

20030585

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

分子生物学的知識に基づいた感音難聴の  
新しい治療法の確立

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 唄 達 也

平成16年（2004年）3月

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成16年 3月31日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 〒112-0011 文京区千石3-36-6  
フリカナ ヤマソバタツヤ  
研究者 氏 名 山唄達也  
(所属機関 東京大学)

平成 15年度厚生科学研究費補助金 ( 感覚器障害 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 分子生物学的知識に基づいた感音難聴の新しい治療法の確立 (H15-感覚器-010)

国庫補助金精算所要額 : 金 20,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書表紙 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況  
なし
8. 健康危険情報  
なし

- (1) 研究費の名称： 厚生労働科学研究費補助金  
(2) 研究事業名： 感覚器障害  
(3) 研究課題名： 分子生物学的知識に基づいた感音難聴の新しい治療法の確立  
(4) 国庫補助金精算所要額： 金 20,000,000 円也  
(5) 研究期間（西暦）： 2003-2005  
(6) 研究年度： 2003  
(7) 主任研究者名（所属機関名）： 山嵜 達也（東京大学）  
(8) 分担研究者名（所属機関名）： 鈴木 光也（東京警察病院）、石本 晋一（東京大学）、  
浅野 知一郎（東京大学）、後藤 雄一（国立精神神経センター）、  
岡 芳知（東北大学）

(9) 研究目的

- ① 遺伝性難聴への遺伝子治療法の開発
- ② 急性期の感音難聴に対する薬物治療の拡大
- ③ 有毛細胞の再生による慢性期感音難聴の治療法の開発

(10) 研究方法

① 遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

1) 難聴・糖尿病・視神経萎縮を引き起こす Wolfram 症候群のモデル動物は岡芳知（東北大学）が作成した。その糖尿病の発現機序について、血糖値、血中インシュリンの測定、糖負荷試験、および膵臓の組織学検討を行った。難聴の発現については生後2ヶ月おきに ABR を計測し、1年経った時点で断頭し、組織学的に検討した。組織は蝸牛の断面を光顕、および透過電顕で観察し、また wolframin の局在の変化を免疫組織学的に観察した。

2) Glut5 のノックアウトマウスの作成を開始した。

② 内耳障害の予防・治療

1) 音響外傷や耳毒性薬剤に対する種々の薬剤の予防・治療効果については、ABR を前後で測定し、蝸牛の感覚上皮を surface preparation 法により観察して有毛細胞死を定量的に評価した。用いた薬剤は ebselen などのフリーラジカルスカベンジャー、iNOS inhibitor、および caspase inhibitor である。Ebselen による temporary threshold shift の予防効果の検討では、透過電顕による観察も加えた。アポトーシスの評価としてホールマウントによる TUNEL 法の導入を行い、耳毒性薬剤後のアポトーシス出現時期・割合について定量的に評価した。

2) 老人性難聴のモデル動物（マウス）における遺伝子の検討では DBA/2J mouse（雄）と C57/BL6 を AHL モデルマウスを用いた。Oligonucleotide array 解析では蝸牛組織を低温室で摘出し、素早く液体窒素で凍結し保管した。Total RNA は TRIZOL 法で抽出し、SuperScript Choice System を用いて cDNA を合成し、Biotin-labeled cRNA を合成した。Hybridization 後 GeneChips の洗浄、染色をおこない、シグナルの検出後、各試料のデータ収集を行った。統計処理後、正常とモデル動物間で発現差のある遺伝子リストを作成した。

③ 内耳有毛細胞の再生

1) 遺伝子導入方法

① アデノウイルスベクター投与による内耳障害の予防として、ステロイドホルモンをベクター反復投与前から投与する群と投与しない群で比較した。比較には ABR による聴力閾値の計測と残存有毛細胞のカウントを行った。

② 蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する新しい導入法を行った。LacZ を組み込んだアデノウイルスベクターを用い、X-gal により発色させて、その分布を調べた。また内耳障害の程度については ABR 計測と有毛細胞のカウントを行った。

2) 支持細胞から有毛細胞への変換

蝸牛に GFP、Math1 を組み込んだアデノウイルスベクターを投与し、どの細胞に取り込まれたかは GFP の存在で確認し、支持細胞が有毛細胞に変化するかどうかは surface preparation および走査電顕で観察した。また免疫組織学的に、Math1 を取り込んだ細胞がミオシンを発現するか調べた。さらにカナマイシンおよびエタクリン酸でモルモットに難聴を作成した後、内耳にこのベクターを投与し、有毛細胞が再生するか、ABR による計測にて聴力が回復するか調べた。

3) 支持細胞の増殖能の検討

カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットおよびラットに難聴を作成し、BrdU を連日投与してパラフィン切片を作成し、免疫染色により細胞増殖能について検討した。また surface

preparation を用いた検討も行い、BrdU は DAB で発色、または蛍光マーカーで発色した。DAB 発色標本の断面を光顕および透過電顕で観察し、surface preparation では BrdU とサイトケラチン、ビメンチン、p 27 による二重染色を行った。さらに増殖のタイミングや増殖因子の投与による増殖能の亢進の誘導について検討した。

## (11) 結果と考察

### ① 遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

- 1) 難聴・糖尿病・視神経萎縮を引き起こす Wolfram 症候群のモデル動物では血糖値、血中インシュリンの測定、糖負荷試験などの検討、および臓器の組織学検討から後天的に糖尿病が発症することを確認した。難聴は1年後の経過ではわずかであり、異なる遺伝子背景のノックアウトマウスを作成して、新たに検討することが必要と思われた。wolframin の局在の変化は免疫組織学的に確認できた。
- 2) Glut5 のノックアウトマウスについてはようやくキメラが作成できた状態である。

### ② 内耳障害の予防・治療

- 1) ebselen は音響外傷（聴力閾値上昇、有毛細胞障害）を著明に軽減した。暴露音圧を下げて temporary threshold shift を生じさせた場合には完全にその発現を抑制した。透過電顕の観察では excitotoxicity を抑制することが判明した。ebselen は音響外傷を予防したが、この薬剤は NO および ONOO を除去する効果とグルタチオン類似の効果があり、強大音響によって生じる reactive oxygen metabolite の除去が蝸牛障害軽減に有効であることが示された。また音圧を下げた場合の temporary threshold shift の抑制は excitotoxicity を予防するためであり、NO および ONOO 除去に密接な関係があることが示唆された。
- 2) iNOS inhibitor、および caspase inhibitor も著明に音響外傷を軽減した。またこれらの薬剤は音響外傷後の蝸牛内の caspase 発現を抑制していた。このことから難聴予防にはアポトーシスを引き起こすシグナル活性化の予防が重要と思われた。アポトーシス抑制因子を細胞内に投与するタンパク治療を行うことを新たに検討項目に加えた。
- 3) アミノ配糖体による蝸牛有毛細胞のアポトーシス発現は、投与数時間以内に生じ、2-3日目でピークとなった。この TUNEL 陽性細胞の出現は組織学的に有毛細胞が破壊されるずっと以前に生じていた。
- 4) 老人性難聴のモデル動物（マウス）における遺伝子の検討では、スクリーニングされた 22,626 遺伝子の内、11,116 遺伝子の発現が確認された。これらのデータを統計処理した結果、遺伝子発現に有意な差が示された 517 遺伝子が同定された。その内 AHL 蝸牛グループにおいて 270 遺伝子の発現低下が示され、247 遺伝子の発現増加が示された。次に BLAST 等で同定されたこれらの遺伝子の機能等について解析を行ったところ、遺伝子発現低下が示された遺伝子としては、Structure/muscle contraction に関わる Myl3, Tpm3、Hearing に関わる Slc26a4、Mitf、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> transportation に関わる Kcnel、Slc12a2 などが明らかになった。遺伝子発現増加が示された遺伝子としては、Inflammatory response に関わる Pigr、Pglyrp、Stress response に関わる Reg3q、Prtn3、Energy metabolism に関わる Pygl、aldo3 などが明らかになった。今後は個々の遺伝子の解釈が必要である。この方法を確立したことで、今後多くの展開が期待される。例えば急性に内耳を障害した場合、有毛細胞障害時や scar 形成時などに異なる遺伝子発現が得られることが予想される。また自然老化マウスではカロリー制限で脳や骨格筋の老化が抑えられることが知られているが、内耳でもそのような事実が見られるか検討する意義がある。

