

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 仁

平成 23（2011）年 6 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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 仁

平成 23（2011）年 6 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. 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 0
芳賀 洋一	
2. 各種化合物の変異ペンドリンの機能回復活性の評価方法の構築	1 3
平澤 典保	
3. 化合物の設計と合成	1 7
中村 浩之	
4. 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 2
石原 研治	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	3 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・教授
石原 研治・茨城大学・准教授

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

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。

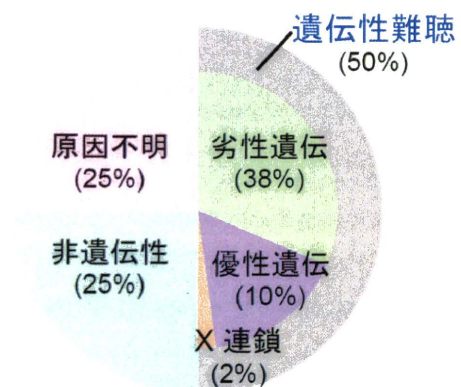


図 1. 先天性難聴患者における遺伝性難聴の割合

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 種類のミスセンス変異が報告されている。

我々は、これまでに 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 変異体に作用し、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、サリチル酸により影響を受け、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 変異体に結合し、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. Pendrin 変異体 (H723R) の機能を回復させる薬剤の同定

B.1.1. 変異体 H723R ベクターの構築

昨年度、同定した変異体のうち、日本人で最

も多く報告されている H723R 変異体のベクターを使用し、機能を回復させる薬剤の同定を行った。pcDNA3.1 に Pendrin-3xFLAG WT を導入した発現ベクターを 1 塩基置換することにより H723R 変異 Pendrin ベクターを構築した。

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 × 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、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (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1に示したサリチル酸 (10 mM) の他、4 種類のサリチル酸誘導体 2-Hydroxybenzyl alcohol, 2,3-Dihydroxybenzoic acid,

表1. 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

Methyl salicylate, 2-Hydroxyacetophenone (1 mM) について、これらの化合物が変異体 H723R の細胞膜へ移行を促進する作用を持っているか調べた。

B.1.5 サリチル酸の細胞毒性評価

サリチル酸の細胞毒性を評価するため、HEK293 細胞に 10mM サリチル酸投与 12 時間後、7-アミノ-アクチノマイシン D (7-AAD) により 10 分間染色した。7-AAD は生細胞内には浸透せず、死細胞には浸透し、共焦点レーザー顕微鏡で判別できる。

B.2. 遺伝性難聴モデルマウスの作製

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製を昨年度より民間業者に委託しており、マウスの Pendrin H723R 変異体を発現するマウスが完成した。また、ヒトの Pendrin H723R 変異体を発現するマウスの作製が進んでおり、現在、オスのホモマウスが完成している。

B.3. 通常マウスにおけるサリチル酸蝸牛内投与の影響

変異 Pendrin の機能回復に効果があると考えられるサリチル酸には、耳毒性があると報告されている。このことから、どの程度の濃度において耳毒性が現れるか、また薬剤として使用できるかの検討を行うため、通常のマウスを用い、サリチル酸の蝸牛内投与の影響を調べた。同時に、マイクロポンプを設置する際に不可欠な耳裏を切開し、蝸牛に薬剤を投与する手術の影響も検討した。

B.3.1. C57BL/6 マウス耳裏切開手術および薬剤投与

C57BL/6 マウスを用い、耳裏を切開し、人工内リンパおよびサリチル酸 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0M) 0.5 μ l を脱脂綿に染み込ませて、正円窓付近に設置した。

B.3.2. 薬剤投与後の聴性脳幹反応 (ABR; Auditory Brain Response) 測定

手術前および薬剤を蝸牛正円窓に注入後、6, 24, 48, 72 時間後の ABR を測定した。

B.4. マウス型ノックインマウスの聴性脳幹反応 (ABR; Auditory Brain Response) 測定

マウスの Pendrin H723R 変異体を発現する 7~22 週齢のノックインマウスを用い、ABR 測定を行った。

B.5. マウス型ノックインマウスの蝸牛形態観察

通常マウスおよびマウス型ノックインマウスの蝸牛を取り出し、マイクロトームで切片を作製した後、ヘマトキシリン染色を行い、形態を顕微鏡で観察した。

B.6. 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用い、恒常的な薬剤投与を目的とした体内埋め込み型マイク

ロポンプシステムの改良・試作を昨年度に引き続き行った。

(詳細は分担研究者、芳賀洋一の報告書を参照)

B.7. 各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

I⁻を能動的に取り込む sodium iodide symporter (NIS)を安定発現する細胞を構築し、各種変異 Pendrin を共発現させた細胞株を樹立し、多種の変異 Pendrin を対象としたスクリーニング系の確立を試みた。

(詳細は分担研究者、平澤典保の報告書を参照)

B.8. 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、その作用機序解明を行うためのサリチル酸ケミカルプローブの合成開発と細胞内イメージングについて検討した。

(詳細は分担研究者、中村浩之の報告書を参照)

