

II. 分担研究報告

4. ムコ多糖症VII型聴覚病変に対する遺伝子治療

奥山虎之

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

ムコ多糖症Ⅶ型聴覚病変に対する遺伝子治療

分担研究者 奥山虎之
国立成育医療センター 特殊診療部遺伝診療科 医長

研究要旨

代謝異常に基づく難聴に対する遺伝子治療の可能性を明らかにするため、ムコ多糖症Ⅶ型(MPSⅦ)、すなわちβ-ガラクトシダーゼ(GUSB)の先天性欠損により進行性の混合性難聴を生じるモデルマウスでの検討を行った。成熟ホモ接合体 MPSⅦマウスの鼓室内に GUSB 発現アデノウイルスベクターを投与し、聴性脳幹誘発電位を経時的に測定することによって聴力の推移を観察したところ、6 例中 2 例で投与後 2 週目に 20-30dB の聴力閾値の改善を認めた。治療効果は漸減し、投与後 5 週目に聴力は治療前と同じレベルに戻った。治療を受けた中耳粘膜は非治療側に比べて壁不正が少なく、中耳腔の粘膜剥離や細胞の剥離も目立たなかった。これらの生理学的・病理学的改善は中耳粘膜に GUSB が一過性に発現したことによる治療効果と推測された。

A. 研究目的

先天性難聴の頻度は 1000 人に 1 人であり、そのうち約 60%は遺伝性難聴である。そして遺伝性難聴の治療研究においてモデルマウスの検討は不可欠である。本研究ではβ-グルクロニダーゼ活性欠損によって引き起こされる難聴の遺伝子治療の確立を目指し、ムコ多糖症Ⅶ型マウスを用いて基礎検討を行った。

ムコ多糖症Ⅶ型(MPSⅦ)はライソゾーム酵素の一つであるβ-グルクロニダーゼ(GUSB)の先天性欠損により、細胞内にグリコサミノグリカンが蓄積する全身性疾患である。全身すべての臓器にグリコサミノグリカンが蓄積し、骨や関節の進行性の変形、精神発達遅滞、聴覚障害、そして生存期間の短縮など様々な症状を呈する。聴覚障害の主体は、進行性の混合性難聴である。難聴の原因は、グリコサミノグリカン過剰蓄積による内耳、中耳、外耳のすべての病変に起因する。外耳病変は軟部組織肥厚による外耳道狭窄、中耳病変は反復性中耳炎や滲出性中耳炎に伴う鼓室内粘膜の肥厚や耳小骨関節硬化、変形などである。内耳病

変は多彩であり、蝸牛骨の硬化、ライスネル膜・基底膜の肥厚、外有毛細胞聴毛の不整・欠損などが挙げられる。

現在、ムコ多糖症Ⅶ型に対する治療研究は、骨髄移植、酵素補充療法、そして遺伝子治療の 3 通りの方法がマウスを用いて検討されている。骨髄移植は欠損酵素を分泌することが可能な造血系細胞を移植し、グリコサミノグリカンの蓄積を抑制しようとするものである。新生児期という血液脳関門がまだ不完全なうちに行うと、聴覚はほぼ正常のままに保たれることが報告されている。しかし、骨髄移植は拒絶反応が不可避であり、その制御は極めて困難である。第二の酵素補充療法は経静脈的に GUSB を全身の細胞に補充する方法で、新生児期に行うと中枢神経系へのグリコサミノグリカン蓄積が抑制され、聴覚の悪化を認めなかったと報告されている。しかし、GUSB の半減期は 1~4 日と大変短いため、静脈注射を頻回に行う必要がある。最後の遺伝子治療は細胞自身に GUSB 遺伝子を組み込むことで GUSB を分泌させる方法である。この方法の利点は移植に伴う拒絶反応などの重篤な副作用がな

く、GUSBも長時間に渡って適度に分泌されることが期待できる。しかし、現在まで本治療法による MPSVII聴覚病変の治療は報告されていない。

本研究では、ヒトムコ多糖症VII型と生化学・病理学的かつ臨床的にも類似した像を呈する B6/MPSVIIモデルマウスを用いて聴覚病変の遺伝子治療の可能性について生理学的ならびに病理学的に検討した。

B. 研究方法

①対象マウス

B6/MPVII (mps/mps) マウス(生後11~12週, 体重20~25g)