### ③ 内耳有毛細胞の再生

- 1) 遺伝子導入においては、①アデノウイルスベクター投与による内耳障害がステロイドにより予防できること、②蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する方法で内耳に幅広く遺伝子導入できることが判明した。アデノウイルスベクター投与による内耳障害がステロイドにより予防できたことは、従来反復投与が無理とされアデノウイルスベクターによる遺伝子投与を複数回行うことを可能とした。また蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する方法は、内耳に直接投与する方法に比べて内耳障害の危険性が極めて小さく、臨床応用にむけてまた一つ進歩が得られた。
- 2) 蝸牛に Math1 組み込みアデノウイルスベクターを投与すると、支持細胞が有毛細胞に変化することを見出した。これらの細胞は Math1 を取り込み、ミオシンを発現していた。カナマイシンおよびエタクリン酸でモルモットに難聴を作成した後、内耳にこのベクターを投与したところ、

有毛細胞が部分的に再生し、聴力がある程度回復した。

- 3) カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットおよびラットに難聴を作成したところ、ラセン靭帯の fibrocyte や蝸牛神経間の glia に増殖能があることが確認された。また蝸牛コルチ器にも増殖能がみられ、DAB 発色による標本の断面を観察したところ、支持細胞であることが疑われた。さらにサイトケラチン、ビメンチン、p 27 による二重染色を行ったところ、支持細胞であることが確認された。断面の透過電顕での観察では、これらの BrdU 陽性支持細胞にアポトーシスの所見が無いことを確認した。増殖のタイミングは難聴作成後 3 - 5 日後がピークであった。増殖因子の投与による増殖能の亢進の誘導については未だ検討中である。この Math1 遺伝子導入による支持細胞から有毛細胞への変換と蝸牛支持細胞増殖能の亢進を組み合わせることでより多くの有毛細胞の再生が可能になると思われる。

(11) 結論

WFS KO マウスの検討により、ヒトにおける Wolfram 症候群の症状発現機序が検討できるようになった。KO マウスによる症状解析は有効な手法であり、Glut5 KO マウスも作成中である。音響外傷においてはアポトーシス誘導を抑制することが重要であると判明した。これをターゲットにした治療法の開発が必要である。また DNA tip を用いて蝸牛から多数の遺伝子を検索できる手技を確立した。老人性難聴モデルでは難聴発症前後の遺伝子を比較検討し、発現の減少・増加している遺伝子を同定できた。この手法を用い、急性難聴発症時や scar 形成時の遺伝子を調べることで、急性期の治療に結びつけることが期待できる。アデノウィルスベクター反復投与による内耳障害は副腎皮質ホルモン併用投与で予防できたが、これにより複数回投与が可能となった。また内耳への侵襲がより少ない遺伝子導入法を開発したが、この手法は臨床応用できると思われる。Math1 遺伝子導入により支持細胞を有毛細胞に変化させることができた。またこれまで増殖能が無いとされていたほ乳類蝸牛支持細胞に増殖能があることを見いだした。これらの組み合わせにより、有毛細胞再生の研究は新たな段階に入ったといえる。

# 目 次

I. 総括研究報告	
分子生物学的知識に基づいた感音難聴の新しい治療法の確立	
山嵜 達也	1
II. 分担研究報告書	
1. ミトコンドリア遺伝子変異と感音難聴	5
後藤 雄一	
2. 蝸牛窓経由のベクター投与方法の確立	7
鈴木 光也	
3. 内耳遺伝子導入による有毛細胞再生の研究	9
石本 晋一	
4. 感音難聴における GLUT5 の関与について	11
浅野 知一郎	
5. 感音難聴における WFS1 蛋白の関与	12
岡 芳知	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

分子生物学的知識に基づいた感音難聴の新しい治療法の確立

主任研究者：山嵜 達也 東京大学医学部耳鼻咽喉科助教授

研究要旨

- 1) WFS KOマウスを作成し、Wolfram症候群の一症状である糖尿病を来すことを確認した。難聴・内耳障害の発現について検討した。
- 2) Glut5 KOマウスの作成を行った。
- 3) 音響外傷後に対する ebselen や NOS inhibitor、caspase inhibitor の治療効果を確認した。音響外傷直後の蝸牛組織を調べ、excitotoxicity を ebselen が抑制することを確認した。またこれらの薬剤はアポトーシスを押さえることを確認した。
- 4) 老人性難聴モデルマウスの難聴発症前後の遺伝子をDNA chipにより検討し、発現の増加・減少する遺伝子を同定した。
- 5) ラットとモルモットに内耳障害を来し、ラセン靭帯の fibrocyte や蝸牛神経間の glia に増殖能があることを確認した。また蝸牛コルチ器にも増殖能があることを見つけ、支持細胞であることを確認した。増殖のタイミングや増殖因子の投与による増殖能の増加を試みた。
- 6) アデノウイルスベクター投与による内耳障害がステロイドにより予防できることを示した。また蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する、新しい内耳遺伝子導入法を開発した。
- 7) 蝸牛に Math1 組み込みアデノウイルスベクターを投与し、支持細胞が有毛細胞に変化することを見出した。難聴作成後の内耳にこのベクターを投与したところ、有毛細胞が部分再生し、聴力が一部回復した。

分担研究者

鈴木 光也 東京警察病院耳鼻咽喉科部長  
浅野 知一郎 東京大学糖尿病代謝内科助手  
石本 晋一 東京大学耳鼻咽喉科助手  
岡芳知 東北大学糖尿病代謝内科教授  
後藤雄一 国立精神神経センター部長

A. 研究目的

目的は感音難聴の新しい治療法の確立であり、①遺伝性難聴への遺伝子治療法の開発、②急性期の感音難聴に対する薬物治療の拡大、③有毛細胞の再生による慢性期感音難聴の治療法の開発、と大きく三つに分けられる。①では分子生物学的手法に基づいてWolfram症候群モデル動物を作成したので、遺伝子導入による治療法の開発を検討する。また外有毛細胞のMotor蛋白Knock outマウス作成によりmotor蛋白の役割を解明する。

①急性期感音難聴の治療法の開発は基礎と臨床の両面で行う。急性感音難聴では主に副腎皮質ホルモンが用いられ、他の薬剤については広く使用されているものの、有効性は定かでない。また副腎皮質ホルモンの作用機序も明らかではない。動物実験レベルではフリーラジカル産生が関与し、アポトーシスなど細胞死を誘導するpathwayを賦活化することが明らかになってきている。これらの知見をさらに深めるとともに、種々の動物でその治療効果、至適濃度、副作用などの検討を行い、臨床応用につなげる。

③内耳、特に蝸牛の有毛細胞再生は従来不可能とされてきた。有毛細胞が再生しないため、障害の固定した感音難聴に対する治療法はなかった。有毛細胞を再生することで感音難聴でも聴力が回復できるようになる。

B. 研究方法

①遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

1) 難聴・糖尿病・視神経萎縮を引き起こすWolfram症候群のモデル動物は岡芳知（東北大学）が作成した。その糖尿病の発現機序について、

血糖値、血中インシュリンの測定、糖負荷試験、および膵臓の組織学検討を行った。難聴の発現については生後2ヶ月おきにABRを計測し、1年経った時点で断頭し、組織学的に検討した。組織は蝸牛の割面を光顕、および透過電顕で観察し、またwolframinの局在の変化を免疫組織学的に観察した。

2) Glut5のノックアウトマウスの作成を開始した。

②内耳障害の予防・治療

1) 音響外傷や耳毒性薬剤に対する種々の薬剤の予防・治療効果については、ABRを前後で測定し、蝸牛の感覚上皮をsurface preparation法により観察して有毛細胞死を定量的に評価した。用いた薬剤はebselenなどのフリーラジカルスカベンジャー、iNOS inhibitor、およびcaspase inhibitorである。Ebselenによるtemporary threshold shiftの予防効果の検討では、透過電顕による観察も加えた。アポトーシスの評価としてホールマウントによるTUNEL法の導入を行い、耳毒性薬剤後のアポトーシス出現時期・割合について定量的に評価した。

