

200930018A

厚生労働科学研究費補助金
厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

マイクロポンプシステムを用いた分子シャペロンとして働く
薬物投与による遺伝性難聴の革新的治療法の創生

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 仁

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

マイクロポンプシステムを用いた分子シャペロンとして働く

薬物投与による遺伝性難聴の革新的治療法の創生

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 仁

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- マイクロポンプシステムを用いた分子シャペロンとして働く薬物投与による遺伝性難聴の
革新的治療法の創生 1
和田 仁

II. 分担研究報告

1. 感音性難聴治療薬候補化合物の耳毒性の解析 1 1
小林 俊光
2. *SLC26A4* 遺伝子変異による難聴に関する研究 1 5
宇佐美 真一
3. 内耳への薬剤投与を目的とする体内埋め込み型マイクロポンプの開発 1 9
芳賀 洋一
4. 各種化合物の変異Pendrinの機能回復活性の評価方法の構築 2 1
平澤 典保
5. 化合物の設計と合成 2 5
中村 浩之
6. 難聴者（児）の現状理解と QOL 向上を指向した社会・教育学的取り組み 2 9
石原 研治

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 4 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書

マイクロポンプシステムを用いた分子シャペロンとして働く 薬物投与による遺伝性難聴の革新的治療法の創生

研究者代表者 和田 仁 東北大学 教授

研究要旨

本研究は、遺伝性難聴患者の遺伝子を操作せずに難聴を治療する方法を開発する画期的な研究である。

日本人における遺伝性難聴の大半は内耳に発現する膜タンパク質 Pendrin 及び Connexin26 の遺伝子変異に起因する。これらの難聴では聴覚閾値が 100 dB 程度と症状が重篤であり、患者の quality of life (QOL) が著しく低下する。このような重度の難聴患者には人工内耳が適応されているが、患者の QOL は十分とは言えない。したがって、我々は新たな手法を提案する。

本研究では、Pendrin 遺伝子の変異により難聴となった患者の持つ遺伝子そのものではなく、その遺伝子から産生される機能を失った変異 Pendrin を標的にし、その機能を回復させる化合物を探索し創薬に結びつける。また、治療薬を内耳局所に投薬するためのマイクロポンプシステムを開発し、遺伝性難聴の治療法を開発する。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

小林 俊光・東北大学・教授
宇佐美 真一・信州大学・教授
池田 勝久・順天堂大学・教授
芳賀 洋一・東北大学・教授
平澤 典保・東北大学・教授
中村 浩之・学習院大学・教授
津本 浩平・東京大学・准教授
石原 研治・茨城大学・准教授

している (図 1)。遺伝性難聴の主な原因は、遺伝子の変異により生じる Pendrin (SLC26A4) 及び Connexin26 (GJB2) のミスフォールディングであるが、これら難聴を根治する治療法はいまだ確立されていない。

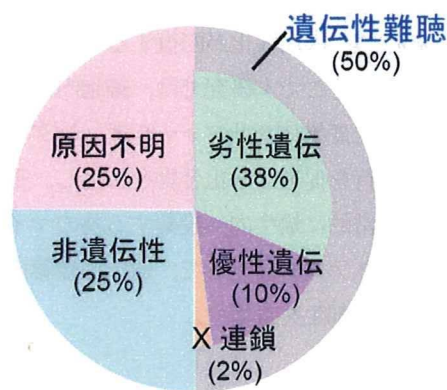


図 1. 先天性難聴患者における遺伝性難聴の割合

A. 研究の背景と目的

高度難聴児は、新生児 1,000 人に 1 人の割合で誕生する。すなわち、難聴は先天性疾患のうち最も頻度の高い疾患の 1 つである。新生児の難聴は、言語発達や教育に遅れを引き起こすため生活の質に大きく影響する。このような先天性難聴のうち少なくとも 50% は遺伝子が関与

Pendrin は、PDS(*SLC26A4*)遺伝子によってコードされる 780 アミノ酸残基からなる分子量 85.7kDa の膜タンパク質であり、12 回膜貫通領域を持っていると推定されている。Pendrin は主に内耳、甲状腺、および腎臓で発現しており、内耳では、内リンパ管、内リンパ嚢および蝸牛を構成している多様な細胞に発現している。Pendrin は、溶質輸送体 26A (*SLC26A*)ファミリーに属しており、Cl⁻, I⁻, HCO₃⁻や蟻酸の輸送体としての機能を有している。内耳における Pendrin の役割は、Cl⁻/HCO₃⁻の交換反応を行い、内リンパ液のイオン濃度の調整を行うことである。PDS 遺伝子の変異による Pendrin 機能の消失は、感音性難聴を引き起こすことが知られており、日本人の PDS 遺伝子変異に起因する難聴患者においては、10 種類の変異が報告されている。

これまでに、我々は Pendrin と同じ *SLC26A* ファミリーに属し、Pendrin と相同性をもつ Prestin の研究を行ってきた。そして、Prestin のミスセンス変異体がミスフォールディングにより、細胞内に蓄積することを発見した。さらに、我々は、サリチル酸が Prestin 変異体をリフォールディングし、細胞膜への局在化を回復させ、Prestin の機能も回復させることを明らかにした。これらの経験から、細胞内に蓄積した Pendrin 変異体も、サリチル酸によりリフォールディングされ、細胞膜への局在化が回復する可能性が高いと考えた。そこで本研究では、細胞内に蓄積した Pendrin 変異体をリフォールディングし、細胞膜へ移行を促進する化合物を特定し、その化合物を恒常的に蝸牛内へ投薬する為のマイクロポンプシステムを開発して、遺伝性難聴の革新的治療法の創生を目指す。

B. 研究方法

B.1. リフォールディングされる Pendrin の同定と変異体をリフォールディングする薬剤の同定

B.1.1 Pendrin 変異体発現ベクターの構築

ヒト Pendrin の cDNA は、Dr. Koichi Suzuki, (National Institute of Infectious Diseases) および Dr. Eric D. Green (National Human Genome Research Institute)から提供された。C 末端に 3xFLAG タグ配列が付加した Pendrin (Pendrin-3xFLAG)を発現する遺伝子を構築するために、PCR 法で増幅した Pendrin cDNA を pIRES-hrGFP-1a ベクター (Stratagene)(図 2)へサブクローニングした。

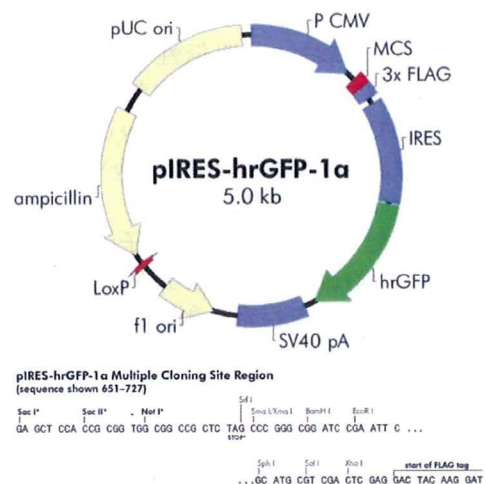


図 2. pIRES-hrGFP-1a ベクター

続いて、Pendrin-3xFLAG の発現遺伝子を PCR で増幅し、pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen) へ導入し、Pendrin-3xFLAG WT 発現ベクターを構築した。10 種類の変異 Pendrin 発現ベクターは、表 1 に示した変異導入プライマーと QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、Pendrin-3xFLAG WT 発現ベクターに 1 塩基変異を導入して構築した。構築した発現ベクターの配列は、DNA 配列解析を行い確認した。

