

200400585A

厚生労働科学研究研究費補助金

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 **山 唄 達 也**

平成17年（2005）3月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 17 年 3 月 31 日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

住 所 〒112-0011 文京区千石 3-36-6
フリカナ ヤマハ タツ
研究者 氏 名 山嵜 達也
(所属機関 東京大学)

平成16年度厚生労働科学研究費補助金 (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 (うち間接経費 0 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 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
7. 健康危険情報
なし

厚生労働科学研究研究費補助金

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山唄 達也

平成17(2005)年 3月

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

山唄 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 ----- 10

石本 晋一

4. 感音難聴における GLUT5 の関与について ----- 13

浅野 知一郎

5. 感音難聴における WFS1 蛋白の関与 ----- 14

岡 芳知

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)
(総括)研究報告書

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。難聴が後天性に出現することを観察し、内耳の組織変化について検討した。
- 2) Glut5 KOマウスの作成を行った。
- 3) ミトコンドリア脳筋症のモデル動物としてゲルマニウム過剰投与マウスを作成した。高度難聴が生じ、血管条・コルチ器・ラセン神経節に変性が生じることを観察した。
- 4) mitochondrial DNA polymerase γ に点変異を来たし、mitochondrial DNAのproof-readingが障害されるマウス (POLGマウス) を作成した。ABRにて後天性に難聴が出現すること、ラセン神経節・コルチ器に変性が生じることを観察した。また蝸牛のDNAマイクロアレイ解析を行った。
- 5) 音響外傷後に対するebselen、iNOS 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、ebselenがexcitotoxicityを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。
- 6) bcl2が細胞内に作用するように修飾した物質(FNK-PTD)をモルモットに投与し、蝸牛内に取り込まれること、および音響外傷や薬剤毒性から予防できることを観察した。
- 7) モルモットにエタクリン酸・カナマイシンで内耳障害を来たし、蝸牛コルチ器にも増殖能があることを見つけ、これがダイテルス細胞であることを確認した。増殖のタイミングについて同定した。
- 8) 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。
- 9) 蝸牛にp27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与し、支持細胞が増殖し、有毛細胞様の細胞に変化することを見出した。
- 10) 老人性難聴モデルマウスとしてDBAマウス、C57BLマウス、POLGマウスの難聴発症前後の遺伝子をDNA tipにより検討し、発現の増加・減少する遺伝子を同定した。またC57BLマウスではカロリー制限が老人性難聴発症を抑制することを見出した。
- 11) ミトコンドリア遺伝子1555位点変異の大家系において、アミノ配糖体抗菌剤曝露なしでも難聴が生じること、同世代では難聴の程度が類似するが世代間で差があること、他のミトコンドリア遺伝子に異常は無いことを見出した。

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 東京大学分子細胞生物学専攻
代謝生理化学 助教授
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種々のモデル動物を作成し、その病態解析、遺伝子導入などの治療法の開発を検討する。②急性期感音難聴の治療法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、蝸牛の断面を光顕、および透過電顕で観察した。
 - 2) Glut5のノックアウトマウスのキメラからの作成を継続した。
 - 3) マウスに0.15%ゲルマニウムを投与し、ABRによる聴力測定、蝸牛の断面の光顕および透過電顕での観察、心臓、腎臓、筋肉の組織学的検討、蝸牛のOligonucleotide array解析を行った。
 - 4) ミトコンドリアDNAの変異が加齢とともに集積するマウス (POLG) を作成し、難聴についてABRによる聴力測定、蝸牛の断面の光顕および透過電顕での観察、TUNELによるアポトーシスの観察、蝸牛のOligonucleotide array解析を行った。
- 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。また26%カロリー制限により難聴の出現、遺伝子変化が抑制されるかどうか検討した。

③内耳有毛細胞の再生

1) 遺伝子導入方法
蝸牛窓経由のベクター投与方法の検討を行った。LacZを組み込んだアデノウイルスベクターを用い、その内耳内分布を調べた。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

①Math1を組み込んだ改良型アデノウイルスベクターの作成を行った。

②p27siRNAを組み込んだアデノウイルスベクターを投与し、支持細胞の分裂の誘導をBrdUの免疫染色で観察し、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、この細胞がミオシン7a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を連日投与して細胞増殖能について検討した。surface preparationを用いた検討で、この細胞がどの細胞であるか検討した。

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。難聴については初期のノックアウトマウスでは軽度であり、異なる遺伝子背景のノックアウトマウスを作成して、検討を開始したところである。

2) Glut5のノックアウトマウスについてはキメラができ、ヘテロ、ホモが作成できつつある。

3) ミトコンドリア脳筋症のモデル動物の0.15%ゲルマニウム投与マウスでは4ヶ月までに高度難聴が生じ、血管条・コルチ器・ラセン神経節に変性が生じることを観察した。蝸牛のOligonucleotide array解析を開始した。

4) ミトコンドリアDNAの変異が加齢とともに集積するマウス(POLG)を作成した。これは野生型では3年生存するのに比し、1年半しか生存できず、早期に白髪、脱毛、筋肉萎縮などの老化現象を生じ、アポトーシスが亢進することがわかった。難聴についても野生型より

早期に出現し、有毛細胞、ラセン神経節が基底回転から変性を来していた。蝸牛のOligonucleotide array解析では聴覚関連遺伝子、神経伝達物質、エネルギー代謝などの遺伝子群がdownregulateし、アポトーシスや炎症に関連した遺伝子群がupregulateしていた。

②内耳障害の予防・治療

1) ebselenはtemporary threshold shiftを抑制し、透過電顕の観察からこれはexcitotoxicityを予防したためであることが判明した。

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(C57BL/6マウス、DBA/2Jマウス)における遺伝子の検討では聴覚関連遺伝子、神経伝達物質、エネルギー代謝などの遺伝子群がdownregulateし、アポトーシスや炎症に関連した遺伝子群がupregulateしていた。26%カロリー制限ではC57BL/6マウスの難聴は完全に予防でき、上記遺伝子変化は抑制され、寿命延長に関与するSirt1が蝸牛内で発現亢進していた。