B6/MPVII (mps/mps)ホモ接合体マウスはジャクソン研究所(Bar Harbor, ME, USA)より購入したものをを用いた。

ヘテロ接合体マウス

B6.C-H-2^{bm1}/ByBir-gus^{mps/+} (mps/+)を交配することにより作成された。

②組換えアデノウイルスベクター AxCAhGUS の作成

CAG プロモーターの制御下で GUSB を発現する非増殖型 E1/E3 欠損型アデノウイルスベクター(AxCAhGUS)を齋藤らの開発した COS-TPC 法に基づき作成した。すなわち, pAxCAwt の *Swa* I サイトにヒト GUSB cDNA (セントルイス大学の William Sly 博士により供与)を挿入したコスミドカセットと *Eco*T22I にて 7 ヶ所を切断したアデノウイルス DNA 末端タンパク複合体 (DNA-TPC) を 293 細胞に同時にトランスフェクションし, 相同組換えにより作製した。

③麻酔

聴力検査にあたり, ムコ多糖症VII型マウスにキシラジンおよびケタミンによる腹腔内麻酔を行った。

④遺伝子の鼓室内投与方法

B6/MPS VII の右鼓室内に経鼓膜的に GUSB 発現組換えアデノウイルスベクター (AxCAhGUS) 3×10^7 pfu を投与した。対照

として左鼓室内には大腸菌 β -ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスベクター AxCALacZ(3×10^8 pfu)を投与した。

⑤聴性脳幹反応(ABR)測定

遺伝子投与前および投与後 1 週間毎に ABR により聴力閾値を評価した。記録電極を頭頂部に, 参照電極を両側の側頭部に装着し, 直径約 2mm イアーカプラ型のスピーカー("ES1spc", BioResearch Center, Nagoya, Japan)をマウスの外耳道に挿入した。電極からの信号を Digital Bioamp system ("BAL-1", Tucker-Davis Technologies, FL, USA)で記録し, 信号処理には PowerLab system (AD Instruments, Castle Hill, Australia)を用いた。8,000Hz または 15,000Hz の正弦波音で刺激し, 脳波を 256 回加算平均処理することで ABR 波形を得た。

刺激音圧は 90dB より 5dB ずつステップダウンし聴力閾値を測定した。刺激音以外の音響ノイズによる影響を極力減らす目的で厚さ1cmの合板で ABR 測定箱を作成し, 音刺激はこの箱内で行った。(図 1)これにより環境音は 15dB 低減させることができた。

⑥病理学的検討

遺伝子治療後 2 週時点で経心臓的に 4%PFA によって灌流固定し, 蝸牛および前庭器官を含む聴覚系組織を摘出した。一晩の後固定後, 4 週間にわたり 0.5M EDTA 水溶液中に脱灰処理した。その後左右の蝸牛を摘出し, 内耳ラセン神経節および両側外耳道・中耳腔の病理学的検討を行った。

C. 研究結果

①ABR による聴覚の推移

治療を行った 6 例の聴力閾値の経時的変化を図 2 に示す。治療前の聴力の評価は A と C のマウス 2 例が両側 15kHz および 8kHz 音に対して 80-90dB 程度の閾値であったのに対し, マウス B, D, E, F においては一部 90dB の音圧を与えても ABR 波形が認めら

れないほどの聴力閾値であった。マウス B と C の右耳は AxCAhGUS 投与後 2 週目の段階で対照耳に比較して 20-30dB の聴力閾値改善を認めた。

治療効果は 1 週目より徐々に出現し、2 週目で最大となった(図 3)。しかし効果は持続せず漸減し、治療後 5 週目には聴力閾値はほぼ元に戻った。マウス B では治療後 8 週目にも聴力測定を行ったが、聴力閾値に変化は認められなかった。マウス B, C では ABR の波形において治療後 2 週目に I 波潜時の短縮を認めた。(図 4)

②病理学的所見

内耳:治療側ラセン神経節の細胞は腫脹がみられ、空胞形成のために核が変位していた。これは非治療側と同じ所見であった。(図 5)