表 1. 変異導入プライマー

Name	Sequence	Length (bp)
P123S_forward	5' GGATATGGTCTCTACTCTGCTTTTCTCCATCCTGACAT AC 3'	42
P123S_reverse	5' GTATGTCAGGATGGAGAAAAAGCAGAGTAGAGACCATATCC 3'	
M147V_forward	5' CTTTCCAGTGGTGGATTAGTGGTGGGATCTGTTGTTTC 3'	39
M147V_reverse	5' GAACAACAGATCCCACTAACTACCACGTGGAAAAG 3'	
K369E_forward	5' CTATTGCAGTGCAGTAGGAGAAGTATATGCCACCAAGTATG 3'	42
K369E_reverse	5' CATACTGGTGGCATACTCTCCTACTGACACTGCAATAG 3'	
A372V_forward	5' GTGTCAGTAGGAAAAGTATATGTCACCAAGTATGATTACACC 3'	42
A372V_reverse	5' GGTGTAATCATACTGTGTCATATACTTTCTACTGACAC 3'	
N392Y_forward	5' GCCTTGGGATCAGCTACATCTCTCAGGATCTTC 3'	36
N392Y_reverse	5' GAAGAATCTGAGAAGATGATGATGCCAAAGGC 3'	
C565Y_forward	5' CGATGGTTTAAAAAATATAACAAGTCCACAGTTGGATTGATGCC 3'	46
C565Y_reverse	5' GGCATCAATCCAACTGGGACTTGATATATTTTAAACCATCG 3'	
S657N_forward	5' CAAAGTGCCAAATCCATAACTGTGCTGTGACTGTG 3'	35
S657N_reverse	5' CACAGTCAAGCAAGGTTATGGATTGACACTTTG 3'	
S666F_forward	5' CITGACTGTGGAGCTATATTTTCTCGGACGTTGTG 3'	37
S666F_reverse	5' CAACAAGTCCAGGAAAAATATAGCTCCACAGTCAAG 3'	
T721M_forward	5' CAACATTAGAAAGGACACAFCTTTTGTGATGCCATGATGC 3'	42
T721M_reverse	5' GCATCATGGACCATCAAAAAGAAATGTGCTCTTAATGTTG 3'	
H723R_forward	5' CTTTGTGACGGTCTGATGCTATACTCTACTACAG 3'	37
H723R_reverse	5' C TGTAGATAGAGTATAGCATACGGACCGTCAAAAAG 3'	

B.1.2. 細胞培養と遺伝子導入

HEK293 細胞は、10% FBS, 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンを含んだ RPMI-1640 培地 (Sigma) を用いて、温度 37°C, 湿度 100%, CO₂ 5% の条件で培養した。遺伝子導入は、6 穴プレートに HEK293 細胞を 5 x 10⁵ 細胞の密度で播種し、12 時間培養した後、FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Roche) を用いて、1 穴あたり 2 µg の Pendrin 発現ベクターを細胞へ導入した。

B.1.3. 免疫蛍光染色

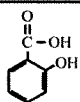
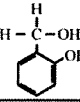
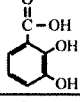
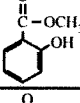

遺伝子導入後 24 時間培養した細胞を 24 穴のガラス底面プレートに移し、12 時間の培養後、サリチル酸ナトリウム(10 mM), あるいはその誘導体(1 mM)を添加し、更に 12 時間培養した。細胞を PBS で 3 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで 5 分間、室温でインキュベーションして細胞を固定した。抗体の非特異的結合を避けるため、ブロッキング溶液 (50% FBS, 50% Block Ace(大日本住友製薬)) で 1 時間、37°C でインキュベーションした。PBS で洗浄後、抗 FLAG 一次抗体 (Sigma) で 1 時間、37°C でインキュベーションし、続いて、抗マウス IgG TRITC 標識二次抗体 (Sigma) で 30 分間、37°C でイン

キュベーションした。最後に、PBS で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV500, Olympus) で蛍光画像を観察した。

B.1.4. サリチル酸誘導体

サリチル酸は 10 mM で変異体を細胞膜へ移行させる作用があったが、1 mM では作用が見られなかった。そこで、より低濃度で作用がある化合物を特定するため、表 2 に示した 4 種類のサリチル酸誘導体 2-Hydroxybenzyl alcohol, 2,3-Dihydroxybenzoic acid, methyl salicylate, 2-Hydroxyacetophenone について、これらの化合物が変異体 P123S の細胞膜へ移行を促進する作用を持っているか調べた。

表2. サリチル酸とその誘導体の化学構造

Chemical compound	Chemical structure	Concentration
Salicylate		1 mM 10 mM
2-Hydroxybenzyl alcohol		1 mM
2,3-Dihydroxybenzoic acid		1 mM
Methyl salicylate		1 mM
2-Hydroxyacetophenone		1 mM

B.2. 遺伝性難聴モデルマウスの作成

日本人の難聴患者で最も出現頻度が高い変異 H723R を発現するノックインマウスの作成を民間業者に委託して開始した。ヒトの Pendrin H723R 変異体を発現するマウスと、マウスの Pendrin H723R 変異体を発現するマウスの 2 種類のマウスの作成を進めている。

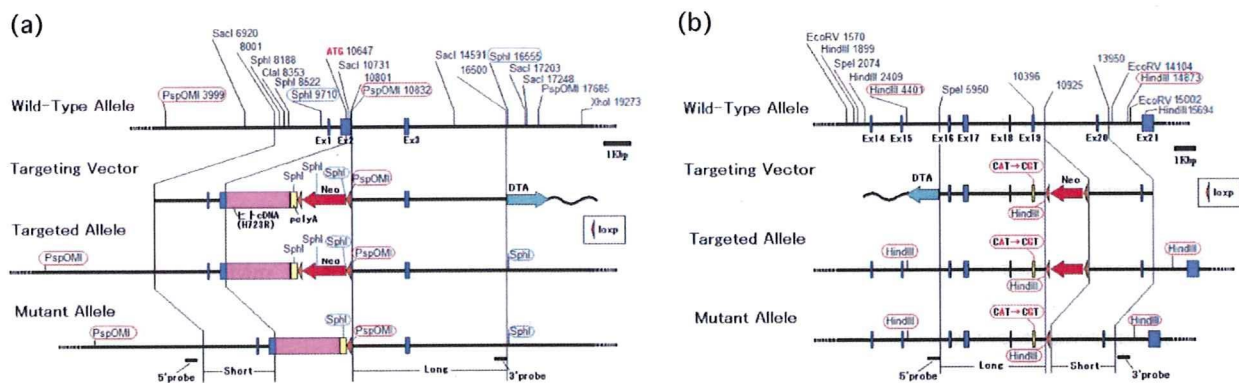


図3. ノックイン・マウス用ターゲティングベクター設計図
(a)ヒト H723R ノックイン用ベクター, (b)マウス H723R ノックイン用ベクター

図3に、ノックインマウスの作成に用いたターゲティングベクターの設計図を示す。ポジティブ・ネガティブ選択法により、相同組換えを起こしたES細胞を選択する為に、ネオマイシン耐性遺伝子(Neo)およびジフテリア毒素A断片(DTA)遺伝子を用いた。