③内耳有毛細胞の再生

1) 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、ほとんど内耳障害を来さないことが判明した。

2) 蝸牛にp27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与すると、支持細胞が聴毛様の形態を持つ有毛細胞様の細胞に変化することを見出した。これらの細胞はミオシンも発現していた。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、支持細胞が増殖し、一部モザイク状に有毛細胞様細胞が出現(再生)していた。

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、蝸牛コルチ器にもわずかながら増殖能がみられ、これはダイテルス細胞であることが判明した。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。

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マウスでの結果が待たれる。

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。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。

老人性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。個々の遺伝子の解釈も必要であるが、クラスター解析からは、エネルギー代謝の低下からp53を介したアポトーシスが誘導されて老人性の蝸牛障害が生じる可能性が示唆された。カロリー制限ではこれらの遺伝子変化がきれいに抑制され、難聴は出現しなかった。またカロリー制限によりSirt1が蝸牛において亢進することも明らかとなった。今後はカロリー制限と同様にSirt1亢進作用のあるトコフェロールなどの投与により、老人性難聴が予防できないか調べる必要がある。また蝸牛のOligonucleotide array解析法を確立したことで、今後種々の動物モデルや種々の内耳障害において本方法を用いることが可能となっている。

③内耳有毛細胞の再生

蝸牛窓経由のベクター投与法は、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。

ほ乳類蝸牛には増殖能がないとずっと信じられていたが、我々は少ないながらも存在することを明らかにした。またp27siRNA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様細胞に変化することを見出した。難聴モデ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することも見出した。Math1の導入では支持細胞の増殖はなく、支持細胞の形質転換のみ誘導できたが、本方法を組み合わせることで、より確実に有効な有毛細胞の再生が期待できる。

E. 結論

WFS KOマウスの検討により、ヒトにおけるWolf ram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。POLGマウス、ゲルマニウム投与マウスもミトコンドリア機能障害の難聴モデルとして用いることができた。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DNAtipを用いて蝸牛から多数の遺伝子を検索できるOligonucleotide array解析法を確立した。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のより安全な内耳投与法を確立したが、この手法は臨床応用できると思われる。p27siRNA導入により支持細胞を有毛細胞様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) Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M. Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett in press*
- 2) Yamasoba T, Tsukuda K. Ototoxicity after use of neomycin ear drops is unrelated to A1555G point mutation in mitochondrial DNA. *J Otol Laryngol* 118:546-550, 2004
- 3) Karino S, Hayashi N, Aoki S, Ohtomo K, Yamasoba T. New method of reconstructed images for assessment of patency of intracochlear spaces for cochlear implant candidates. *Laryngoscope* 114:1253-1258, 2004
- 4) Ito K, Momose T, Oku S, Ishimoto S, Yamasoba T, Sugasawa M, Kaga K. Cortical activation shortly after cochlear implantation. *Audiol Neurootol* 9:282-293, 2004
- 5) Ishimoto S, Ito K, Kondo K, Yamasoba T, Kaga K. The role of the external auditory canal in the development of the malleal manubrium in humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:913-916, 2004
- 7) 石本晋一, 山俣達也. 難聴の遺伝子治療. 加我君孝編: 新生児聴覚スクリーニング. 金原出版 127-132, 2004
- 6) Sakamoto T, Kondo K, Yamasoba T, Suzuki M, Sugasawa M, Kaga K. Overexpression of ErbB-2 protein in human middle ear cholesteatomas. *Laryngoscope*. 114:1988-1991, 2004
- 7) Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13: 1159-1170, 2004
- 8) Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, Oka Y. Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 250-256, 2004
- 9) Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S. Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114:153-160, 2005.
- 10) Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth S, Hofer T, Hacker T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Sedivy J M, Yamasoba T, Tanokura M, Saupe KW, Weindruch RH, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science submitted*

2. 学会発表

- 1)山唄達也、近藤健二、石本晋一、牛尾宗貴、鈴木光也。哺乳類蝸牛支持細胞の分裂能誘導。第104回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2004. 5. 16-18. 広島)
- 2)鈴木光也、樫尾明憲、山唄達也、石本晋一：鼓膜麻酔液による経蝸牛窓膜の内耳遺伝子導入の検討 第104回日本耳鼻咽喉科学会総会 2004. 5. 16-18 (広島)
- 3)Yamasoba T, Miyajima C, Kondo K, Okano H. Expression of musashi1 in guinea pig cochlea and vestibular endorgans. 5th Molecular Biology of Hearing & Deafness Meeting (2004.9.30-10.4 Washington DC)
- 4) Someya S, Yamasoba T, Prolla TA, Tanokura M. Gene expression profile of age-related hearing loss in cochlea of DBA/2j mice. 5th Molecular Biology of Hearing & Deafness Meeting (2004.9.30-10.4 Washington DC)
- 5)山唄達也、加我君孝. Ebselenによるtemporary threshold shiftの予防. 第49回日本聴覚医学会 (2004. 10. 14-15. 福岡)
- 6)山唄達也、染谷慎一、田之倉優. 老人性難聴モデルマウスの難聴発症予防：カロリー制限の効果. 第14回日本耳科学会 (2004. 10. 21-23. 京都)
- 7)染谷慎一、山唄達也、田之倉優. 老人性難聴モデルマウスにおける蝸牛の遺伝子発現解析. 第14回日本耳科学会 (2004. 10. 21-23. 京都)
- 8)石本晋一、近藤健二、山唄達也、鈴木光也、加我君孝. モルモット中脳階へのアデノウイルスベクター注入によるアポトーシスについて. 第14回日本耳科学会 (2004. 10. 21-23. 京都)
- 9)宮島千絵、近藤健二、山唄達也、岡野栄之. モルモット内耳障害時におけるMusashi 1蛋白の発現分布. 第14回日本耳科学会 (2004. 10. 21-23. 京都)
- 10)鳥海早矢佳、石本晋一、伊藤健、山唄達也. 突発性難聴に対するPGE 1の併用効果について.