B.9. 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

本研究は、社会・教育の面から遂行課題を研究・発展させることを目的としており、近年、新生児を対象とした聴覚スクリーニングが行われ難聴の早期発見が可能になったことや人工内耳や補聴器の性能が向上したことから、難聴児の言語習得のレベルも向上し、難聴を抱える子どもたちは聾学校だけではなく通常学校に在籍するケースも増えてきている。すなわち、通常の学校では受け入れるための準備が必要となり、養護教諭をはじめとする教員、保護者、そこに通う健聴な児童生徒の理解が必要である。しかし、難聴者の QOL は依然として十分でなく何らかの取り組みが必要となる。そこで、本研究

では、茨城大学教育学部養護教諭養成課程の学生とともに、そのような疾患を持つ人の心の痛みを理解し、健康な人が疾患を持つ人と共に明るく楽しい生活が送れる環境および社会を作ることができるような社会構築を目指すため、難聴理解のための実践を行った。

(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お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 Pendrin 変異体 (H723R) の機能を回復させる薬剤の同定

C.1.1 薬剤による Pendrin 変異体 (H723R) の局在変化

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2に示す。図2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。

WT およびサリチル酸、2-ヒドロキシベンジルアルコール、2-ヒドロキシアセトフェノン投与した細胞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。

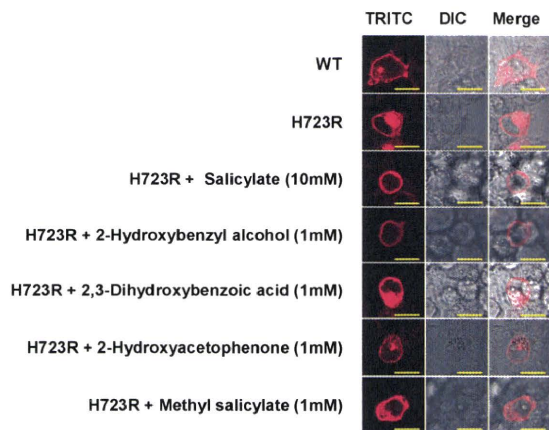


図2. H723R 変異体導入後の HEK293 細胞におけるサリチル酸および4種類のサリチル酸誘導体投与後の免疫染色画像. スケールバーのサイズは 10 μ m.

また、陰性対照としてサリチル酸を溶解するに用いた溶媒のみを加えた H723R 変異体を導入した細胞および 2,3-ジヒドロキシベンゾイック酸、メチルサリチル酸を投与した細胞では、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。

このことから、サリチル酸および2種類のサリチル酸誘導体により、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が明らかとなった。

C.1.2 サリチル酸の細胞毒性評価

10mM サリチル酸の細胞毒性を調べたところ、7-AAD での染色は見られなかったことから、10mM では細胞毒性はないと考えられる(図3)。

C.2. 遺伝性難聴モデルマウスの作製

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

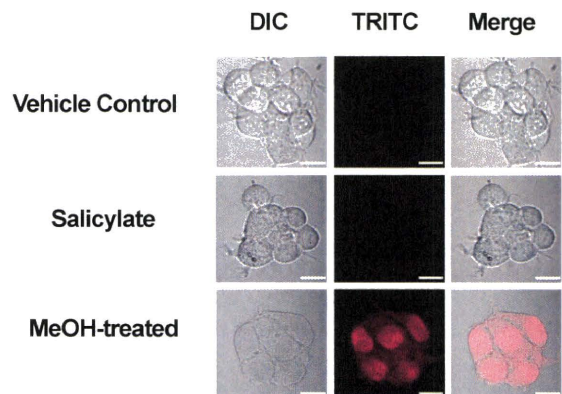


図3. HEK293 細胞に水、サリチル酸、メタノール投与を行った免疫染色画像. スケールバーのサイズは 20 μ m.

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ティ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、マウス型ホモマウスを取得した。ヒト型 Pendrin H723R 変異体を発現するノックインマウスは 2011 年 6 月頃に完成予定である。

C.3. 通常マウスにおけるサリチル酸蝸牛内投与の影響

人工外リンパ投与コントロールマウスとサリチル酸投与(4M, 0.5 μ l) マウスで明確な差が見られた。術前に 20~30dB まで聞こえていたマウスの聴力が、人工外リンパ投与マウスでは、30~40dB と若干の聴力低下がみられたが、サリチル酸投与マウスでは、50~60dB 程度まで落ちるという結果が得られた(図4)。

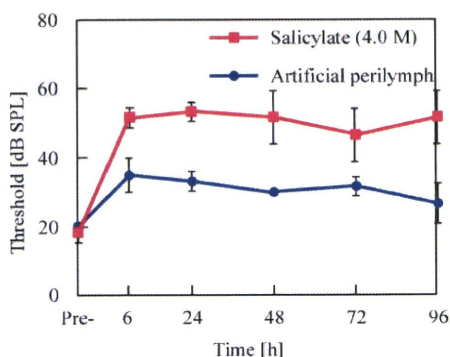


図4. 4.0M サリチル酸投与マウスと人工外リンパ投与マウスの ABR 閾値変化.

また, 0.5, 1.0, 2.0 M の3種類の濃度のサリチル酸を投与したマウスにおいて ABR 閾値の測定を行ったところ, 0.5, 1.0 M では人工外リンパと大きな差は見られなかったが, 2.0 M では6時間後に聴力の低下が見られたものの, 時間経過とともに聴力が回復する傾向が見られ, 72時間後には, 人工外リンパを投与したマウスとほとんど差がなかった (図5). このことから, 2.0 M 程度の濃度で変異 Pendrin の活性回復が見られれば, 聴力回復に非常に有効な効果が見られると考えられる.

