

201122029A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 仁

平成 24 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田 仁

平成 24（2012）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. ヒト型 H723R 変異 Pendrin ノックインマウスの形態観察 . . . . . 1 1  
宇佐美 真一
2. 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 5  
芳賀 洋一
3. マウス及びヒト型変異 Pendrin 発現ノックインマウスにおけるイオン濃度並びに  
内リンパ電位の測定 . . . . . 1 9  
小林 俊光
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 3  
平澤 典保
5. 化合物の設計と合成 . . . . . 2 7  
中村 浩之
6. 遺伝性難聴モデルマウスを用いた分子病態解析および新規治療法の開発 . . . . . 3 1  
池田 勝久
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 . . . . . 3 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。そこで、Pendrin の遺伝子に起因する難聴の根治を目指し、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 に治療薬を投与し、機能回復を試みる。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。さらに、より効果的に機能を回復させる化合物を探索し創薬に結びつける。

### 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と考えられているが、これら難聴を根治する治療法ははまだ確立されていない。

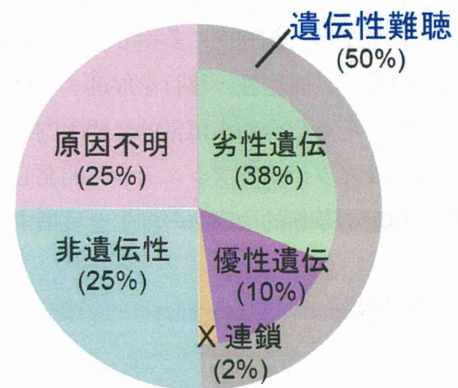


図 1. 先天性難聴患者における遺伝性難聴の割合

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<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>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<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>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。

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探索し、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. 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一

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およびヒトの Pendrin H723R 変異体を発現するマウスが完成した。これらのマウスを用いて、以下の実験を行った。

### B.2. 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 6~32 週齢のノックインマウス 33 匹で ABR 測定を行った。

### B.3. ヒト型ノックインマウスの聴性脳幹反応 (ABR; Auditory Brain Response) 測定

ヒトの Pendrin H723R 変異体を発現する 6 週齢のノックインマウス 3 匹で ABR 測定を行った。

### B.4. マウス型ノックインマウスへのサリチル酸投与による聴力測定

マウス型ノックインマウスの右耳を切開し、サリチル酸 (2.0, 3.0M) 0.5μL を脱脂綿に染み込ませて、正円窓付近に設置した後、ABR によりマウスの聴力を測定した。

### B.5. マウス型及びヒト型変異ペンドリン発現ノックインマウスにおけるイオン濃度並びに内リンパ電位の測定

Pendrin ノックインマウスの蝸牛機能を検討する準備として、通常マウスにおけるイオン濃度並びに内リンパ電位を測定した。

(詳細は分担研究者、小林俊光の報告書を参照)

### B.6. ヒト型ノックインマウスの蝸牛形態観察

昨年度マウス型ノックインマウスで行ったのと同様の形態観察をヒト型ノックインマウスに対しても行った。ヒト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、ヘマトキシン染色を行い、形態を顕微鏡で観察した。

(詳細は分担研究者、宇佐美真一の報告書を参照)

### B.7. 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

細胞実験において、薬剤の投与により機能が回復する効果が見られたことから、内耳に薬剤を恒常的に投与する治療法を考えた。

これまでの内耳への薬剤投与は、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ったが、この研究では、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開発を行った。

このマイクロポンプは、ヒトでの恒常的薬剤投与を目的としているため、これまで、ヒトに対して使用できるようなマイクロポンプの作製を行ってきたが、今年度は、ノックインマウスの治療を目指すため、より小型化したチューブなどのサイズの改良に取り組んだ。

(詳細は分担研究者、芳賀洋一の報告書を参照)

### B.8. 各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

本研究は、Pendrin の機能回復活性の評価を迅速に行えるよう、スクリーニング系の確立を目指すものである。

昨年度までは、1) 変異 Pendrin の安定発現株の樹立と 2) I を能動的に細胞内に取り込む sodium iodide symporter (NIS)安定発現細胞と各種変異ペンドリンを共発現させた細胞株の樹立を試みたが、目標とする結果が得られなかった。

そこで、今年度は、細胞内 pH の変化ならびにサリチル酸の Heat Shock Protein (HSP)の発現について解析した。

野生型 Pendrin を発現させた細胞では、Cl<sup>-</sup>を含まない緩衝液に交換すると、Cl<sup>-</sup>が細胞外へ輸

送され、かわりに HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が細胞内に輸送されて細胞内 pH が上昇する。しかし、活性のない変異 Pendrin を発現した細胞ではこの交換作用がないために pH の変化は認められない。この現象を利用し、薬剤の効果を評価する方法の確立を目指した。

また、サリチル酸が Pendrin の局在を回復する作用機構が不明であるため、蛋白質の構造の維持・巻き戻し作用を持つ化合物である化学シヤペロンとしての作用の有無について HSP の発現を指標に解析した。

(詳細は分担研究者、平澤典保の報告書を参照)