B.3. SLC26A4 遺伝子変異による難聴に関する研究

SLC26A4 遺伝子変異が疑われる臨床像を有する患者を対象に遺伝子解析を行い、変異の種類、頻度につき検討した。

(詳細は分担研究者、宇佐美真一の報告書を参照)

B.4. 内耳への薬剤投与を目的とする体内埋め込み型マイクロポンプの開発

超音波により発生する音響流を利用したマイクロポンプを試作し、超音波によりポンプが駆動し、送液が可能であることを実験的に確かめた。(詳細は分担研究者、芳賀洋一の報告書を参照)

B.5. 各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

HEK293細胞を用いて、Pendrin変異体の安定発現細胞を作製した。また、¹²⁵Iを用いてPendrinの活性測定を行った。

(詳細は分担研究者、平澤典保の報告書を参照)

B.6. 化合物の設計と合成

サリチル酸が、Pendrin変異体に分子シャペロンとして働き膜移行性を促しその機能発揮に関わっていることが明らかとなっており、本研究ではさらにシャペロン活性の高い化合物を見出すことを目的として研究を進める。

(詳細は分担研究者、中村浩之の報告書を参照)

B.7. 難聴者(児)の現状理解とQOL向上を指向した社会・教育的取り組み

(1) 特別講義の実施。(2) 信州大学医学部耳鼻咽喉科学教室および付属人工内耳センターの見学。(3) 難聴者へのインタビューと健聴者への難聴に対するアンケートを行った。

(詳細は分担研究者、石原研治の報告書を参照)

(倫理面への配慮)

本研究には動物実験および遺伝子組換え実験が含まれる。動物実験は、「国立大学法人東北大学に置ける動物実験等に関する規定」に基づき、学内の動物実験委員会の承認を得た上で行った。遺伝子組換え実験は、「国立大学法人東北大学遺伝子組換え実験安全管理規程」に基づき、遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

C.1. リフォールディングされる Pendrin の同定

と変異体をリフォールディングする薬剤の同定

C.1.1 Pendrin の細胞内局在

Pendrin 変異体の細胞内局在を明らかにするために、C 末端に FLAG タグの付いた WT および変異体を HEK293 細胞に発現させ、免疫蛍光染色により、それらの局在解析を行った。その結果を図 4 に示す。図 4 において、DIC は細胞の微分干渉顕微鏡画像を、TRITC は蛍光標識された WT および変異体の存在場所を蛍光顕微鏡画像として示している。Merge は DIC と TRITC を重ね合わせた画像である。

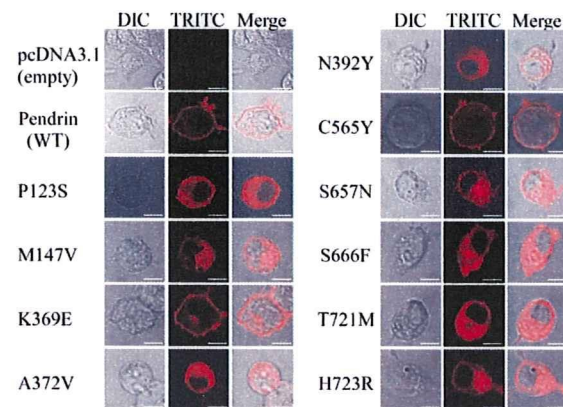


図 4. Pendrin 変異体の細胞内局在

WT および 2 種類の変異体 K369E および C565Y では細胞膜に強い蛍光が観察され、これらは細胞膜へ局在していることが示された。一方、他の 8 種類の変異体 P123S, M147V, A372V, N392Y, S657N, S666F, T721M 及び H723R では、核を除く細胞全体に蛍光が見られ、これらは細胞内に留まっていることが示された。

C.1.2. サリチル酸による変異体の局在変化

次に、細胞内に留まる 8 種類の変異体 P123S, M147V, A372V, N392Y, S657N, S666F, T721M 及び H723R がサリチル酸により細胞膜へ移行するかどうか解析した。図 5(A)はサリチル酸を溶解するに用いた溶媒のみを加えたサンプルであるが、細胞全体に蛍光が見られ、変異体の細胞膜への局在は認められなかった。一方、サリチル酸 (10 mM) を添加した場合、4 種類の変異

体 P123S, M147V, S657N 及び H723R で、細胞膜での TRITC の強い蛍光が見られた (図 5(B))。

一方、A372V, N392Y, S666F 及び T721M 変異体では細胞全体に蛍光が見られた (図 5(B))。

図 6 は WT および変異体を発現した細胞における、細胞膜 (PM) と細胞質での蛍光強度の比を棒グラフにしたものである。4 種類の変異体 P123S, M147V, S657N 及び H723R を発現した細胞では、サリチル酸により、細胞膜での蛍光強度が有意に増加しており、変異体の細胞膜への移行が促進されたことを示している。

C.1.3. 低濃度サリチル酸およびサリチル酸誘導体による変異体 P123S の局在変化

低濃度サリチル酸及びサリチル酸誘導体の作用を変異体 P123S を発現させた HEK293 細胞で調べた。サリチル酸は 10 mM で P123S の細胞膜への移行を促進したが、1 mM では P123S を細胞膜へ移行させる作用はなかった (図 7, 8)。

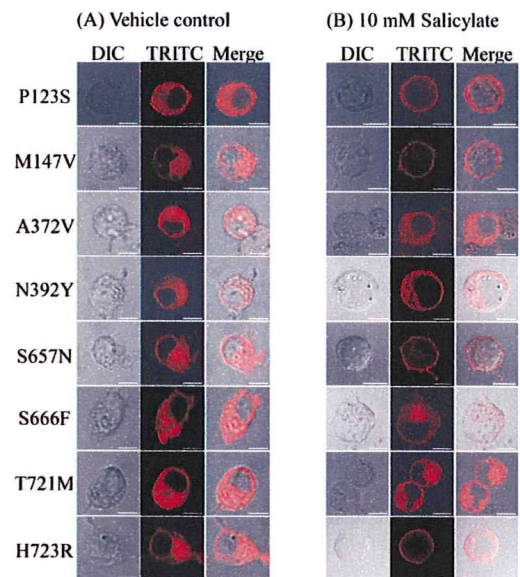


図 5. サリチル酸による変異体の局在変化

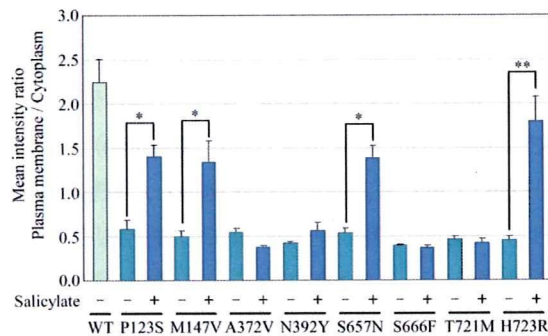


図 6. サリチル酸添加による蛍光強度比の変化は 6-9 サンプルの平均値±SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01