C.4. マウス型ノックインマウスの聴性脳幹反応 (ABR; Auditory Brain Response) 測定

7~22 週齢のマウス型ノックインマウスの

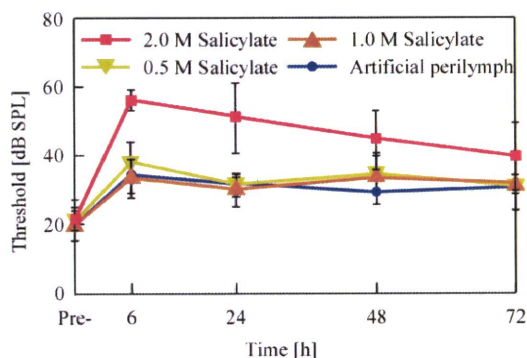


図5. 0.5~2.0M サリチル酸投与マウスと人工外リンパ投与マウスの ABR 閾値変化.

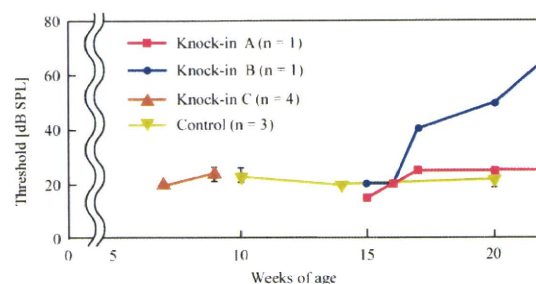


図6. マウス型ノックインマウス ABR 閾値変化.

ABR を測定したところ, 1 体において 17 週から聴力が低下する現象が見られた. その他のノックインマウスでは, コントロールである C57BL/6 通常マウスの ABR 値と差は見られなかった (図6). しかしながら, 通常マウスでも 20 週前後で数%の割合で聴力低下が見られることが知られており, この場合もその可能性が大きいと考えられる. 引き続き調査し, 統計処理にて有意差判定を行わなければならない.

C.5. マウス型ノックインマウスの蝸牛形態観察

以前の研究 (Wangemann P., *Am J Physiol Renal Physiol.*, 297, 1435-1447, 2009) において, ペンドリンのノックアウトマウスで形態が変化したことが観察されており, ノックインマウスでも同様の変化が見られるのではないかと予測の下, マウス型ノックインマウスの蝸牛をヘマトキシリンで染色し, 断面を観察したところ, 通常マウスと大きな差は見られず, 形態に変化を起こしているようには見られなかった (図7).

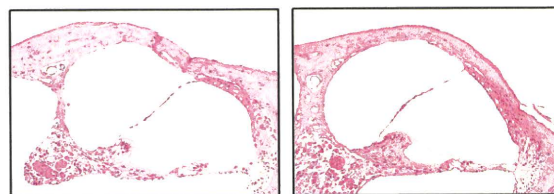


図7. 通常マウス (左) とマウス型ノックインマウス (右) のヘマトキシリン染色蝸牛形態.

このことから、今回作製したマウス型ノックインマウスは、ほぼ通常マウスと同様の聴力を有していると考えられる。

C.6. 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

体内埋め込み型マイクロポンプシステムの開発を行った。昨年度試作したシステムを基に、生体への適用を視野に入れた形状および材質等の改良を行った。具体的には 1)ポンプ構成・トランスミッター・タンク等の改良, 2)ヒト用に試作した実寸大マイクロポンプの検討・評価を行った。

(詳細は分担研究者、芳賀洋一の報告書を参照)

C.7. 各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

ペンドリンは、 Cl^- , HCO_3^- , I^- などの陰イオンの輸送を行なうタンパク質で、1塩基変異による機能消失と遺伝性難聴との関連性が明らかにされている。ある種の変異ペンドリンの活性はサリチル酸により回復されることも報告されている。そこで本研究はペンドリンの機能を回復させる薬物の探索を目的としている。初年度は、変異ペンドリン (H723R, M147V, S657N の3種) および野生型ペンドリンを安定発現させた HEK293 細胞を確立し、 I^- 放出作用を指標としたスクリーニング系の構築を試みた。しかし種々条件検討の結果、細胞内 I^- の取り込みもペンドリン活性により大きく影響を受け、細胞内トータル I^- 量が変動することが明らかになり、これまでのアッセイ方法では I^- を指標としたペンドリン活性の回復作用の精密な比較はできないことが示唆された。そこで本年度は、 I^- を能動的に細胞内に取り込む sodium iodide symporter (NIS)を安定発現する細胞を構築し、さらに各種変異ペンドリンを共発現させた細胞株を確立し、多種の変異ペンドリンを対象とした

スクリーニング系を確立することを試みた。NISの発現により細胞に取り込まれる I^- 量は増大し、ペンドリン活性を見易くなったが、野生型ペンドリンと変異ペンドリンの活性の差は明確に認められなかった。ペンドリン活性を回復される化合物をスクリーニングするためにはさらに工夫が必要である。

(詳細は分担研究者、平澤典保の報告書を参照)