### B.9. 化合物の設計と合成

変異 Pendrin にサリチル酸を投与することによって、機能が回復することが見出されているが、サリチル酸には耳毒性があることが知られている。そこで、毒性が無くしかもサリチル酸よりも高いシヤペロン活性を有する化合物を見出す必要がある。ここでは、その評価方法を確立することを目的として、Pendrin およびその変異体定常発現株の樹立を行った。

(詳細は分担研究者、中村浩之の報告書を参照)

### B.10. 遺伝性難聴モデルマウスを用いた分子病態解析および新規治療法の開発

新規開発した Cx26 欠損マウスへの CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) の導入を試み、移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークの構築を試みた。

(詳細は分担研究者、池田勝久の報告書を参照)

### B.11. 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

学校保健実務必携にある、学校で注意すべき難聴としてヘッドホン難聴が挙げられている。

ヘッドホン難聴は、長時間、大音量で音楽等

を聴くことにより引き起こされ、慢性的な症状になると治療することが難しく、予防をすることが大切である。

本研究は、学校で注意すべき難聴として上げられているヘッドホン難聴に関して、小学生および大学生のヘッドホン使用状況を調査した。

(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)

本研究には遺伝子組換え実験および動物実験が含まれる。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。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。

## C. 研究結果

### C.1. 遺伝性難聴モデルマウスの作製

昨年度完成したマウス型ノックインマウスに引き続き、予定より遅れていたヒト型ノックインマウスが完成した。ジェノタイピング結果より、間違えなくノックインマウスになっていることが判明した。

### C.2. 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 6~32 週齢のノックインマウス 33 匹を用い、ABR 測定を行ったところ、聞こえが良いマウスと聞こえが悪いマウス 2 つの傾向に分けることができる結果が得られた (図 2, 3)。

遺伝子型は、全て同じであるが、表現型として 2 種類に分けることができる傾向にあったので、H723R 以外の他の遺伝子による補償などが関係しているかもしれない。今後、これら 2 種

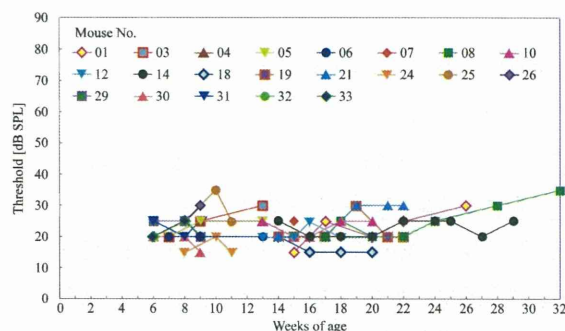


図 2. マウス型ノックインマウス全 33 匹中聞こえが悪くならなかった 21 匹の ABR 閾値計測結果

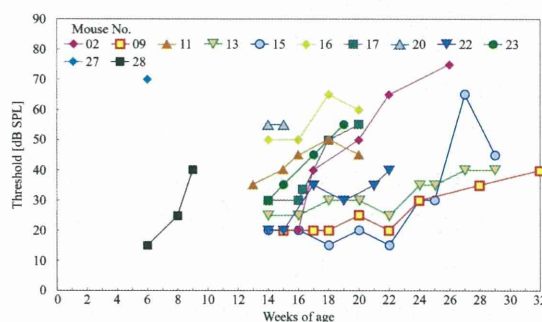


図 3. マウス型ノックインマウス全 33 匹中聞こえが悪くなった 12 匹の ABR 閾値計測結果

類のマウスを別系統として飼育し、遺伝子型を詳細に調査することで、複合的要因を見出す予定である。

### C.3. ヒト型ノックインマウスの聴性脳幹反応 (ABR; Auditory Brain Response) 測定

ヒトの *Pendrin* H723R 変異体を発現する 6 週齢のノックインマウス 3 匹を用い、ABR 測定を行ったところ、全てのマウスの ABR 閾値が最大音圧 90 dB SPL (この機械で計測できる限界値) を超えていた。グラフでは、計測不能として Scale out としている (図 4)。

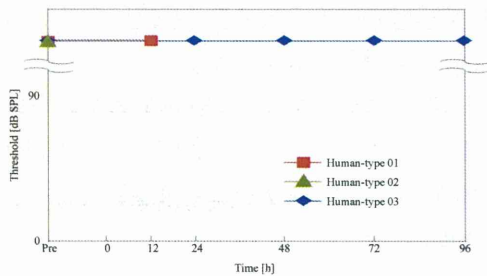


図 4. ヒト型ノックインマウスのサリチル酸投与後の ABR 閾値計測結果

#### C.4. マウス型ノックインマウスへのサリチル酸投与による聴力測定

マウス型ノックインマウスの右耳を切開し、サリチル酸 (2.0, 3.0M) 0.5 $\mu$ L を脱脂綿に染み込ませて、正円窓付近に設置した後、ABRによりマウスの ABR 閾値を測定したが、聴力が回復するマウスは観察できなかった (図 5)。