- て. 第14回日本耳科学会 2004. 10. 21-23. 京都)
- 11)山唄達也、宮島千絵、鈴木光也. モルモット前庭・半規管におけるMusashi 1の発現. 第63回日本めまい平衡医学会 (2004. 11. 17-19. 前橋)
- 12)Tatsuya Yamasoba, Chie Miyajima, Kenji Kondo, Hideyuki Okano. Changes in Expression of Musashi 1 in Guinea Pig Vestibular Endorgans Following Gentamicin-Induced Damage. 28th ARO Mid-Winter Meeting (2005.2.19-24. NewOrleans, USA)
- 13) Chie Miyajima, Tatsuya Yamasoba, Kenji Kondo, Hideyuki Okano. Alteration of the Expression Patterns of Musashi-1 in the Guinea Pig Cochlea Following Hair Cell Injury Induced by Ototoxic Agents. 28th ARO Mid-Winter Meeting (2005.2.19-24. NewOrleans, USA)
- 14) Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba, Akinori Kashio. Effect of adenoviral vector gene delivery via the round window membrane treated with phenol. 28th ARO Mid-Winter Meeting (2005. 2.19-24. New Orleans, USA)
- 15)田村明、石原寿光、高橋累、山口賢、山田高弘、武井大祐、檜尾好徳、鈴木進、荻原健英、片桐秀樹、佐藤譲、岡芳知. WFS1欠損マウスの解析：系統差とアポトーシスの亢進. 第47回日本糖尿病学会年次学術集会, 2004年5月13-15日、東京

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

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 アミノグリコシド感受性難聴を引き起こす事で知られているミトコンドリアDNAのA1555G変異を有する大家系（6世代、124人）の中の、4世代、67人について、問診・聴覚検査を行うとともに、8人については全ミトコンドリアDNA塩基配列を決定した。ミトコンドリアDNAの1555部位以外の多型は39個存在したが、患者間での差は全く認めなかった。また難聴の程度は、個々の家族に由来する小家系内ではほぼ均一であり、一方小家系間では大きく異なっていた。以上から、症状の発症や重症度に関わる核遺伝子の存在が強く示唆された。

A. 研究目的

ミトコンドリアDNAの変異に伴う感音難聴は、神経筋症状を伴う場合と伴わない場合が知られている。ミトコンドリア12SリボソームRNA内に存在するA1555G変異は、無症候性感音性難聴の代表である。我々は、このA1555G変異を有する大家系（6世代、124人）の中で、発症者と非発症者の検査所見、発症者の中の発症年齢や重症度の違いがミトコンドリアDNA上の別の変異が関わっているかどうかについて検討した。

B. 研究方法

4世代、67名に対して、問診・聴覚検査（純音オージオメトリーなど）、を行うとともに、そのうちの8人については全ミトコンドリアDNA塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1) 純音オージオメトリー (PTA)

0.5、1.0、2.0 kHzが閾値であり、これらを用いて検査した。

| 難聴 | PTA閾値 | 頻度 |
|-----|--------|-----|
| なし | <15 dB | 59% |
| 極軽度 | 16-25 | 14% |
| 軽度 | 26-40 | 9% |
| 中等度 | 41-55 | 4% |
| 重症 | 56-70 | 5% |
| 最重症 | 71-90 | 3% |

であり、41例の難聴なしとされた被験者のうち、8人は極軽度?軽度の聴力障害が検出された。また、8kHzを用いるとさらに鋭敏に異常を検出できた。

2) ミトコンドリアDNA全周の塩基配列の決定

8人の症例を対象にミトコンドリアDNAの全周の塩基配列を決定した。その結果は以下の通り

である。

| mtDNAの遺伝子部位 | 変異 |
|-------------|--|
| D-loop | A73G, T152C, A263G, 311ins CT489C, C16185T, C16186T, C16223T, C16260T, T16298C |
| 12S rRNA | A750G, A1438G, A1555G |
| 16S rRNA | A2706G, A3145G |
| ND1 | A4715G, A4769G |
| COI | T6632C, A6752G, C7028T, C7196A |
| COII | A8188G |
| ATP6 | G8584A, A8701G, A8860G, T9090C |
| COIII | T9540C |
| ND3 | A10398G, C10400T |
| ND4 | T10873C, G11719A |
| ND5 | C12705T |
| ND6 | C14668T |
| Cyt b | C14766T, T14873C, G15043A, G15301A, A15326G, A15487T, T15784C |

であり、A1555G以外の変異は、すでに報告されている多型であった。

D. 考察

純音オージオメトリーにより、種々のレベルの聴力障害が検出できた。特に、8kHzを用いることで、臨床的には難聴を示していない極めて軽度の障害を検出することが可能であった。これは、1555変異に伴う難聴をスクリーニングする際の有力な方法となる。

また、難聴を示した症例のなかでもその程度は種々であったが、その要因としてミトコンドリアDNA上の1555変異以外の多型の関与は明らかではなかった。むしろ、個々の家族に由来する小家系内ではほぼ均一であり、一方小家系間では大きく異なっていた。以上から、症状の発症や重症度に関わる核遺伝子の存在が強く示唆された。

E. 結論

1555変異を有する大家系による検討で、症状の発症や重症度は、ミトコンドリアDNA上のシス変異ではなく、核DNA上に存在する別な要因が必要であることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G. 研究発表

1. 論文発表

後藤雄一、ミトコンドリア機能異常と変性性痴呆との関連、日本臨床62巻増刊号4、220-223、2004

後藤雄一、ミトコンドリア病の分子メカニズム、Molecular Medicine、41巻、299-305、2004

後藤雄一、ミトコンドリア脳筋症の病態と治療への展望、神経治療学、21巻5号、521-528、2004

後藤雄一、ミトコンドリア病の組織診断?ゴモリ染色、活性染色、免疫染色、臨床検査、49巻1号、45-49、2005

Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S. Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside. Ann Otol Rhinol Laryngol 114: 153-160, 2005

2. 学会発表

(国際学会)

Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Novel mtDNA G3242A and G3244A mutations adjacent to a common A3243G mutation. The 52th Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Canada, 10.27, 2004