C.8. 化合物の設計と合成

遺伝性難聴患者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。遺伝子进行操作せずに難聴を治療する方法を開発する画期的な方法として、本研究代表者により治療薬を内耳局所に投薬するための体内埋め込み式のマイクロポンプシステムが提案され、本研究事業によりその実用化研究が進められている。本分担研究では、それと相補的な役割を持つ薬剤開発を行う。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シャペロン活性を有する化合物を探索し創薬に結びつける。

(詳細は分担研究者、中村浩之の報告書を参照)

C.9. 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

(1) 特別講義の実施。(2) 難聴を疑似体験できるソフト HearLoss を活用して「聴覚障害ってなんだろう？」という授業案を作成し、教育学部学生に対して講義を行った。

(詳細は分担研究者、石原研治の報告書を参照)

D. 考察

我々のこれまでの研究から、Pendrin 変異体の細胞内への蓄積が、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。これまでに、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。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。

また、我々は、サリチル酸による Pendrin 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 がサリチル酸の投与によって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、マウス型の Pendrin H723R 変異体を発現するノックインマウスが完成し、聴性脳幹反応 (ABR) による、聴覚障害の評価を行った。その結果、今回作製したマウス型ノックインマウスは通常マウスと聴力および蝸牛の形態において大きな差は見られなかった。このことから何かしらの補償が働いたと考えられる。このメカニズムの解明も重要な課題ではあるが、現在、ヒト型のノックインマウスが完成予定であるため、それらの聴力検査を行い、通常マウスよりも低いことを確かめた後、薬剤の効果を調査する実験が喫緊の課題である。

また、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、機能的変化を調べる方法によって変異体の活性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。現在、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構想中である。

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。昨年度、試作したドラッグデリバリーシステムを基に、生体への適用を視野に入れた形状および材料等を検討し、ポンプ構成、トランスミッター、タンク等の改良を行った。本年度は、ヒト用の実寸大マイクロポンプの作製を行い、ラット側頭部を用いて駆動状態を確かめた。この実験により、ヒトの体内にポンプを埋め込み、駆動させることが可能であると考えられる。今後の課題として、ポンプシステムにストップバルブを実装し、薬剤となる液体の流

量調節を行う必要がある。

E. 結論

日本人に最も多いとされる H723R Pendrin 変異体は細胞質内に蓄積し機能を失うが、サリチル酸およびサリチル酸誘導体の投与により細胞膜への移行が生じる。このことからサリチル酸およびサリチル酸誘導体が H723R Pendrin 変異体の機能回復に有効であることが示された。また、通常マウスを用いた実験において、耳裏を切開して薬剤を設置する手術方法を確立し、マイクロポンプ設置の負荷が大きくないことが示された。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の改良がなされ、ヒトへ適用が可能であると示唆された。以上のことから、蝸牛内へ変異ペンドリンの機能を回復させる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

Ishihara K, Okuyama S, Kumano S, Iida K, Hamana H, Murakoshi M, Kobayashi T, Usami S, Ikeda K, Haga Y, Tsumoto K, Nakamura H, Hirasawa N, Wada H, Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutation. *Hearing Research*, **270**, 110-118, (2010).

2. 学会発表

Wada H, Translocation of prestin having mutation in the GTSRH sequence by salicylate, The 47th Inner Ear Biology, 2010 年 8 月 29 日, プラハ, チェコ

Wada H, Recovery by salicylate of the plasma membrane expression of prestin mutants

The 6th World Congress of Biomechanics

2010年8月2日, シンガポール

Wada H, Site-directed mutagenesis of the motor protein prestin, 第12回 東北大学GCOE国際シンポジウム, 2010年3月27日, 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

1. 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

研究分担者 芳賀 洋一 東北大学 教授

研究要旨 超音波により発生する音響流を用い、恒常的な薬剤投与を目的とした体内埋め込み型マイクロポンプシステムの改良・試作を引き続き行った。具体的には 1)ポンプ構成・トランスミッター・タンク等の改良, 2)ヒト用に試作した実寸大マイクロポンプを用いホルマリン固定したモルモット側頭部に埋め込み、検討・評価を行った。

A. 研究目的

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 connexin26(*GJB2*) 及び pendrin(*SLC2644*) が変異により正しく折りたたまれないミスフォールディングにより、その結果機能低下すること起因する。これまでの薬剤投与手段は鼓膜に微小な切開を行い、薬剤を正円窓上に塗布するものであり、投与の度手術を行わなければならなかった。本研究では、変異タンパク質の正しい折りたたみを促す物質を恒常的に内耳へと投与するため、蝸牛への試薬導入用の体内埋め込み型マイクロポンプの開発を行う。

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。

B. 研究方法

マイクロポンプシステムの試作機を用いて正常マウスの蝸牛内に薬物を導入する。薬物の導入効率及びポンプシステムの生体適合性を考慮し、ポンプシステムの改良を行い、ヒト用の埋め込み型ポンプを開発する。

1. マイクロポンプ概要

マイクロポンプシステム概要を Fig. 1 に示す。乳突蜂巣の骨内に作製することができる空間は短径 10 mm×長径 20 mm×奥行 15 mm の円筒形である。この空間を利用して薬剤タンク(ドーナツ型)とポンプを設置する。タンクに充填した薬剤は、体外に設置した超音波プローブから超音波が照射されたときのみ、ポンプからチューブを通して蝸牛に送出される。本研究では、ポンプの駆動力として音響流を使用する。音響流は超音波の伝搬過程で駆動力を得るため、音源付近で加速流となる細いビーム状の流れになる。音響流をポンプ内で選択的に発生させるためポンプの底面部に超音波透過膜を取り付ける。超音波透過膜として、音響インピーダンスが皮膚に近いポリエチレンを使用した。