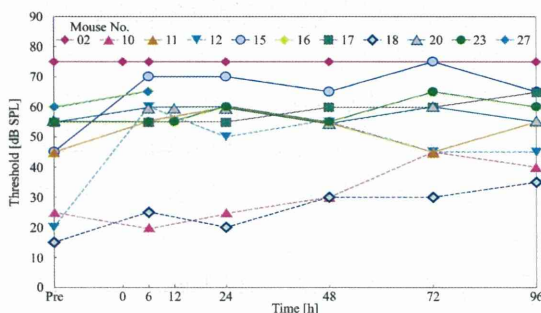


図 5. マウス型ノックインマウスへのサリチル酸投与後の ABR 閾値計測結果

#### C.5. ヒト及びマウス型変異ペンドリン発現ノックインマウスにおけるイオン濃度並びに内リンパ電位の測定

通常マウスで  $K^+$ イオン濃度および内リンパ電位の測定が正確にできることが確認されたので、今後 Pendrin ノックインマウスを繁殖し個体数が増え次第、同様の測定を行う。

(詳細は分担研究者、小林俊光の報告書を参照)

#### C.6. ヒト型ノックインマウスの蝸牛形態観察

ヒト型ノックインマウスの蝸牛を取り出し、

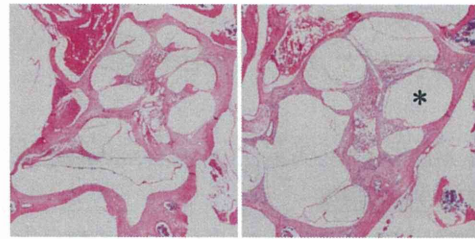


図 6. 通常マウス(左)およびヒト変異型 Pendrin ノックインマウス(右)の蝸牛  
\*: 内リンパ水腫部位

マイクロームで切片を作製した後、ヘマトキシン染色を行い、形態を顕微鏡で観察したところ、通常マウス (C57BL/6) と比較して、明らかな違いが見られた (図 6)。

ヒト型ノックインマウスの basal turn に hydrops を認め、Corti, limbs, spiral ligament などが圧迫変性している。

昨年観察したマウス型ノックインマウスにおいては、通常マウスと比較して違いが見られなかったことから、マウス型ノックインマウスに対しての薬剤投与は効果を期待できるものの、ヒト型ノックインマウスにおいては、形態の異常が大きいため、薬剤での治療は困難と考えられる。

(詳細は分担研究者、宇佐美真一の報告書を参照)

#### C.7. 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てきた。一昨年から試作しているシステムを引き続き改良し、人体への適用を視野に入れた形状および材質等の最適化を行い、駆動実験によりマイクロポンプからの吐出の検討・評価を行った。

今回、ノックインマウスで、薬剤を継続投与できるようにマイクロポンプを改良した。マウス蝸牛の投薬部に合わせて吐出部先端径を細



径化し、チューブの内径を 0.2 mm とした。この時、投与量が最適であった。

(詳細は分担研究者、芳賀洋一の報告書を参照)

### C.8. 各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

細胞内 pH の変化ならびにサリチル酸による HSP の発現について解析したところ、細胞内 pH については、野生型 Pendrin と変異 Pendrin で有意差はなく、サリチル酸の効果を評価できるほどの差は認められなかった。また、HSP については、サリチル酸が Pendrin の局在を変化させる濃度において、HSP70 および HSP105 を誘導するかどうか、real-time PCR 法により解析した結果、HEK 細胞では HSP70 の発現は極めて低いこと、HSP70 ならびに HSP105 はいずれもサリチル酸により増大しないことが明らかになった。

以上の結果から、Pendrin の機能回復を評価するための方法として、細胞内 pH の変化をみることは適していない可能性が示された。また、HSP の発現量が極めて低かったことから、サリチル酸の作用機構として、Pendrin とサリチル酸が直接結合している可能性が示唆された。評価系については、今後さらなる条件検討を行う。

(詳細は分担研究者、平澤典保の報告書を参照)

### C.9. 化合物の設計と合成

HEK293 細胞に Pendrin-3xFLAG が挿入されているプラスミドベクター pcDNA3.1(+) を導入し、クローニングすることで、野生型 Pendrin 定常発現株ならびに P123S 定常発現株を樹立することに成功した。両者ともそれぞれの特性を獲得した定常発現株となったことから、化合物スクリーニングが可能となり、サリチル酸よりも分子シャペロン活性の高い化合物を探索する研究に貢献できる。

(詳細は分担研究者、中村浩之の報告書を参照)

### C.10. 遺伝性難聴モデルマウスを用いた分子病態解析および新規治療法の開発

ヒト遺伝性難聴の新規治療法開発のための最適な遺伝子改変モデルマウスを開発し、骨髄間葉系幹細胞への細胞導入効率を飛躍的に高める方法を開発した。

新規開発した Cx26 欠損マウスへ CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) を導入したところ、移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

(詳細は分担研究者、池田勝久の報告書を参照)

### C.11. 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

小学生や大学生にヘッドホンの使用状況やヘッドホン難聴に対する認識を質問紙調査した結果、約 20 年前と比較してヘッドホンは広く社会全体に普及し、生活に深く根付いていると考えられた。しかし、ヘッドホン使用が聴力にどのような影響を及ぼすかについて意識している割合は低かった。このことから、ヘッドホン使用の際、大音量で聴くこと、長時間聴くこと、周波数の高い音を聴くことなどは避けるような指導の必要性があることが明らかとなった。

(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。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。

続いて、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。

細胞実験において、膜移行活性を示し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。昨年度、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、20 週齢未満の若い段階で聴力が悪くなる個体群と 20 週齢を越えても聴

