

GJB2 変異による難聴：臨床像と細胞導入による検討

分担研究者：宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：小口智啓、大塚明弘、大島章、橋本繁成、（信州大学耳鼻咽喉科）、
阿部聡子（あべ耳鼻咽喉科）、小林有美子（岩手医大耳鼻咽喉科）、
長井今日子（群馬大学耳鼻咽喉科）、松永達雄（東京医療センター
耳鼻咽喉科）、岩崎聡（浜松医大耳鼻咽喉科）、中川尚志（九州大学
耳鼻咽喉科）

研究要旨

先天性難聴の主たる原因として注目されている GJB2（コネキシン 26）遺伝子変異について、日本人難聴患者に見いだされた変異と臨床像との関連性を比較検討した。また日本人に高頻度で検出される遺伝子変異を細胞導入することで変異蛋白の細胞内局在について比較検討した。

biallelic な変異が見出された 60 症例の遺伝子型/表現型の関連について比較検討した結果、遺伝子変異の組み合わせにより、難聴の重症度に差が見られることが明らかになった。すなわち 235delC が関与する症例では高度難聴症例が多数を占めており、V37I が関与する症例では難聴は軽度～中等度であった。また inactivating mutation（欠失変異およびナンセンス変異）が関与する症例では non-inactivating mutation（ミスセンス変異）が関与する症例に比較して難聴の程度が高度であることが明らかになった。細胞導入による検討では wt を導入した細胞では細胞膜上に斑点状に蛋白の局在が認められた。多型と知られている V27I、及び軽度～中等度難聴を示す V37I も wt と類似した細胞内局在を示した。一方 235delC では、蛋白は細胞膜状には発現せず核周辺に凝集して認められた。今回の結果から、変異の種類によって蛋白発現様式、すなわちギャップ結合の機能に差が生じ、それが難聴の程度の差になっている可能性が推測された。

研究目的

GJB2（コネキシン 26）遺伝子変異は先天性難聴の主たる原因の一つとして現在注目されている。現在 90 種類以上の変異が報告されているが、遺伝子変異と臨床像との関連についてはまだ明らかになっていないのが現状で

ある。我々は、日本人難聴患者に見出された変異と臨床像との関連について検討すると共に、日本人に高頻度で検出される 235delC と V37I 変異に関して、Cx26 変異蛋白の細胞内局在について検討した。

研究方法

日本国内 7 施設より集められた難聴患者に関し採血献体から得られた DNA sample を直接シーケンスし、コネキシン 26 の biallelic な遺伝子変異を持つ症例 (60 症例) を検出、その患者の臨床像である難聴の重症度を比較した。また、培養細胞より抽出された cDNA を用いて、wild type と日本人に高頻度に検出される遺伝子変異である 235delC と V37I、polymorphism (遺伝子多型) である V27I を作成、それぞれ融合タンパク質ベクターである pEGFP-C2 に組み込み培養細胞 COS-7 細胞に導入し発現させ、蛋白の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。

倫理面への配慮

- (1) 遺伝子診断、検査に際しては同意書を作成し研究対象者のインフォームドコンセントを得ている。
- (2) 当該研究課題に関しては各施設の倫理委員会で承認されている。

研究結果および考察

biallelic な変異が見出された 60 症例の遺伝子型/表現型の関連について比較検討した結果、235delC homozygote 症例と V37I homozygote 症例、235delC/other mutation と V37I/other mutation、inactivating mutation/inactivating mutation と non-inactivating mutation/non-inactivating mutation それぞれに聴力像に有意な差が認められた。すなわち 235delC が関与する症例では高度難聴症例が多数を占めているのに対し、

V37I が関与する症例では難聴は軽度～中等度であった (図 1)。また inactivating mutation (欠失変異およびナンセンス変異) が関与する症例では non-inactivating mutation (ミスセンス変異) が関与する症例に比較して難聴の程度が高度であることが明らかになった (図 1)。また今回 wt、V27I、V37I、235delC 変異を実際に培養細胞に導入し蛋白を強制発現させ細胞内局在を検討したところ、wt を導入した細胞では細胞膜上に斑点状に蛋白の局在が認められた。多型と知られている V27I、及び軽度～中等度難聴を示す V37I も wt と類似した細胞内局在を示した。一方 235delC では、蛋白は細胞膜状には発現せず核周辺に凝集して認められた (図 2)。今回の結果から、変異の種類によって蛋白発現様式、すなわちギャップ結合の機能に差が生じ、それが難聴の程度の差になっている可能性が推測された。

結論

現在多数の自治体で新生児難聴スクリーニングが開始されており、難聴を早期発見されるようになってきた。難聴の診断後、重症度に応じて補聴器や人工内耳による治療を行うことで言語習得が可能となるが、早期に難聴の程度を予測することは困難である。遺伝子検査により難聴の重症度が予測でき、早期診断、早期治療に結びつけることができれば、治療法の選択に際し有用な情報になりうる可能性が考えられた。

研究発表

Oguchi T, Ohtsuka T, Hashimoto S, Oshima A, Abe S, Kobayashi Y, Nagai K, Matsunaga T, Iwasaki S, Nakagawa T, Usami S, Clinical features of patients with *GJB2* (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns, J Hum Genet (in press).