2. 体内埋め込み用ポンプシステム設計・作製

Fig. 2(a)にヒトの体内に埋め込むポンプシステムの構成を、Fig. 2(b)に実際に作製したシステムを示す。ポンプの外枠として加工のし易さから真鍮を用いており、タンクとチューブ間はシリコンチューブにて接続されている。また、薬剤を蝸牛へと送出するため薄肉のポリイミドチューブを接続した。ポンプの底面部には膜厚 12

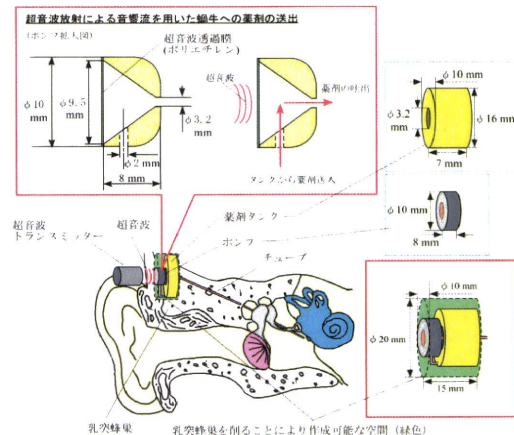


Fig. 1. マイクロポンプシステムの概要。

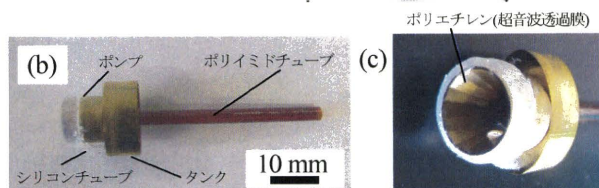
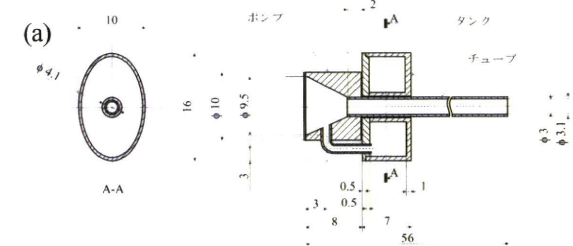


Fig. 2. ポンプシステム設計・作製。
(a)設計図 (b)作製したポンプシステム
(c)ポンプ底面

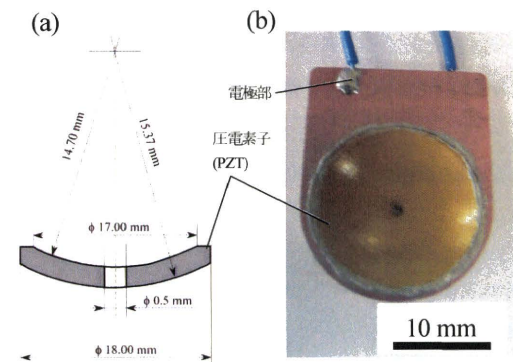


Fig. 3. トランスミッター概要。
(a)断面設計図 (b)作製したトランスミッター

μm のポリエチレン膜が実装されており、体外から照射された超音波を透過させることが可能である (Fig. 2(c)).

Fig. 3(a) にトランスミッター断面形状とサイズを、Fig. 3(b) に作製したトランスミッターを示す。部材には圧電素子 (PZT N-61, NEC Tokin) を用い加工し、14.7 mm 先に焦点を持ち超音波強度を高めることが可能なトランスミッターを作製した。以前までは焦点距離を 30 mm としており、ヒトに用いる際に焦点が合わせにくいなど問題が考えられた。今回の設計により、よりヒト用に適したサイズとされている。

3. ポンプシステムの駆動検証

作製したポンプをホルマリン固定されたモルモット側頭部に埋め込み駆動実験を行った。Fig. 4 に実験装置の概要を示す。ただし、タンクは外枠内に陰圧対策として設置するフレキシブルバルーンが実装されていないため、以前試作したタンクを使用し、薬剤が吐出され続けた際タンク内部が陰圧になり液体が吐出されなくなるのを防止した。ホルマリン固定されたモルモット体内に作製したポンプシステムを埋め込み、モルモットの皮膚とトランスミッター間に超音波を透過し易くする超音波ゲルを塗布する。体外からトランスミッターをモルモット皮膚上に設置し、電圧 80 V、3.3 MHz で駆動した。今回の検証では、ポンプの先端に、外径 3.12 mm、内径 3.0 mm、長さ 30 mm のポリイミドチューブを実装している。

C. 研究結果

Fig. 5 にポンプシステム駆動結果を示す。電圧を負荷しトランスミッターを駆動させたときのみチューブ先端から液体が吐出された。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モルモットの皮膚・ポンプ底面に実装された超音波透過膜 (ポリエチレン薄膜) を透過し、ポンプ内で超音波が収束し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確認した。