H. 知的所有権の出願・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

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蝸牛窓膜経由でモルモットの蝸牛の有毛細胞と支持細胞により安全かつ確実に遺伝子導入を行うための投与条件の検討を行った。コントロール群として未処置の蝸牛窓膜中耳側にアデノウイルスベクターを投与したところ、内耳へのどの細胞にも遺伝子導入はなされなかった。実験群は蝸牛窓膜中耳側にアデノウイルスベクターを投与する前にフェノールを滴下したが、その滴下時間を3分、7分、15分、30分と変化させて蝸牛への遺伝子導入の状況と ABR の変化を観察した。フェノールの滴下時間が3分間の条件では、蝸牛内に遺伝子導入は認められなかった。フェノールを滴下時間が7分間では2/3の動物において、蝸牛全回転の有毛細胞と支持細胞に遺伝子発現を確認できた。またフェノールの滴下時間が15分、30分間では、全動物の蝸牛の全回転において有毛細胞と支持細胞に遺伝子発現を確認できた。フェノールの滴下時間が7分間では2/3に、また15分、30分間では全例に、基底回転の下1/2のコルチ器に有毛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。ABR の変化は、4kHz では30分間フェノールを滴下した動物は、3分間および7分間フェノールを滴下した動物に比して、また12kHz では30分間フェノールを滴下した動物は、3分間、7分間および15分間フェノールを滴下した動物に比して有意に閾値が上昇した。20kHz においては、フェノールの滴下時間で、7分、15分、30分の間に有意な様認められなかった。

形態学的観察と ABR の結果より、蝸牛窓膜に15分間フェノールを滴下した後アデノウイルスベクターを投与する方法が、有毛細胞に障害を最小限度にとどめ、最も確実に遺伝子導入できると思われた。15分間フェノールを滴下した動物では、全例に有毛細胞の障害が認められるものの、支持細胞により高率に遺伝子導入されることから、すでに有毛細胞が強く障害されている高度難聴例に対し、有毛細胞再生を目的とした遺伝子治療を行なうために有用な方法と思われた。次にカナマイシンとエタクリン酸の全身投与により作成された難聴動物に対し、15分間フェノールで処理した蝸牛窓膜中耳側に p27 を down-regulation する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与し、ラセン神経節細胞の増殖の有無を観察した。現在蝸牛の回転ごとにラセン神経節細胞の数を算定し、比較検討中である。

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。内耳有毛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、有毛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方法と外リンパ腔内へ直接投与する方法がある。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。外リンパ腔内へ直接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。我々は、鼓膜麻酔液（フェノールおよび4%キシロカイン）を用いて蝸牛窓膜の outer epithelium に障害を与えて、蝸牛窓膜を破らずに蝸牛の有毛細胞と支持細胞に遺伝子導入できることを証明した。この方法は、外リンパ瘻の危険もなく、また手術方法も簡便であるため、実験方法としても非常に有用と思われるが、蝸牛窓膜中耳側を

フェノールで処置する時間が長くなるにつれ、外リンパの pH が低下して蝸牛障害が惹起されることが考えられる。本研究の目的は、ウイルスベクターを用いてより安全かつ確実に蝸牛の有毛細胞と支持細胞に遺伝子導入を行う際に、蝸牛窓膜のフェノール処置時間として適切と思われる時間を決定することである。

2) 薬剤により減少したラセン神経節細胞の再生の試み

哺乳類の蝸牛感覚細胞、支持細胞そしてラセン神経節細胞は、一旦消失すると再生しないと思われてきた。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やラセン神経節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。臨床において、高度感音難聴症例に対し、人工内耳手術が盛んに行なわれているが、ラセン神経節細胞の80-90%消失した高度障害例では聴力の改善は困難である。P27 は細胞増殖を抑制する遺伝子であり、正常マウスの蝸牛支持細胞およびラセン神経節細胞にその発現が認められている。蝸牛内の P27 の発現を down-regulation することにより、支持細胞およびラセン神経節細胞の増殖が誘導されると推察されるが、薬剤によって障害されたラセン神経節細胞が、In vivo において細胞増殖するか否かは確認されていない。障害された蝸牛のラセン神経節細胞が、In vivo において増殖する条件を見出すことは、高度感音難聴を克服する戦略として見た場合、極めて重要なことである。カナマイシンとエタクリン酸投

与により作成された蝸牛障害動物に、P27 の発現の down-regulation する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与し、ラセン神経節細胞の細胞増殖の有無を検討する。

B. 研究方法

1) 全身麻酔下に、4, 12, 20 kHz の ABR 閾値を測定した。その後、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) を $50 \mu\text{l}$ 滴下し 3(n=5), 7(n=6), 15(n=5) または 30(n=4) 分間放置後、それらをふき取り、LacZ 遺伝子組み込んだアデノウイルスベクターを $50 \mu\text{l}$ 滴下し、手術を終了した。3 日後、全身麻酔下に 4, 12, 20 kHz の ABR 閾値を測定後、断頭して側頭骨を摘出し、直ちに固定した。脱灰後パラフィン包埋し、 $4-7 \mu\text{m}$ の切片を作成した後、ABC 法を用いた免疫染色によってコルチ器内の LacZ 遺伝子の発現の有無を検討した。

2) モルモットに全身麻酔下を施した後、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、鼓膜麻酔液 (フェノールおよび4%キシロカイン) を $50 \mu\text{l}$ 滴下し7分間放置後、それらをふき取り、P27 の発現を down-regulation する遺伝子組み込んだアデノウイルスベクターを $50 \mu\text{l}$ 滴下し、手術を終了した。30 日後の全身麻酔下に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、 $6 \mu\text{m}$ の切片を作成した。トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡下に手術側と非手術側のラセン神経節細胞を算定し、検定する。