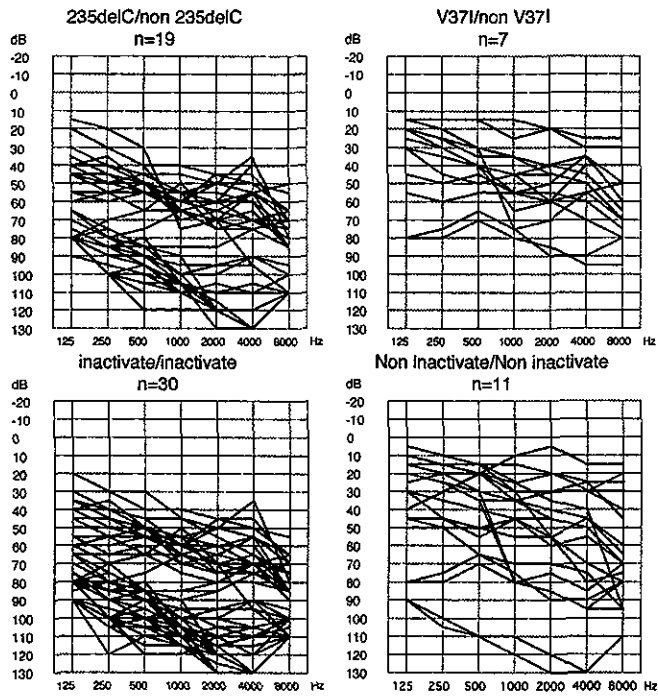


図1 遺伝子変異のパターンと聴力像

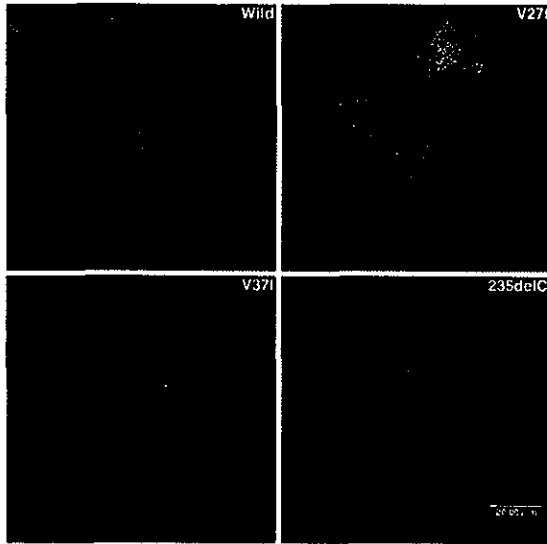


図2 各変異と細胞内局在パターン

ミトコンドリア遺伝子 961delT 変異における難聴の頻度 および臨床像の検討

分担研究者：宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：小林克彦、小口智啓、浅村賢二、宮川麻衣子（信州大学耳鼻咽喉科）、
宝来聡（総合大学院大学）、阿部聡子（あべ耳鼻咽喉科）

研究要旨

最近、ミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子内の 961delT 変異も同様にアミノ配糖体抗生物質による難聴と関連するという報告があるが、詳細に関しては未だ不明な点も多い。本研究では難聴患者における 961delT 変異の頻度をスクリーニングし、見出された 961delT 変異患者の変異ミトコンドリア（ヘテロプラスミー）の割合、聴力像、家系内での変異保有者の有無を検討し、アミノ配糖体抗生物質による難聴との関連性を検討した。難聴者群の 1.6%-2.1%に 961delT 変異が認められた。しかしながら難聴者群との間で有意差は認められなかった。961delT 変異を認めた患者のヘテロプラスミーの割合は 97-100%であり、ほとんどのミトコンドリアが変異型であることが明らかになった。しかしながら今回の検討では変異を持つ患者の聴力は正常から高度難聴まで様々でありヘテロプラスミーの割合との相関は認められなかった。また家系内でも必ずしも難聴と変異の相関はなく、961delT 変異が難聴の原因となる証拠は見出せなかった。アミノ配糖体抗生物質との関連性についても高感受性との関連が明らかとなっている 1555A>G 変異と比較したところ、1555A>G の頻度はアミノ配糖体投与歴のある難聴者群で有意に高くアミノ配糖体抗生物質との関連性が再確認されたが、961delT 変異ではアミノ配糖体投与歴の有無で有意差はなく、アミノ配糖体抗生物質との関連性は見出されなかった。

研究目的

アミノ配糖体抗生物質による難聴はある特定の家系に集積して見られることから、その感受性には遺伝的要因が関与することが示唆されてきた。近年の分子遺伝学の発達によりミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子内の変異（1555A>G）が感受性に関与していることが明らかになってきた。最近、同じくミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子内の 961delT 変異も同様にアミノ配糖体抗生物質による難聴と関連

するという報告があるが、詳細については未だ不明な点も多い。そこで我々は難聴患者における 961delT 変異の頻度をスクリーニングし、見出された 961delT 変異患者の変異ミトコンドリア（ヘテロプラスミー）の割合、聴力像、家系内での変異保有者の有無を検討し、アミノ配糖体抗生物質による難聴との関連性を検討した。

研究方法

(1) Group 1: 334名の難聴者群、Group 2: アミノ配糖体投与歴のある61名の難聴者群、Group 3: 臨床像の判明している176名のコントロール群、Group 4: 臨床像が不明である334名のコントロール群、の4つのGroupを対象に検討をおこなった。

(2) RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法および直接シーケンス法にて961delT変異を検出した(図1)。

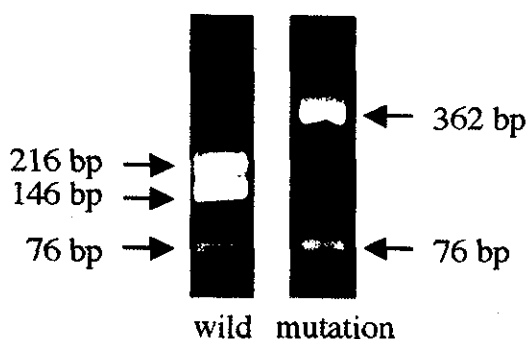


図1 RFLP法による961delT変異の同定

(3) 変異を認めたサンプルにおいて、蛍光標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅された産物を制限酵素(MnlI)にて処理を行った。6%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、正常(216bp)、変異型(362bp)の割合をスキャナー(FM-BIO II)で検出し、ヘテロプラスミー割合を算出した。