D. 考察

今回の結果から、体内にポンプシステムを埋め込み駆動させることが可能であると考えられる。この音響流を用いたシステムは、体内にポンプ駆動用のバッテリーが存在しないことからバッテリーの交換等を必要とせず、MRI 検査等により誤作動をおこすこともない。さらに、ポンプシステム自体に駆動部を持たないため、破損しにくい等の利点も考えられる。しかし、現段階ではバルブが実装されていないため、薬剤が不必要に投与される可能性がある。そのためストップバルブの実装が求められる。また、今回の検証では音響流による液体の吐出の確認を行えたが、流量の測定が行えていない。トランスミッターへの負荷電圧の調節により音響流の

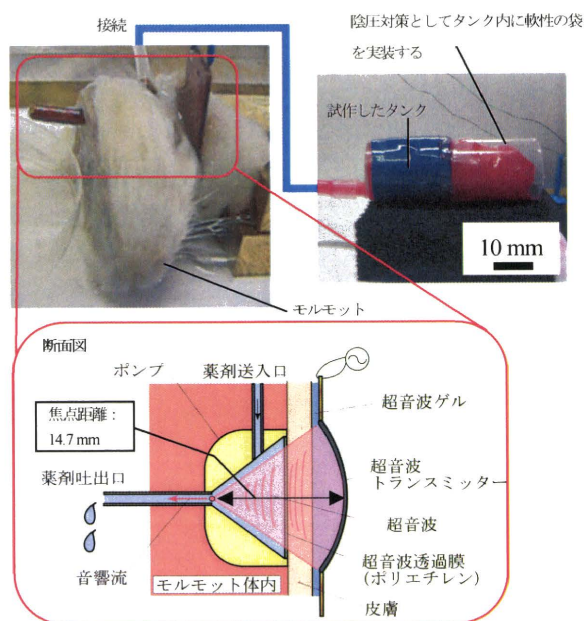


Fig. 4. ポンプシステム駆動実験.

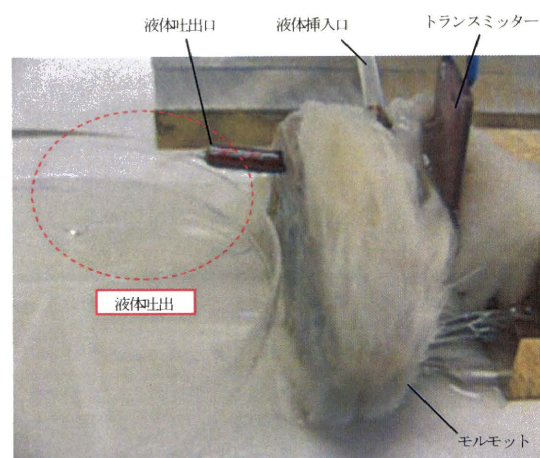


Fig. 5. ポンプシステム駆動結果.

強度を変化させ、液体流量の変化を測定する必要があると考えられる。

E. 結論

本報告ではヒト用にポンプシステムを開発し、モルモット体内に埋め込むことでポンプ駆動の検証を行ってきた。検証結果よりヒトの体内にポンプを埋め込み、駆動させることが可能である。これからの課題として、ポンプシステムにストップバルブを実装し、薬剤となる液体の流量の調節を行う必要がある。

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. 各種化合物の変異ペンドリンの機能回復活性の評価方法の構築

研究分担者 平澤典保 東北大学 教授

研究要旨

ペンドリンは、 Cl^- , HCO_3^- , I^- などの陰イオンの輸送を行なうタンパク質で、1塩基変異による機能消失と遺伝性難聴との関連性が明らかにされている。ある種の変異ペンドリンの活性はサリチル酸により回復されることも報告されている。そこで本研究はペンドリンの機能を回復させる薬物の探索を目的としている。初年度は、変異ペンドリン（H723R、M147V、S657Nの3種）および野生型ペンドリンを安定発現させた HEK293 細胞を確立し、 I^- 放出作用を指標としたスクリーニング系の構築を試みた。しかし種々条件検討の結果、細胞内 I^- の取り込みもペンドリン活性により大きく影響を受け、細胞内トータル I^- 量が変動することが明らかになり、これまでのアッセイ方法では I^- を指標としたペンドリン活性の回復作用の精密な比較はできないことが示唆された。そこで本年度は、 I^- を能動的に細胞内に取り込む sodium iodide symporter (NIS)を安定発現する細胞を構築し、さらに各種変異ペンドリンを共発現させた細胞株を確立し、多種の変異ペンドリンを対象としたスクリーニング系を確立することを試みた。NIS の発現により細胞に取り込まれる I^- 量は増大し、ペンドリン活性を見易くなったが、野生型ペンドリンと変異ペンドリンの活性の差は明確に認められなかった。ペンドリン活性を回復させる化合物をスクリーニングするためにはさらに工夫が必要である。

A. 研究の背景と目的

遺伝性難聴の原因遺伝子の1つであるペンドリンは、内耳等に発現する 780 アミノ酸からなる膜タンパク質である。 Cl^- , HCO_3^- , I^- などの陰イオンの輸送を行なうタンパク質で、聴覚の維持に重要な役割を果たしている。これまで、日本人では 10 種類の変異ペンドリンが報告されており、その機能消失と遺伝性難聴との関連性が明らかにされている。本研究事業は、この変異ペンドリンの機能を回復させる薬物をマイクロポンプシステムにより投与