力が衰えない個体群の 2 種類の表現型が現れた。遺伝子型が同一であるにもかかわらず、表現型に違いが出ているため、違う部分の遺伝子が影響を及ぼしたり、補償のようなメカニズムが働いている可能性が考えられる。また、マウス型ノックインマウスと通常マウスの蝸牛の形態において大きな差は見られなかった。

細胞実験で効果のあったサリチル酸は耳毒性があることが知られている。ここで、サリチル酸誘導体の耳毒性について解析を進めた結果、現在のマウスへの手術方法においては、2 M を脱脂綿に浸み込ませて、蝸牛正円窓に設置したとき、聴力の低下を起こさない最大の濃度であることが明らかになった。従って、この濃度が耳毒性を示さず、変異 Pendrin の機能を回復させるのに最も有効であると判断した。

そこで、20 週齢未満の若い段階で聴力が悪くなっている個体にサリチル酸投与手術を行ったが、明確な聴力の回復は見られなかった。蝸牛内への浸透が十分ではなかった可能性などが考えられる。

ヒト型ノックインマウスにおいては、予定の完成時期が大幅に遅れたことから、十分な個体数の計測ができなかったが、6 週齢の非常に若い段階で、計測した 3 匹ともに 90 dB 以上の閾値と考えられるスケールアウトとなる結果を得た。現在、引き続き ABR 計測を行っているが、表現型としては、ほぼ全ての個体で聴力が悪くなっており、表現型が一致している。また、蝸牛の形態を観察したところ、内リンパ水腫とそれに伴うものと思われる Corti, Limbus, Spiral ligament において圧迫変性が見られた。また、ラセン神経節細胞の減少も見られ、難聴の原因として内リンパ水腫の関与が示唆された。さらに、前庭でも水腫を認めており、ペンドレッド症候群および前庭水管拡大を伴う難聴患者の臨床像との類似が見られ、モデル動物として有用であると考えられた。しかしながら、このヒト

型ノックインマウスでは、若い段階で蝸牛において非常に大きな変形を伴うことから、薬剤投与による治療は困難と推察される。

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。一昨年度より試作しているドラッグデリバリーシステムを基に、人体への適用を視野に入れた形状および材料等を検討してきた。ヒトに搭載可能なマイクロチューブはすでに完成しており、恒常的な薬剤投与に適したサイズの生体適合性チューブは作製できている。

ノックインマウスでの実験のために、薬剤投与する際に、目標投与量（サリチル酸の耳毒性評価実験より得られた最適と考えられる量 0.5 $\mu$ L）を投与できるよう吐出部先端径を細径化したチューブを作製した。また、マウスに投与する際のポンプ本体は、外部に設置し、投薬できるようにした。

以上のことから作製したマイクロポンプによって、マウスおよびヒトに対して薬剤注入が可能であることが明らかとなった。

## E. 結論

日本人に最も多いとされる H723R Pendrin 変異体をもつマウス型およびヒト型の 2 種類のノックインマウスを作製し、聴力の変化を調べた。

マウス型ノックインマウスでは、若い段階で聞こえが悪くなるマウスと聞こえが悪くならないマウスの 2 パターンの表現型が見られた。遺伝子型は両者とも H723R の変異を持っていたため、H723R 以外の他の遺伝子による何かしらの補償などが働いたと考えられるが、今後は更なる調査を要する。このマウス型ノックインマウスにおいて、聞こえが悪かったものに対して、サリチル酸投与手術を行ったが、回復の効果は見られなかった。

ヒト型ノックインマウスにおいては、全ての

マウスで聞こえが悪い表現型が現れ、蝸牛の形態も通常マウスと比べ、著しく変形しており、薬剤での回復は難しいと考えられる。

薬剤を恒常的に投薬できるマイクロポンプシステムについては、小型化が成功し、ヒトに対して使用できるものが完成した。

今後は、引き続き、ノックインマウスへの施術により、聴力の回復を試みるとともに、継続投与が可能なマイクロポンプのさらなる改良を行う。また、スクリーニング系をさらに充実させ、サリチル酸に匹敵するような、変異 Pendrin の機能を回復させる効果のある薬剤探索を行う。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

- (1) Inaoka, T., Shintaku, H., Nakagawa, T., Kawano, S., Ogita, H., Sakamoto, T., Hamanishi, S., Wada, H., Ito, J., Piezoelectric materials mimic the function of the cochlear sensory epithelium. *PNAS*. 2011, 108(45): 18390- 18395.