より低濃度で P123S を膜に移行させる化合物を特定するため、4 種類のサリチル酸誘導体、2-Hydroxybenzyl alcohol, 2,3-Dihydroxybenzoic acid, methyl salicylate, 2-Hydroxyacetophenone を用いて P123S の局在を解析した。その結果 2 種類の誘導体 2-Hydroxybenzyl alcohol, 2,3-Dihydroxybenzoic acid がサリチル酸よりも低濃度の 1 mM で、P123S を細胞膜へ移行させた (図 7)。図 8 に P123S を発現させた細胞にサリチル酸誘導体を添加した際の細胞膜 (PM) と細胞質での蛍光強度比を表したグラフを示す。

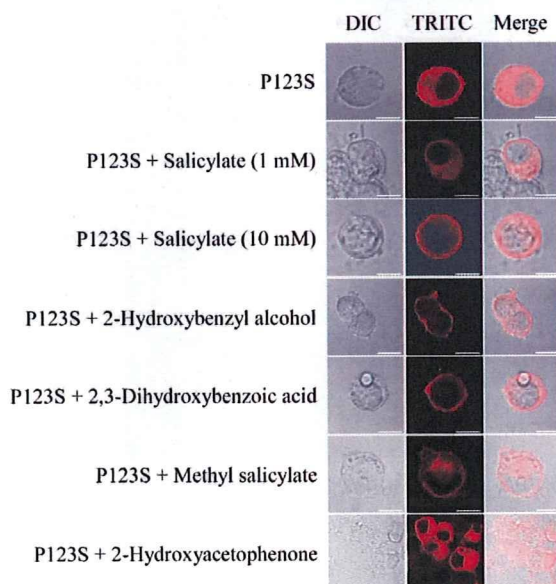


図 7. サリチル酸誘導体の P123S の細胞内局在に与える影響

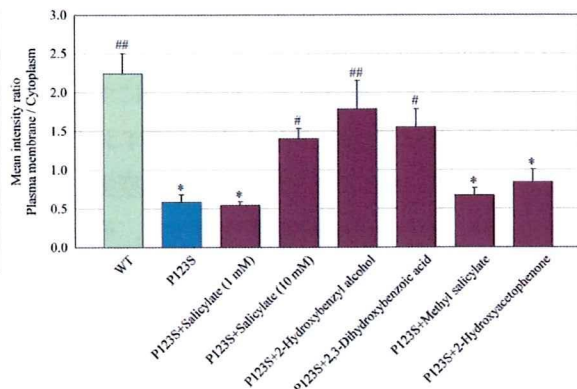


図 8. サリチル酸誘導体添加による蛍光強度比の変化

値は 6-9 サンプルの平均値±SEM. * p < 0.01 vs. WT; # p < 0.05; ## p < 0.01 vs. P123S.

C.2. 遺伝性難聴モデルマウスの作成

ターゲッティングベクターは、エレクトロポレーションにより ES 細胞(C57BL/6 マウス由来)へ遺伝子導入した。ネオマイシン、ジフテリア毒素 A 断片によるポジティブ・ネガティブ選択法により相同組換えが起こった ES 細胞を選択した。そして、PCR 法を及びサザンブロットングにより相同組換えが起こっていることを確認した。相同組換えが確認された ES 細胞を胚盤胞(BALB/c マウス由来)へマイクロインジェクションし、仮親マウスの子宮に移植し、生まれてきた子から、キメラマウスを得た。キメラマウスと野生型 C57BL/6 マウスを掛け合わせて、得られた産子から、毛色が黒色のマウスを選別し、PCR 法によるジェノタイピングを行い、F1 ヘテロマウスを得た。現在、ホモマウスの取得に向けて作業が進んでおり、マウスの Pendrin H723R 変異体を発現するノックインマウスは 2010 年 8 月頃に、ヒトの Pendrin H723R 変異体を発現するノックインマウスは 2010 年 10 月頃に完成予定である。

C.3. SLC26A4 遺伝子変異による難聴に関する研究

遺伝子解析の結果、新規遺伝子変異を含むい

くつかの変異を見だし、特に新規変異が認められた症例に関しては、親族の遺伝子解析も行い家系内罹患情報と照らし合わせ矛盾が無いことを確認するとともに、NCBI のホームページより BLAST 検索を行い、変異部位が生物種を超えて保存されていることを確認した。さらに、コントロールの解析を行い、コントロール群には変異が認められないことを確認した。

(詳細は分担研究者、宇佐美真一の報告書を参照)

C.4. 内耳への薬剤投与を目的とする体内埋め込み型マイクロポンプの開発

トランスミッターを駆動させ音響流が発生したときのみ送液された。このことから、トランスミッターにより放射された超音波がポンプの超音波透過膜(ポリエチレン薄膜)を透過し、ポンプ内で音響流が発生していることが確認できた。また、トランスミッターへの負荷電圧を 0-80 V へと変化させることにより、液体の吐出量を調節することも可能であった。

(詳細は分担研究者、芳賀洋一の報告書を参照)

C.5. 各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

日本人に最も多い変異である H723R および、M147V, S657N の 3 種類の変異 Pendrin を安定に発現する HEK293 細胞株ならびに野生型 Pendrin を安定に発現する HEK293 細胞株を樹立した。免疫染色の結果から、一過性発現株で得られた結果と同様に、野生型 Pendrin は主として細胞膜に、変異 Pendrin は主として細胞質に分布することが確認された。安定発現株を用いて Pendrin 活性の測定を行ったが、 ^{125}I の細胞内への取り込みに問題があった。

現在、 ^{125}I を細胞内に取り込むシンポーター NIS を安定発現する細胞株の調製を進めている。

(詳細は分担研究者、平澤典保の報告書を参照)

B.6. 化合物の設計と合成

構造活性相関の検討から pendrin の P123S 変異体に対しシャペロン活性を有する化合物には、1,3-プロパンジオール骨格を有する環状化合物が有望であることが示唆された。

(詳細は分担研究者、中村浩之の報告書を参照)

C.7. 難聴者 (児) の現状理解と QOL 向上を指向した社会・教育的取り組み

(詳細は分担研究者、石原研治の報告書を参照)