倫理面への配慮

(1) 遺伝子診断、検査に際しては同意書を作成し研究対象者のインフォームドコンセントを得ている。

(2) 当該研究課題に関しては信州大学医学部倫理委員会で承認されている。

研究結果および考察

難聴患者群では、それぞれGroup 1では7例(2.1%)に、Group 2では1例(1.6%)に961delT変異を認めた。しかしながらコントロール群でもGroup 3では8例(1.1%)、Group 4では8例(2.2%)に変異が見られ難聴者群との間で有意差は認められなかった。961delT変異を認めた患者のヘテロプラスミーの割合は97-100%であり、ほとんどのミトコンドリアが変異型であることが明らかとなった。従来からMELASや糖尿病を伴う難聴の原因となる3243変異にはヘテロプラスミーの存在が報告されており、各臓器におけるヘテロプラスミーの割合がある一定閾値を超えると症状が出るとされ、変異型の割合が多くなるとより強い症状が出るとされている。しかしながら今回の検討では変異を持つ患者の聴力は正常から高度難聴まで様々でありヘテロプラスミーの割合と相関は認められなかった(図2)。

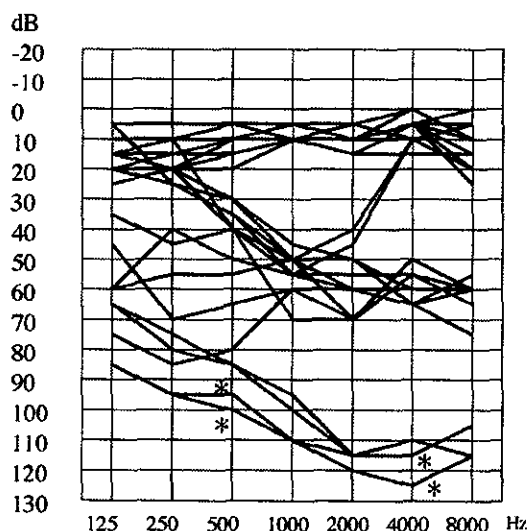


図2 961delT変異を持つ患者の聴力像

また家系内で必ずしも難聴と変異の相関はなく、961delT 変異が難聴の原因となる証拠は見出せなかった。アミノ配糖体抗生物質との関連性についても高感受性との関連が明らかとなっている 1555A>G の頻度はアミノ配糖体投与歴のある難聴患者群 (Group 2) で有意に高く (Group 1 : 2.7%、group 2 : 18%) アミノ配糖体抗生物質との関連性が再確認された。一方、961delT 変異ではアミノ配糖体投与歴の有無で有意差はなく (Group 1 : 2.1%、group 2 : 1.6%) アミノ配糖体抗生物質との関連性は見出されなかった。

結論

ミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子内の 961delT 変異と難聴/アミノ配糖体抗生物質による難聴との関連性について検討したところ、正常コントロールとの間に有意差は認められず、難聴/アミノ配糖体抗生物質による難聴とは関連ないことが明らかになった。

研究発表

Kobayashi K, Oguchi T, Asamura K, Miyagawa M, Horai S, Abe S, Usami S, Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation, *Auris Nasus Larynx* (in press).

Type IX コラーゲンノックアウトマウスに見られた 進行性難聴と蓋膜の形態的变化

分担研究者：宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：鈴木伸嘉、浅村賢二、菊池安剛、工藤（信州大学耳鼻咽喉科）、

阿部聡子（東京大学医科学研究所）、

林利彦、今村保忠（東京大学大学院総合文化研究科）、

Attila Aszodi, Reinhard Fässler (Max Planck 研究所)

研究要旨

IX 型コラーゲンは II、IV、V、XI 型コラーゲンとともに、内耳における構成要素として重要な役割を担っていると考えられている。近年 II、IV、XI 型のコラーゲン遺伝子の変異により難聴を来すことが報告され、コラーゲン遺伝子群が難聴の原因遺伝子として注目されるようになってきた。本研究では IX 型コラーゲンと難聴との関連性を検討するために IX 型コラーゲンノックアウトマウスを用い蓋膜の形態学的異常の有無を観察するとともに聴性脳幹反応検査（ABR：auditory brainstem response）を用いて難聴の経時的変化を検討した。ノックアウトマウスは 1 ヶ月齢で難聴が認められ、月齢が進むにつれて難聴は進行し 6 ヶ月齢のノックアウトマウスでは高度感音難聴をきたすことが明らかになった。光学顕微鏡にて内耳の蓋膜を観察したところ、ノックアウトマウスの蓋膜はコントロールのマウスの蓋膜に比べて、収縮、肥厚していた。この蓋膜の変化は内耳の basal turn で特に顕著に認められた。また蓋膜の形態異常は basal turn から始まり、徐々に頂部方向に進んでいることが明らかになった。月齢とともに蓋膜の形態異常の範囲が拡大する所見は、進行する感音難聴と関連があると考えられた。電子顕微鏡学的検討では蓋膜のコラーゲン繊維の不整が認められ、それが原因となって蓋膜の形態異常が引き起こされていると考えられた。

研究目的

IX 型コラーゲンは II、IV、V、XI 型コラーゲンとともに、内耳における構成要素として重要な役割を担っていると考えられている。近年 II、IV、XI 型のコラーゲン遺伝子の変異により難聴を来すことが報告され、コラーゲン遺伝子群が難聴の原因遺伝子として注目されるようになってきた。IX 型コラーゲンと難聴との関連性を検討するために IX 型コ

ラーゲンノックアウトマウスを用い蓋膜の形態学的異常の有無を観察するとともに ABR（聴性脳幹反応検査：auditory brainstem response）を用いて難聴の経時的変化を検討した。

研究方法

実験には生後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月の IX 型コラーゲンノックアウトマウスを用いた。コントロールとして同じ週齢の同系統マウスを

用いた。①2%グルタルアルデヒドにて蝸牛を固定し、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用い蓋膜の形態異常の有無を検討した。