中耳:治療側の中耳は非治療側と比べて壁不整が少なく、細胞脱落が目立たなかった。また、中耳腔内の分泌物も治療側の方が少なかった(図 6)。

D. 考察

本検討において、ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの鼓室内に GUSB 発現組換えアデノウイルスベクターを投与したところ、投与前に聴力評価できた 3 例中 2 例に聴力の一時的改善が認められた。遺伝性難聴の多くは蝸牛の内毛細胞と外毛細胞に障害を認める。このため遺伝性難聴に対する遺伝子治療の試みは従来、内耳の有毛細胞にベクターを感染させて遺伝子を導入させようとする手段をとっているものが多い。実際には有毛細胞が存在する蝸牛への投与となるが、これらの領域は機械的損傷を受けやすい部位であり、さらに有毛細胞にウイルスを感染させることは大変困難である。

一方、ムコ多糖症 VII 型では有毛細胞のみならず、内耳、中耳、外耳という広範囲の病変を伴う。そこで本研究では、伝音性障害の責任病変への治療効果を期待して、蝸牛ではなく鼓室にベクターを感染させる投与方法

を採用した。その結果、6 例中 2 例に聴力の一時的改善が認められた。この機序としては、中耳腔粘膜に GUSB が発現しある程度の治療効果が引き起こされたことが推測される。特に、ABR で I 波潜時の短縮を認めたことは中耳における伝音性障害が改善されたことを示唆する。また中耳壁の不整も非治療側に目立った。一方、鼓膜を穿刺したことにより中耳滲出液が減少し、聴力が改善しただけなのかもしれない。この場合は治療後 1 週目に最も聴力が改善すると推測される。ところが今回の結果では、治療後 2 週目に ABR 上最大の聴力改善を認め、さらにその効果は 4 週目まで持続した。よって、これらの所見は単なる穿刺効果である可能性は低い。なお、ラセン神経節ニューロンは膨化しており、今回のベクターは鼓室内投与では内耳に感染することはできず、感音性障害への治療効果はなかったと考えられる。

聴力改善効果は一過性で、治療後 5 週目に消失した。これは遺伝子の発現が一時的であり、レシピエントマウスの細胞内で永続的な遺伝子組み換えを起こすには至らなかったことを示している。もっとも、全身投与の場合でも永続的な組み換えは起こりにくいと言われ、肝における GUSB 活性は遺伝子の全身投与後 1 週目で最も高く、時間とともに減少していき、9 週目にはピーク時の 1% にまで低下すると報告されている。

今回用いたアデノウイルスベクターは分化を終了した細胞にも効率良く遺伝子導入を行えるベクターであるが、その短所は免疫反応を引き起こすために反復投与ができないことである。また、グリコサミノグリカンの蓄積により全身の病変が不可逆的な状態に陥った場合、遺伝子導入によりどこまで難聴が改善するかは疑問である。さらに今回は、治療効果が認められなかったマウスがいたことにより、アデノウイルスの中耳粘膜への親和性も検討する必要がある。しかしながら、本研究のように成熟マウスの聴覚病変に対して治療を行い、一定の成果をあげることができたことは特筆すべきである。鼓室内遺伝子

投与は手技的に容易で侵襲が少なく、この点では臨床的にヒトへの応用は十分可能である。今後、本治療法による聴力改善効果の作用機序を検討し、さらにより有効性の高い遺伝子治療を探索していく予定である。

E. 結論

成熟ムコ多糖症VII型モデルマウスの混合性難聴に対し、鼓室内への遺伝子治療効果を検討したところ、6例中2例に聴覚の改善を認めた。鼓室内遺伝子投与では伝音性障害に対する効果が主にもたらされると考えられた。

研究協力者

守本倫子 国立成育医療センター耳鼻咽喉科

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図の説明

1. ABR 測定箱

- a) 真上から見た図 約 1cm 厚さの合板で密閉できるようにした。
- b) 横から見た図 振動が伝わらないように、底にゴムをつけて浮かせるようにした。

2. 治療開始後の ABR 閾値の推移

6例中2例(B,C)において治療耳の聴力が改善した。

3. マウス C における ABR 波形の比較

- a) 治療前は 85dB にて波形が認められる。I 波潜時は 3.05ms であった。
- b) 治療後 2 週目、45dB の閾値が得られた。I 波潜時は 2.63ms まで短縮した。

4. 個体 B,C における治療前および治療後

2 週目の I 波潜時の比較

15kHz, 8kHz において、明らかに治療後 2 週目に I 波潜時の短縮を認めた。

5. ラセン神経節の HE 染色病理所見 (400 X)