することによる遺伝性難聴の革新的治療法の創生を目指したものである。

本研究グループによりある種の変異ペンドリンの活性はサリチル酸により回復されることが明らかにされている。しかし、サリチル酸自身は他のタンパク質にも結合して聴覚を低下させる作用もあり、治療薬とは成り難い。そこで、ペンドリンの機能を回復させる薬物の探索を目的として、スクリーニング系の確立を目指した。これまでペンドリン活性は HEK293 細胞に変異ペンドリンを一過性に発

現させ、 ^{125}I 放出作用を指標として、その活性が測定されていた。しかしながら、本法では、一過性発現株を用いるために、詳細な条件検討ができていないこと、さらに実験間の誤差が大きく、多種類の化合物の活性比較には不適當であることが考えられ、初年度には、変異ペンドリンの安定発現株を作製し、ペンドリン活性を測定したが、細胞内に取り込まれる I^- 量が少なく、優れたスクリーニング系を構築することができなかった。そこで本研究ではさらに I^- を能動的に細胞内に取り込むトランスポーター sodium iodide symporter (NIS) を安定発現する細胞を構築し、スクリーニング系としての有用性を解析した。

B. 研究方法

B. 1. 安定発現株の作製

B. 1. 1. 遺伝子

ヒト野生型ペンドリン及び変異ペンドリン (H723R, M147V, S657N の 3 種) 遺伝子を Flag tag 配列の下流に接続した発現プラスミド (pcDNA) は、東北大学 和田仁教授より、全長ヒト sodium iodide symporter (NIS) を含む発現プラスミドはオハイオ州立大学 Jiang 博士より供与された。

B. 1. 2. NIS 安定発現株の作製

HEK 293 細胞を 1×10^7 cells/ml となるように K-PBS 中に懸濁し、その 0.4 ml をエレクトロポレーション用キュベットにとった。各発現プラスミド 5 μg を加え、エレクトロポレーター (BTX) により、15 msec 300 V の電圧をかけ、エレクトロポレーションを行った。プレートに蒔き、G418 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で培養することにより、安定発現株を得た。

B. 1. 3. ペンドリンの一過性発現

ペンドリン各種遺伝子を Fugene を用いて、

NIS を安定に発現する HEK293 細胞にトランスフェクトした。

B. 1. 4. NIS およびペンドリン安定発現株の作製

NIS とともに、野生型ペンドリン、ならびに変異 (H723R) ペンドリンも安定発現する細胞を樹立するために、NIS 安定発現細胞に、各種ペンドリン発現プラスミド (pcDNA) ならびにハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミド pTXHyg を用いて、同様にエレクトロポレーションし、ハイグロマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で培養して、遺伝子が導入された細胞を選択した。ペンドリンの発現はウェスタンブロットあるいはドットブロットで確認した。

B. 2. ペンドリン活性の測定

HEK293 細胞に発現したペンドリンの活性を評価するため、 ^{125}I を用いて、 ^{125}I の放出活性を測定した。HEK293 細胞 (5×10^5 cells/ml) 0.5 ml を 24-well dish に蒔き、翌日 10 mM サリチル酸を含む培地と交換する。12 時間後、培地を除き、Hanks balanced salt solution (HBSS) で 2 回洗浄し、 ^{125}I (74kBq/ml) を含む HBSS を加え、40 分間インキュベートした。HBSS で 3 回洗浄したのち、可溶化剤 (0.1N NaOH、0.1% SDS、2% Na_2CO_3) を 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加えることにより細胞を溶解し、細胞内の放射活性を測定した。

C. 研究結果

C. 1. NIS 安定発現株の ^{125}I 取り込み活性

^{125}I の取り込みを増大させるために NIS を安定に発現する HEK293 細胞株を樹立した。HEK293 細胞と NIS を安定発現させた HEK293 細胞の ^{125}I の取り込み量を比較した

ところ、図1のようにNISの発現により $^{125}\text{I}^-$ の取り込みは著しく増大した。

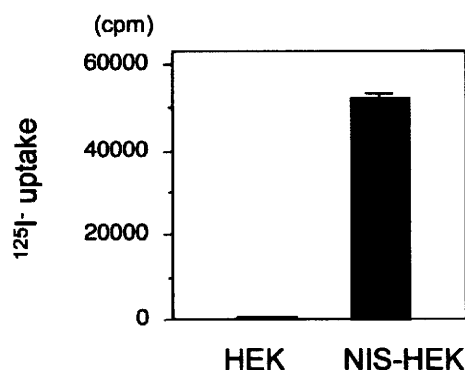


図1. NIS 安定発現株の $^{125}\text{I}^-$ の取り込み増大

C. 2. ペンドリン活性の測定

これまでに報告されているペンドリン活性の測定は、 $^{125}\text{I}^-$ の放出活性として測定している。その原理は細胞内に $^{125}\text{I}^-$ を取り込ませ、その後一定時間内の $^{125}\text{I}^-$ 放出を細胞内に残存する $^{125}\text{I}^-$ として測定するものであった。しかし、初年度の解析により、通常の細胞では $^{125}\text{I}^-$ の取り込み量が少なく、野生型ペンドリンの発現により、細胞内 $^{125}\text{I}^-$ の取り込み量が大きく変化した。精度よいペンドリン活性の評価ができなかった。より精度の良い方法としてNISを強制発現させ、 $^{125}\text{I}^-$ の取り込みを増大させることで、ペンドリンの活性を調べられることが報告されている。そこでまずNIS安定発現株にペンドリンを一過性に発現させた場合にペンドリン活性を評価できるかどうか解析した。その結果、図2に示すように、野生型ペンドリンの活性($^{125}\text{I}^-$ の放出活性)を明瞭にすることができた。その一方で、活性のない変異ペンドリン(H723R)を発現させた場合にもペンドリン活性が認められ、野生型ペンドリンとの差は小さかった。この差はサリチル酸ナトリウム 10 mM 前処理後でも変化しなかった。このようなわずかな差ではペンド