②各週齢のマウスの ABR を記録し難聴の経時的变化を記録した。

研究結果および考察

ノックアウトマウスでは1ヶ月齢で難聴が認められた。さらに、月齢が進むにつれて難聴は進行し6ヶ月齢のノックアウトマウスでは高度感音難聴をきたすことが明らかになった。光学顕微鏡にて内耳の蓋膜を観察したところ、ノックアウトマウスの蓋膜はコントロールのマウスの蓋膜に比べて、収縮、肥厚していた。この蓋膜の変化は内耳の basal turn で特に顕著に認められた。蓋膜の厚さを計測し、月齢(1, 3, 6ヶ月齢)ごとにコントロールマウスと比較検討したところ、basal turn は1ヶ月齢から形態異常を認めていたが、middle turn は1ヶ月齢では形態上の変化は認められなかった。3ヶ月齢のノックアウトマウスでは、middle turn の蓋膜に形態異常が認められた。このことは蓋膜の形態異常が basal turn から始まり、徐々に頂部方向に進んでいることを示している。月齢とともに蓋膜の形態異常の範囲が拡大する所見は、進行する感音難聴と関連があると考えられた。電子顕微鏡学的検討では蓋膜のコラーゲン繊維の不整が認められ、それが原因となって蓋膜の形

態異常が引き起こされていると考えられた。

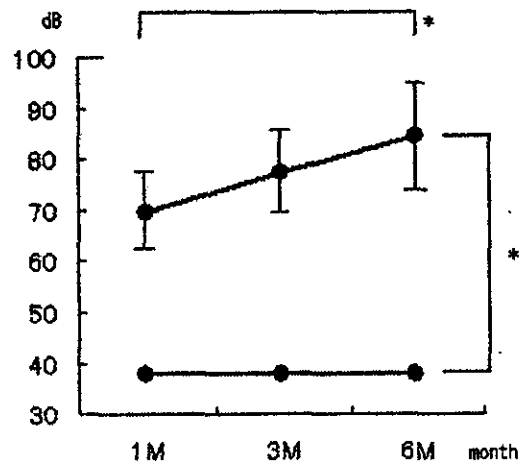


図1 Type IX コラーゲンノックアウトマウスに認められた進行性難聴

結論

Type IX コラーゲンノックアウトマウスは進行性難聴と進行性の蓋膜形態的变化を呈することが明らかになった。本研究により Type IX コラーゲンが聴力に重要な機能的役割を果たしていることが明らかになった。

研究発表

Suzuki N, Asamura K, Kikuchi Y, Takumi Y, Abe S, Imamura Y, Hayashi T, Aszoli A, Fasler R, Usami S, Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss, Neuroscience Research (in press).

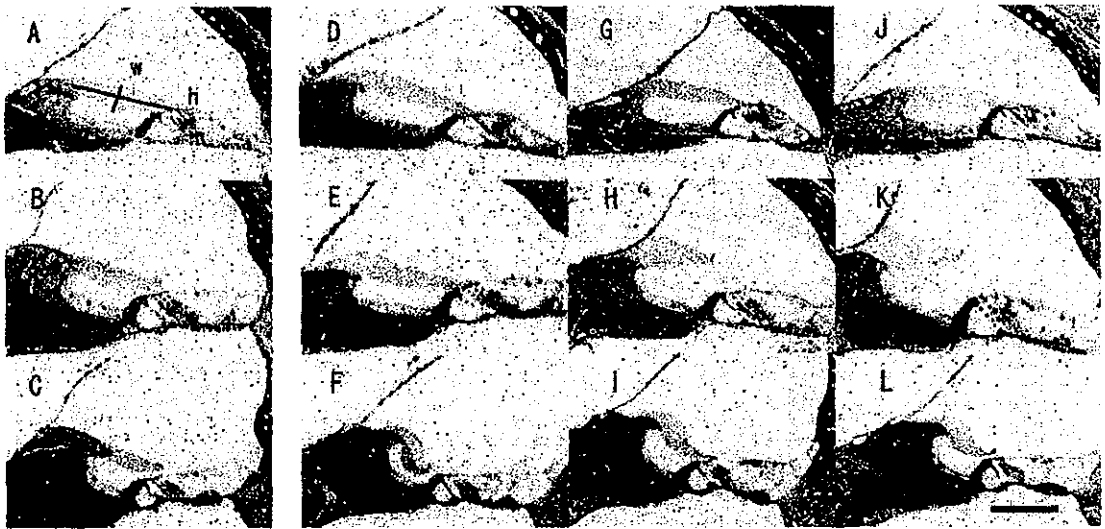


図2 Type IX コラーゲンノックアウトマウスの形態的变化

上段: apical turn 中段: middle turn 下段: basal turn

ABC: 正常コントロール DEL: ノックアウトマウス 1M GHI: ノックアウトマウス 3M

SKL: ノックアウトマウス 6M

COL9A3 遺伝子の変異解析

分担研究者：宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：浅村賢二、福岡久邦（信州大学耳鼻咽喉科）

中村祐輔、阿部聡子（東京大学医科学研究所）

研究要旨

内耳に特異的あるいは高発現している遺伝子は難聴の原因遺伝子である可能性が高く、最近 cDNA マイクロアレイ発現解析を用いた方法によってヒト内耳（蝸牛・前庭）に特異的・高発現を示す遺伝子群が明らかにされ、その中から実際に難聴の原因遺伝子が同定されている。本論文ではその遺伝子群の中で COL9A3 遺伝子に注目し、非症候群性難聴患者を対象に変異スクリーニングを行った。その結果、2 つの病的変異が同定され難聴の原因遺伝子である可能性が示唆された。

研究目的

内耳に特異的あるいは高発現している遺伝子は難聴の原因遺伝子である可能性が高く、実際にいくつかの難聴原因遺伝子が同定されている。COL9A3 遺伝子は内耳に高発現している遺伝子群の 1 つであることが cDNA マイクロアレイによって確認された。COL9A3 遺伝子がコードする IX 型コラーゲン蛋白は内耳コルチ器の蓋膜において、II 型および V 型コラーゲンと共に重要な構成成分であることが知られており、重要な役割を担っていると予想される。今回この COL9A3 遺伝子について、非症候群性難聴患者を対象に変異スクリーニングを行った。

研究方法

日本人および韓国人の非症候群性難聴患者計 159 名を対象とした。対象患者の内訳は常染色体優性およびミトコンドリア遺伝家系 95 家系、常染色体劣性遺伝家系 15 家系、孤発難聴症例 49 家系であった。コントロール群は聴力の正常な 150 名とした。COL9A3 遺伝

子のそれぞれのエクソンに対するプライマーを作成し、直接シーケンス法により遺伝子変異を検索した。変異の同定されたエクソンについては、コントロール群にて変異の有無を確認した。

倫理面への配慮

(1) 遺伝子診断、検査に際しては同意書を作成し研究対象者のインフォームドコンセントを得ている。

(2) 当該研究課題に関しては信州大学医学部倫理委員会で承認されている。

研究結果および考察

変異解析の結果、2 つの病的変異と 5 つの polymorphism が同定された。病的変異が疑われる 1 つはエクソン 11 に 9bp deletion のホモ変異として同定された。この変異は両側中等度進行性感音難聴をもつ家系に見つかり、両親が近親婚であることから劣性遺伝である可能性が示唆された (図 1)。もう 1 つはエクソン 31 にミスセンス変異として日本人と

韓国人の 2 家系より同定され、優性遺伝である可能性が示唆された (図 2)。いずれの変異もこれまでに報告がなく、コントロール群に発見されなかったことや、変異部位がマウスやニワトリなどの種を越えて保存されており機能的に重要であると考えられること、難聴のパターンが IX 型コラーゲンのノックアウトマウスで認められた難聴のパターンと類似していることなどから難聴の原因遺伝子である可能性が示唆された。これまでに難聴との関連で II 型コラーゲンや XI 型コラーゲンの異常による Stickler 症候群や、IV 型コラーゲンの異常による Alport 症候群などが報告されており、コラーゲンと難聴との関連が注目されてきている。IX 型コラーゲンは内耳では蓋膜への局在が報告されており、IX 型コラーゲンのノックアウトマウスを用いた研究では蓋膜を構成する繊維の異常により全体が変形し、進行性の難聴をきたすことが明らかとなっており、今回の結果と類似するも

のであった。

結論

内耳に高発現する COL9A3 遺伝子の変異解析を行ったところ、2 種類の変異が同定されたことより、COL9A3 遺伝子が難聴の原因遺伝子である可能性が示唆された。

研究発表

Asamura K, Abe S, Fukuoka H, Nakamura Y, Usami S, Mutation analysis of COL9A3, a gene highly expressed in the cochlea, in hearing loss patients, ANL (in press).