D. 考察

Pendrin 変異体の細胞内への蓄積は、感音性難聴の症状を伴う Pendred 症候群の発症の主な原因であると考えられている。日本人の難聴患者では 10 種類のミスセンス Pendrin 変異体 P123S, M147V, K369E, A372V, N392Y, C565Y, S657N, S666F, T721M 及び H723R が報告されている。このうち 2 種類 (M147V と H723R) については、細胞内に蓄積することが既に報告されている。しかし、残りの 8 種類の変異体の細胞内局在は明らかにされていなかった。そこで、本研究では、日本人の難聴患者で発見されている 10 種類の Pendrin 変異体の局在解析を行った。そして、我々は、既に報告のあった M147V と H723R の 2 種類の変異体の細胞内への蓄積を確認し、新たに 6 種類の変異体 P123S, A372V, N392Y, S657N, S666F, T721M が細胞内に蓄積することを明らかにした (図 4)。従って、日本人患者で見られる 10 種類のミスセンス変異体のうち 8 種類は細胞内に蓄積され、2 種類は WT と同様に細胞膜へ局在することが明らかとなった。

次に我々は、サリチル酸による Pendim 変異体の局在変化を調べた。その結果、細胞内に蓄積する 8 種類の変異体のうち 4 種類の変異体 P123S, M147V, S657N 及び H723R がサリチル酸によりリフォールディングされ、細胞膜へ移行することが明らかとなった。また、サリチル酸

は 1 mM では変異体を細胞膜へ移行させる効果がなく、10 mM でその効果が見られるのに対し、サリチル酸の誘導体の 2 種類 2-Hydroxybenzyl alcohol 及び 2,3-Dihydroxybenzoic acid は、サリチル酸よりも低濃度の 1 mM で、P123S 変異体を細胞膜へ移行させる作用があることが分かった。サリチル酸は耳毒性があることが知られている。サリチル酸誘導体の耳毒性については、現在解析を進めている段階であるが、サリチル酸よりも低濃度で効果があることから、サリチル酸誘導体が、副作用が少ない治療薬となる可能性が示唆された。

薬剤の治療効果を評価する為には、Pendrin 遺伝子の変異により難聴となった動物に薬剤を投与して、その効果を確かめる必要がある。そこで、日本人の難聴患者において、最も出現頻度が高い変異 H723R (ヒト型、マウス型) の遺伝子変異をもつ 2 種類のノックインマウスの作成を委託して進めた。現在、ターゲティングベクターの構築、ES 細胞への遺伝子導入、キメラマウス、F1 ヘテロマウスの作成が完了しており 2010 年 8 月頃にはマウスの Pendrin H723R 変異体を発現するノックインマウスが完成予定である。マウスが完成次第、聴性脳幹反応 (ABR) による、聴覚障害の評価を行い、実際に、サリチル酸誘導体等の治療薬候補化合物をノックインマウスの蝸牛内へ投与して、化合物による遺伝性難聴の治療の可能性を確かめる予定である。

より効果の高い治療薬を探索するには、細胞内における Pendrin 変異体の局在変化を解析するよりも、直接的に変異体の活性の回復を解析した方が、迅速に候補薬剤を特定することが出来る。そのために、野生型 Pendrin および変異 Pendrin(H723R, M147V, S657N)の安定発現株を作製した。これらの細胞株を用いて ^{125}I -の放出活性を測定したところ、正確な Pendrin 活性を反映していない可能性が示唆された。さらに Pendrin と NIS の共発現系を構築し、高精度なス

クリーニング系の確立を目指している。また、pH の変化など、 ^{125}I の放出以外の方法による Pendrin 活性の測定系の確立も必要であると考えられる。

難聴患者の治療においては、恒常的に内耳に薬剤を投与することが求められる。そのためには埋め込み型ドラッグデリバリーシステムが必要となる。そこで、体外から超音波を照射し、体内に埋め込んだポンプユニットから薬剤を内耳に投与可能な埋め込み型ドラッグデリバリーシステムを設計した。そして試作したマイクロポンプを用いて超音波によりポンプが駆動し、送液が可能であることを実験的に確かめた。薬剤を必要量投与するには、薬剤が不必要に投与されることを確実に防止するためのストップバルブが必要であると考えられる。また、皮膚を模した寒天によるファントムを準備し、トランスミッターにより発生した超音波の強度がどれだけ減衰しポンプ内の音響流に影響を及ぼすのか測定を行う。

E. 結論

Pendrin 変異体のリフォールディングにサリチル酸誘導体が有効であることが示された。また、超音波により発生する音響流を用いたマイクロポンプで送液が可能であることが示された。これらのことから、体内に埋め込んだマイクロポンプを用いて蝸牛内へ薬剤を投与して遺伝性難聴を治療できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shun Kumano, Koji Iida, Kenji Ishihara, Michio Murakoshi, Kouhei Tsumoto, Katsuhisa Ikeda, Izumi Kumagai, Toshimitsu Kobayashi, Hiroshi

Wada, Salicylate-induced translocation of prestin having mutation in the GTSRH sequence to the plasma membrane. FEBS Letters, 584, 2327-2332, (2010).

Shun Kumano, Michio Murakoshi, Koji Iida, Hiroshi Hamana, Hiroshi Wada, Atomic force microscopy imaging of the structure of the motor protein prestin reconstituted into an artificial lipid bilayer. FEBS Letters, (in press).

2. 学会発表

和田 仁, 宇佐美真一, 池田勝久, 小林俊光, 遺伝性難聴に関わる変異 Pendrin のサリチル酸及びその誘導体によるリフォールディング, 第19回日本耳科学会総会・学術講演会, 東京 (2009年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

1. 感音性難聴治療薬候補化合物の耳毒性の解析

研究分担者 小林 俊光 東北大学 教授

研究要旨

本研究では、感音性難聴治療薬の候補化合物に耳毒性がないかを調べるため、マウス蝸牛正円窓にゲルフォームを設置し、聴性脳幹反応(ABR)により聴力測定を行った。今回の実験においては、人工外リンパ液および感音性難聴治療薬の候補化合物であるが耳毒性がある物質として知られているサリチル酸を投与し、ABR がどのように変化するかを測定した。

A. 研究の背景と目的

先天的難聴は、一般に新生児 1000 人に 1 人の割合で誕生し、そのうちの 50%は遺伝的な原因によるものである。また、全ての先天的聴覚障害のうち 7.5%はペンドレッド症候群による。このペンドレッド症候群は感音性難聴や甲状腺腫に特徴的な常染色体劣勢遺伝でペンドリン遺伝子の変異によるものである。膜タンパクであるペンドリンは主に内耳、腎臓および甲状腺で発現する。内耳において、ペンドリンはCl⁻とHCO₃⁻の運搬役として働き、内リンパのイオン濃度調節に関わっている。しかしながら、この疾患に対していまだ有効な治療法は確立されていない。一般的にペンドリンなどの膜タンパクは、小胞体やゴルジ体を通して細胞膜に移動するが、いくつかの変異を持ったタンパクは、ミスフォールディングにより小胞体に留まる。このような場合、細胞膜に局在するペンドリンの量は減少し、内耳のイオン濃度は異常になると考えられる。このような説明がペンドレッド症候群のメカ