学会発表

- (1) Ikehara, Y., Koyama, S., Murakoshi, M., Ikeda, R., Nakaya, K., Hashimoto, S., Nishio, S., Takumi, Y., Oshima, T., Usami, S., Kobayashi, T., Wada, H., Effects of salicylate on sensorineural hearing loss in Pendred syndrome. The 5th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering. 2012. 12. Singapore.
- (2) 池原康裕, 小山眞, 村越道生, 池田怜吉, 中谷和弘, 橋本繁成, 西尾信哉, 工穰, 大島猛史, 宇佐美真一, 小林俊光, 和田仁, サリチル酸がペンドリン H723R 変異ノックインマウスの聴覚に与える影響 (Effects of salicylate on the auditory system in a knock-in mouse model for H723R mutation in Pendrin), 第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012. 1. 大阪.
- (3) 池原康裕, 小山眞, 村越道生, 池田怜吉, 中谷和弘, 橋本繁成, 西尾信哉, 工穰, 大島猛史, 宇佐美真一, 小林俊光, 和田仁, サリチル酸が C57BL/6 マウスの聴覚に与える影響 (Effects of Salicylate on the Auditory

- System in C57BL/6 Mice), 第22回バイオフロンティア講演会, 2011.10. 津.
- (4) 堺奈津貴, 小山眞, 村越道生, 平澤典保, 中村浩之, 石原研治, 和田仁, 感音難聴を引き起こすペンドリン変異体の サリチル酸誘導体による細胞膜への輸送 (Transport of Pendrin Mutant Causing Sensorineural Hearing Loss to Plasma Membrane by Salicylate Derivatives), 第22回バイオフロンティア講演会, 2011.10. 津.
- (5) 須田慎一郎, 芳賀洋一, 松永忠雄, 鶴岡典子, 和田仁, 体内埋込型超音波駆動マイクロポンプ, 日本機械学会東北支部第47期秋季講演会, 2011.9. 米沢.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2011-206641

体内埋込型液体ポンプシステム

出願日: 2011年9月21日

発明者: 芳賀洋一, 松永忠雄, 須田信一郎,

和田仁

出願人: 国立大学法人東北大学

## II. 分担研究報告書

### ヒト型 H723R 変異 Pendrin ノックインマウスの形態観察

研究分担者 宇佐美 真一 信州大学 教授

#### 研究要旨

先天性難聴は新生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性障害の一つである。難聴は音声言語コミュニケーションの大きな障害となることより、その治療法の開発が期待されている。

難聴の原因のうちおよそ 50~60%が遺伝子が関与するものであると推測されており、*GJB2* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子など 60 を超える原因遺伝子の関与が報告されている。

本研究では、前庭水管拡大を伴う両側感音難聴および Pendred 症候群の原因遺伝子である *SLC26A4* 遺伝子のうち、日本人難聴患者に最も高頻度で認められる p.H723R 変異を持つヒト cDNA をマウスの *SLC26A4* 遺伝子領域に導入したヒト型 H723R 変異 Pendrin ノックインマウスの形態観察を行った。

その結果、ヒト型 H723R 変異 Pendrin ノックインマウスでは、前庭、蝸牛とも高度の内リンパ水腫を認め、特に基底回転部では内リンパ圧による変性と思われる所見が複数箇所で見られた。

#### 研究協力者

工藤、西尾信哉 (信州大学医学部耳鼻咽喉科)

橋本繁成 (信州大学大学院加齢適応生物学専攻)

#### A. 研究の背景と目的

先天性難聴は、新生児 1,000 人に 1 人の割合で誕生する先天性障害のうち最も頻度の高い疾患の一つである。難聴は音声言語コミュニケーションの大きな障害となるとともに、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。従って、適切な医学的介入や治療法の開発が期待されている。

難聴の原因のうちおよそ 50~60%は遺伝子が関与するものであると推測されており、*GJB2* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子など 60 を超える原因遺伝子の関与が報告されている。

*SLC26A4* 遺伝子は、前庭水管拡大を伴う両側感音難聴および Pendred 症候群の原因遺伝子である。

*SLC26A4* 遺伝子にコードされる Pendrin は 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 は溶質輸送体ファミリーに属しており、Cl<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  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と考えられているが、実際の症例では前庭水管拡大を伴うという奇形を合併していることから、その発症メカニズムは必ずしも明らかではない。

本研究では、研究代表者である東北大学の和田仁教授の開発した、サリチル酸投与により変異 Pendrin タンパクをリフォールディングさせ、機能回復をさせる手法を臨床応用し、遺伝性難聴の薬物治療を目指す画期的な研究手法のためのモデル動物として開発されたヒト型変異 Pendrin ノックインマウスの表現型の解析を主に行った。

変異導入の際には、日本人難聴患者のなかで最も高頻度で認められる p.H723R 変異を cDNA に組み込み、マウスの *SLC26A4* 遺伝子領域に導入したヒト型 H723R 変異 Pendrin ノックインマウス（ホモ接合体）の形態観察を行った。

## B. 研究方法

### ヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウスの形態観察

ヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウスおよび野生型マウスに対して、ケタラルールおよびソムノペンチルの腹腔内投与を行い深麻酔下においた後、開胸して 4%パラホルムアルデヒドによる還流固定を行う。固定後のマウスより内耳を取り出し、シュクロースアップを行い、通常のパラフィン包埋法による包埋後にマイクロトームで切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジン染色を行い、形態を顕微鏡で観察した。

（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、「国立大学法人信州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。また、遺伝子組換え実験は「国立大学法人信州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

### ヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウスの形態観察

図1に示すように蝸牛の全体像の形態観察において、ヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウス（右）では、野生型（左）と比較して、基底回転部分で高度の内リンパ水腫が認められるが、第2回転以降では殆ど水腫は認められない。

基底回転部分を更に詳細に見ると、図2に示すように、ヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウス（右）では、野生型（左）と比較して、ラセン神経節細胞が減少していた。基底回転部分で減少が著しいが第2回転、頂回転でも神経細胞の減少が認められる。