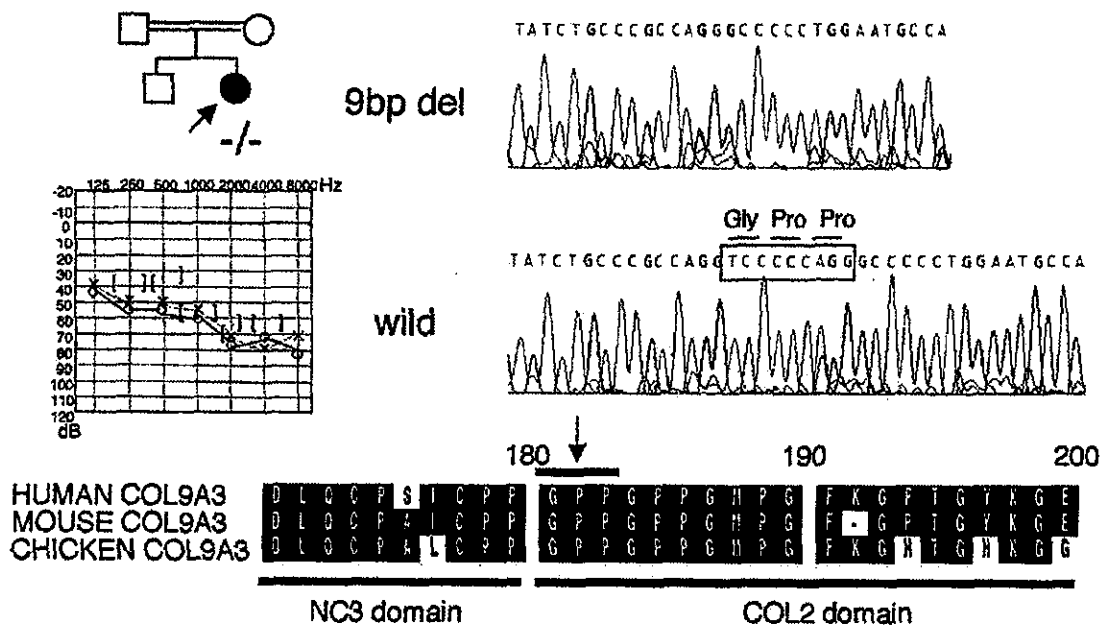


図 1 劣性遺伝形式をとる家系に見出された 9bp del 変異

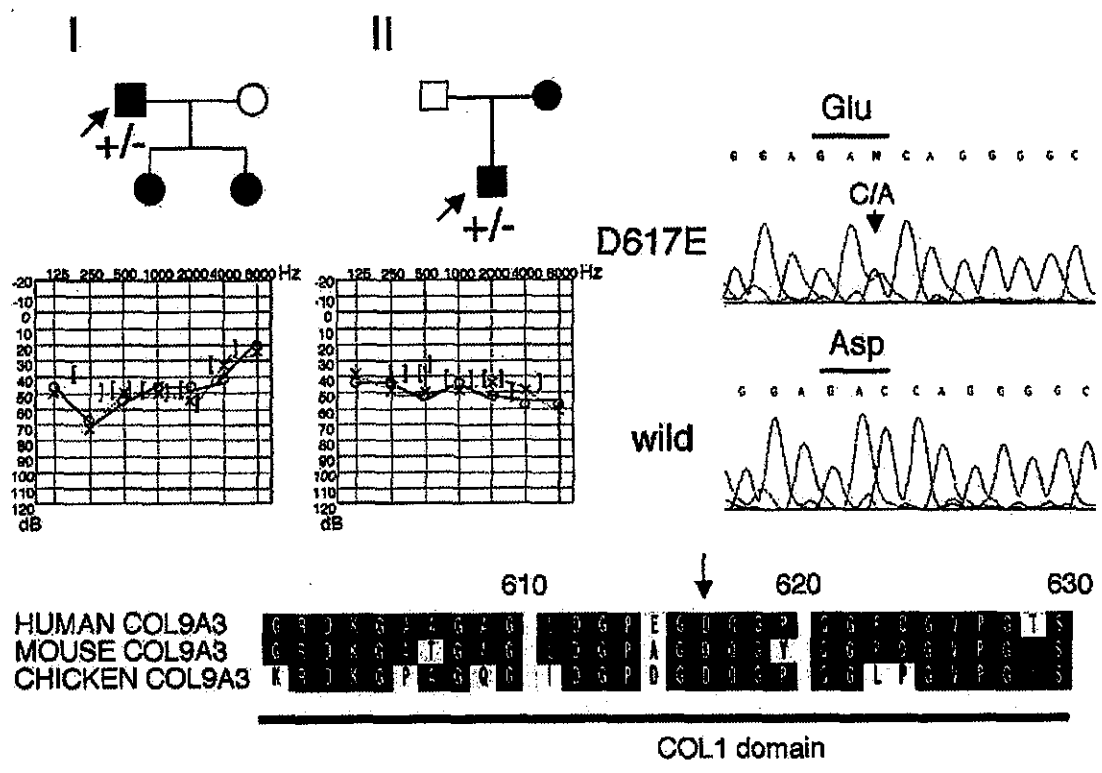


図2 優性遺伝形式をとる家系に見出された D617E 変異

siRNA を用いた内耳遺伝子治療に関する基礎的研究

分担研究者 福島邦博 (岡山大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科)
共同研究協力者 前田幸英 (岡山大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科)

研究要旨

聴覚障害の最も頻度の高い原因である感音難聴については、未だ根本的な治療法が確立されておらず、その対策を立てることは急務である。難聴の原因のうちで、進行性感音難聴を示すものには、優性遺伝性を示すものがあり、この中には病的遺伝子の dominant negative 効果によって、難聴が進行性に生じるものがあることが推定されている。我々は今まで、siRNA を用いた系によって、こうした病的遺伝子の発現抑制を行う方法を *in vitro* の系で行ってきた。こうした研究を踏まえて、今回は、遺伝性難聴のモデルマウスを作成し、siRNA を用いた *in vivo* での実験でもこうした病的遺伝子を、配列特異的に発現抑制を行うことが可能であることを示した。また、*in vivo* での実験ではこうしたモデル動物の聴力が、コントロールと比較して有意に改善しうることを示した。

研究目的

聴覚障害は、人口の5%を占めると言われる非常に頻度の高い障害であり、その多くは内耳性難聴である。内耳機能が損なわれる原因には様々なものがあるが、常染色体優性遺伝の場合には、病的遺伝子の産物が、正常な遺伝子産物の働きを阻害することによって機能低下を生じさせる、いわゆる dominant negative 効果によって難聴が生じる場合があることが推定されている。我々は、昨年度までの研究過程において、いわゆる先天性難聴の原因疾患として最も頻度の高い GJB2 の遺伝子発現を siRNA によって制御する方法について報告してきた。昨年までの研究では、ヒト培養細胞およびマウスを用いて GJB2 遺伝子に対して特異的に発現抑制をする siRNA を作成し、*in vitro* での実験に成功した。本年度は、マウスの中耳経由で病的遺伝子である GJB2R75W を内耳に発現させ、聴力低下が

生じることを確認した後、siRNA を用いることによってこうした聴力低下が抑制できるかどうかを検討した。

研究方法

siRNA の使用

前回の報告で作成したマウス用 siRNA 4種の配列を参考に、ヒト GJB2R75W に特異的な siRNA を作成した。また、GAPDH 用およびランダムな配列を用いた negative control siRNA を陰性コントロールとして用いた。(Ambion, Inc) 一部の siRNAs は、Cy3-labeling kit (Ambion) を用いて、蛍光ラベルした。作成した siRNA は、リポソームに封入して 200 μ M の濃度で投与した。実際の取り込みには Silencer transfection reagent (Ambion) を用いた。mRNAs の定量には、RT-PCR を用いた。

R75W の co-transfection

GJB2 の常染色体優性遺伝の原因となる遺伝子異常として知られる R75W と eGFP を含んだベクターの Co-transfection には、lipofectamine2000 (Clontech) を用いた。

動物モデルの作成と使用: マウスには、1) GJB2R75W-eGFP を投与した疾患モデル群、2) コントロールの RNA を用いた sham operation 群、3) GJB2R75W-eGFP と、これに対する病態遺伝子特異的 siRNA を投与する群の 3 群に分けて検討した。

これらの手術群について、それぞれの聴力を聴性脳幹反応によってその変化を検討した。

結果

この GJB2siRNA2 ではトランスフェクトした GJB2-eGFP の R75W 遺伝子発現を、コントロールと比較して 85% 程度の割合で抑制した。内因性の、すなわちマウスゲノム遺伝子由来の GJB2 遺伝子についてはほとんど遺伝子発現の抑制を認めなかった。

各群 8 匹のマウスによる聴性脳幹反応検査の結果では、コントロール siRNA 投与群と比較して、疾患特異的遺伝子に対する siRNA 投与群では有意に聴力が改善し、コントロール群との有意差が認められないレベルまで改善していた。