ニズムとして推察されている。

シャペロンとして働くいくつかの物質によって、変異タンパクが細胞膜に発現することが知られている。このような物質を体内埋め込み型のドラッグデリバリーシステムにより蝸牛内に供給し続けることでミスフォールドしたペンドリンを細胞膜に移動させ、機能を回復させることができると期待される。これにより遺伝子操作なしに遺伝性難聴を治療する手法の確立を目指す。投与する薬剤は毒性を持っていないことが求められるので、聴覚機能に影響がないかを調べる必要があるとされる。本研究では、ゲルフォームを使ったマウス蝸牛への薬剤運搬の方法の確立および聴性脳幹反応(ABR)という聴力測定を使用し、聴覚機能の回復効果を測定した。

B. 研究方法

B.1. 薬剤候補化合物

候補薬剤の溶媒として人工外リンパ液を用いた。人工外リンパ液(NaCl; 120 mM, KCl; 3.5 mM, CaCl₂ mM; 1.5mM, グルコース; 5.5 mM, HEPES; 20 mM)を用いた。1.2 M のサリチル酸溶液は、サリチル酸ナトリウムを人工外リンパ液に溶解して作った。それぞれの溶液は NaOH により pH を 7.5 に調節して使用した。

B.2. 対象

C57Bl/6 マウスの 4~6 週齢オス(14 - 21 g)を麻酔薬ケタミン(100 mg/kg)とキシラジン(10 mg/kg)で腹腔内注射により麻酔して使用した。麻酔効果の維持が必要な場合は、ケタミン(50 mg/kg)とキシラジン(5 mg/kg)を加えた。

B.3. 外科手術

手術用顕微鏡下で正円窓が露出するよう耳の後ろを切開した。候補薬剤を 0.5 μ l 含ませたゼラチンゲルフォームを正円窓に設置し、皮膚を縫合した(図 1)。

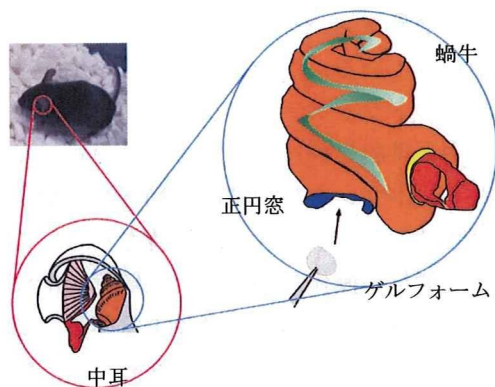


図 1. ゲルフォーム設置概略図

薬剤が浸透したゲルフォーム片を正円窓膜に直接接触れるよう設置。正円窓は蝸牛外リンパ空間に通じる穴である。ゲルフォーム内の薬剤は正円窓を通して蝸牛外リンパに拡散する。

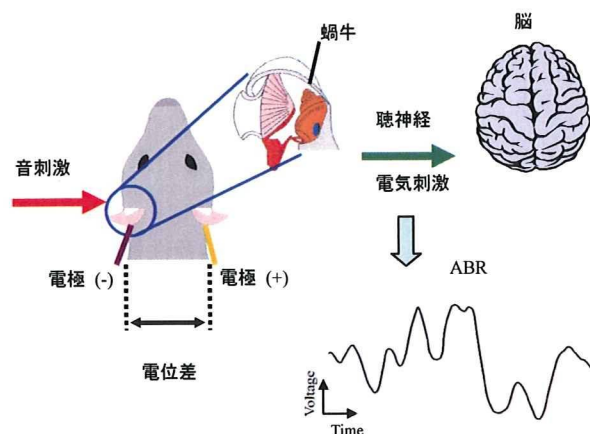


図 2. ABR 測定

音の信号により聴覚システムが刺激されると電気信号が喚起され聴性神経を通して脳に伝わる。ABR 測定は簡単な音刺激によって作られる電位差を反映している。

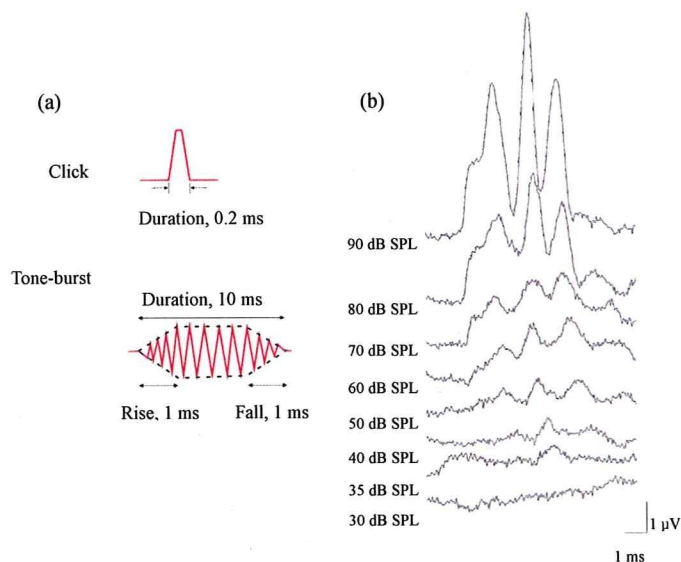


図 3. 信号刺激と ABR 波形

(a)実験に用いた音刺激波形 (b)手術前のマウスの ABR 波形。異なる音圧の 16 kHz トーンバースト刺激を用いた。この場合、ABR のピークは 30 dB SPL で全て見られなくなった。このことから 35 dB SPL を閾値と決定した。

B.4. ABR 聴力測定

聴性脳幹反応(ABR)聴力測定は、聴覚刺激に反応する聴性脳幹機能の神経テストである。本研究では、両耳の後ろ皮下にステンレス鋼電極を設置し(図 2)、尻尾付近に設置した電極をグラウンドとし、左耳からの反応のみを計測した。ABR 測定には刺激音としてクリック音(0.2 ms 間隔)とトーンバースト音(10 ms 間隔、

1 ms rise/fall; 8, 16, 24 and 32 kHz)を用いた(図 3 (a)). 異なった音圧強度の音刺激を加え, どの強度においても 500 回の反応を計測し, 平均した. 明確で繰り返し反応するピークを形成する一番低い刺激レベルを ABR の閾値と定義した(図 3 (b)). ABR 測定は手術の直前および直後とゲルフォームを設置してから 3, 6, 12, 24, 48 時間後に行った.

C. 研究結果

サリチル酸を蝸牛に適用すると難聴が引き起こされる. このため, ゲルフォームを用いて薬剤を蝸牛に投与できるかを確認するため, サリチル酸を試験薬物として用いた. サリチル酸が蝸牛内に送り届けられていれば ABR の閾値の上昇が確認されるはずである.