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または鼓膜麻酔液で3分間処置では、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、7分間以上鼓膜麻酔液で処置した全動物の鼓室階上皮細胞に、LacZ 遺伝子の発現が認められた。蝸牛窓膜を鼓膜麻酔液で7分間処置した動物では6匹中4匹、また15、30分間処置した全動物では全例に、蝸牛全回転の有毛細胞と支持細胞に LacZ 遺伝子の発現が認められた。蝸牛の有毛細胞と支持細胞に LacZ 遺伝子の発現が認められた全動物の基底回転、特に下方1/2に、有毛細胞の消失が認められたが、有毛細胞が消失した支持細胞にも LacZ 遺伝子の発現が観察された。ABR の結果は、4kHz では蝸牛窓膜を鼓膜麻酔で30分間処置した動物では、3分間または7分間処置した動物に比して、有意に閾値が上昇した。12kHz では、蝸牛窓膜を鼓膜麻酔液で30分間処置した動物では、3分間、7分間または15分間処置した動物に比して、有意に閾値が上昇した。20kHz でも、蝸牛窓膜を鼓膜麻酔液で30分間処置した動物に比して、閾値の上昇は有意であった。どの周波数においても、蝸牛窓膜の鼓膜麻酔液による処置時間が3分間、7分間そして15分間の間で ABR の閾値上昇に有意な差は認められなかった。

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、P27 の発現の down-regulation する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与し、蝸牛回転毎にラセン神経節細胞数を算定し、左右の変化を検定中である。

D. 考察

1) 蝸牛窓膜の outer epithelium は物質の透過性に関するバリア機能の主体となる層として知られている。outer epithelium が鼓膜麻酔液に含まれているフェノールによって障害されることにより、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たと思われた。3分間の鼓膜麻酔液による処置後、アデノウイルスベクターを投与した群では、基底回転の鼓室階の上皮およびコルチ器に LacZ 遺伝子の発現がまったく認められなかった。この結果は3分間の鼓膜麻酔液による処置では、アデノウイルスは蝸牛窓膜を通過できなかったことを示唆している。7分間以上鼓膜麻酔液による処置を行なった後、アデノウイルスベクターを投与した群では、基底回転下1/2の有毛細胞の消失したコルチ器内の LacZ 遺伝子の発現が認められた。鼓膜麻酔液が外リンパ腔へ浸透することにより、鼓室階の外リンパの pH が低下して有毛細胞が消失したと思われるが、この外リンパの pH が低下は外リンパ-内リンパ閾門の透過性の亢進を易くもたらし、それによってアデノウイルスが容易に内リンパ腔へ侵入できた可能性も考えられる。7分間鼓膜麻酔液による処置を行なった動物で LacZ 遺伝子の発現が認められなかった2匹では、基底回転下1/2の有毛細胞の消失もみられていないという結果は、pH が低下によって生じたと思われるこれらの仮説を支持するものである。今回、モルモットの蝸牛窓膜を鼓膜麻酔液によって15分間の処置することで、難聴を最小限度に抑えつつ確実にコルチ器に遺伝子導入することができた。このように、低侵襲かつ簡便にそして確実に内耳コルチ器へ遺伝子導入ができる方法が開発されたことは、今後の研究において極めて大きな意義をもつ。また蝸牛基底回転下方2分の1において、有毛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は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おり、Math1 を組み込んだアデノウイルスベクターを投与する際の理想的方法といえる。

E. 結論

1) アデノウイルスベクターを用いて、鼓膜麻酔液によって処置した蝸牛窓膜経由で、モルモットの内耳に遺伝子導入をおこなった。ABR の閾値変化と組織学的検討から、鼓膜麻酔液によって15分間処置した場合、難聴を最小限度に抑えつつ確実にコルチ器に遺伝子導入できることが判明した。

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、P27 の発現の down-regulation する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与した後のラセン神経節細胞数の変化を検定中である。

今回の研究によって、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する、また P27 の発現の down-regulation する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターの投与によって細胞増殖が誘導するといった二つの目的を達成するための投与方法が確立された。今後は、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ために、ベクターに組み込む遺伝子の選択、ベクターの選択とその投与方法をさらに検討する必要がある。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

なし

2. 学会発表

- 1) 鈴木光也, 樫尾明憲, 山俣達也, 石本晋一
: 鼓膜麻酔液による経蝸牛窓膜の内耳遺伝子導
入の検討 第104回日本耳鼻咽喉科学会総会
2004. 5. 16-18 (広島)
- 2) Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba,
Akinori Kashio. Effect of adenoviral vector gene

delivery via the round window membrane treated
with phenol. 28th ARO Mid-Winter Meeting
(2005. 2. 20-24. New Orleans, 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) Math1組み込みアデノウイルスベクターを委託して作成した。
- 2) p27^{kip1}遺伝子をdown regulationするベクターを組み込んだアデノウイルスベクターを蝸牛に投与し、蝸牛の組織学的変化（有毛細胞再生の有無）を観察した。
- 3) アデノウイルスベクター投与による内耳障害について再評価した。

A. 研究目的

老人性難聴や音響暴露、薬物による蝸牛有毛細胞の障害による感音難聴は薬物治療や手術では治療が困難であることが知られている。そのため感音難聴の新しい治療法を確立する必要がある。近年、蝸牛有毛細胞の再生には大きく遺伝子導入方法と幹細胞移植術が試みられている。我々は前者で特にアデノウイルスベクターを用いて蝸牛への遺伝子導入を試みてきた。そしてMath1遺伝子組み込みアデノウイルスベクターを蝸牛のコルチ器へ注入することでコルチ器の支持細胞から有毛細胞の再生が可能であることが証明された。この研究に関しては留学先であったミシガン大学で研究が続けられ聴力の機能改善が認められた。しかし、その聴力の改善は不十分なものであり臨床応用するには新たな取り組みが必要であると考えられる。そのため効率よいMath1遺伝子による蝸牛有毛細胞の再生、さらに新たな有毛細胞再生ベクターを用いた有毛細胞の再生を試みる必要がある。また蝸牛へのアデノウイルスベクターの投与方法も検討する必要があると考えた。そのためMath1遺伝子導入の研究を継続するとともに新たな蝸牛有毛細胞再生の可能性がある遺伝子を導入したアデノウイルスベクターを用いた有毛細胞の再生に取り組む必要がある。さらにアデノウイルスベクター投与方法を検討する実験を計画して効率よく有毛細胞の再生を実現し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したいと考え実験を計画した。

