し内耳障害の防御効果を証明する、2)脳虚血障害時に現在最も効果があると認められている低体温療法の虚血性内耳障害に対する効果の有無を明らかにする、の2項目について重点的に行うことを目的とした。

B. 研究方法

スナネズミは後交通動脈が先天的に欠損しているため、両側の椎骨動脈をクランプする

ことにより一過性内耳虚血モデルを作成した。遺伝子治療の研究では、ウイルスの蝸牛での定着性を安全性を見るために、まず蛍光蛋白であるb-ガラクトシダーゼを発現させる遺伝子を組み込んだLacZアデノウイルスの蝸牛内投与を行った。ついでGDNFアデノウイルスを蝸牛投与後、一過性内耳虚血を負荷し、経時的な聴力閾値の測定及び蝸牛コルチ器の組織障害の観察を行った。また低体温療法の検討では動物の体温を32度と低下させた群と常温群で虚血性内耳障害に対する保護効果の比較を行った。（倫理面への配慮）本研究は愛媛大学医学部動物実験指針に基づいて実施されたものである。

C. 研究結果

遺伝子治療の研究では、アデノウイルスを正円窓経路で蝸牛内投与を行った場合、ウイルス投与4日後において蝸牛基底回転より頂回転に及ぶ広いウイルスの定着が確認された。蝸電図検査ではウイルスの投与前、投与4、8日後のCAP域値の有意な変化は認められず、さらに組織学的にもGDNFアデノウイルスの投与は虚血性内耳障害を防御した。また低体

温療法の研究では虚血-低体温群では虚血-常温群に比べ機能的にもならず組織学的にも虚血後の内耳障害が有意に抑制されていた。

#### D. 考察

以上の結果より、アデノウイルスをベクターとして用いることによりGDNFを安全に蝸牛内に導入できることが確認できた。また、GDNFアデノウイルスや、低体温が内耳循環障害に対して保護効果を持つことが証明された。これらの研究は脳虚血障害の治療用に開発された薬剤や低体温療法を、難聴治療に応用しようとするものであり、確実な研究成果が得られる可能性が高いが、今日までこのような発想による研究は国内外ともに行われていない。さらに、今回の研究で用いられた神経栄養因子の一つであるGDNFは細胞再生そのものを促すため、虚血性障害ばかりではなく、音響外傷性難聴や老人性難聴など内耳の神経細胞変性に伴うさまざまな難聴に対しても高い有効性が考えられるため、本研究のGDNF遺伝子治療は将来難治性難聴全ての治療に結びつく社会的意義の大きいものと思われる。

今後、GDNFアデノウイルスの虚血性細胞障害に対する防御効果を、内耳障害の程度、ウイルス投与時期、投与量の観点から検討するとともに、その他の防御効果を有する薬剤（ジンチノサイト、プロサポシン）についても検証を行い、内耳障害を防御する薬剤の開発をめざす予定である。

#### E. 結論

GDNFアデノウイルスや低体温は虚血性内耳障害を防御し有毛細胞を保護する効果のあることが確認された。細胞死防御効果の詳細なメカニズムについては不明であるが、グルタミン酸遊離の抑制、細胞内カルシウム流入の抑制、Bcl-xl遺伝子の発現促進などが想定されている。これらが総合的に作用し虚血障害に対し内耳保護効果を示したものと推察される。従って、GDNFアデノウイルス遺伝子治療や低体温療法は、虚血性内耳障害を始めと

する、内耳の神経細胞変性に伴うさまざまな難聴に対しても高い有効性のある治療法であることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hyodo J, Hakuba N, Koga K, Gyo K : The Effect of Hypothermia in the Acute Transient Cochlear Ischemia in Gerbils. Neuro Report12:1983-1987. 2001

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 別添 5

厚生科学研究費補助金（感覚器及び免疫アレルギー等に関する研究事業）  
分担研究報告書  
ジンセノサイドRb1及びGDNFウイルスベクターを用いた  
虚血性難聴の治療効果

分担研究者 秦 龍二 愛媛大学医学部生理学第1講座

### 研究要旨

虚血性細胞障害による難聴の遺伝子治療の可能性を検討する為に、GDNF発現アデノウイルスベクターの作製と精製及びウイルス力価の評価を行った。更にこのウイルスベクターを蝸牛組織に投与して実際にGDNFが強制発現するかどうかをWestern blottingにて確認した。