ラセン神経節の細胞は腫脹がみられ、空胞形成のために核が変位している。これは治療耳、非治療耳共に違いがなかった。

6. 同一マウスにおける中耳腔の組織 (HE 染色)

粘膜は非治療側(左)では壁不整が目立ち(a 矢印)、細胞の剥離があった。一方、治療側(右)は肥厚が少なかった。また、中耳腔の分泌物は左側では充満していたが、右は比較的少なかった(b)。

図1

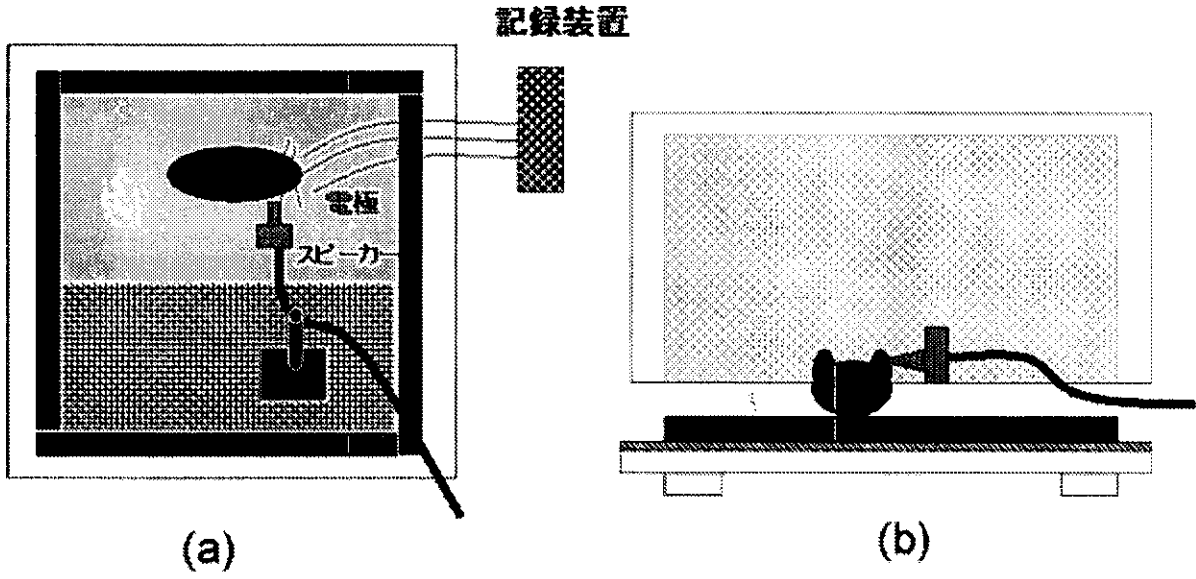


図2