2) 老人性難聴のモデル動物（マウス）における遺伝子の検討ではDBA/2J mouse（雄）とC57/BL6をAHLモデルマウスを用いた。Oligonucleotide array解析では蝸牛組織を低温室で摘出し、素早く液体窒素で凍結し保管した。Total RNAはTRIZOL法で抽出し、SuperScript Choice Systemを用いてcDNAを合成し、Biotin-labeled cRNAを合成した。Hybridization後GeneChipsの洗浄、染色をおこない、シグナルの検出後、各試料のデータ収集を行った。統計処理後、正常とモデル動物間で発現差のある遺伝子リストを作成した。

③内耳有毛細胞の再生

1) 遺伝子導入方法

①アデノウイルスベクター投与による内耳障害の予防として、ステロイドホルモンをベクター反復投与前から投与する群と投与しない群と比較した。比較にはABRによる聴力閾値の計測と残存有毛細胞のカウントを行った。

②蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを

投与する新しい導入法を行った。LacZを組み込んだアデノウイルスベクターを用い、X-galにより発色させて、その分布を調べた。また内耳障害の程度についてはABR計測と有毛細胞のカウントを行った。

## 2) 支持細胞から有毛細胞への変換

蝸牛にGFP、Math1を組み込んだアデノウイルスベクターを投与し、どの細胞に取り込まれたかはGFPの存在で確認し、支持細胞が有毛細胞に変化するかどうかはsurface preparationおよび走査電顕で観察した。また免疫組織学的に、Math1を取り込んだ細胞がミオシンを発現するか調べた。さらにカナマイシンおよびエタクリン酸でモルモットに難聴を作成した後、内耳にこのベクターを投与し、有毛細胞が再生するか、ABRによる計測にて聴力が回復するか調べた。

## 3) 支持細胞の増殖能の検討

カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットおよびラットに難聴を作成し、BrdUを連日投与してパラフィン切片を作成し、免疫染色により細胞増殖能について検討した。またsurface preparationを用いた検討も行い、BrdUはDABで発色、または蛍光マーカーで発色した。DAB発色標本の断面を光顕および透過電顕で観察し、surface preparationではBrdUとサイトケラチン、ビメンチン、p27による二重染色を行った。さらに増殖のタイミングや増殖因子の投与による増殖能の亢進の誘導について検討した。

## C. 研究結果

### ① 遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

1) 難聴・糖尿病・視神経萎縮を引き起こすWolfram症候群のモデル動物では血糖値、血中インシュリンの測定、糖負荷試験などの検討、および膵臓の組織学検討から後天的に糖尿病が発症することを確認した。難聴は1年後の経過ではわずかであり、異なる遺伝子背景のノックアウトマウスを作成して、新たに検討することになった。wolframinの局在の変化は免疫組織学的に確認できた。

2) Glut5のノックアウトマウスについてはようやくキメラが作成できた状態である。

### ② 内耳障害の予防・治療

1) ebselenは音響外傷（聴力閾値上昇、有毛細胞障害）を著明に軽減した。暴露音圧を下げたtemporary threshold shiftを生じさせた場合には完全にその発現を抑制した。透過電顕の観察ではexcitotoxicityを抑制することが判明した。

2) iNOS inhibitor、およびcaspase inhibitorも著明に音響外傷を軽減した。またこれらの薬剤は音響外傷後の蝸牛内のcaspase発現を抑制していた。

3) アミノ配糖体による蝸牛有毛細胞のアポトーシス発現は、投与数時間以内に生じ、2-3日でピークとなった。このTUNEL陽性細胞の出現は組織学的に有毛細胞が破壊されるずっと以前に生じていた。

2) 老人性難聴のモデル動物（マウス）における遺伝子の検討では、スクリーニングされた22,626遺伝子の内、11,116遺伝子の発現が確認された。これらのデータを統計処理した結果、遺伝子発現に有意な差が示された517遺伝子が同定された。その内AHL蝸牛グループにおいて270遺伝子の発現低下が示され、247遺伝子の発現増加が示された。次にBLAST等で同定されたこれらの遺伝子の機能等について解析を行ったところ、遺伝子発

現低下が示された遺伝子としては、Structure/muscle contractionに関わるMyl3, Tpm3, Hearingに関わるSlc26a4, Mitf, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> transportationに関わるKcnk1, Slc12a2などが明らかになった。遺伝子発現増加が示された遺伝子としては、Inflammatory responseに関わるPigr, Pglyrp, Stress responseに関わるReg3q, Prtn3, Energy metabolismに関わるPygl, aldo3などが明らかになった。

### ③ 内耳有毛細胞の再生

1) 遺伝子導入においては、①アデノウイルスベクター投与による内耳障害がステロイドにより予防できること、②蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する方法で内耳に幅広く遺伝子導入できることが判明した。

2) 蝸牛にMath1組み込みアデノウイルスベクターを投与すると、支持細胞が有毛細胞に変化することを見出した。これらの細胞はMath1を取り込み、ミオシンを発現していた。カナマイシンおよびエタクリン酸でモルモットに難聴を作成した後、内耳にこのベクターを投与したところ、有毛細胞が部分的に再生し、聴力がある程度回復した。

3) カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットおよびラットに難聴を作成したところ、ラセン靭帯のfibrocyteや蝸牛神経間のgliaに増殖能があることが確認された。また蝸牛コルチ器にも増殖能がみられ、DAB発色による標本の断面を観察したところ、支持細胞であることが疑われた。さらにサイトケラチン、ビメンチン、p27による二重染色を行ったところ、支持細胞であることが確認された。断面の透過電顕での観察では、これらのBrdU陽性支持細胞にアポトーシスの所見が無いことを確認した。増殖のタイミングは難聴作成後3-5日後がピークであった。増殖因子の投与による増殖能の亢進の誘導については未だ検討中である。

## D. 考察

### ① 遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

WFS KOマウスではWolfram症候群のphenotypeの一つである糖尿病の発症が確認できた。この糖尿病は後天的であり、ヒトの発現と一致した。一方難聴の出現は確認できなかったが、ヒトでも難聴は軽度であり、遺伝子背景の異なるKOマウスを作成して新たに検討すべきと思われた。

### ② 内耳障害の予防・治療

ebselenは音響外傷を予防したが、この薬剤はNOおよびONOOを除去する効果とグルタチオン類似の効果があり、強大音響によって生じるreactive oxygen metaboliteの除去が蝸牛障害軽減に有効であることが示された。また音圧を下げた場合のtemporary threshold shiftはexcitotoxicityを予防するためであり、NOおよびONOO除去に密接な関係があることが示唆された。またiNOS inhibitor、およびcaspase inhibitorも著明に音響外傷を軽減したが、これらの薬剤は音響外傷後の蝸牛内のcaspase発現を抑制しており、アポトーシスを引き起こすシグナルの活性化予防が重要と思われた。アポトーシス抑制因子を細胞内に投与するタンパク治療を行うことが重要と考え、新たに検討項目に加えた。

難聴動物の遺伝子スクリーニングでは多くの遺伝子の発現が減少または増加を示した。今後は個々の遺伝子の解釈が必要である。この方法を確立したことで、今後多くの展開が期待され



る。例えば急性に内耳を障害した場合、有毛細胞障害時や scar 形成時などに異なる遺伝子発現が得られることが予想される。また自然老化マウスではカロリー制限で脳や骨格筋の老化が抑えられることが知られているが、内耳でもそのような事実が見られるか検討する意義がある。

### ③内耳有毛細胞の再生

アデノウイルスベクター投与による内耳障害がステロイドにより予防できたが、これにより従来反復投与が無理とされアデノウイルスベクターによる遺伝子投与を複数回行うことが可能となった。また蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する方法は、内耳に直接投与する方法に比べて内耳障害の危険性が極めて小さく、臨床応用にむけてまた一つ進歩が得られた。