- ①有毛細胞の再生による慢性期感音難聴の治療
感音難聴のほとんどは蝸牛有毛細胞の障害によって生じる。有毛細胞の障害は過大の音響暴露・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、加齢などによって引き起こされる。そして何れの原因によっても有毛細胞の障害がひとたび生じると哺乳類では薬物などの治療では有毛細胞の再生は不可能である。そのため有毛細胞を再生を惹起させるために幹細胞移植術、アデノウイルスなどを用いた遺伝子導入が試みられている。我々は動物実験において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を用いて遺伝子導入を行い再生関連のベクターをDNAに組み込んで有毛細胞の再生を試みる（Math1他）
- ②アデノウイルスベクターの支持細胞への遺伝子導入による細胞傷害の検討

蝸牛コルチの支持細胞が有毛細胞の前駆細胞であることは最近の研究から明らかになった。そのため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する方法が適切であることと考えられている。しかし支持細胞への遺伝子

導入方法には課題が残されている。それは非常に繊細な構造であるコルチ器のある中央階に投与するために注入するという行為でその繊細な構造にダメージを与えるからである。そのためせっかく再生遺伝子を投与しても支持細胞自体が傷害を受けかねないからである。また支持細胞周囲の組織破壊もおこしかねないからである。そのため今後有毛細胞の再生による感音難聴という治療法が確立して臨床応用され、聴力回復という大きな問題を解決に取り組むにあたって投与方法を検討する必要がある。

B. 研究方法

①Math1ベクター導入アデノウイルスベクターの作成

Math1 遺伝子が蝸牛有毛細胞再生を誘導することができることは昨年kawamotoら（共著）の論文から明らかになった。この研究で使用した Math1 遺伝子導入アデノウイルスベクターを譲り受けることはできなかったため京都大学の影山教授より Math1 のプラスミドを譲り受けることができた。大腸菌を用いてプラスミドを増殖させてアデノウイルスベクターに組み込むことを行った。今後はそのアデノウイルスベクターにさまざまな増殖因子（GDNF, NT, IGF, TGF）などと併用して実験を進める。

② p27^{kip1}遺伝子抑制遺伝子導入アデノウイルスベクターの蝸牛への投与

支持細胞が有毛細胞の前駆細胞であり支持細胞を増殖できれば有毛細胞の増殖の可能性もあるため細胞増殖を惹起する遺伝子導入を行った。今回着目した遺伝子はCDK遺伝子の1つであるp27^{kip1}遺伝子である。この遺伝子は細胞周期が回転することに抑制的に働くためp27^{kip1}遺伝子をdown regulationするベクターを組み込んだアデノウイルスベクターを投与すれば細胞増殖が生じるのではないかという仮説からはじめた。そして蝸牛のコルチ器の支持細胞へ働かせるためにMath1同様中央階へ投与した。そして2ヶ月後にコルチ器で細胞増殖が起こるかどうかをsurface preparationおよび走査電顕で観察した。

③アデノウイルスベクター投与による細胞障害の検討

実験にはモルモットを用いてGFPの組み込んだアデノウイルスベクターとコントロールとして人工リンパ液を蝸牛の鼓室階（外リンパ腔）に投与した後どのように細胞死が生じるかTUNEL法を用いて検討する。TUNEL法は組織標本を作製して切片で観察するものと細胞障害の程度をsurface preparation法を用いて有毛細胞の傷害を観察して、さらにカウントを行って検討する。他の標本をロダミンで染色してsurface prepara

tion法で残存有毛細胞をカウントして細胞傷害を検討する。

C. 研究結果

①内耳有毛細胞の再生

1) Math1 遺伝子導入アデノウイルスベクターの作成はほぼ終了し、今後はモルモットを使用して増殖因子と併用して蝸牛のコルチ器に投与して有毛細胞の再生を検討していく。検討方法としては今までの実験から有毛細胞の再生は明らかになっているため ABR 及び走査電顕を中心に行う。また聴力改善のためには内耳有毛細胞の再生が重要であるため内耳有毛細胞障害モデルのある砂ねずみの虚血モデルを作成して内耳有毛細胞傷害を起こしてそこに Math1 遺伝子導入アデノウイルスベクターを投与して内耳有毛細胞の再生を検討する。特に内耳有毛細胞の再生が起こるかどうかが、さらに ABR により聴力回復がどの程度起こるか非常に興味のあるところである。再生有毛細胞の評価、検討方法は ABR 及び走査電顕で行う。

② 27^{mi} 遺伝子を down regulation するベクター (p27siRNA) を組み込んだアデノウイルスベクターは Jonathan Kil より提供を受けた。モルモットにカナマイシンとエタクリン酸を投与して有毛細胞傷害モデルを作成して、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、直接ベクターをモルモットの蝸牛の中央階に投与した。2ヶ月後に走査電顕で観察したところ支持細胞の増殖があり、有毛細胞類似の聴毛を持つ細胞も多数見出すことができた。この細胞は主に支持細胞領域に認めることができたが、聴毛は正常のものよりも短く、束になっていた。この有毛細胞類似細胞の機能に関しては今後の検討課題である。

③アデノウイルスベクター投与による細胞障害の検討

GFPベクター導入アデノウイルスベクターと人工内リンパ液をそれぞれモルモットの鼓室階に前述の方法で投与して細胞死が生じた有毛細胞を TUNEL 法で検討した。この実験においては細胞死が進行している有毛細胞は両者ともに注入して12時間後をピークに徐々に減少していくことがわかった。また人工内リンパ液とアデノウイルスベクターを注入した2群の間で細胞死が生じた有毛細胞の障害細胞数は有意差は認めなかった。また残存有毛細胞数を検討して cochleogram を作成したところ傷害された細胞数でも2群間で有意差は認めなかった。そして有毛細胞の傷害は両者ともに注入部位から1mm程度の近傍で基底回転ではほとんど認めなかった。また傷害された有毛細胞数は両群で有意差は認めなかった。

D. 考察

薬物、騒音や加齢などさまざまな要因で有毛細胞の傷害が生じて難聴になる。そして有毛細胞の傷害を主とする感音難聴は現代の医学で治療できない疾患の1つに挙げられる。それは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からである。そのためさまざまな薬剤などの治療法が試されたが薬物治療で回復することはできなかった。そして最近の分子生物学の発展から遺伝子導入方法や幹細胞移植術という新しい治療法が進められている。そして、Math1 遺伝子導入アデノウイルスベクターを蝸牛のコルチに投与することで動物実験において哺乳類においても *in vivo* で支持細胞から有毛細胞の再生が可能であることが証明された。しかし、感音難聴を治療するためには有毛細胞を効率よ