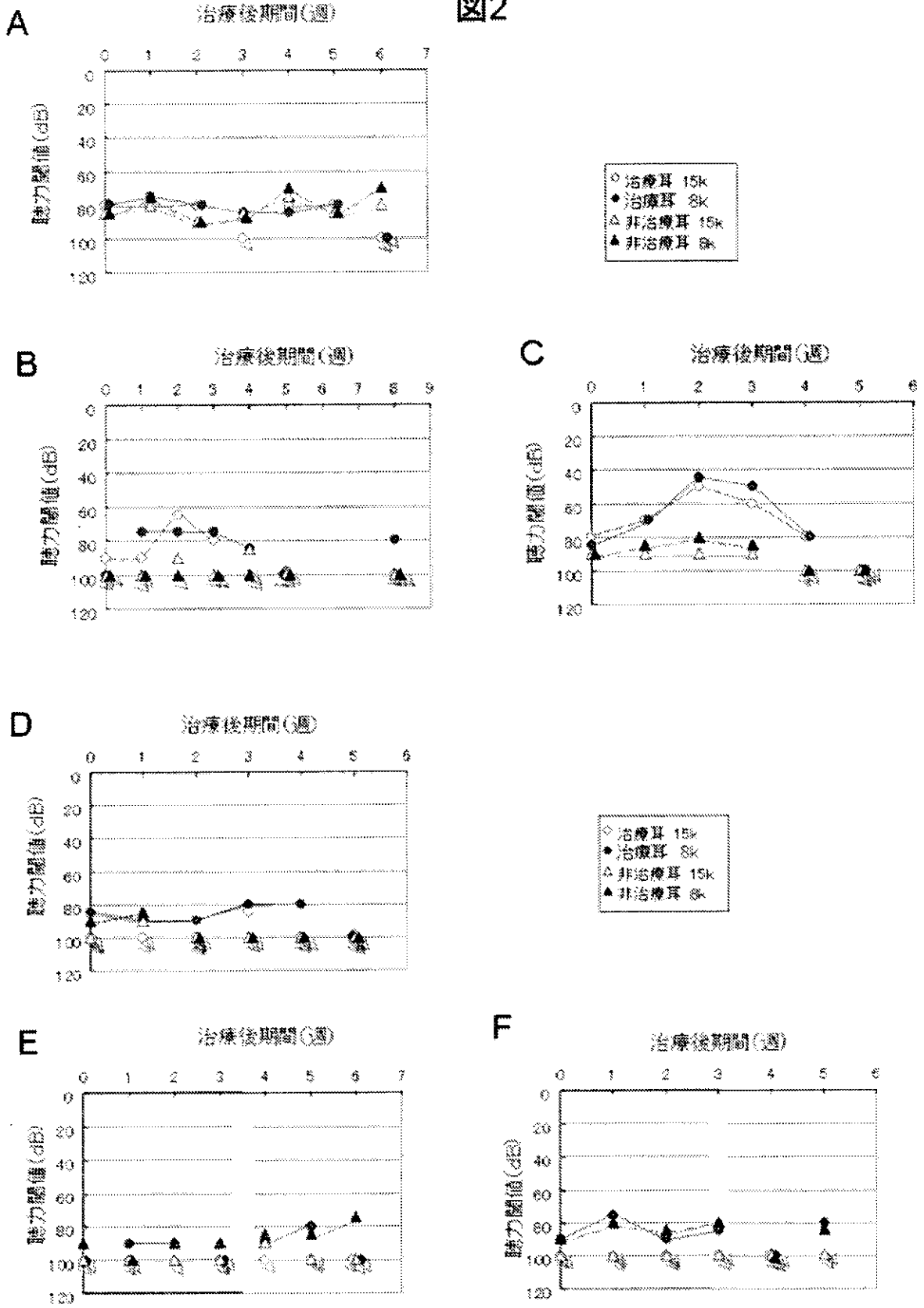
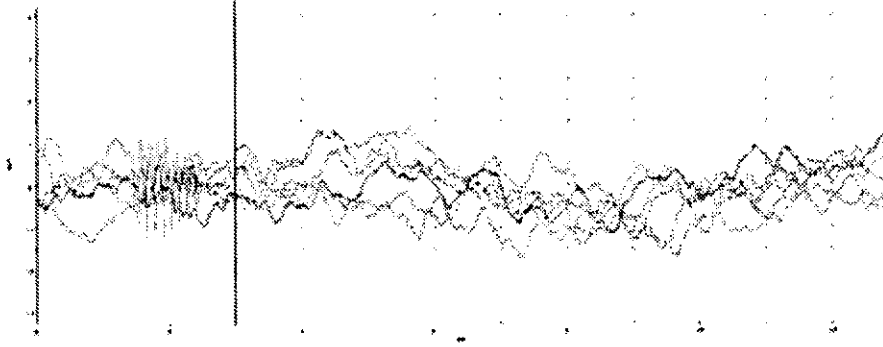


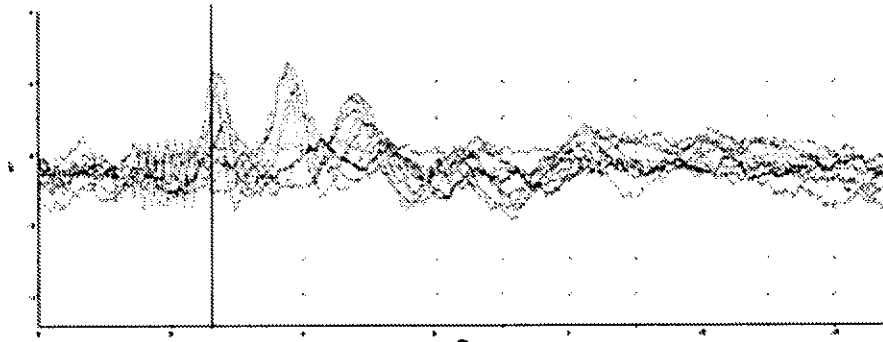
図3

I波



治療前

I波



治療2週後

図4

個体	周波数 (Hz)	治療前 (ms)	治療2週後 (ms)
B	15k	2.78	2.63
	8k	2.91	2.71
C	15k	3.05	2.63
	8k	2.88	2.63