考察

常染色体優性遺伝性難聴の場合、しばしば、変異の加わった遺伝子の産物が、正常な他の遺伝子産物の機能を抑制し、症状を発症するといういわゆる dominant negative 効果による発症機序を示すものがあることが知られている。GJB2 によってコードされているタン

パクのコネキシン 26 は、他のコネキシンと 6 量体を形成してヘミチャンネルを作り、隣接する細胞との間でさらに結合してギャップ結合を形成している。R75W 変異は、ヒトの常染色体優性遺伝性感音難聴家系から検出された突然変異で、おそらくはこのヘミチャンネルの機能を破壊する dominant negative 変異であると考えられている。通常ヒトで頻度の高い GJB2 の遺伝子異常は、常染色体劣性であり、50% の発現量があれば聴力に関しては正常の機能が保持されることが考えられる。従って、この変異遺伝子自体を抑制することが出来れば、機能を改善することが出来るはずである。

今まで我々が行ってきた in vitro の実験だけでなく、in vivo でも siRNA を用いて病的遺伝子の発現がコントロールできることを示した。また、その結果が聴力に反映され、siRNA 投与によって難聴が効果的に予防できることが示された。これは、遺伝子治療によって遺伝性難聴の発生が予防出来ることを示したはじめての報告であり、今後臨床応用を前提とした技術開発に力を入れていきたい。

結論

マウス培養細胞を用いた系を用いて、ヒトで遺伝性難聴の原因となっている R75W 遺伝子異常を有する遺伝子を、in vivo によって異常遺伝子特異的に発現抑制を行うことができた。siRNA によって、病的遺伝子特異的に発現を抑制し、その機能の改善を ABR によって家訓することが可能であった。

健康危険情報

該当無し

研究発表

1. 論文発表
現在投稿中
2. 学会発表
2004 年 molecular biology of hearing and

deafness, Bethesda, MA USAにて発表

知的財産権の出願・登録状況
該当無し

正円窓經由遺伝子投与による難聴モデルマウスの作製

分担研究者 福島邦博 (岡山大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科)

研究協力者 前田幸英 (岡山大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科)

研究要旨

マウス中耳にリポソーム封入したベクターを投与し、その表現型について検討したので報告する。ヒトで常染色体優性遺伝性難聴の原因遺伝子であることが確認されている *GJB2R75W* 変異遺伝子と GFP の融合蛋白を発現する発現ベクターを作成し、これをリポソーム封入して中耳正円窓付近に留置した。GFP の発現は、コルチ器とラセン板縁に認められた。また、ABR では聴力は低下していることが確認され、さらに行動異常からは前庭機能の異常が疑われた。手術操作自体によって生じた聴力低下はごく軽度で、この手法自体によって生じる内耳の機能異常はごく軽度であることが推測された。経正円窓的リポソーム封入遺伝子投与は、内耳の遺伝子治療の方法として有効であり、同時に遺伝子異常の *in vivo* スクリーニング法として有用であることが示された。

研究目的

内耳は、内耳骨包によって隔絶された臓器であり、遺伝子治療を行なってもその影響が他に及びにくいと、少ない副作用での治療的応用の可能性が示唆されてきた。しかし、その事実は逆に内耳へ遺伝子を投与するアプローチ自体に制限があることを意味し、特に聴力を保存したまま蝸牛に遺伝子を入れることは非常に困難であることが予想されている。今まで報告の見られる内耳、特に蝸牛局所への遺伝子投与の方法としては、従来 1) 蝸牛内に直接投与する方法、2) 外側半規管から投与する方法、3) 内リンパ嚢から投与する方法などが検討されてきた。これらの方法ではしかし、蝸牛に影響を与えないで治療をすることは困難であり、聴力の低下は避けがたいと考えられた。今回われわれは、聴力に影響を与えないで内耳に遺伝子を投与する手法のひとつとして、リポソームに封入した遺伝子を中耳に投与し、正円窓經由で内耳への遺

伝子投与を行ったので報告する。また、この際、ヒトでの遺伝性難聴の原因であることがわかっている *GJB2R75W* の発現ベクターを投与し、興味深い結果が得られたので報告する。

研究方法

GJB2R75W と eGFP の fusion protein を発現するベクターを作成し、リポソームで調整した。リポソーム調整液を酸化セルローススポンジに浸透させ、実験に供した。その後、マウスの中耳を外科的に開放し、正円窓近傍にリポソーム・酸化セルローススポンジを 7 2 時間留置した (7 耳)。また、同時に反対側の耳には sham operation として、empty vector を含むリポソーム調整液を同様に酸化セルローススポンジに浸透させたものを留置するものと、手術的操作のみを加え、正円窓には何も留置しないものをそれぞれ 7 耳作成した。

結果

GJB2R75W の発現は、RT-PCR で蝸牛の広い範囲で検出された。eGFP の発現によって形態学的に検討すると、supporting cell、outer hair cell、outer pillar cell、inner hair cell など、コルチ器の広い範囲の細胞に eGFP のシグナルが確認できた。また、spiral limbus および spiral ligament にも広い範囲でシグナルを認めた。

マウスの ABR を用いた聴力の実験では、Sham operation として行った empty vector 投与耳では、手術操作を加えない耳に比べて有意な聴力低下を認めなかった。しかし、GJB2R75W 投与群では、健側に比べ平均 20dB 程度の閾値上昇を認めた。また、7 例の GJB2R75W 投与群のうち 3 例では、前庭機能異常に起因すると考えられる異常行動（横向きに傾いたまま、一方向に偏倚して進む動作を繰り返す）が観察された。