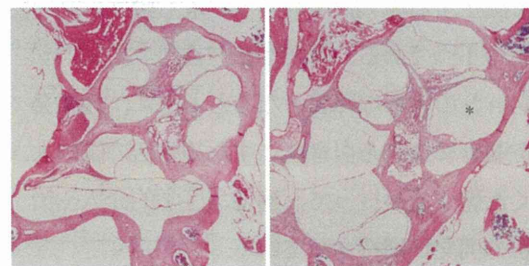


図1 野生型マウスおよびヒト変異型 Pendrin ノックインマウスの蝸牛の比較

\*: 内リンパ水腫部位

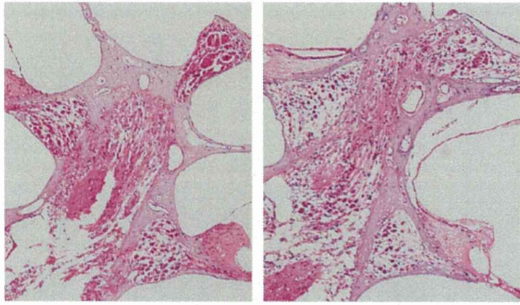


図2 野生型マウスおよびヒト変異型 Pendrin ノックインマウスのラセン神経節の比較

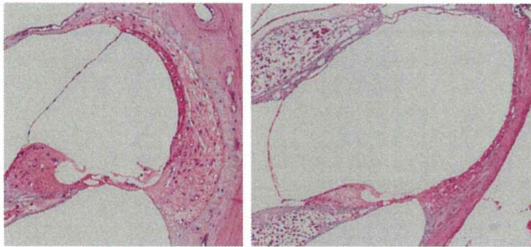


図3 野生型マウスおよびヒト変異型 Pendrin ノックインマウスの蝸牛基底回転の比較

また、基底回転部分の内リンパ周辺を詳細に見ると、図3に示すようにヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウス (右) では、内リンパ水腫が著しく、また Corti, Limbus, Spiral ligament などが圧迫変性している様子が認められた。

また、前庭を更に詳細に見ると、図4に示すように、ヒト p.H723R 変異型 Pendrin ノックインマウス (右) では、野生型 (左) と比較して、Endolymphatic space に hydrops を認め、Endolymphatic Sac まで hydrops が続いていた。

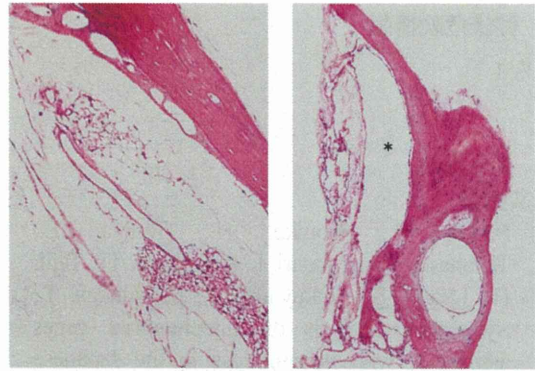


図4 野生型マウスおよびヒト変異型 Pendrin ノックインマウスの前庭 (Endolymphatic Sac) の比較 \* : 内リンパ水腫部位

#### D. 考察

本研究では、遺伝性難聴の薬物治療を目指す画期的な研究手法のためのモデル動物として開発されたヒト型変異 Pendrin ノックインマウスの表現型 (主に内耳の解剖学的所見) の解析を主に行った。その結果、内リンパ水腫とそれに伴うものと思われる Corti, Limbus, Spiral ligament などの圧迫変性が認められた。また、ラセン神経節細胞の減少も認めており、難聴の原因として内リンパ水腫の関与が示唆される。また、前庭でも水腫を認めており、Pendred 症候群および前庭水管拡大を伴う難聴患者がめまい発作を伴いながら難聴が増悪していく臨床像との類似が示唆される所見であり、モデル動物として有用であると考えられる。

#### E. 結論

ヒト型変異 Pendrin ノックインマウスでは、基底回転において著しい内リンパ水腫を認めた。また、Corti, Limbus, Spiral ligament などの変性、ラセン神経節細胞の減少も認めており、難聴の原因としてこれら変性が関与していることが示唆される。また前庭でも水腫を認めており、めまい発作を伴う本疾患のモデル動物と

して有用であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

- (1) Mutai, H., Kouike, H., Teruya, E., Takahashi-Kondomoari, I., Kakishima, H., Tajii, H., Usami, S.I., Okuyama, T., Matsunaga, T., Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation. *BMC Med. Genet.* 2011, 12: 1-12.
- (2) Moteki, H., Naito, Y., Fujiwara, K., Kitoh, R., Nishio, S., Oguchi, K., Takumi, Y., Usami, S.I., Different cortical metabolic activation by visual stimuli possibly due to different time courses of hearing loss in patients with *GJB2* and *SLC26A* mutations. *Acta. Oto-Laryngol.* 2011, 131: 1232-1236.
- (3) 宇佐美真一, 難聴の遺伝子診断, 日本臨牀, 2011, 69 (2) : 357-367.
- (4) Tsukuda, K., Nisio, S., Usami, S., A large cohort study of *GJB2* mutations in Japanese hearing loss patients. *Clin. Genet.* 2010, 78: 464-470.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