图5

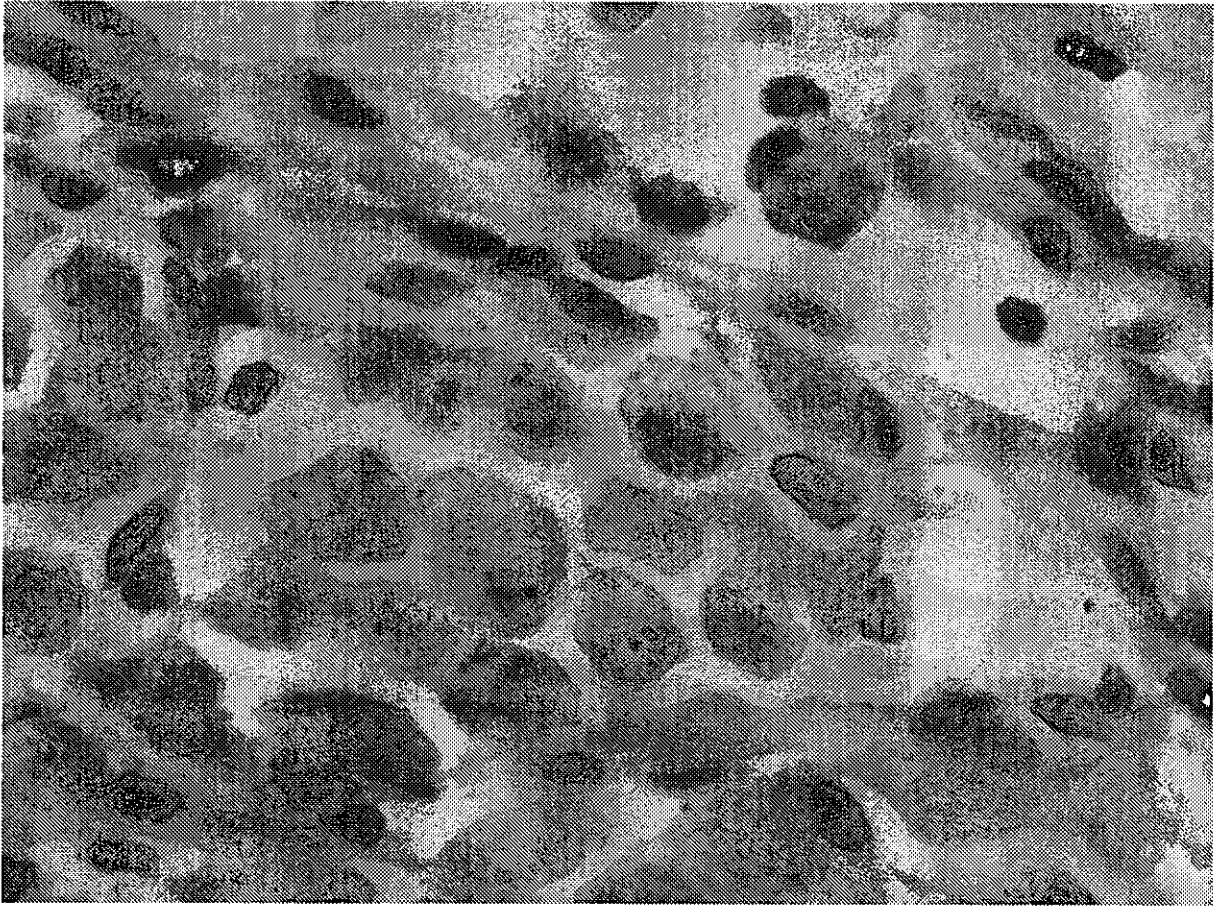


図6 a