く適切な部位に再生させなければいけない。そのため更なる研究が必要であると考えられる。そのため有毛細胞の再生を惹起することが証明できた Math1 遺伝子導入アデノウイルスベクターの作成に着手した。今後は効率よく Math1 遺伝子による有毛細胞の再生をすすめて聴力改善を行い臨床応用まで発展できるように実験を進めていきたい。

Math1 遺伝子による有毛細胞の再生が哺乳類で初めて認めることができたが他の有毛細胞の再生を惹起する遺伝子の検討も必要である。そのため我々は支持細胞を増殖させれば有毛細胞の再生も起こるのではないかと推測した。細胞増殖を調整する遺伝子には CDK とよばれ細胞増殖を抑制する遺伝子がある。その中の1つ27^{mi} 遺伝子がある。27^{mi} 遺伝子を down regulation したノックアウトマウスでは外有毛細胞が4列や5列になるものが以前に報告されている。今回この事実に着目して27^{mi} 遺伝子を down regulation するベクターを組み込んだアデノウイルスベクターを中央階からコルチ器に投与した結果 Math1 以外の遺伝子に於ても有毛細胞の再生が起こることがわかった。これは画期的なことである。しかし、再生した細胞は本来の有毛細胞の形状を呈していないため今後は再生した細胞の機能評価を行う必要があると考えている。

アデノウイルスベクターの投与方法に関して検討を行ったところアデノウイルスベクター及び人工内リンパ液で細胞傷害に有意差は認めなかった。これはアデノウイルスベクターによる毒素や免疫応答による細胞傷害よりも繊細なコルチ器への細胞導入法によるダメージが非常に強いことを示している。さらにヒトの場合はアデノウイルスへの抗体を有している場合が多いので、さらに細胞傷害が強く起こる可能性があると思われる。昨年検討したように免疫抑制作用のあるステロイドなどの投与が必要であるのではないかと推測される。

E. 結論

27^{mi} 遺伝子を down regulation する遺伝子を直接コルチ器へ投与することで有毛細胞類似細胞を観察できたことで Math1 以外の遺伝子でも蝸牛有毛細胞の再生の可能性があると推測される。このことで有毛細胞再生の研究は、また一歩新たな段階に入ったといえる。今後はさらに Math1 やさまざまな有毛細胞再生に関与する遺伝子の導入、増殖因子の投与などを組み合わせてより効率よく有毛細胞の再生が起こる可能性があると推測される。この研究から機能を検討して聴力回復という大きな課題に取り組み、臨床応用に結びつけることができる日が近いと信じている。

アデノウイルスベクターの中央階への投与方法は有毛細胞再生に必要な不可欠な投与方法であるが直接繊細なコルチ器へ投与するため細胞傷害が大きい。今後は細胞傷害を最小限にとどめるような投与方法の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishimoto S. Ito K. Kondo K. Yamasoba T.

Kaga K. Does external auditory canal coordinate development of malleal manubrium in human? Archives of Otolaryngol Head Neck Surg. 2004;130:913-6

2) Ito K, Momose T, Oku S, Ishimoto S, Yamasoba T, Sugawara M, Kaga K. Cortical activation shortly after cochlear implantation. Audiol Neurootol. 2004;9:282-93.

3) 石本晋一、山嵜達也：難聴の遺伝子治療
加我君孝編：新生児聴覚スクリーニング 金原出版 127-132、2004

2. 学会発表

1) 石本晋一、近藤健二、山嵜達也、鈴木光也、加我君孝. モルモット中央階へのアデノウイルスベクター注入による細胞傷害に関する検討. 第 14 回

日本耳科学会, 2004年10月21-23日

2) 石本晋一、伊藤健、近藤健二、山嵜達也、加我君孝. 小耳症外耳道狭窄・閉鎖症における中耳奇形の側頭骨CTの解析. 第105回日本耳鼻咽喉科学会総会 2004年5月13-15日。

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 東京大学医学部分子細胞生物学専攻生化学・分子生物学講座
代謝生理化学 助教授

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、キメラマウスを作成、GLUT5ヘテロ欠損マウスを作成した。

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な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なったES細胞をサザンプ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した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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

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

若年発症糖尿病をきたすWolfram症候群は感音難聴もしばしば合併する。したがって、我々がクローニングしたWolfram症候群原因遺伝子WFS1蛋白の機能の解明は感音難聴の発症機構解明にも重要である。そこで、WFS1ノックアウトマウスを作製しWFS1機能の解析を進めた。WFS1欠損マウスから単離した膵島は、タプシガルギンやツニカマイシンなどの薬物による小胞体ストレス誘導に対してアポトーシスによるDNA断片化が増強し、小胞体ストレスに対して脆弱である。さらに、ウオルフラム症候群でみられる膵β細胞の脱落の機構を解明するため、WFS1欠損膵島の小胞体ストレス応答について野生型膵島と比較検討し、WFS1欠損膵島では、翻訳抑制、転写誘導、小胞体関連分解の3つの小胞体ストレス応答経路が増強しており、それとともにCHOPの誘導が起こり、アポトーシスに至ると考えられた。同様の細胞内イベントが、WFS1発現の多い内耳のspiral ganglion, Deiters' cell, inner hair cell, vestibular hair cellでも生じていることが推測される。

A. 研究目的

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するWolfram症候群は、感音難聴もしばしば合併する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。本研究の第1の目的はWFS1機能の解明である。

B. 研究方法

6週齢マウスより単離したWFS1欠損膵島、野生型膵島のtotal RNAを用いてaffymetrix社のDNAマイクロアレイにより、発現遺伝子の網羅的解析を行った。WFS1欠損膵島において増加あるいは減少していた遺伝子についてLight Cyclerによるreal time PCRを行った。また、小胞体シャペロンの転写誘導を担うXBP1のプライマーを作製しtotal RNAを用いてRT-PCR、電気泳動を行ない、スプライシング型XBP1 mRNA量を半定量解析した。次に膵島より抽出した蛋白を用いて小胞体シャペロンの