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を開発した。ヒトおよびマウスへの投薬を行う際に適したポンプから内耳までのチューブ設計を考慮したシステムを試作し、駆動実験により吐出の確認を行った。

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(*SLC26A4*) 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に起因する。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、投与の度に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薬剤を恒常的に内耳へ投薬可能な体内埋め込み型マイクロポンプの開発を行う。動作原理として、体外から照射する超音波により発生する音響流を利用して薬液を吐出する。

B. 研究方法

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成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液タンク(ドーナツ型)とポンプを設置する。タンクに充填した薬液は、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内耳(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。

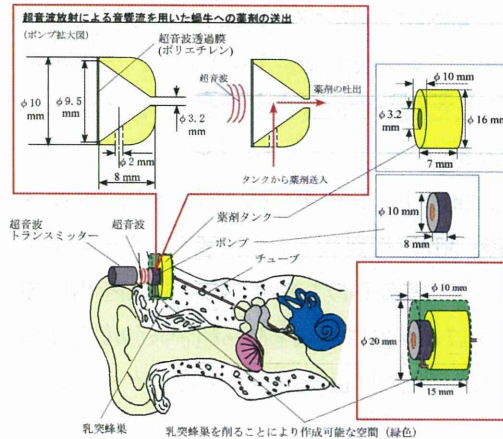


Fig. 1. マイクロポンプシステムの概要。

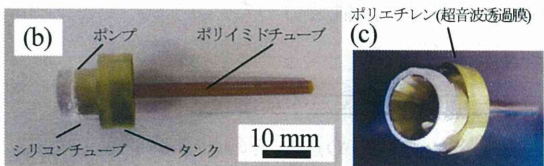
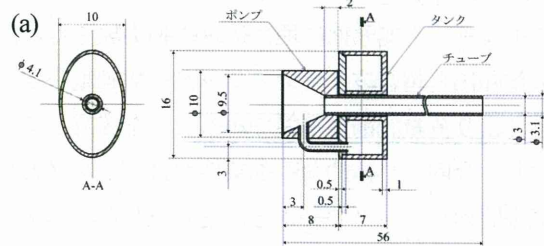


Fig. 2. ポンプシステム設計・作製。(a)設計図 (b)作製したポンプシステム (c)ポンプ底面

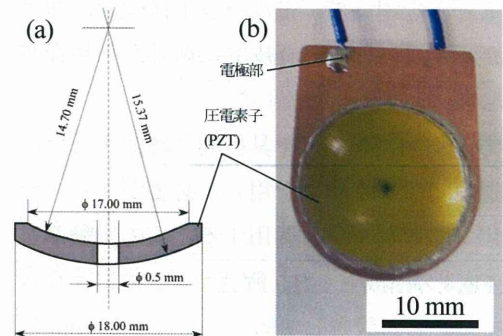


Fig. 3. トランスミッター概要。(a)断面設計図 (b)作製したトランスミッター

## 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容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的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  $\mu\text{m}$  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凹面型トランスミッターとしている。

既に、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い、液体吐出と超音波トランスミッター駆動電圧変化により流量調節が可能であることを確認しており、今回、具体的な駆動条件およびポンプと蝸牛間のチューブの長さや径を考慮したシステムとして設計と評価を行った。

## 3. チューブ径と長さの最適化

実際にヒトに埋め込んでの駆動を想定した場合、ポンプから後鼓室開放孔までチューブ長さ 30~40 mm、経路中最も狭い部分で内径  $\phi 3$  mm を考慮し、長さ 40 mm、内径  $\phi 3$  mm のポリイミドチューブを用いて、モルモット側頭部に埋め込んだポンプに接続し経皮的に体外から超音波照射し液体の吐出を確認した。

一方、薬剤の有効性を具体的に確認するためには遺伝子改変マウスを用いる必要があり、今回のポンプをマウスに適用するための実験系として Fig. 4 の構成とした。飼育ケージ内にマウスに見立てた台が設置してあり、底から 20 mm の

地点でチューブを固定してある。マウスの投薬部に合わせて吐出部先端径を細径化するため、ポンプに外径 3 mm、内径 2 mm、長さ 600 mm のシリコンゴムチューブを接続し、更にその端部に熱収縮チューブを用いて長さ 20 mm の細径ポリイミドチューブを接続した(Fig. 5), ポリイミドチューブ径を内径 0.2~0.5 mm と 0.1 mm ごとに変化させポンプを動作させた。駆動周波数は 3.3 MHz、印加電圧は 194 V である。そのときの各チューブ径の場合での単位時間当たりの液の流量を測定した。

## C. 研究結果

Fig. 6 に最適化実験の結果を示す。横軸が内径 [mm]、縦軸が流量 [ $\mu\text{l/s}$ ] である。それぞれの径のときの流量は 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 mm 径のときそれぞれ 15.5, 6.42, 2.32, 0.46  $\mu\text{l/s}$  であった。サリチル酸の毒性評価実験から、動物実験の際の目標投薬量は 0.5  $\mu\text{l/s}$  であるので、測定結果から流量が 0.46  $\mu\text{l/s}$  であったポリイミドチューブの内径 0.2 mm が最も適当と考えられる。チューブの選択肢を考慮しポリイミドチューブの長さを 70 mm に伸ばし変更し測定を行ったところ、流量は 0.36  $\mu\text{l/s}$  であった。