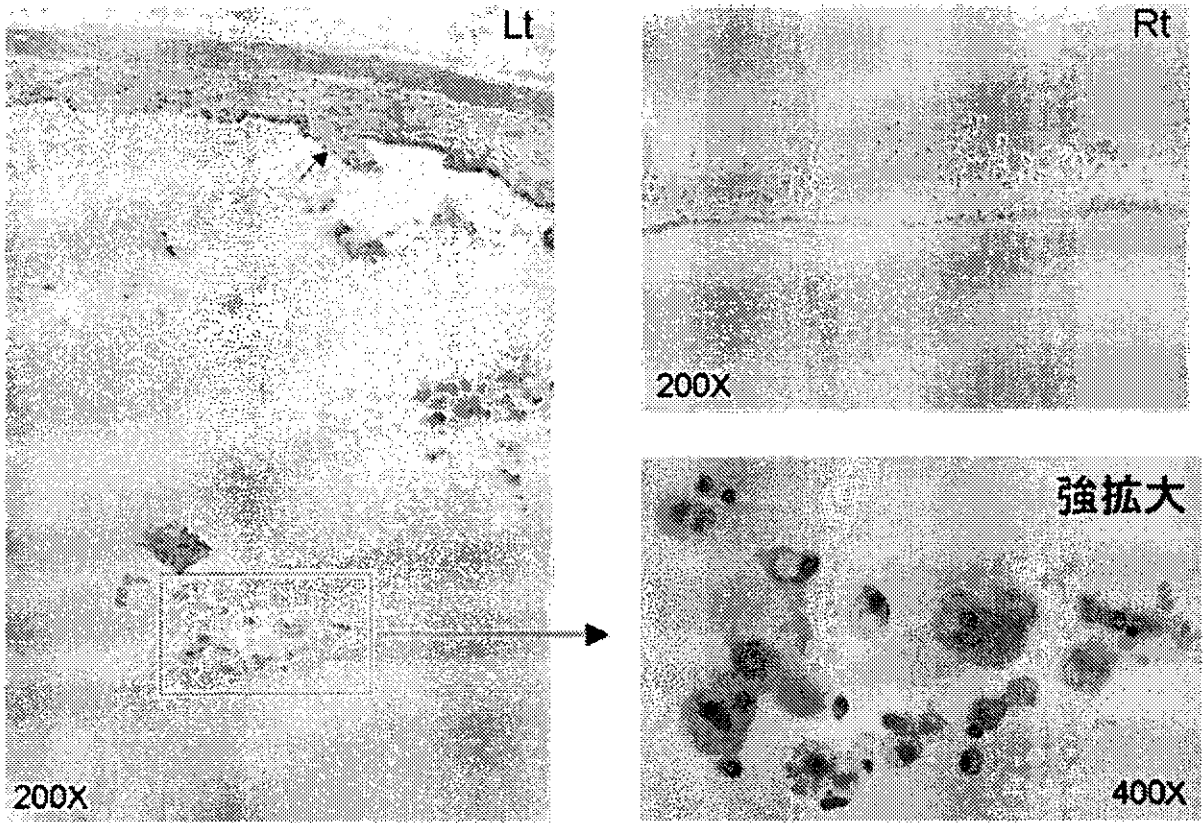
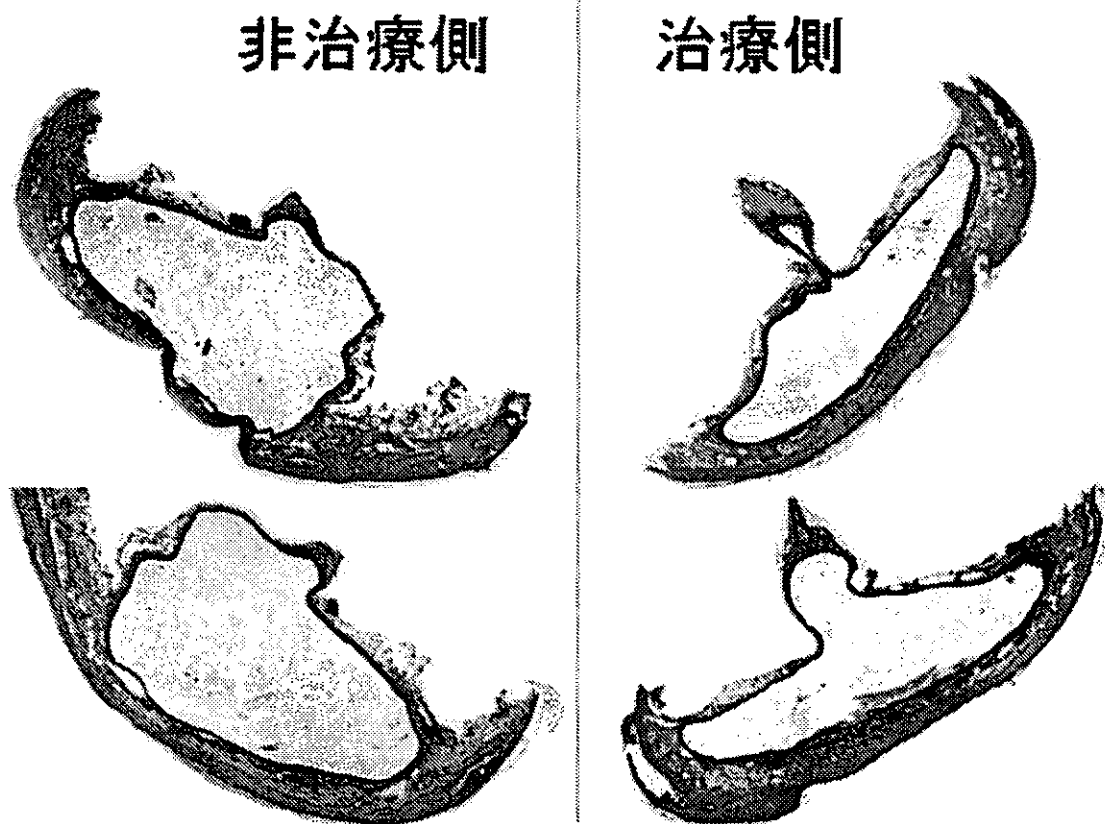