リン活性を回復する薬のスクリーニングは難しいと考え、安定発現株の作製を試みた

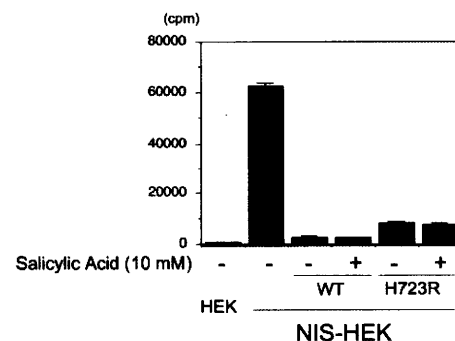


図2. NIS 安定発現株に ペンドリンを一過性に発現した場合の $^{125}\text{I}^-$ 放出活性

C. 3. NIS およびペンドリン安定発現株による解析

NIS と変異ペンドリンを安定発現させた細胞を確立した。本細胞において、ペンドリン活性を回復する作用をもつことが示唆されているサリチル酸ナトリウム 10 mM で 12 時間処理した後に $^{125}\text{I}^-$ の放出活性の変化を測定したが、サリチル酸で処理しても活性に有意な差は認められなかった。

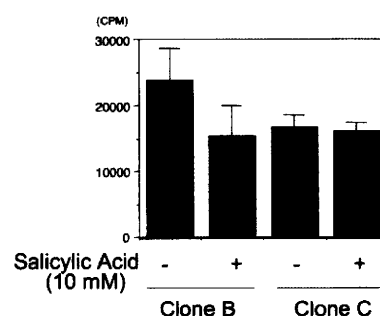


図3 NIS-ペンドリン安定発現株による解析

D. 考察

本研究において、ペンドリンと NIS の共発現細胞株を新たに構築し、高精度なスクリーニング系の確立を目指した。しかし本細胞においても野生型ペンドリンと変異ペンドリンの活性の差を明瞭なものにすることはできず、機能回復薬のスクリーニング系としては不十分であることが明らかになった。今後、より詳細な条件を解析し、最適化をはかり、ペンドリン活性回復薬のスクリーニング系を確立したい。

E. 結論

変異ペンドリン安定発現株を作製したが、種々化合物のペンドリン活性回復作用を高精度で評価するためにはさらに詳細な検討が必要である。

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

3. 化合物の設計と合成

研究分担者 中村 浩之 学習院大学 教授

研究要旨

遺伝性難聴患者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。遺伝子进行操作せずに難聴を治療する方法を開発する画期的な方法として、本研究代表者により治療薬を内耳局所に投薬するための体内埋め込み式のマイクロポンプシステムが提案され、本研究事業によりその実用化研究が進められている。本分担研究では、それと相補的な役割を持つ薬剤開発を行う。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シャペロン活性を有する化合物を探索し創薬に結びつける。鎮痛作用を有することが古くから知られているサリチル酸が、この機能を失った変異 Pendrin に対し、シャペロン活性作用を有することが、研究代表者の先行研究よりわかっている。本研究では、その作用機序解明を行うためのサリチル酸ケミカルプローブの合成開発と細胞内イメージングについて検討した。

A. 研究の目的

遺伝性難聴患者の大半は内耳に発現する膜タンパク質 Pendrin (SLC26A4) 及び Connexin26 (GJB2) の遺伝子変異に起因する。本研究代表者らのこれまでの研究により、Pendrin と相同性が高く、内耳外有毛細胞に発現する膜タンパク質 Prestin (SLC26A5) において、変異により Prestin が細胞内でミスフォールディングして機能を失う場合、分子シャペロンとして働く物質を細胞に投与すると、変異 Prestin がリフォールディングし、その機能が回復することが発見された。そこで、変異 Prestin と同様にミスフォールディングした変異 Pendrin をリフォールディングさせ、それらの機能を回復させる薬剤の開発を目的とする。このような薬剤が見出すことができれば、本研究代表者らにより進められているマイクロポンプシステムと組み合わせこ

とにより、遺伝性難聴の治療においてQOLの向上が期待できる。

これまで鎮痛作用を有することが古くから知られているサリチル酸が、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本研究代表者らにより明らかにされてきている。本研究ではサリチル酸のシャペロン活性について、その詳細な作用機序解明を目的として研究を進める。具体的には、サリチル酸をシード化合物として、その骨格に細胞内蛍光イメージングが可能な官能基を有機合成により導入することで、ケミカルプローブ化を検討する。

B. 研究方法

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、本研究事業の代表者・和田および分担者・平澤、石原によって