本研究より、GDNFを用いた遺伝子治療の有効性の検討の足がかりが得られた。次年度は、実際にGDNF発現ウイルスベクターを蝸牛組織に投与する事で虚血障害による神経難聴が改善するかどうかの検討を開始する。また ジンセノサイドRb1の原材料からの分離・精製も開始する。

#### A. 研究目的

GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)はTGF-beta(Transforming growth factor)のsuperfamilyで、最も強力な神経栄養因子の1つである。そしてGDNFは虚血負荷に対して神経細胞を強力に保護する事が知られている。最近我々は砂ネズミの脳幹を虚血にする事で、蝸牛の有毛細胞に虚血性細胞死を誘導させる、新しい実験的虚血性難聴モデルの開発に成功した。本研究ではアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が虚血性難聴の治療として有用かどうかを検討するため、まずGDNFとLacZ発現ウイルスベクターの作製を行なった。ついで実際にこのベクターの使用により目的とした蛋白を蝸牛組織に強制発現させうるかを検討した。

#### B. 研究方法

##### ① アデノウイルスベクターの作製

Reporter geneを持つウイルスベクターとしてAdenovirus vector -- AxCALacZを、またFull length GDNFを持つウイルスベクターとしてAxCAhGDNFを用いた。この2つのウイルスベクターは、E1A regionに加えてE1BおよびE3 regionを欠失したReplicant deficient

adenovirus で、E1A欠失部位にCAG promoter以外にそれぞれbeta-galactosidase (LacZ) 遺伝子とGDNF遺伝子発現カセットを組み込んである。AdexCALacZの増殖には、Human embryonal kidney 由来の293細胞を用い、培養にはDulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (Gibco, BRL)にPenicillin G 100 mg/ml, streptomycin 100 mg/ml, 10% fetal bovine serum (Gibco, BRL)を付加した培養液を使用し、37℃, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。ウイルスを含む培養液の精製にはCsCl step gradient法を用い、ウイルス力価の検定にはbioassay法により行った。

##### ② Western blottによる確認

砂ネズミの後耳介部位を切開し、otic bullaを露出し、穴を開け、内径0.1 mmのprobeを挿入した。マイクロインヒュージョンポンプを用いてAdenovirus vector(1.0 x10<sup>10</sup>)を0.5micro liter/minで4分間投与した。3日後中耳及び内耳に炎症がないことを肉眼的に確認した後、蝸牛組織をとりだし、Lysis bufferに入れ、mixerとsonicatorとで溶解した。その後蛋白定量を行った後3%SDS(sodium dodecyl sulfate)にて溶解し、電気泳動、ニトロセルロース膜へ転写、抗GDNF抗体 (Santa

Cruz, SC-328) を用いたimmunoblott、そして最後にアルカリホスファターゼラベルの2次抗体を用いてImmunoblott bandの可視化を行った。

#### C. 研究成果

精製したウイルスベクターはbioassay法による力価検定ではそれぞれ約 $1.0 \times 10^{10}$  PFU/mlの力価があった。またWestern blottによる検討では42kDaの位置に目的としたバンドが見出され、明らかにGDNF発現ウイルスベクター投与例でより多くの蛋白発現が見出された(図1参照)。

図1



#### D. 考察

今回作製したアデノウイルスベクターは $1.0 \times 10^{10}$  PFU/mlの高力価であった。また実際にGDNF発現ウイルスベクターを蝸牛に直接注入した後3日目での蝸牛組織からのサンプルを用いたWestern blottでは、目的の分子量のバンドが確認された。またその発現量はコントロールとして用いたLacZ発現ウイルスベクター投与群より遙かに多かった。従って今回制作した高力価のウイルスベクターを用いると蝸牛組織に大量のGDNFを強制発現させる事ができる事が明らかとなった。

#### E. 結論

GDNF発現アデノウイルスベクターとReporter geneであるLacZ発現ウイルスベクターの作製を完了し、実際に蝸牛組織に強制発現させる事を確認した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### ① 論文発表

Masumura M, Hata R, Uetsuki T, Nishimura I, Nagai Y and Sawada T: In

vivo gene transfer to cerebral white matter lesions with a recombinant adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:440-444, 2001

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hyodo J, <u>Gyo K</u>	The Effect of Hypothermia in the Acute Transient Cochlear Ischemia in Gerbils.	Neuro Report	12	1983- 1987	2001
Matsumua M, <u>Hata R</u>	In vivo gene transfer to cerebral white matter lesions with a recombinant adenovirus vector.	Biochem Biophys Res Commun	287	440-444	2001

20010775

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。