図 6-b MPSVIIマウス中耳腔 病理像
(HE染色)



非治療側の中耳腔は耳垢に満たされていたが、治療側は比較的インタクトであった

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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	頁	出版年
Horimoto R, Inagaki M, Yano T, Sata Y, Kaga M	Mismatch negativity in the color modality during a selective attention task to auditory stimuli in children with mental retardation.	Brain & Development	24	703-709	2002
Kaga M, Kon K, Uno A, Horiguchi T, Yoneyama H, Inagaki M	Auditory perception in auditory neuropathy: Clinical similarity with auditory verbal agnosia.	Brain & Development	24	197-202	2002
佐田佳美, 稲垣 真澄, 白根聖 子, 加我牧子	漢字および図形に対する認知機能評価 第1報: 刺激別視覚性事象関連電位 P300 の発達変化	脳と発達	34	300-306	2002
佐田佳美, 稲垣 真澄, 白根聖 子, 加我牧子	漢字および図形に対する認知機能評価 第2報: 精神遅滞児における視覚性事象関連電位 P300	脳と発達	34	491-497	2002
白根聖子, 稲垣 真澄, 加我牧子	解剖と機能 “中枢性聴覚障害シリーズ” 小児の中枢性聴覚障害	JOHNS	18	1822-1824	2002
Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S.	Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation.	Neurology	58	811-813	2002
Kotani K, Shimomura T, Shimomura F, Ikawa S, Nanba E.	A polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region and frequency of migraine attacks.	Headache	42	893-895	2002
Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S	Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E4 homozygosity.	Ann Neurol	52	351-355	2002

Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G	Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex.	Am J Med Genet	110	268-2 72	2002
Li XK, Kosuga M, Tokieda K, Kanaji A, Fukuhara Y, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Yamada M, Suzuki S, Okuyama T	Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier a in rodent liver after adenoviral gene transfer.	Mol Ther	5	262-2 68	2002
Sano Y, Yamada J, Ishino Y, Adachi W, Kawasaki S, Suzuki T, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N	Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege.	Exp Eye Res	75	475-4 83	2002
小須賀基通, 奥 山虎之	小児遺伝性神経疾患の遺伝 子治療の開発	最新医学	57	79-84	2002
Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T	Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII.	Gene Therapy	10	406-4 14	2003

書籍

著者氏名	論文タイト ル名	編集者	書籍名	出版社 名	出版 地	出 版 年	頁
奥山虎之	遺伝性疾患 の治療	白木和夫, 前川喜平	小児科学 第2版	医学書 院	東京	2002	248 - 251

20020684

以降は雑誌/図書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。