考察

eGFP の発現からは、比較的容易なこの遺伝子投与方法によって、内耳、特にコルチ器の広い範囲に遺伝子発現が認められることが確認できた。Sham operation での結果からはこの手術自体では聴力を落とすことが無いため、内耳への遺伝子投与方法としては非常に有用であることが期待できる。実際に臨床的な応用をヒトで行うことを前提として考えた場合、「正円窓近傍に酸化セルローススポンジを留置する」という手術操作はきわめて容易で、簡単な局所麻酔から経鼓膜的に、すなわち病院外来などの医療設備のみで投与することが可能となると考えられる。現在までに報告されている遺伝子投与の方法はいずれも侵襲が

大きいため、大規模な設備が必要でまた副作用の危険性も高いと言えるが、今回我々が検討した報告はきわめて有用性が高いと考えられる。

GJB2R75W 投与による聴力低下と、前庭機能異常は、こうした系が難聴、あるいは前庭機能異常のモデル動物として使用できる可能性を示唆している。現時点で一般的に使用されている遺伝子改変マウスを用いた研究では、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作成自体に非常に時間がかかり、遺伝子異常と聴力低下の直接の因果関係を検討するためには多大な労力と時間が必要になる。従来、遺伝性難聴の原因遺伝子としては 100 を超える遺伝子が関与すると考えられており、またそれぞれの遺伝子にそれぞれの家系で異なる遺伝子変異が報告されている。こうした個々の遺伝子変異が実際の難聴にどの程度関与しているのかという検討は非常に time-consuming であり、困難な作業であった。今回我々が報告した系では、比較的短時間で内耳に対する機能異常を確認できるため、聴力や前庭機能に影響を与えうる遺伝子異常のスクリーニング法として使用できる可能性があり、従来の研究スピードを飛躍的に高めることが期待できる。また、本モデルでは、マウスにおける片側性の前庭機能異常を呈するため、マウスに基づいためまいの病態モデル、治療モデルとなる可能性が期待できる。

結論

我々は正円窓経由での遺伝子投与の方法を確立し、これによって難聴遺伝子治療の為の基礎的な手法を確立した。また同時に遺伝性難聴研究のための遺伝子スクリーニング法としても有用であることを示した。

健康危険情報
該当無し

E. 研究発表

2004年 molecular biology of hearing and deafness, Bethesda, MA USAにて発表

F. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

遠位尿細管アシドーシス症例の遺伝子解析

分担研究者 喜多村 健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 八島隆敏、野口佳裕、古宇田寛子、堤 剛 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)

研究要旨

前回報告後にさらに遠位尿細管アシドーシスと難聴を伴う症例を追加しえたため、これを加えて報告する。遠位尿細管アシドーシスは腎尿細管におけるH⁺の分泌障害により生じ、低K血症、骨軟化症、尿路結石などの症状を示し、その約1/3が進行性の感音難聴を伴うと言われ、Karetらが1999年にATP6B1を原因遺伝子のひとつとして同定した。前庭水管拡大は、最も頻度の多い内耳奇形でありSLC26A4が原因遺伝子のひとつとして同定されている。今回我々は、めまい、難聴を呈し、前庭水管拡大の全てもしくはその一部を認める遠位尿細管アシドーシスの症例について聴覚、平衡機能検査、遺伝子解析について報告する。

研究目的

原因不明感音難聴患者のうち遠位尿細管アシドーシスと前庭水管拡大を伴う症例について、その聴覚および平衡機能検査結果を解析し、臨床的特徴をとらえ遺伝子変異との関連性について検討する。

研究方法

対象は当院小児科にて遠位尿細管アシドーシスと診断され、当科を受診し聴力、平衡機能検査を施行した症候群性遺伝性感音難聴と考えられる症例を対象とした。聴覚機能検査として純音聴力検査、歪成分耳音響放射(DPOAE)、聴性脳幹反応などを施行し、平衡機能検査として電気眼振検査を行った。文書による同意を得たのち、末梢血よりDNAを抽出した。ATP6B1遺伝子及び、SLC26A4遺伝子の翻訳領域をPCR法により増幅し、直接シーケンス法により塩基配列を同定した。

研究結果

症例1は14歳男性で生後間もなくより哺乳不良、体重増加不良あり、エコーにて腎に石灰化を認め、1ヶ月で当院小児科入院し遠位尿細管アシドーシスと診断され、以後アルカリ剤の内服を続けている。3歳頃から補聴器を使用しているが、難聴の進行の自覚はなかった。現在、両耳補聴器装用中である。4歳頃より回転性のめまいの自覚がある。

7歳時に交通事故で頭部打撲しているが、特に聴力低下、めまい等を認めなかったとの事であ

る。12歳時、小児科入院中に補聴器の調節を目的に当科初診。

14歳時、3、5月にめまいにて当科入院。聴力検査では3月の時は左、5月の時は右がほぼ聾となったが、ステロイドによる治療で聴力は発症前のレベルに回復した。

オージオグラムは初診時右68.8dB、左57.5dBであった。両耳ともに急激な難聴の進行があったがそのつどステロイドの点滴で回復している。ABRは右側の反応が無く、左側でI~V波間の延長を認めず、左側は正常と考えられた。DPOAEは反応を認めなかった。

平衡機能検査については、発作時はフレンツェル眼鏡下で左向きの方方向性水平回旋混合性眼振を示した。ENG検査時はいずれも、自発、注視、頭位、頭位変換眼振を認めなかった。指標追跡検査では特に所見を認めなかったが、視運動性眼振検査は両方向ともに不良であった。温度眼振検査では両側ともに反応不良で前庭機能の低下が疑われた。

症例2は13歳女性で生後から体重増加不良にて精査され、遠位尿細管アシドーシスとターナー症候群、馬蹄腎などと診断された。8歳時滲出性中耳炎にて近医で鼓膜切開を行ったところ、左耳聾となった。右耳は正常範囲内である。めまいの自覚、眼振を認めない。CTでは前庭水管拡大、その他の内耳奇形などを認めなかった。

症例3は24歳の女性で乳児期より遠位尿細管アシドーシスの診断にて治療されている。左耳に軽度の高音障害型の感音難聴をみとめ、DPOAEでは右は正常であるが、左の反応が消失してい