蝸牛に *Math1* 組み込みアデノウイルスベクターを投与すると、支持細胞が有毛細胞に変化することを見出した。また難聴モルモットにこのベクターを投与したところ、有毛細胞が部分的に再生し聴力がある程度回復した。これらは画期的な発見であり、有毛細胞再生がかなり現実味を帯びてきている。

カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットに難聴を作成したところ、蝸牛支持細胞に増殖能があることを見いだした。これまでほ乳類蝸牛には増殖能が無いと信じられてきていたが、今回の発見は有毛細胞再生に向けて新しいアプローチを導入するものであり、今後は増殖能の亢進を誘導することが急務である。この方法と *Math1* を組み合わせることで、より多くの有毛細胞再生が期待できる。

## E. 結論

WFS KO マウスの検討により、ヒトにおける Wolfram 症候群の症状発現機序が検討できるようになった。KO マウスによる症状解析は有効な手法であり、*Glut5* KO マウスも作成中である。音響外傷においてはアポトーシス誘導を抑制することが重要であると判明した。これをターゲットにした治療法の開発が必要である。また DNA tip を用いて蝸牛から多数の遺伝子を検索できる手技を確立した。老人性難聴モデルでは難聴発症前後の遺伝子を比較検討し、発現の減少・増加している遺伝子を同定できた。この手法を用い、急性難聴発症時や scar 形成時の遺伝子を調べることで、急性期の治療に結びつけることが期待できる。アデノウイルスベクター反復投与による内耳障害は副腎皮質ホルモン併用投与で予防できたが、これにより複数回投与が可能となった。また内耳への侵襲がより少ない遺伝子導入法を開発したが、この手法は臨床応用できると思われる。*Math1* 遺伝子導入により支持細胞を有毛細胞に変化させることができた。またこれまで増殖能が無いとされていたほ乳類蝸牛支持細胞に増殖能があることを見いだした。これらの組み合わせにより、有毛細胞再生の研究は新たな段階に入ったといえる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ishimoto S, Kawamoto K, Stover T, Kanzaki S, Yamasoba T, Raphael Y. A glucocorticoid reduces adverse effects of adenovirus vectors in the cochlea. *Audiol Neurotol* 2003;8:70-79.

2) Pourbakht A, Yamasoba T. Cochlear damage caused by a continuous and intermittent noise exposure. *Hear Res* 2003;178:70-78.

3) Suzuki M, Yamasoba T, Suzukawa K, Kaga K Adenoviral vector gene delivery via the round window membrane in guinea pigs. *Neroreport* 14:1951-1955,2003

4) Yamasoba T, Kondo K, Miyajima C, Suzuki M. Changes in cell proliferation in rat and guinea pig cochlea after aminoglycoside-induced damage. *Neuroscience Letter* 347:171-174, 2003.

5) Pourbakht A, Yamasoba T. Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hear Res* 2003;181:100-108.

6) Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. *Math1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 23:4395-4400,2003

7) Fujishiro M, Ogihara T, Tsukuda K, Shojima N, Fukushima Y, Kimura S, Oka Y, Asano T. A case showing an association between type 1 diabetes mellitus and Kabuki syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 60:25-31, 2003

8) Suzuki Y, Suzuki S, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, Oka Y, Atsumi Y, Matsuoka K. Multiple cranial mononeuropathies with acetylcholine receptor antibody in mitochondrial diabetes. *Diabetes Care* 13:18, 2003

9) Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, Goto Y. A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrom. *Mitochondrion* 2:293-304,2003

10) : ミトコンドリア脳筋症の病因・病態解析. *遺伝子医学* 7:78-83,2003

11) 後藤雄一. 核遺伝子変異によるミトコンドリア異常症. *脳の科学* 25:321-328, 2003

## 2. 学会発表

1) 山嵜達也、宮島千絵、近藤健二、鈴木光也. モルモット・ラット蝸牛におけるカナマイシン・エタクリン酸による障害後の細胞増殖能の変化. 第13回日本耳科学会 (2003. 10. 16-18. 幕張)

2) Tatsuya Yamasoba, Mitsuya Suzuki, Kenji Kondo. Evidence of mitosis in sensory epithelium of the mature cochlea in the deafened guinea pig. 27<sup>th</sup> ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

3) Shin-ichi Ishimoto, Kenji Kondo, Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba. Apoptotic hair cell death after direct inoculation of adenovirus vectors to the scala media of the guinea pig. 27<sup>th</sup> ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

4) Munetaka Ushio, Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba, Kimitaka Kaga. Apoptotic cell changes precede to manifestation of structural and functional damage in cochlear hair cells of gentamicin-poisoned guinea pig. 27<sup>th</sup> ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
研究報告書

ミトコンドリア遺伝子変異と感音難聴

分担研究者：後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨

難聴に関連するミトコンドリアDNA上のあらたな多型を見いだすために、3243変異を有する患者10名について全ミトコンドリアDNAの塩基配列を決定した。結果は、難聴の発症に関連するような別な多型は見いだせなかった。今後は、難聴との関連が示唆されているMT01、GTPBP3等の核DNA上の遺伝を検討する必要がある。また、今回の研究で新たに12SリボソームRNA領域の多型（A1275G）を見いだした。その病因性の検討は今後の課題である。

A. 研究目的

多様な原因によって感音性難聴が引き起こされるが、ミトコンドリア機能異常も重要な因子として注目されている。ミトコンドリア機能異常は、核DNA変異によるものとミトコンドリアDNA異常によるものに大別され、核DNAではDDP1遺伝子（ジストニア・難聴症候群）が知られており、またミトコンドリアDNAでは、欠失や重複、1555変異、3243変異、8344変異、13513変異など多数の点変異が知られている。今回の研究では、特に3243変異を有しながら難聴のある患者群とならない患者群で、3243変異以外の塩基配列を調べることで、あらたな難聴に影響を与えるミトコンドリアDNA多型の存在の有無を検討した。

B. 研究方法

対象は3243変異を有する患者10名。すべてMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) の臨床病型に合致している。そのうち5例は難聴があきらかであり、5例は聴力検査にて難聴の無いことを確認した。骨格筋からDNAを調整し、Akanumaらの方法で、まずミトコンドリアDNA全体を2つのプライマーセットで増幅し、次に96個のシークエンスプライマーでシークエンス反応を行い、ABI3700で全ミトコンドリアDNA（16568塩基）の塩基配列を決定した。

C. 研究結果

10例の検討で、3243変異以外の部分はホモプラスミーで認められる多型であり、しかもほとんどはMITOMAP (<http://www.mitomap.org>) に報告されているものであった。しかしながら、16SリボソームRNAの領域に、明らかな難聴の原因として認められている1555変異と同じ12SリボソームRNA領域にあらたな点変異（A1275G）を認めた。

D. 考察

最近の研究で、ミトコンドリアDNA変異でもっとも頻度の高い3243変異がもたらす病態に、その

変異が存在している転移RNA内のアンチコドン修飾障害が何らかのはたらきをしていると報告されている。一方、難聴を来すミトコンドリアDNA変異として有名な1555変異の効果を抑制する因子がいくつか同定され、いずれも核DNA上に存在する遺伝子にコードされている。これらMT01、GTPBP3などの遺伝子産物のはたらきは、転移RNAの修飾に関わることが判明し、難聴と転移RNA修飾異常との関係が注目されている。

そこで、3243変異を有する患者に難聴の有無で特徴的な多型がないかどうかをみたのが今回の研究であったが、結果は陰性であった。しかし、ミトコンドリアDNAの検討を終了したことで、次いでMT01、GTPBP3などの核DNA上の遺伝子を検討し、その病態への関与を明らかにできる。

また、今回の研究では、あらたな12SリボソームRNA上の多型を見いだした。これについては、難聴患者群での頻度の検討、患者培養細胞を用いた生化学的な検討を行い、病因かどうかの検討を予定している。

E. 結論

今回の研究では、3243変異を有している患者において、難聴の発症に関連するような別な多型は見いだせなかった。今後は、MT01、GTPBP3などの1555変異効果の修飾遺伝子産物であるMT01、GTPBP3等の遺伝子を検討することが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, Goto Y. A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. *Mitochondrion* 2:293-304, 2003
- 2) 後藤雄一：ミトコンドリア脳筋症の病因・

病態解析. 遺伝子医学 7:78-83, 2003

3) 後藤雄一. 核遺伝子変異によるミトコンドリア異常症. 脳の科学 25:321-328, 2003

## 2. 学会発表

1) Goto, Y., H, Mimaki, M., Sudo, A., Akanuma, J., Komaki, H., Nishino, I., Nonaka, I.: Overview of 200 patients. 5<sup>th</sup> Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies, Tokyo, 6.13, 2003

2) 後藤雄一:ミトコンドリア病の治療、第46回

日本小児神経学会総会イブニングトーク、

5.23、2003

## H. 知的所有権の出願・取得状況（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 |

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
研究報告書

蝸牛窓経由のベクター投与法の確立

分担研究者：鈴木光也 東京警察病院耳鼻咽喉科部長

研究要旨

アデノウイルスベクターを用いてモルモットの蝸牛及び前庭迷路により安全かつ確実に遺伝子導入を行う方法の検討、アミノグリコシド抗生物質の投与によってモルモットおよびラットの蝸牛に傷害を与えた後に、蝸牛組織内の細胞増殖の観察を行った。蝸牛窓膜経由でアデノウイルスベクターを投与し内耳へ遺伝子導入を試みとして、蝸牛窓膜に前処置を加えずにアデノウイルスベクターを投与しても、内耳へのどの細胞にも遺伝子導入はなされなかった。蝸牛窓膜上にフェノールを滴下した後、アデノウイルスベクターを同部に投与したところ、蝸牛全回転、前庭および半規管の感覚細胞、支持細胞をはじめ、多くの細胞に遺伝子発現を効率に確認できた。基底回転の下1/2のコルチ器のみに感覚細胞の消失がみられたが、支持細胞の形態は変化なく、遺伝子発現も認められた。これらの結果は蝸牛窓膜をフェノールで前処置する事でアデノウイルスベクターに対する蝸牛窓膜の透過性が亢進したこと、この方法により内耳へ効率がよく遺伝子導入できることを示唆している。この方法は、高率に感覚上皮の支持細胞に遺伝子導入できるため、内耳の感覚細胞を再生させるための遺伝子治療に応用できる方法と思われた。カナマイシンとエタクリン酸の投与によって蝸牛に傷害を与えた後 BrdU を10日間連続投与し、BrdU 陽性細胞の数を蝸牛のパラフィン切片上で算定した。ラセン靭帯と蝸牛神経繊維では BrdU 陽性細胞の数が有意に増加したが、感覚上皮では BrdU 陽性細胞は全く認められなかった。この結果より、成熟したほ乳類の蝸牛では、細胞増殖は非感覚上皮には生じるものの感覚上皮には生じない可能性が考えられた。

A. 研究目的

1) 内耳感覚細胞および支持細胞に安全且つ高率に遺伝子導入する方法の確立

内耳は遺伝子治療を行なうのに理想的な器官であり、種々のウイルスベクターを用いた研究がなされている。ベクターの種類とその投与方法によって内耳内の遺伝子発現が異なることが報告されている。内耳感覚細胞の再生は内耳の遺伝子治療において最も大きなテーマの一つであるが、感覚細胞の再生には支持細胞への遺伝子導入が必要である。支持細胞への遺伝子導入には内リンパ腔内に直接ベクターを投与するほうが有効と思われるが、内リンパ腔内への直接投与する場合は、コルチ器の変性と高度難聴が必発である。外リンパ腔に投与する場合はコルチ器の障害は認められず難聴も出現しないが、支持細胞への遺伝子導入は難しい。浸透圧ポンプを用いて外リンパ腔内に直接ベクターを投与することで支持細胞に遺伝子導入ができたという報告は一つだけで、その後の追試研究では遺伝子導入は確認されておらず、投与方法の確実性に疑問が残る。また臨床においては外リンパ腔内へ直接ベクターを注入することは、外リンパ瘻や手術の機械的刺激から内耳障害をきたす危険があるため、より低侵襲にベクターを投与する方法の開発が必要である。蝸牛窓膜を破らず、経蝸牛窓膜経由で遺伝子導入可能な内耳細胞を観察する。

2) 蝸牛障害後における細胞増殖の存在部位の同定

哺乳類において、胎生期に産生された蝸牛感覚細胞は、一旦消失すると再生しないと考えられてきた。近年、哺乳類の前庭感覚細胞が再生するという報告以後、哺乳類においても感覚細胞の再生に関する研究が盛んに行なわれるようになった。薬剤によって障害された蝸牛感覚細胞が、培養条件下に細胞増殖することが報告されているが、*In vivo*においては、蝸牛感覚細胞の増殖は確認されていない。障害された蝸牛の感

覚細胞が *In vivo* おいて増殖する条件を見出すことは、広範に障害された蝸牛の感覚細胞の再生を考える際に非常に大きな意味を持つ。カナマイシンとエタクリン酸投与により蝸牛障害動物を作成後、蝸牛の細胞増殖の有無を部位別に検討する。

B. 研究方法

1) 全身麻酔下に、モルモットの蝸牛窓膜上に人工外リンパ液または鼓膜麻酔液（フェノールおよび4%キシロカイン）で15分間滴下した後、それらをふき取り、LacZ 遺伝子組み込みアデノウイルスベクターを20 $\mu$ l滴下し、手術を終了した。3日後全身麻酔下に断頭し、側頭骨を摘出し直ちに固定した。脱灰後パラフィン包埋し、4-7 $\mu$ mの切片を作成した後、ABC法を用いた免疫染色によってLacZ 遺伝子の発現の部位を検討した。

2) モルモットおよびラットに全身麻酔下を施した後、2、4、8、20 kHz の ABR 閾値を測定した。その後、カナマイシンとエタクリン酸投与により蝸牛障害動物を作成し、核分裂のトレーサーである bromodeoxyuridine (BrdU) を10日間連日投与した。10日目の BrdU 投与終了後に、全身麻酔下に ABR 閾値を再び測定し、断頭および側頭骨の摘出を行なった。ホルマリン固定後、脱灰処理を経てパラフィン包埋し、6 $\mu$ mの切片を作成した。BrdU に対するマウスモノクローナル抗体と反応させた後、2次抗体と反応させ BrdU 陽性細胞の有無を、光学顕微鏡下に観察し算定した。

C. 研究結果

1) 蝸牛窓膜を人工外リンパ液で処置した動物では、蝸牛窓膜にまったく変化は認められず、また内耳のどこにも LacZ 遺伝子の発現は観察されなかった。一方、鼓膜麻酔液で処置した蝸牛窓膜では、outer epithelium の障害が光学顕微鏡下に確認された。蝸牛窓を鼓膜麻酔液で

処理した動物の蝸牛では全回転において、血管条、ラセン靭帯、ラセン唇、ラセン神経節、感覚細胞そして支持細胞に LacZ 遺伝子の発現を同定できた。半規管においては、暗細胞領域の上皮細胞、移行上皮、感覚細胞そして支持細胞に LacZ 遺伝子の発現が観察された。卵形囊においては、感覚細胞そして支持細胞に LacZ 遺伝子の発現が観察された。蝸牛基底回転下方 2 分の 1 の感覚細胞は、約半数の動物において消失していたが、支持細胞には LacZ 遺伝子の発現が観察された。

2) カナマイシンとエタクリン酸投与により蝸牛障害動物では ABR はどの周波数においても無反応であった。モルモットとラットのラセン靭帯と蝸牛神経では、BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められたが、支持細胞、感覚細胞では変化は見られなかった。