GRP94、翻訳抑制に関わる eIF2α、リン酸化 eIF2α、ユビキチンリガーゼであるHRD1、アポトーシスに関わる転写因子のCHOPの発現についてWestern blottingを行い比較検討した。

C. 研究結果

DNAマイクロアレイ解析により様々な小胞体ストレス関連遺伝子の増減が認められた。また、Reg遺伝子などの膵β細胞の再生に関わる遺伝子の増加も認められ、β細胞の脱落に対しての代償反応が起こっているものと考えられた。小胞体ストレス関連遺伝子についてはreal time PCRにより変動を定量し、小胞体関連分解において重要なED EM、CHOPなどで有意な増加が確認された。また、WFS1欠損膵島において、スプライシング型XBP1 mRNA発現の約2倍の増加が認められた。Western blotでは、GRP94は野生型群と比較して明らかな増加傾向は認められなかったが、eIF2α、リン酸化 eIF2α はともに野生型群と比較して増加傾向を認めた。さらにHRD1、CHOPともに有意な増加を認めた。

D. E 結論・考察

WFS1欠損では、XBP1の増加に示される転写誘導系、eIF2α に示される翻訳抑制系および、EDEM やHRD1の増加に示される小胞体関連分解系の3つの小胞体ストレス応答経路の増強が膵島において認められた。その結果、CHOPの誘導もみられアポトーシスに至るものと考えられた。同様の細胞内イベントが、WFS1発現の多い内耳の細胞でも生じており、感音難聴を来していることが推測される。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. Hum Mol Genet. 13:1159-1170, 2004
2. Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, and Oka Y. Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. Biochem Biophys Res Commun 325: 250-256, 2004

2. 学会発表

1. 田村明、石原寿光、高橋累、山口賢、山田高弘、武井大祐、檜尾好徳、鈴木進、荻原健英、片桐秀樹、佐藤謙、岡芳知. WFS1 欠損マウスの解析: 系統差とアポトーシスの亢進. 第47回日本糖尿病学会年次学術集会, 2004年5月13-15日, 東京

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>Yamasoba T</u> , <u>Pourbakht A</u> , <u>Sakamoto T</u> , <u>Suzuki M</u> . | Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift | Neurosci Lett | | in press | |
| <u>Yamasoba T</u> , <u>Tsukuda K</u> . | Ototoxicity after use of neomycin ear drops is unrelated to A1555G point mutation in mitochondrial DNA. | J Otol Laryngol | 118 | 546-550 | 2004 |
| <u>Karino S</u> , <u>Hayashi N</u> , <u>Aoki S</u> , <u>Ohtomo K</u> , <u>Yamasoba T</u> | New method of reconstructed images for assessment of patency of intracochlear spaces for cochlear implant candidates. | Laryngoscope | 114 | 1253-1258 | 2004 |
| <u>Ito K</u> , <u>Momose T</u> , <u>Oku S</u> , <u>Ishimoto SI</u> , <u>Yamasoba T</u> , <u>Sugasawa M</u> , <u>Kaga K</u> . | Cortical activation shortly after cochlear implantation. | Audiol Neurootol | 9 | 282-293 | 2004 |
| <u>Ishimoto S</u> , <u>Ito K</u> , <u>Kondo K</u> , <u>Yamasoba T</u> , <u>Kaga K</u> . | The role of the external auditory canal in the development of the malleal manubrium in humans. | Arch Otolaryngol Head Neck Surg | 130 | 913-916 | 2004 |
| <u>石本晋一</u> 、 <u>山嵜達也</u> | 難聴の遺伝子治療 | 加我君孝編： 新生児聴覚スクリーニング。 金原出版 | | 127-132 | 2004 |
| <u>Sakamoto T</u> , <u>Kondo K</u> , <u>Yamasoba T</u> , <u>Suzuki M</u> , <u>Sugasawa M</u> , <u>Kaga K</u> | Overexpression of ErbB-2 protein in human middle ear cholesteatomas | Laryngoscope | 114 | 1988-1991 | 2004 |
| <u>Ishihara H</u> , <u>Takeda S</u> , <u>Tamura A</u> , <u>Takahashi R</u> , <u>Yamaguchi S</u> , <u>Takei D</u> , <u>Yamada T</u> , <u>Inoue H</u> , <u>Soga H</u> , <u>Katagiri H</u> , <u>Tanizawa Y</u> , <u>Oka Y</u> . | Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. | Hum Mol Genet | 13 | 1159-1170 | 2004 |
| <u>Yamaguchi S</u> , <u>Ishihara H</u> , <u>Tamura A</u> , <u>Yamada T</u> , <u>Takahashi R</u> , <u>Takei D</u> , <u>Katagiri H</u> , <u>Oka Y</u> . | Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. | Biochem Biophys Res Commun | 325 | 250-256 | 2004 |
| <u>Matsunaga T</u> , <u>Kumanomido H</u> , <u>Shiroma M</u> , <u>Goto Y</u> , <u>Usami S</u> . | Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside. | Ann Otol Rhinol Laryngol | 114 | 153-160 | 2005 |

| | | | | | |
|------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------|------|
| 後藤雄一 | ミトコンドリア機能異常と変性 性痴呆との関連 | 日本臨床 | 62 巻 増 刊 号4 | 220-2 23 | 2004 |
| 後藤雄一 | ミトコンドリア病の分子メカニ ズム | Molecular Medicine | 41 巻 | 266-2 68 | 2004 |
| 後藤雄一 | ミトコンドリア脳筋症の病態と 治療への展望 | 神経治療学 | 21 巻 5号 | 521-5 28 | 2004 |
| 後藤雄一 | ミトコンドリア病の組織診断- ゴモリ染色、活性染色、免疫染 色 | 臨床検査 | 49 巻 1号 | 45-49 | 2005 |

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル | 書籍全体の 編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|----------------|-------------------|---------|------|-----|------|-----|
| 後藤雄一 | ミトコンドリ ア脳筋症 | 山口徹、北原 光夫(総編集) | 今日の治療指針 | 医学書院 | 東京 | 2004 | 657 |