## D. 考察

今回の結果から、目的に応じて設計されたチューブを用い、ヒトのほかマウスに対しての薬液注入も可能であることが分かった。

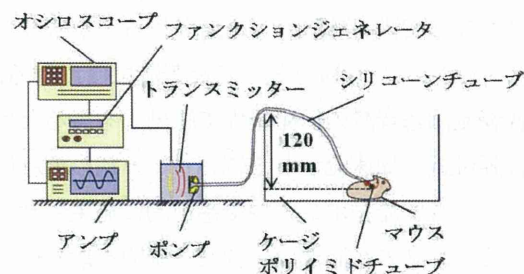


Fig. 4. 実験装置図.

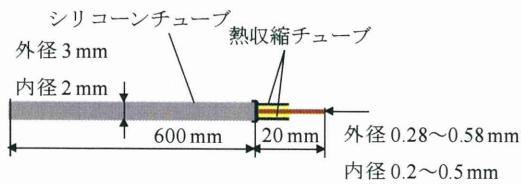


Fig. 5. チューブ概略図.

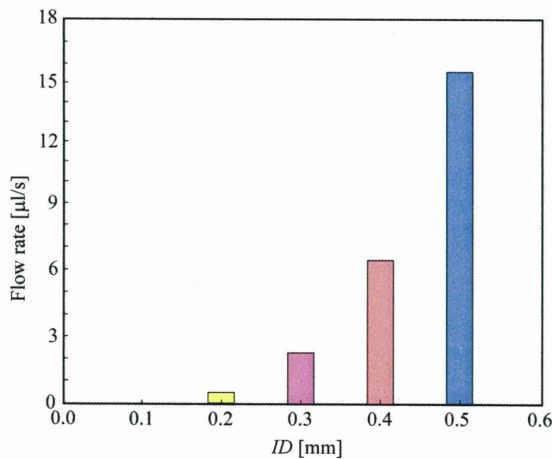


Fig.6. 測定結果 (内径と流速の関係).

### E. 結論

この音響流を用いたシステムは、体内にマイクロモーターや電源を必要とせず、比較的シンプルな構成であり、長期的安全性を求められる埋め込み機器に適する。今後求められる改良点として、ストップバルブなどの誤注入防止機構による安全性の向上などが挙げられるが、基本的な設計はほぼ確立し、ヒトおよび、薬剤の効果を確認するためのマウスへの投与を想定した駆動および送液の見通しを立てることができた。

本事業終了後も遺伝性難聴に関してマウスへの投与を行い、有効性確認を行う一方で、体内にエレクトロニクスや複雑な機構を持ち込まない体内埋込ポンプとして他用途も検討しながら改良を進め、内耳への薬剤投与を可能にする体内埋め込み型マイクロポンプを実現する。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 学会発表

- (1) 須田慎一郎, 芳賀洋一, 松永忠雄, 鶴岡典子, 和田仁, 体内埋込型超音波駆動マイクロポンプ, 日本機械学会東北支部第47期秋季講演会, 2011.9. 米沢.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2011-206641

体内埋込型液体ポンプシステム

出願日：2011年9月21日

発明者：芳賀洋一, 松永忠雄, 須田信一郎,  
和田仁

出願人：国立大学法人東北大学

マウス及びヒト型変異 Pendrin 発現ノックインマウスにおける  
イオン濃度並びに内リンパ電位の測定

研究分担者 小林 俊光 東北大学 教授

研究要旨

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。それらの難聴を回復させるために、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、機能を回復させる作用を持つ化合物を内耳局所に投薬する体内埋め込み式マイクロポンプシステムが本研究代表者により提案された。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、通常マウスにおけるイオン濃度並びに内リンパ電位を測定し、Pendrin ノックインマウスの蝸牛機能を検討する。

**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。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*) や *GJB2* の遺伝子異常などがあるが、これらの難聴に対する治療法はいまだ確立されていない。

Pendrin (*SLC26A4*) 遺伝子異常では、前庭水管拡張をとまなう感音難聴を生じるが、経過中に聴力閾値の変動を繰り返しながら、聴力閾値が上昇していくことがしばしばみられる。Pendrin (*SLC26A4*) 遺伝子はイオントランスポーターをコードしており、内耳においてはおもに血管条に発現しイオンの取り込みに関与していると考

えられている。しかし、聴力悪化の原因や機序については十分に解明はされていない。

本分担研究では、本研究代表者らによって作製された Pendrin ノックインマウスにおけるイオン濃度並びに内リンパ電位を測定 Pendrin ノックインマウスの蝸牛機能を検討し、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.  $K^+$ イオン濃度および内リンパ電位の測定**

$K^+$ イオン濃度および蝸牛内リンパ電位は、ventral approach にて蝸牛の round window より測定を行った。(図 1)

Double-barreled electrodes を用いて測定した。Double-barreled electrodes は 2 本のフィラメント入りのガラス管 (WPI 1 B 100 F-4) を使い、ピペットプーラー (PD-5 ナリシゲ) にて熱しな