#### D. 考察

1) 鼓膜麻酔液で処置した蝸牛窓膜では、outer epithelium の障害が認められた。蝸牛窓膜において、outer epithelium は物質の透過性に対して最もバリア機能を有する層である。これが障害されたことにより蝸牛層膜の透過性が高まり、アデノウイルスが蝸牛膜を通過し内耳へ達したと思われる。アデノウイルスベクターはこれまでの多くの研究では外リンパ腔にのみ遺伝子発現がみられている。浸透圧ポンプを用いてコルチ器に遺伝子導入できたという報告は 1 例あるが、追試の結果では遺伝子導入されていない。よって今回、実験動物の全コルチ器に遺伝子導入することができた意義は極めて大きい。最近、蝸牛中央階に Math1 を組み込んだアデノウイルスベクターを直接投与した結果、支持細胞が感覚細胞に変化したという報告がなされているが、蝸牛中央階へ直接投与による機械的刺激によって、殆どの感覚細胞は障害を受けてしまい、臨床応用には不適である。その点、我々の方法は手法が簡便且つ低侵襲であり、ベクターの投与方法としてより理想的と考える。蝸牛基底回転下方 2 分の 1 において、感覚細胞が消失した支持細胞においても遺伝子発現がみられたことは、内耳障害例に対しても我々の投与方法によって遺伝子導入が可能であることを示唆している。

2) カナマイシンとエタクリン酸投与を投与されたモルモットとラットのラセン靭帯と蝸牛神経では、BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められた。今回の観察では支持細胞、感覚細胞には明らかな変化は見られなかったが、成熟した哺乳類の蝸牛でも薬剤により傷害された後に細胞増殖が生じることが確認された。このことは哺乳類の蝸牛を再生させるにあたり、きわめて有用な事実である。

#### E. 結論

1) アデノウイルスベクターを用いて経蝸牛窓膜経由でモルモットの内耳に遺伝子導入できるかの検討を行ない、血管条、ラセン靭帯、ラセン神経節のみならず蝸牛および前庭迷路の感覚細胞と支持細胞に遺伝子導入できることが確認された。このベクター投与の方法において、蝸牛の基底回転の一部を除き感覚細胞および支持細胞の形態は正常に保たれていることが確認された。

2) カナマイシンとエタクリン酸投与により、

成熟したモルモットとラットの蝸牛においても、BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められた。今回の観察では、特にラセン靭帯と蝸牛神経において、有意な細胞増殖が観察された。

今回の二つの研究は、Math1 遺伝子を組み込んだウイルスベクターを安全且つ確実に内耳に導入できること、薬剤によって障害された蝸牛では成熟した哺乳類でも細胞増殖が見られることを示す事ができた。細胞増殖の調節とレトロウイルスによる遺伝子導入を組み合わせることによって、目的とする細胞に選択的に遺伝子導入できるようにする事が、臨床応用に向けた次の重要な課題である。感覚細胞の再生の臨床応用を近い将来可能とするためにも、この再生の研究の更なる継続と発展が望まれる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Suzuki M, Yamasoba T, Suzukawa K, Kaga K. Adenoviral vector gene delivery via the round window membrane in guinea pigs. *Neroreport* 14:1951-1955, 2003

2) Yamasoba T, Kondo K, Miyajima C, Suzuki M. Changes in cell proliferation in rat and guinea pig cochlea after aminoglycoside-induced damage. *Neuroscience Letter* 347:171-174, 2003.

##### 2. 学会発表

1) 鈴木光也、山嵜達也、鈴川佳吾、加我君孝：モルモット蝸牛窓膜経由による遺伝子導入の可能性。第 104 回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2003. 5.22 - 24. 東京)

2) 山嵜達也、近藤健二、鈴木光也：モルモット・ラット蝸牛におけるカナマイシン・エタクリン酸による障害後の細胞増殖能の変化。第 13 回日本耳科学会 (2003. 10.16 - 18. 千葉)

3) Tatsuya Yamasoba, Mitsuya Suzuki, Kenji Kondo. Evidence of mitosis in sensory epithelium of the mature cochlea in the deafened guinea pig. 27<sup>th</sup> ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

4) Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba, Akinori Kashio. Morphological and functional changes in the inner ear hair cells following adenoviral vector gene delivery via the round window membrane treated with phenol. 27<sup>th</sup> ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (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 |

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
研究報告書

内耳遺伝子導入による有毛細胞再生の研究

分担研究者：石本晋一 東京大学医学部耳鼻咽喉科助手

研究要旨

- 1) 蝸牛に Math1 組み込みアデノウイルスベクターを投与し、支持細胞が有毛細胞に変化することを見出した。
- 2) アデノウイルスベクター投与による免疫応答による内耳障害がステロイドにより予防できることを示した。

A. 研究目的

目的は加齢変化による老人性難聴、抗癌剤などの薬物投与、音響暴露により生じる蝸牛有毛細胞の消失が原因の感音難聴の新しい治療法の確立である。特に遺伝子導入法を用いて有毛細胞の再生に取り組み、有毛細胞の再生による現在治癒不可能である感音難聴の新しい治療法の確立と臨床応用への問題点の解決

①有毛細胞の再生による慢性期感音難聴の治療  
感音難聴の多くは蝸牛有毛細胞の障害によって生じる。哺乳類の蝸牛では過大の音響暴露・シスプラチン、ゲンタマイシンなどの内耳毒性を有する薬剤の使用によって有毛細胞の障害がひとたび生じると有毛細胞の再生は不可能であるといわれている。そのため感音難聴の治療として有毛細胞を再生が試みられている。動物実験によりコルチ器の有毛細胞の前駆細胞と考えられている支持細胞にアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入 (math1: 有毛細胞再生に関与するという遺伝子) を行い有毛細胞の再生を試みる。

②遺伝子導入に用いるアデノウイルスベクターに対する免疫応答による内耳障害の予防

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法にはさまざまな問題点がある。特に臨床応用するためには、さまざまな問題点を解決していかなければいけない。その最も大きな問題点がアデノウイルスベクターの抗原性に対する免疫応答である。ヒトの場合、すでにアデノウイルスに対する抗体を有しているためにアデノウイルスベクターを初回投与した場合でも細胞障害を生じる可能性が高いことが推測される。そのため免疫応答による細胞障害モデルを作成して、細胞障害による障害部位を同定するとともに予防法を検討する。

B. 研究方法

①内耳有毛細胞の再生

モルモットの蝸牛の中央階（有毛細胞の存在スペース）に lacZ, Math1 を組み込んだアデノウイルスベクターを投与して、コルチのどの細胞に遺伝子発現がおこっているかということをも β-galactosidase の発現部位で確認する。さらに抗 math1 抗体で math1 がコルチのどの細胞に取り込まれているか同定する。math1 組み込みアデノウイルスベクターを投与して 2ヶ月後に支持細胞が有毛細胞に変化するかどうかが surface preparation および走査電顕で観察する。Math1 を取り込んだ細胞がミオシンを発現するか調べる。また神経軸索が伸長していることを neurofilament を染色して確認する。

②アデノウイルスベクター投与による細胞障害

の検討

アデノウイルスベクターを蝸牛の鼓室階（外リンパ腔）に投与して有毛細胞の障害が初回投与1週間後および3週間間隔をあけて2回投与した後1週間と比較する。聴力の変化を ABR で他覚的に比較する。さらに実際に細胞障害の程度を surface preparation 法を用いて有毛細胞の傷害を確認するとともに組織標本を作製して炎症の程度および細胞障害部位を同定する。次に免疫抑制作用を有するステロイドホルモンをベクター投与前から systematic に投与して免疫抑制モデルを作成して免疫抑制群と抑制剤なしの群で比較した。比較には ABR による聴力閾値の計測と残存内・外有毛細胞のカウントを行う。

C. 研究結果

①内耳有毛細胞の再生

1) モルモットの蝸牛の血管条をメルクマールとして cochleostomy を行い、直接アデノウイルスベクター (LacZ) をモルモットの蝸牛の中央階に投与することでコルチ器の支持細胞に β-galactosidase の発現を認めることができた。しかし、直接 cochleostomy 行い、コルチ器に導入するために機械的な操作による有毛細胞障害を生じた。しかし、この投与法で内耳の有毛細胞の前駆体である支持細胞に目的遺伝子を導入することができた。

2) さらに同様の方法で Math1 組み込みアデノウイルスベクターを投与したことで支持細胞が有毛細胞に変化することを見出した。これらの細胞は Math1 を取り込み、ミオシンを発現していた。