研究の初期段階ではマウスの扱いについて問題があった. 実験の途中でマウスが弱って死んでしまい, 実験データを得ることが不可能であった. この問題を解決するために, プロトコルに二点変更を加えた. 第一に, 動物の直腸温を計測し, ヒーティング・パッドもしくはゲル製湯たんぽを用い, 直腸温度を $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ に保持した. 第二にマウスの週齢を 4 週齢から 6 週齢 (18 - 21 g)に変更した. この変更は, 4 週齢のマウスは実験をするのに若すぎて弱すぎると考えたためである. プロトコル変更前の実験で用いたマウスの個体数は 35 であり, また別の 7 匹のマウスは問題の原因を突き止めるために用いた. 変更後, 8 匹のマウスを用いて実験を行い, そのうち 2 匹からデータを得ることに成功した. 1 匹は人工外リンパを用いた実験であり(図 4(a)), もう 1 匹はサリチル酸の溶液を用いた実験である(図 4(b)). 実験の数は薬剤の耳毒性を解析するには不十分ではあるが, 計測結果の解析を試みた.

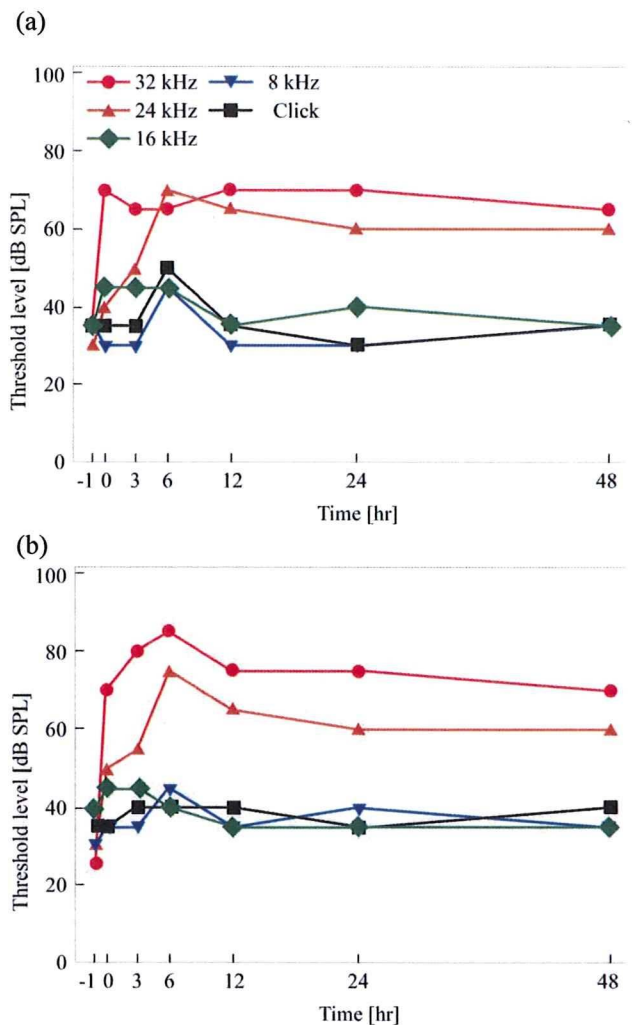


図 4. それぞれの刺激における ABR の閾値
両図において, 縦軸は ABR 閾値, 横軸はゲルフォームを設置してから経過時間を示している. -1 および 0 時間はそれぞれ手術直前および手術直後を示している. (a)人工外リンパゲルフォームの結果. (b)サリチル酸ゲルフォームの結果.

D. 考察

図 4 (a)において, 32 kHz と 24 kHz の刺激を用いた実験においては手術後に閾値の大きな上昇が見られた. 他の種類の刺激に対する閾値の上昇は比較的小さく, また時間とともに減少した. 閾値の上昇は施術のみによって聴覚が損傷を受けた可能性を示している. なぜより高い周波数の刺激に対する閾値が低い周波数の場合よりも強く影響されるのかについての説明の一つは, 正円窓に近い位置すなわち蝸牛の

基部側がより深刻に影響されるということである。蝸牛においてはその基部側で高い音が検知され、頂部側で低い音が検知される。ゲルフォームを正円窓に置くことによって、入力音に対する反応としてのリンパ液の動きが制限され、高音域の刺激での閾値の上昇につながっている可能性が考えられる。

次に、図 4 (b)において、人工外リンパを用いた実験に比べ、サリチル酸を用いた実験では 3 時間目における 32 kHz の刺激に対する閾値が 15 dB 高く、6 時間目における閾値は 20 dB 高い。これはサリチル酸の効果であると推察できる。しかし、人工外リンパを用いた実験では施術の影響が現れており、これを無視することはできない。加えて他の種類の刺激に対する閾値についてははっきりした違いがない。これはおそらく蝸牛内の外リンパ空間に届いた薬剤の量が不十分であったためであり、二つの理由が考えられる。一つは、薬液の濃度が不十分であった可能性がある。もう一つは、薬剤が周辺組織に拡散し、効果が不十分であった可能性が考えられる。

E. 結論

本研究において、ゲルフォームを蝸牛正円窓

に設置することで薬剤を蝸牛に投与できる可能性が示された。しかし、実験に用いられた動物の数が限られており、また、ゲルフォームを設置することに関する実験手技の向上も必要である。今後の展望としては、人工外リンパ及び濃度の異なるサリチル酸を用いて実験を行い、より詳細な解析を行う予定である。実験手技については、薬液の周辺組織への拡散を防ぐために正円窓にゲルフォームを設置した後、その上から筋膜をかぶせるという工夫を行う予定である。さらに、今回試験したサリチル酸以外の候補薬剤（主にサリチル酸誘導体）を用いた実験も行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. SLC26A4 遺伝子変異による難聴に関する研究

研究分担者 宇佐美 真一 信州大学 教授

研究要旨

Pendred 症候群および前庭水管拡大を伴う非症候性難聴は、従来は異なる疾患群と区別されていたが、近年の遺伝子検索の進歩により両者は SLC26A4 遺伝子変異が引き起こす同一の疾患群であることが明らかになってきた。Pendred 症候群および前庭水管拡大を伴う非症候性難聴両疾患は 1) 前庭水管拡大、2) 変動する難聴という共通の臨床的特長をもつが、患者の臨床像（聴力型、めまい、甲状腺腫）には大きなバリエーションがあることが知られている。本研究は、SLC26A4 遺伝子変異が疑われる臨床像を有する患者を対象に遺伝子解析を行い、変異の種類、頻度につき検討した。また、聴力像などの臨床情報を収集し、データベースを構築している。

本年度は、遺伝性難聴の疑われる両側感音難聴患者のうち前庭水管拡大を伴う症例を対象に、SLC26A4 遺伝子のスプライシング領域を含む全エクソン領域を PCR 法により増幅し直接シーケンス法により遺伝子変異の有無を同定している。遺伝子解析の結果、新規遺伝子変異を含むいくつかの変異を見いだした。特に新規変異が認められた症例に関しては、親族の遺伝子解析も行い家系内罹患情報と照らし合わせ矛盾が無いことを確認するとともに、NCBI のホームページより BLAST 検索を行い、変異部位が生物種を超えて保存されていることを確認した。さらに、コントロールの解析を行い、コントロール群には変異が認められないことを確認した。

A. 研究目的

Pendred 症候群および前庭水管拡大を伴う非症候性難聴は、従来は異なる疾患群と区別されていたが、近年の遺伝子検索の進歩により両者は SLC26A4 遺伝子変異が引き起こす同一の疾患群であることが明らかになってきた。Pendred 症候群および前庭水管拡大を伴う非