②アデノウイルスベクター投与による細胞障害の検討

アデノウイルスベクターをモルモットの鼓室階に投与した場合、一度目の投与では細胞障害は生じなかった。しかし、2回目の投与後には鼓室階に投与したにもかかわらず中央階のコルチ器で内・外有毛細胞の障害を認めた。この結果は ABR の域値上昇の結果と一致していた。ステロイドを投与して免疫応答を抑制した場合、アデノウイルスベクター投与により内・外有毛細胞の障害を抑制し、内耳障害が予防できた。

D. 考察

感音性難聴の主な原因である蝸牛有毛細胞の障害は今まで有毛細胞の形態学的特長から哺乳類に於ては再生が不可能であると言われてきた。そのため対処法としては補聴器があるのみであった。しかし、障害が高度になれば補聴器による補聴効果も低く、日常生活に支障きたし良好に過ごす事が困難である。今回我々の遺伝子導入の実験結果から哺乳類においても in vivo で有

毛細胞の再生が可能であることが証明できた。有毛細胞の再生に関しては幹細胞による再生が試みられているが蝸牛の複雑な環境下においてはその再生はいまだ成功していない。そのため有毛細胞の再生に関しては遺伝子治療が現段階においては最も優れているものと考えられる。今後は難聴モデル(有毛細胞障害モデル)において有毛細胞の再生が誘導されることを明らかにすることが必要である。さらに最終的にはその再生した有毛細胞の機能が本来の有毛細胞と同様のものであるかを検討する必要があると考えられる。また今回の実験では有毛細胞の再生が本来の有毛細胞存在部位で生じたのではなく、支持細胞存在位置に有毛細胞の再生が生じたため聴力が回復するためには蓋膜下に再生した有毛細胞の機能回復は見込めない。今後は有毛細胞の再生部位の検討や機能回復による聴力獲得という機能回復ができるかどうかの問題になる。

また今回の結果はコルチ器の支持細胞が *math1* 遺伝子を導入することで有毛細胞に分化することから、以前から推測されてきた支持細胞が有毛細胞の前駆細胞であり、さらには幹細胞であることを強く支持するものである。

遺伝子導入法が蝸牛有毛細胞の再生に最も優れている方法であることを証明したが、その導入法は多くの問題点を抱えている。その第一の問題点がアデノウイルスベクターの持つ抗原性による免疫応答であると考えられる。そのため今回は免疫抑制作用のあるステロイド剤を投与して蝸牛内の反応を検討したところ回復投与して治療が可能になったことが明らかになった。これは初回投与で成功しなかった際に回復して投与が可能になったことを示しているものと結論づけることができる。今後は有毛細胞再生の実験と同様に直接中央階に投与してその際の免疫応答による細胞障害を検討する必要があるものと考えられる。この免疫応答への対処法を用いて *math1* 等の遺伝子導入を行い有毛細胞の再生をより効率的に行い臨床応用へ近づけることができるものと確信している。

#### E. 結論

アデノウイルスベクターをモルモットの蝸牛中央階に直接投与することでコルチ器の支持細胞に遺伝子導入することが可能になった。さらに *Math1* 遺伝子を直接モルモットのコルチに導入することで、初めて *in vivo* で哺乳類の支持細胞から有毛細胞の再生を成功させた。このことで有毛細胞再生の研究は新たな段階に入ったといえ、今後は再生した有毛細胞の機能

を検討して、いかに聴力回復ができるか、またこの結果をいかに臨床応用することができるといふことに関心が向けられるものと推測される。

アデノウイルスベクター反復投与による内耳障害はステロイド投与で予防することができた。これによりアデノウイルスベクターの複数回投与が可能となった。またアデノウイルスベクターに抗体を持つ場合の対処法を開発した。このような免疫応答を抑制するくして遺伝子導入法を開発した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. *Math1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. The Journal of Neuroscience 23:4395-4400, 2003
- 2) Ishimoto S, Kawamoto K, Stover T, Kanzaki S, Yamasoba T, Raphael Y. A glucocorticoid reduces adverse effects of adenovirus vectors in the cochlea. *Audiol Neurotol* 2003;8:70-79.

##### 2. 学会発表

- 1) Shin-ichi Ishimoto, Kenji Kondo, Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba. Apoptotic hair cell death after direct inoculation of adenovirus vectors to the scala media of the guinea pig. 27<sup>th</sup> ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況(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 |



厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
研究報告書

感音難聴におけるGLUT5の関与について

分担研究者 浅野 知一郎 東京大学医学部代謝生理化学分野 助手

研究要旨

GLUT5蛋白は小腸においてフルクトースの取り込みに重要な役割を果たしている。最近、GLUT5が内耳において発現し、これが外有毛細胞において発現しており、モーター蛋白としての役割を担うことで聴覚に重要であるとの報告がなされた。難聴の成因には未だ不明の部分が多く残されており、我々はGLUT5ノックアウトマウスを作製し、GLUT5の聴覚における役割を解明し、難聴に対する新たな治療方法への開発に結びつけたい。現在、GLUT5をノックアウトしたES細胞の樹立に成功し、キメラマウスが作成されている段階である。

A. 研究目的

糖輸送担体は12回膜貫通蛋白であり、グルコース及びフルクトースの輸送に関わっている。我々は、糖輸送担体を糖尿病との関わりにおいて研究を進めてきたが、最近、GLUT5に糖を輸送する機能のみでなくモーター蛋白としての機能が報告された。これは聴神経において認められ、その機能は聴力に大きく影響する可能性が高い。そこで、難聴の原因としてGLUT5の機能不全が関係している可能性を考慮し、GLUT5ノックアウトマウスの作製を試みた。

B. 研究方法

胚性幹細胞（ES細胞）は、マウスのプラストシスト（約3日胚）から確立された細胞で、マウスの胚に戻すと個体を形成するほぼすべての細胞に分化する能力をもつ。生殖細胞にも分化することができるため、ES細胞由来のマウス個体を作出することが可能である。このES細胞を遺伝的に操作することにより、GLUT5ノックアウトマウスを作成している。

GLUT5ノックアウトのためのベクターのコンストラクトは、exon2の翻訳開始部位の200塩基対を欠損させたexon1からexon4までのゲノム配列を含む。exon2の欠損部位には、LacZ遺伝子が挿入されており、GLUT5のプロモーター下に発現するLacZを観察することで、生体でのGLUT5の発現をモニターできる。その他、neomycin耐性遺伝子(neo)、tyrosin kinase遺伝子(TK)を含む。さらに、lox配列を有しており、Creリコンビナーゼを発現させることにより、GLUT5のプロモーター下に種々の遺伝子(X)をノックインさせ、その蛋白を発現させることが可能である。

作成したベクターを、エレクトロポレーション法を用いてES細胞に導入した。相同組換によって遺伝子を導入されたES細胞を2種の薬剤を用いて選択した。まず、ネオマイシン耐性遺伝子を遺伝子もつES細胞を、培地中へのネオマイシン投与により選択した。そして、相同組み換えをおこさなかったチロシンキナーゼ遺伝子をもつES細胞を、ガンシクロピルの投与により排除した。相同組み換えをおこしたES細胞をサザンブロットにより確認し、4クローン得た。

C. D. E. 研究結果・結論・考察

ES細胞からマウスを作成するために二つの方

法を用いた。そのひとつがインジェクション法で、これはマウスのプラストシスト（胚胞）にES細胞を入れて内部細胞塊と一緒に発生させる方法である。もうひとつがアグリゲーション法（細胞凝集法）である。これはマウス2日胚（8細胞）の透明帯を取り除きES細胞と一緒に培養し凝集塊を作らせる。この凝集塊を一日培養すると一個のプラストシストになる。インジェクション法またはアグリゲーション法により得られたプラストシストを仮親の子宮に移植し発生させる。現在、総数454個の胚を移植し、キメラマウス4匹を得た。これらキメラマウスを交配させることでGLUT5ヘテロ欠損マウスを作成中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujishiro, M., Ogihara, T., Tsukuda, K., Shojima, N., Fukushima, Y., Kimura, S., Oka, Y. and Asano, T. A case showing an association between type 1 diabetes mellitus and Kabuki syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 60:25-31, 2003

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況（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

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
研究報告書

感音難聴におけるWFS1蛋白の関与

分担研究者：岡 芳知 東北大学分子代謝病態学分野 教授

研究要旨

WFS1蛋白の発現をマウス内耳で検討したところ、特にspiral ganglion, Deiters' cell, inner hair cell, vestibular hair cellに強く発現していた。また、細胞内レベルでは網状の免疫染色像から小胞体に存在するとの他の細胞での報告と合致した。Wolfram症候群では主に高音域の難聴を、LFSNHLでは低音域難聴をきたすが、WFS1蛋白の蝸牛での発現は、basal側（高音域を感知）とapical側（低音域）で差を認めなかった。WFS1ノックアウトマウスの作製にも成功した。ノックアウトマウスでは膵β細胞数の進行性の減少と糖代謝障害を認め、単離ラ島ではグルコースによるインスリン分泌が低下していた。すなわち、ウオルフラム症候群の糖尿病は、膵β細胞の数の減少と機能異常の両者により生じることが明らかとなった。

A. 研究目的

Wolfram症候群は、インスリン治療を必要とする若年発症糖尿病と視神経萎縮を主徴とし、感音難聴もきたす常染色体劣性遺伝疾患である。我々は、日本人3家系を主要な解析家系としたpositional cloningにより、この原因遺伝子を世界に先駆けて同定し、WFS1と名付けた（Inoue H, Tanizawa Y et al. Nature Genetics 1998）。この遺伝子異常のヘテロ接合体でも、低音域感音難聴（LFSNHL）をきたすことが2001年に発表され、WFS1と難聴との関わりはさらに注目を浴びることになった。

WFS1蛋白は既知蛋白と全くホモロジーがなく機能の推測ができない。しかし、Wolfram症候群患者（すなわちWFS1遺伝子異常のホモ接合体）では、膵β細胞やある種の神経細胞が選択的に減少しており、WFS1は膵β細胞の生存・維持にきわめて重要な役割を果たしていると考えられる。おそらく、聴覚に関わる細胞の機能と維持にも重要な役割を果たしていると思われる。

そこで、WFS1が内耳でどのような発現をしているかを明らかにするとともに、WFS1の機能の解明をめざしてノックアウトマウスの作製を試みた。

B. 研究方法

WFS1蛋白のN端290アミノ酸をGST fusion蛋白として発現させ、これで免疫してWFS1蛋白への特異抗体を作製した。この抗体を用いて、マウスの内耳での免疫組織染色を行った。また、マウスWFS1遺伝子のエクソン2にネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターをマウスES細胞に導入し、ネオマイシン耐性細胞クローンから相同組み替えの起こっているクローンをPCRおよびサザンブロット方により選別した。得られた2つの組み替えES細胞クローン（#133と#190）をマウスC129系のプラストシトに注入し、偽妊娠マウス子宮に着床させ、キメラマウスを得た。キメラマウスとC57BL/6Jの交配により生まれたWFS1ヘテロ欠損マウスをさらにC57BL/6Jに交配し、得られたヘテロ欠損マウス同士を交配することによりホモ欠損マウスを得た。WFS1遺伝子ホモ欠損マウスの脳および心臓より抽出したRNAを用いたRT-PCRにより、ホモ欠損マウスでは正常転写産物が欠損していることが確認された。そこで、血糖値を含む種々

の代謝パラメーターを検討するとともに、膵の組織像、ならびに単離ラ島でのインスリン分泌を検討した。

C. 研究結果

マウス内耳では、生後1日目にはすでに種々の細胞で発現が認められ、特に強い発現が、spiral ganglion, Deiters' cell, inner hair cell, vestibular hair cellで認められた。ホモ欠損マウスに外見上の異常はなく、正常対照マウスと同様に成長した。オスのホモ欠損マウスでは10-16週齢より随時血糖の上昇を認め、その後さらに上昇した（24週齢：対照 $146 \pm 34$ mg/dl、ヘテロ $158 \pm 29$ 、ホモ $267 \pm 33$ ）。また、膵インスリン含有量の著明な低下を認め、抗インスリン抗体を用いた膵の免疫染色では、β細胞の進行性の脱落が明らかとなった。また、単離ラ島でのグルコース刺激によるインスリン分泌はノックアウトマウス単離ラ島では低下していた。さらに、小胞体ストレスを惹起するツニカマイシンやタプシガルギンの処理により、DNA ladderがノックアウトマウスでは増強されていた。

D. E 結論・考察

WFS1蛋白は内耳の種々の細胞に発現しており、特にspiral ganglion, Deiters' cell, inner hair cell, vestibular hair cellに強く発現していた。また、ウオルフラム症候群の糖尿病は、膵β細胞の数の減少と機能異常の両者により生じることが明らかとなった。細胞数の減少はアポトーシスの増加によるものであり、ノックアウトマウスの膵ラ島では小胞体ストレスに対して脆弱であることが示され、WFS1の機能に重要な示唆を与える結果を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Cryns K, Thys S, Van Laer L, Oka Y, Pfister M, Van Nassauw L, Smith RJ, Timmermans J-P, Van Camp G.. The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural

hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells, *Histochem Cell Biol* 119: 247-256, 2003

progressive loss of islet b cells. *Diabetes* 52 suppl 1, A42, 2003 第 63 回 (2003 年) 米国糖尿病学会

2. 学会発表

1. 田村明 石原寿光 et al. ウォルフラム症候群原因遺伝子産物 (WFS1 蛋白) の解析: 組織特異的発現とノックアウトマウスでの病変。平成 15 年度日本糖尿病学会総会
2. 石原寿光 田村明 et al. ウォルフラム症候群原因遺伝子 WFS1 ノックアウトマウスの樹立。平成 15 年度日本糖尿病学会総会
3. Ishihara H, Tamura A et al. Disruption of the WFS1 gene causes diabetes in mice due to

H. 知的所有権の出願・取得状況 (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

刊行物リスト

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Ishimoto S</u> , Kawamoto K, Stover T, Kanzaki S, <u>Yamasoba T</u> , Raphael Y	A glucocorticoid reduces adverse effects of adenovirus vectors in the cochlea	Audiology and Neurootology	8	70-79	2003
Pourbakht A, <u>Yamasoba T</u>	Cochlear damage caused by a continuous and intermittent noise exposure	Hearing Research	178	70-78	2003
<u>Suzuki M</u> , <u>Yamasoba T</u> , Suzukawa K, Kaga K	Adenoviral vector gene delivery via the round window membrane in guinea pigs	Neuroreport	14	1951-1955	2003
<u>Yamasoba T</u> , Kondo K, Miyajima C, <u>Suzuki M</u>	Changes in cell proliferation in rat and guinea pig cochlea after aminoglycoside-induced damage	Neuroscience Letter	347	171-174	2003
Pourbakht A, <u>Yamasoba T</u>	Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma	Hearing Research	181	100-108	2003
Kawamoto K, <u>Ishimoto S</u> , Minoda R, Brough DE, Raphael Y	<i>Math1</i> gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs <i>in vivo</i>	The Journal of Neuroscience	23	4395-4400	2003
Fujishiro M, Ogihara T, Tsukuda K, Shojima N, Fukushima Y, Kimura S, <u>Oka Y</u> , <u>Asano T</u>	A case showing an association between type 1 diabetes mellitus and Kabuki syndrome	Diabetes Research and Clinical Practice	60	25-31	2003
K.Cryns, S. Thys, L.Van Laer, , <u>Y.Oka</u> , M Pfister, L. Van Nassauw, J.-P.Timmermans R.J.H.Smith, G. Van Camp	The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells	Histochem Cell Biol	119	247-256	2003
Suzuki Y, Suzuki S, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, <u>Oka Y</u> , Atsumi Y, Matsuoka K	Multiple cranial mononeuropathies with acetylcholine receptor antibody in mitochondrial diabetes	Diabetes Care	13	18	2003
Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, <u>Goto Y</u>	A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome	Mitochondrion	2	293-304	2003
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア脳筋症の病因・病態解析	遺伝子医学	7	78-83	2003
<u>後藤雄一</u>	核遺伝子変異によるミトコンドリア異常症	脳の科学	25	321-328	2003