症候性難聴両疾患は 1) 前庭水管拡大、2) 変動する難聴という共通の臨床的特長をもつが、患者の臨床像（聴力型、めまい、甲状腺腫）には大きなバリエーションがあることが知られている。本研究は、SLC26A4 遺伝子変異が疑われる臨床像を有する患者を対象に遺伝子解析を行い、変異の種類、頻度につき検討

するとともに、聴力像などの臨床情報を収集したデータベースを構築し、疾患の臨床的特徴を明らかにし、本研究課題であるマイクロポンプシステムを用いた分子シャペロンとして働く薬物投与による遺伝性難聴の革新的治療のための基盤情報のとりまとめを行うことを目的とした。

B. 研究方法

本年度は、信州大学附属病院および研究協力医療機関に受診した両側感音難聴患者のうち CT 画像上で前庭水管拡大を認める症例およびその親族 301 名を対象に、*SLC26A4* 遺伝子のスプライシングジャンクション領域を含む全エクソン領域を PCR 法により増幅し、直接シーケンス法による塩基配列の決定を行い遺伝子変異を同定する手法により実施した。特に新規変異が認められた症例に関しては、親族の遺伝子解析も行い家系内罹患情報と照らし合わせ矛盾が無いことを確認するとともに、NCBI のホームページより BLST 検索を行い、変異部位が生物種を超えて保存されていることを確認した。さらに、従来、既に実施してあったコントロール 100 名のデータの再確認を行い、コントロール群には変異が認められないことを確認した。

(倫理面への配慮)

- ・遺伝子解析に際しては、研究協力者に対する十分な説明の後、書面で同意を得てから解析を行っている。
- ・サンプルには ID 番号を付加して匿名化することで個人情報の漏洩を防止する手順を遵守

して行っている。

- ・当該研究課題に関しては信州大学医学部遺伝子解析倫理委員会で審査を受け承認を得ている。

C. 研究結果

信州大学附属病院および研究協力医療機関に受診した両側感音難聴患者のうち CT 画像上で前庭水管拡大を認める症例およびその親族 301 名を対象に、*SLC26A4* 遺伝子解析を実施した。その結果、*SLC26A4* 遺伝子変異がホモ接合体で見いだされた症例が 26 例、コンパウンド・ヘテロ接合体が 58 例、ヘテロ接合体が 104 例であった。また、変異を認めない症例も 97 例あった。また、遺伝子解析の結果 IVS15+5 G>A 変異や W133X を含む数種の新規遺伝子変異を見出した。薬剤を用いてタンパク質をリフォールディングさせて難聴治療を行う際には、ミスセンス変異あるいはフレームシフト変異の場合には、完全長のタンパク質をコードしていないため、ミスフォールディングによる難聴ではないことが示唆され、薬剤効果が無いと考えられる。

我々の調べた症例では H723R 変異がおおよそ 70% を占めているため、ほとんどの場合は H723R との複合ヘテロ症例となっており薬剤効果が期待されるが、ミスセンスおよびフレームシフト変異のホモ接合体や複合ヘテロ接合体の場合には薬剤が無効であることが想定される。本研究の成果は、実際に治療を開始する前に予め治療効果を推定し、薬剤療法を行うかどうかの判断を行うために必須の検査として非常に重要で意義深い。

D. 考察

本年度の研究により、新たに見出された SLC26A4 遺伝子変異に関しては、今後、聴力の程度進行の有無、変動の有無、めまい発作の有無などの臨床症状に関する精査をおこなうとともに CT、MRI を用いた画像的解析、半規管機能、球形嚢機能検査といった平衡機能検査を行い、平衡機能障害の有無および程度に関する情報収集を行うことで、遺伝子変異を持つ難聴患者の臨床的特徴を明確にすることで、臨床で利用可能な情報としてフィードバックしていくとともに、薬剤投与による治療のためのキャンディデートとして情報を共有し研究を進める予定である。

本研究の成果は、将来的には薬剤効果のある遺伝子変異（薬剤でリフォールディング可能な変異）と薬剤効果のない（あるいは少ない）変異（薬剤でリフォールディング不能な変異）とを、治療前に予め鑑別する上で必須となることが考えられるため、本研究課題の発展に伴い遺伝子型に応じたオーダーメイドの薬物治療を行うための基盤情報として非常に重要かつ必須の情報である。特に、ナンセンス変異やフレームシフト変異など全長のタンパク質を合成できないために機能障害を生じることが推定される遺伝子変異の場合には薬剤によるタンパク質のリフォールディングによる治療が期待できないため、治療前に予め鑑別することが極めて重要である。

E. 結論

遺伝性難聴の疑われる両側感音難聴患者のう

ち前庭水管拡大を伴う症例を対象に、SLC26A4 遺伝子のスプライシング領域を含む全エクソン領域を PCR 法により増幅し直接シーケンス法により遺伝子解析を実施した。遺伝子解析の結果、新規遺伝子変異を含むいくつかの変異を見いだした。本年度の解析により明らかとなった遺伝子変異のスペクトラムの情報は、今後薬物治療を行う際に非常に重要な基盤情報である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shin-Ichi Usami, Maiko Miyagawa, Nobuyoshi Suzuki, Hideaki Moteki, Shin-Ya Nishio, Yutaka Takumi & Satoshi Iwasaki, Genetic background of candidates for EAS (electric-acoustic stimulation). Audiological Medicine, 2010 in press

宇佐美 真一, 先天性難聴, 小児科, 50: 1182-1185, 2009

宇佐美 真一, 予防医学からみた遺伝性難聴, JOHNS, 25(12): 1719-1723, 2009

2. 学会発表

菊池景子, 塚田景大, 長井今日子, 宇佐美真二, 難聴患者におけるプレスチン遺伝子の変異解析, 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 東京 (2009年5月)

宇佐美真一, 遺伝性難聴の診断と取り扱い, 第71回耳鼻咽喉科臨床学会, 旭川 (2009年7月)

宇佐美真一，難聴の遺伝子診断，日本人類遺伝学会第 54 回大会，東京（2009 年 9 月）

塚田景大，鈴木宏明，工 穰，宇佐美真一，
両側進行性感音難聴患者における遺伝的背景
についての検討，第 54 回日本聴覚医学会総会
学術講演会，横浜（2009 年 10 月）

宮川麻衣子，鈴木伸嘉，茂木英明，工 穰，
宇佐美真一，高音急墜型/高音漸傾型感音難聴
症例の臨床像と遺伝的背景，第 54 回日本聴覚
医学会総会学術講演会，横浜（2009 年 10 月）

宇佐美真一，難聴の遺伝子診断の現況，第 1
回難聴遺伝子の研究会，横浜（2009 年 10 月）

和田 仁，宇佐美真一，池田勝久，小林俊光，
遺伝性難聴に関わる変異 Pendrin のサリチル
酸及びその誘導体によるリフォールディング，
第 19 回日本耳科学会総会・学術講演会，東京
（2009 年 10 月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし