

201122029B

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～23年度 総合研究報告書

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21年度～23年度 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 2

修正済

III. 研究成果の刊行物・別刷

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）

総合研究報告書

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。

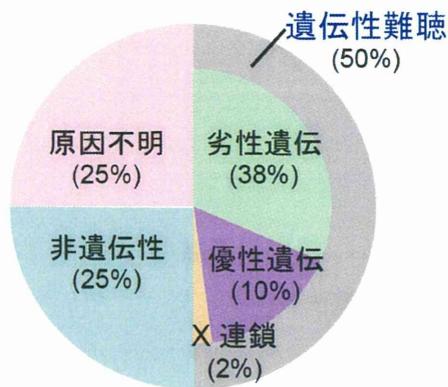


図1. 先天性難聴患者における遺伝性難聴の割合

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、内リンパ囊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。

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. Pendrin 変異体の同定と機能を回復させる薬剤の同定

B1.1. Pendrin 変異体発現ベクターの構築

Pendrin (Pendrin-3xFLAG) を発現する遺伝子を構築するため、ヒト Pendrin cDNA を PCR 法で増幅し、pIRES-hrGFP-1a にサブクローニングした後、Pendrin-3xFLAG の発現遺伝子を pcDNA3.1 ベクターに導入した。この Pendrin-3xFLAG WT 発現ベクターから変異導入プライマーと QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、1 塩基変異を導入して、10 種類の変異 Pendrin 発現ベクターを構築した (表 1)。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' GGATATGGTCTCTACTCTGCTTTTCTCCATCTGACAT AC 3'	42
P123S_reverse	5' GTATGTCAGGATGGAGAAAAAGCAGAGTAGAGACCATATCC 3'	
M147V_forward	5' CTTTCCAGTGGTGGATTTAGTGGGGATCTGTGTTC 3'	39
M147V_reverse	5' GAACAACAGATCCACCCTAACTCACCCTGGAAAAAG 3'	
K369E_forward	5' CTAITGCACTGTCAGTAGGAGAAGIATAGCCACCAAGIATG 3'	42
K369E_reverse	5' CATACTGGTGGCATATACTCTCCTACTGACACTGCAATAG 3'	
A372V_forward	5' GTGTCAGTAGGAAAAAGTATATGTCACCAAGTATGATTACACC 3'	42
A372V_reverse	5' GGIGTAAATCACTCTGGTGGACATATACTTTTCCACTGACAC 3'	
N392Y_forward	5' GCCTTTGGGATCAGCTACATCTTCTCAGGATTTCTC 3'	36
N392Y_reverse	5' GAAGAATCCIGAGAAGATGTAGCTGATCCCAAGGC 3'	
C565Y_forward	5' CGATGGTTTTAAAAATATAATCAAGTCCACAGTTGGATTGATGCC 3'	46
C565Y_reverse	5' GGCATCAATCCAACTGTGGACTTGATATATTTTTAAACCATCG 3'	
S657N_forward	5' CAAAGTGCATCCATAAACCITGGTCTGTACTGTGG 3'	35
S657N_reverse	5' CACAGTCAAGACAAGGTTATGGATTGGCCTTTG 3'	
S666F_forward	5' CTTGACTGTGGAGCTATATTTTCTGGACGTGTGTG 3'	37
S666F_reverse	5' CAACAACGTCCAGGAAAAATATAGCTCCACAGTCAAG 3'	
T721M_forward	5' CAACATTAGAAAGGACACATTTTGTGATGGTCCATGATGC 3'	42
T721M_reverse	5' GCATCATGGACCATCAAAAAGAAATGTGTCCTTCTAATGTTG 3'	
H723R_forward	5' CTTTTGACGGTCCGTGATGCTATACTCTACTACAG 3'	37
H723R_reverse	5' C TGTAGATAGAGTATAGCATCCGGACCGTCAAAAAG 3'	

B.1.2. 細胞培養と遺伝子導入

遺伝子を導入する細胞としてヒト胎児腎臓 (HEK293) 細胞を用いた。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), あるいはサリチル酸誘導体 (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 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 および 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。

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.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. 遺伝子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民間業者に委託し、C57BL/6 マウスで Pendrin H723R 変異体を発現する 2 種類のノックインマウスが完成した。

2 種類のノックインマウスの作製に用いたターゲティングベクターの設計図を図 2 ((a)マウス型, (b)ヒト型) に示す。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。

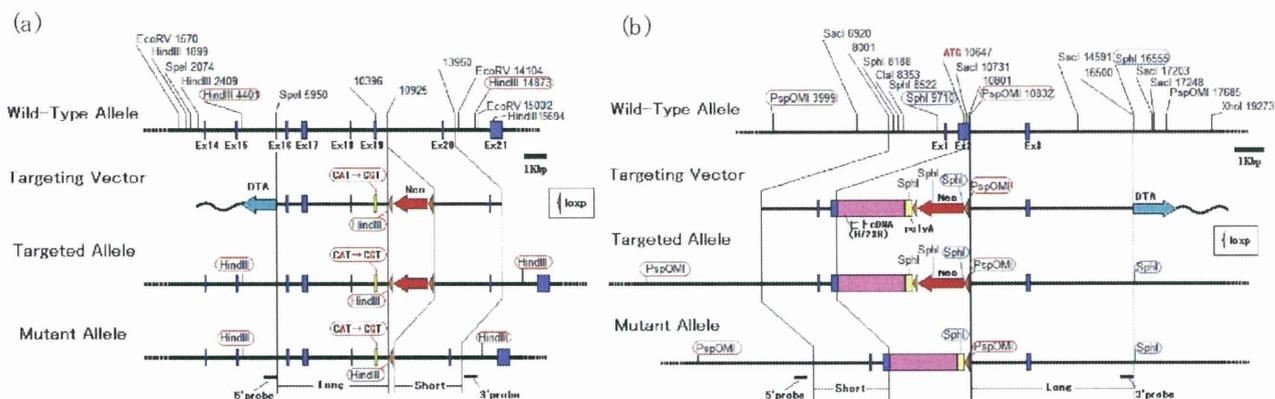


図2. ノックイン・マウス用ターゲティングベクター設計図
 (a)マウス H723R ノックイン用ベクター, (b)ヒト H723R ノックイン用ベクター

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。

B3.1. 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 (NaCl; 120 mM, KCl; 3.5 mM, CaCl₂ mM; 1.5mM, グルコース; 5.5 mM, HEPES; 20 mM) およびサリチル酸 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0M) 0.5 μl を脱脂綿に染み込ませて、正円窓付近に設置した。

B3.2. 聴性脳幹反応 (ABR; Auditory Brain Response) を用いたマウスの聴力測定

ABR は、聴覚刺激に反応する聴性脳幹機能の神経テストで、両耳の後ろ皮下にステンレス鋼電極を設置し、頭部中央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) を用い、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。

ABR 測定は、手術前および薬剤を蝸牛正円窓に注入後、6, 24, 48, 72 時間後に行った。

B.4. ノックインマウスの ABR 測定

B.4.1. マウス型ノックインマウスの ABR 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.4.2. ヒト型ノックインマウスの ABR 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.4.3. 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 μl 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. マウス型およびヒト型ノックインマウスの蝸牛形態観察

マウス型およびヒト型ノックインマウスの蝸牛を取り出し、マイクロ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

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。

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

HEK293 細胞を用いて、Pendrin 変異体の安定発現細胞の作製を試み、¹²⁵Iを用いて Pendrin の活性測定を行った。また、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。さらに、感度よく Pendrin の機能回復を明らかにするスクリーニング系の確立のため、細胞内 pH の変化ならびにサリチル酸の HSP の発現について解析を行った。

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きたことから、サリチル酸をリード化合物とし、誘導体の合成を行い、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。また、サリチル酸よりも高いシャペロン活性を有する化合物を見出すため、そのアッセイ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。

B.9. 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

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を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。また、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、その使用状況を研究した

具体的には、(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) 難聴を疑似体験できる授業(4) 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。(5) 小学生および大学生のヘッドホン使用状況についての調査を行った。

(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. Pendrin 変異体の同定と機能を回復させる薬剤の同定

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 3 に示す。図 3 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 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。

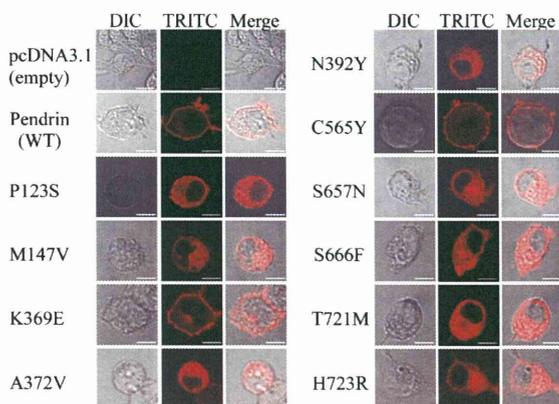


図 3. Pendrin 変異体の細胞内局在

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 4(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 4(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 4(B))。

図 5 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 6, 7)。

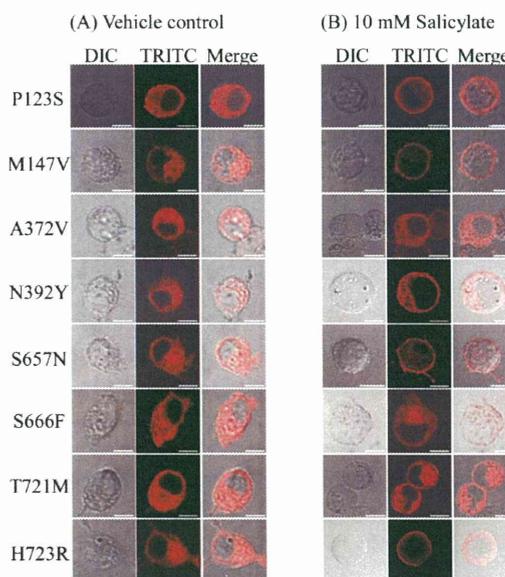


図 4. サリチル酸による変異体の局在変化

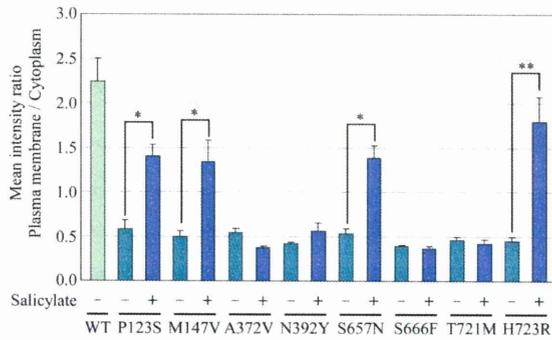


図5. サリチル酸添加による蛍光強度比の変化
値は6-9 サンプルの平均値±SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01

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6)。図7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。

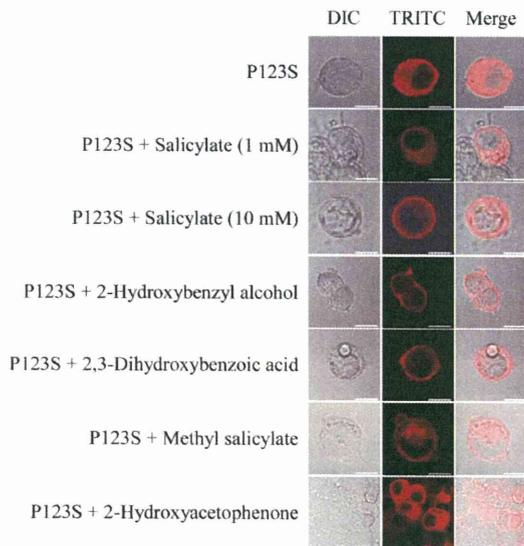


図6. サリチル酸誘導体の P123S の細胞内局在に与える影響

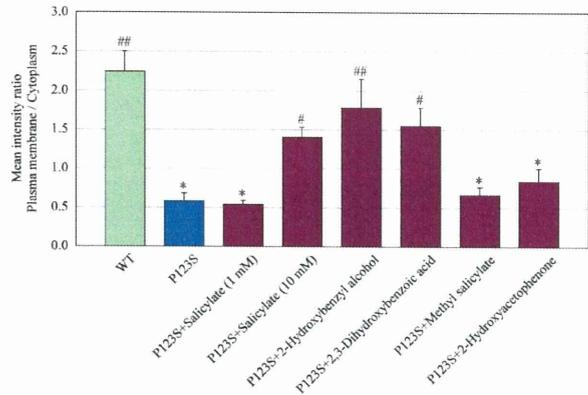


図7. サリチル酸誘導体添加による
蛍光強度比の変化

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.1.4. 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 H723R の局在変化

C.1.3.と同様に、変異体 H723R におけるサリチル酸およびサリチル酸誘導体による Pendrin の局在変化を調べたところ、10 mM のサリチル酸および 1 mM の 2-Hydroxybenzyl alcohol と 2-Hydroxyacetophenone を投与した細胞において、細胞膜に強い蛍光が観察され、これらの薬剤が変異体 Pendrin を細胞膜に移行させることを示唆した (図8)。

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-Dihydroxybenzoic acid, methyl salicylate 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。

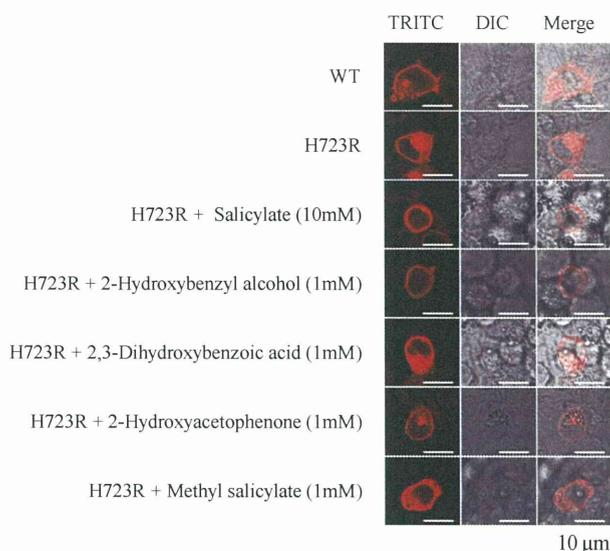


図 8. サリチル酸誘導体の P123S の細胞内局在に与える影響

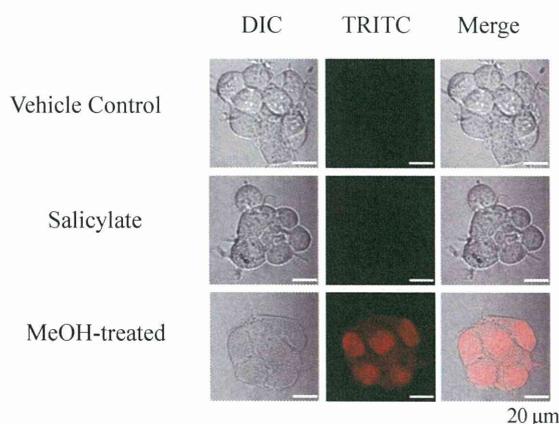


図 9. HEK293 細胞に水, サリチル酸, メタノール投与を行った免疫染色画像.

C.1.5. 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9).

C.2. 遺伝子難聴モデルマウスの作製

ターゲットインベクターは, 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, ノックインマウスを取得した.

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 μl) 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った結果が得られた(図10).

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11). 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.

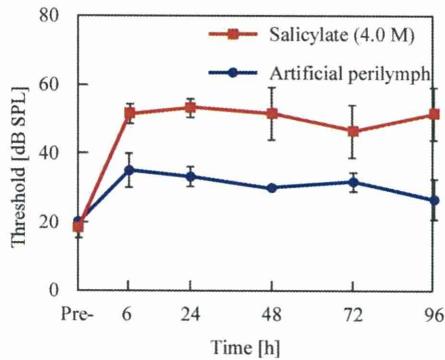


図 10. 4.0M サリチル酸投与マウスと人工外リンパ投与マウスの ABR 閾値変化.

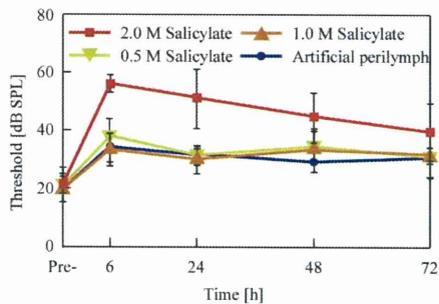


図 11. 0.5~2.0M サリチル酸投与マウスと人工外リンパ投与マウスの ABR 閾値変化.

C.4. ノックインマウスの ABR 測定

C.4.1. マウス型ノックインマウスの ABR 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 12, 13)。

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。

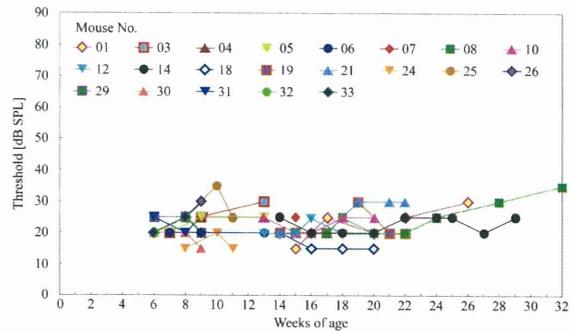


図 12. マウス型ノックインマウス全 33 匹中間こえが悪くならなかった 21 匹の ABR 閾値計測結果

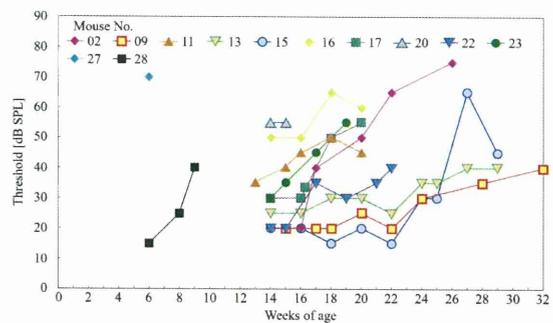


図 13. マウス型ノックインマウス全 33 匹中間こえが悪くなった 12 匹の ABR 閾値計測結果

C.4.2. ヒト型ノックインマウスの ABR 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 14)。

C.4.3. 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 μ l を脱脂綿に染み込ませて、正円窓付近に設置した後、ABR によりマウスの聴力を測定したが、聴力が回復するマウスは観察できなかった (図 15)。

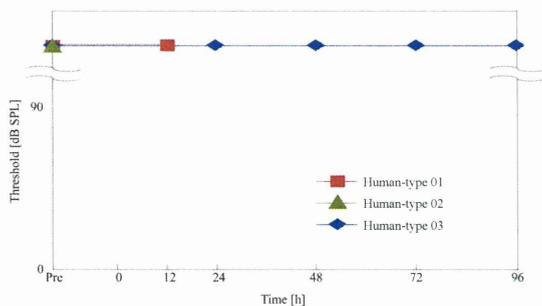


図 14. ヒト型ノックインマウスの ABR 閾値計測結果

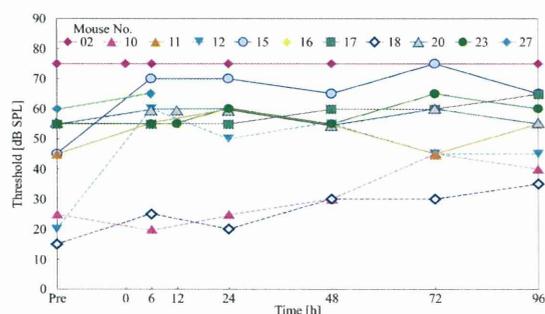


図 15. マウス型ノックインマウスへのサリチル酸投与後の ABR 閾値計測結果

C.5. マウス型およびヒト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ている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、形態に変化を起しているようには見られなかった (図 16)。

また、ヒト型ノックインマウスの形態を顕微鏡で同様に観察したところ、通常マウス (C57BL/6) と比較して、明らかな違いが見られた (図 17)。ヒト型ノックインマウスでは、basal turn に hydrops を認め、Corti, limbs, spiral ligament などが圧迫変性している。

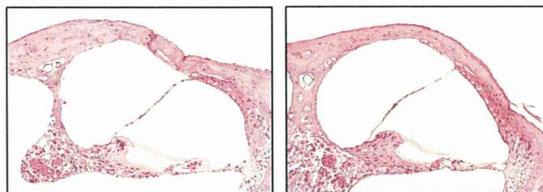


図 16. 通常マウス (左) とマウス型ノックインマウス (右) のヘマトキシリン染色蝸牛形態。

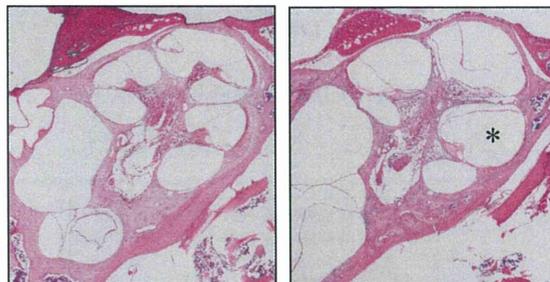


図 17. マウス型ノックインマウス (左) とヒト型ノックインマウス (右) のヘマトキシリン染色蝸牛形態。

* : 内リンパ水腫部位

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

従来、内耳へ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が、この体内埋め込み型マイクロポンプでは、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にし、投薬毎の切開手術を行わないで、侵襲を軽減できる。このポンプの動作原理は、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薬液を吐出するもので、今回の開発で、非常に理想的なマイクロポンプが開発できた。

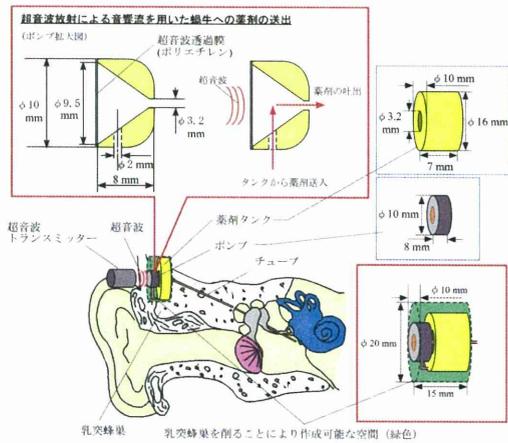


図 18. マイクロポンプシステムの概要.

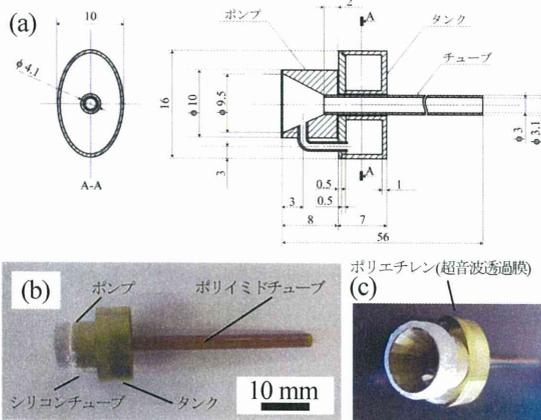


図 19. ポンプシステム設計・作製.
(a)設計図 (b)作製したポンプシステム
(c)ポンプ底面

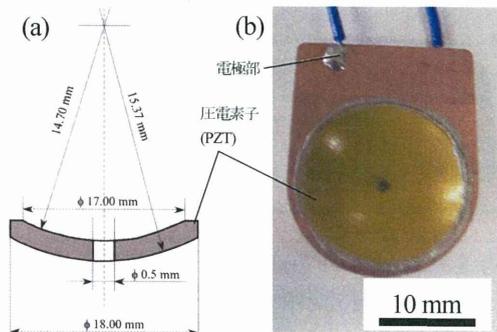


図 20. トランスミッター概要.
(a)断面設計図 (b)作製したトランスミッター

マイクロポンプシステム概要を図 18 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. また, 図 19(a)にヒトの体内に埋め込むポンプシステムの構成を, 図 19 (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 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 (図 19(c)).

図 20 (a)にトランスミッター断面形状とサイズを, 図 20 (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.

次に, 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図 21 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(図 22)、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作動させた。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。

その最適化実験の結果を図 23 に示す。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

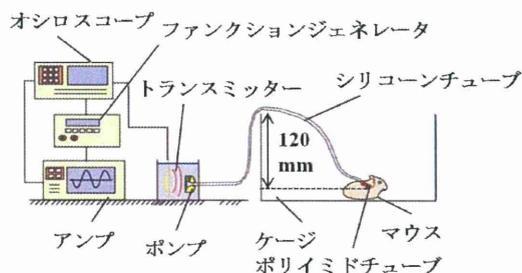


図 20. 実験装置図.

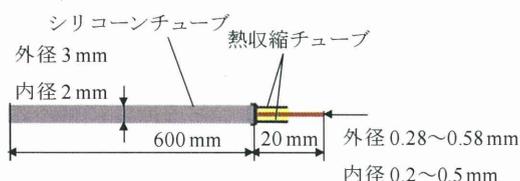


図 21. チューブ概略図.

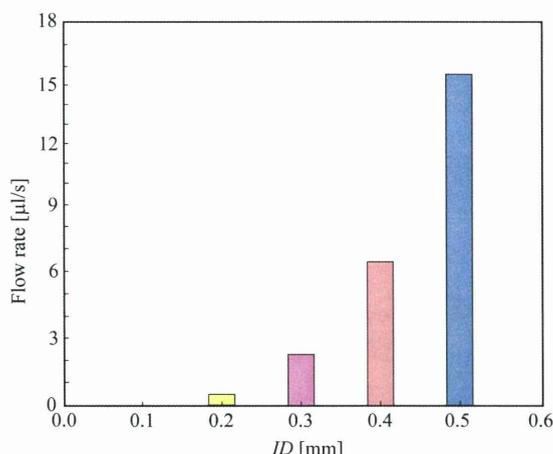


図 22. 測定結果 (内径と流速の関係).

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。

以上の結果から、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。

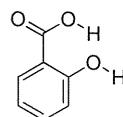
本事業終了後も遺伝性難聴に関してマウスへの投与を行い、有効性確認を行う一方で、体内にエレクトロニクスや複雑な機構を持ち込まない体内埋込ポンプとして他用途も検討しながら改良を進め、内耳への薬剤投与を可能にする体内埋め込み型マイクロポンプを実現する。

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

Pendrin 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。多種類の化合物の Pendrin 機能回復活性を厳密に比較するために、変異 Pendrin (日本人で最も多い変異である H723R, M147V, S657N の3種) および野生型 Pendrin を安定発現させた HEK293 細胞を確立し、 Γ 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ところ、細胞内 Γ の取り込みも Pendrin 活性により影響を受け、細胞内トータル Γ 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 Γ を指標とした Pendrin 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。これを踏まえ、 Γ 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 Pendrin を共発現させた細胞株を確立し、多種の変異 Pendrin 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 Γ 量は増大し、Pendrin 活性を見易くなったが、野生型 Pendrin と変異 Pendrin の活性の差は明確に認められなかった。そこで、さらに新たな実験系の開発が必要であると考えられたため、細胞内 pH の変化、ならびにサリチル酸の HSP の発現について解析したが、感度よく Pendrin の機能回復を明らかにする系の確立にはいたらなかった。

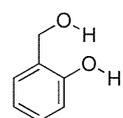
C.8. 化合物の設計と合成

サリチル酸に関して、その安定な3次元立体構造の配座異性体について MM2 計算を行った。その結果、図 23 に示すように、カルボニル基の非共有電子対と2位の水酸基が水素結合を形成できるような構造が安定であることが分かった。同様に、2-ヒドロキシベンジルアルコールに関して安定な配座構造計算を行ったところ、サリチル酸の場合と異なり、2つの水酸基が同一平



サリチル酸

Dipole/Dipole: 2.6812
Total Energy: 5.4798 kcal/mol



2-ヒドロキシベンジル
アルコール

Dipole/Dipole: -2.1241
Total Energy: -7.2756 kcal/mol

図 23. P123S 変異体に対するシャペロン活性分子の予想される立体構造

面上からはみ出ていることが分かった。

その一方で、P123S 変異体に対し弱いシャペロン活性を示した2-ヒドロキシアセトフェノンでは、カルボニル基と2位の水酸基が同一平面上に位置しているにもかかわらず、活性が低いことが分かった。このことから、仮に、サリチル酸が直接 Pendrin の P123S 変異体に結合してシャペロン活性を誘導しているのであれば、サリチル酸のカルボン酸基が結合する部位は極性の高い (hydrophilic な) ポケットであり、2-ヒドロキシアセトフェノンやサリチル酸メチルのような疎水性基が置換することで、その結合が阻害され、それゆえ活性が低下したと考えられる。

以上の、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、図 24 に示すような 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。

しかしながら、H723R 変異体においては、2-ヒドロキシベンジルアルコールで細胞膜への移

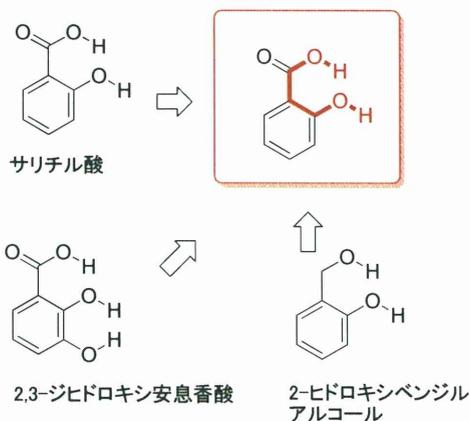


図 24. Pendrin P123S 変異体に対する
分子シャペロンの活性中心構造

行活性が見られたものの、2,3-ヒドロキシ安息香酸で活性が見られず、P123S で活性が見られなかった2-ヒドロキシアセトフェノンによって活性が見られたことから、1,3-プロパンジオール骨格だけでは判断できないと考えられるため、変異体の種類により活性にも変化が見られることが示唆された。

続いて、機能を失った変異 Pendrin に対するシャペロン活性作用の機序解明のため、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。

ケミカルプローブの設計においては、細胞内でイメージングを行うために、クリック反応を用いた。今回は、生体内でよく用いられているヒュスゲン付加環化反応を用いた。本反応は、図 25 に示すように、アジド部位を有する基質と、アセチレン部位を有する基質を銅触媒存在下、クリック付加環化反応が進行し、1,2,3-トリアゾールが得られる反応である。そこで、この二つの基質のどちらかに蛍光発色団を導入し、もう一方には生物親和性骨格（本研究では、サリチル酸骨格）を導入することで、生体内で本クリック反応を進行させることができる。すなわち、サリチル酸が Pendrin 等の標的タンパクと結合した後に、蛍光基質を作用させることで、細胞内におけるサリチル酸の挙動がイメージングできることになる。そこで、図 26 に示すように、

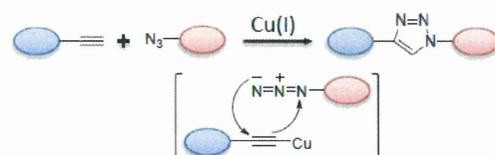


図 25. ヒュスゲン付加環化反応

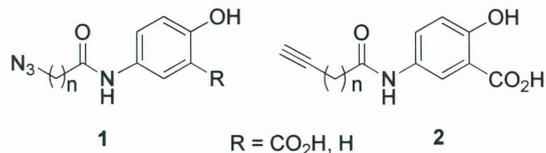


図 26. サリチル酸ケミカルプローブの
分子構造

分子内にアジド部位を有するサリチル酸誘導体(1)およびアセチレン部位を有するサリチル酸誘導体(2)を分子設計した。

分子内にアジド部位を有するサリチル酸誘導体を図 27 に示す方法で有機合成を行った。まず、4-ニトロフェノール(3)をベンゾイル基で保護し、得られたエステル(4)のニトロ基を鉄を用いて還元しアニリン(5)とした。プロモアセチルブロミドおよびプロモプロパノイルブロミドとアニリン(5)を反応させ、プロモアセチルアニリド(6a)およびプロモプロパノイルアニリド(6b)とし、アジ化ナトリウムと反応させて対応するアジド化合物(7a, b)を得た。最後にベンゾイル基の脱保護を行い、アジド誘導体(1a, b)を合成した。

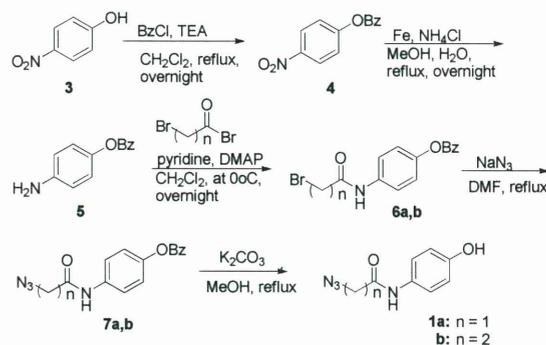


図 27. アジド化合物(1a,b)の合成

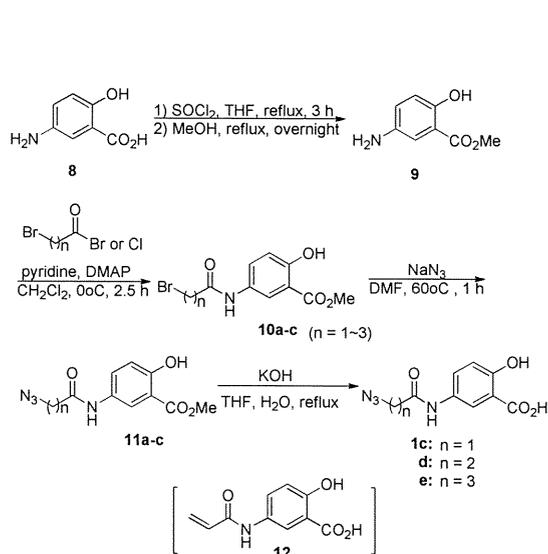


図 28. アジド化合物(1c-e)の合成

アジド化合物(1a,b)の合成と同様にして、図 28 のように化合物(1c-e)の合成を行った。4-アミノサリチル酸(8)を出発原料として、チオニルクロリドと処理し酸クロリドとした後、メタノールと反応させメチルエステル(9)へと誘導した。得られたメチルエステル(9)のアミン部位に種々の酸クロリドまたは酸プロミドを反応させアニリド(10a-c)とし、アジ化ナトリウムと反応させて、アジド誘導体(11a-c)へと変換した。最後に水酸化カリウムでけん化させることにより、対応するサリチル酸アジド(1c)および(1e)の合成に成功した。しかしながら、炭素鎖 ($n-2$) のエステル(11b)からは、目的のサリチル酸アジド(1d)は得られなかった。

次に、図 29 に示すようにアセチレン化合物の合成について検討した。図 28 で合成したメチルエステル(9)に対し、5-ヘキシン酸と EDCI カップリングを行い、アニリド(14)とした後、水酸化カリウムを用いて加水分解を行い、目的のアセチレンサリチル酸(2)の合成に成功した。

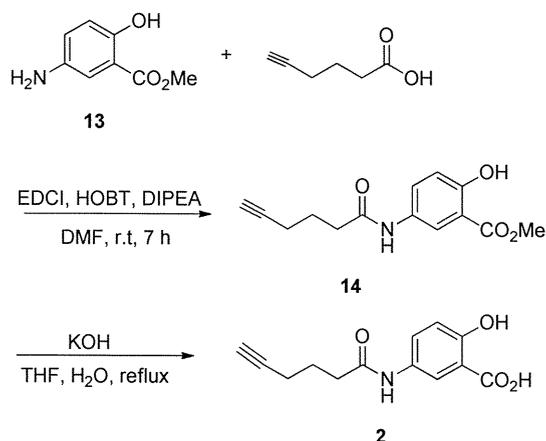


図 29. アセチレン化合物(2)の合成

合成したこれらのサリチル酸ケミカルプローブを用いて、細胞内クリック反応を行った。合成したサリチル酸プローブのアジド部位と蛍光ラベルである Alexa488 のアセチレン部位との細胞内クリック反応により、サリチル酸の細胞内イメージングを行った。蛍光標識試薬である Alexa488 を加えることにより細胞内では、図 30 に示すような化学反応が起こり、サリチル酸プローブの局在部分が蛍光標識されると考えられる。ヒトがん細胞である HeLa 細胞を用いて、合成したサリチル酸プローブ(1a-c)の細胞内イメージを蛍光顕微鏡で観察した。図 31 は Alexa488 とクリック反応させた化合物の細胞内局在をみたもの、真ん中の図は染色した細胞核のみをみたもの、右の図はこの 2 つの図をマージさせたものである。

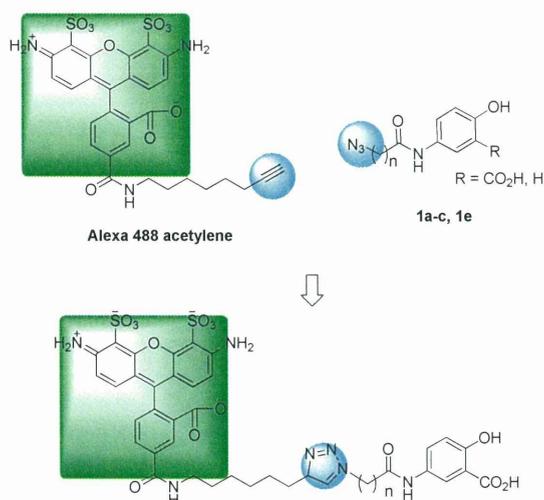


図 30. 細胞内クリック反応

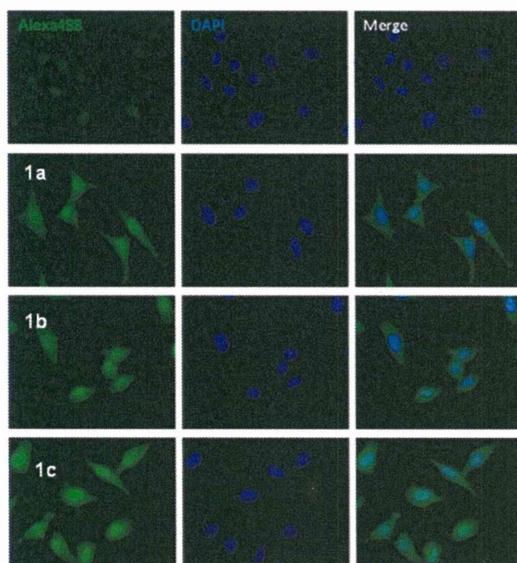


図 31. サリチル酸誘導体の細胞内局在

ケミカルプローブの合成には、それぞれ4-ニトロフェノールおよび4-アミノサリチル酸(8)を出発原料として、目的とするアジド化合物(1a-c)および(1e)を合成することに成功した。その一方で、炭素鎖 (n-2) のエステル(11b)からは、水酸化カリウムを用いた加水分解反応条件下では、目的のサリチル酸アジド(1d)は得られなかった。本反応の詳細を検討したところ、共役カルボニル化合物(12)が生成していることが分かった。このことから、エステル(11b)において塩

基条件下ではアジド基が脱離基として働き、カルボニルのα位のプロトンが引き抜かれることにより、脱離反応が進行していることが分かった。

細胞内クリック反応によるサリチル酸ケミカルプローブの局在イメージング実験では、ケミカルプローブの緑色蛍光と DAPI による細胞核の青色蛍光が重なっていることから、化合物 (1a), (1b) とサリチル酸プローブである化合物 (1c)が細胞の核内に局在していることが示唆された。

次に、サリチル酸よりも高いシャペロン活性を有する化合物を見出すため、そのアッセイ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。

抗生物質 G418 を用いたスクリーニングにより、耐性遺伝子導入された細胞を選択し、限界希釈法によってクローニングを行った。細胞名は Pendrin の変異体名 (A), トランスフェクションした 96 ウェルの位置 (X), 限界希釈時濃度 (B cell/well), およびそのクローニングを行った 96 ウェルの位置 (Y) を基にして、「AX.BY」とした。例えば、「PF1.1D6 細胞株」は、P123S Pendrin プラスミドベクターをトランスフェクションしたとき F1 のウェルに存在し、1 cell/well の濃度で限界希釈クローニングを行ったプレートの D6 のウェルに存在した細胞を意味する。

野生型 Pendrin 定常発現株 HEK293 細胞の抗 FLAG 抗体での免疫染色を図 32 に示す。クローニングの結果、WC2.3A7 細胞株、WC2.3A10 細胞株、WC1.1D4 細胞株において、Pendrin の細胞膜上での局在が見られた。

一方、Pendrin 変異体 P123S 定常発現株 HEK293 細胞の抗 FLAG 抗体での免疫染色を図 34 に示す。クローニングの結果、PF1.10A1 細胞株および PF1.1D6 細胞株において、細胞質において Pendrin の局在が見られたが (図 33(A) および (C)), サリチル酸ナトリウム投与後 12 時

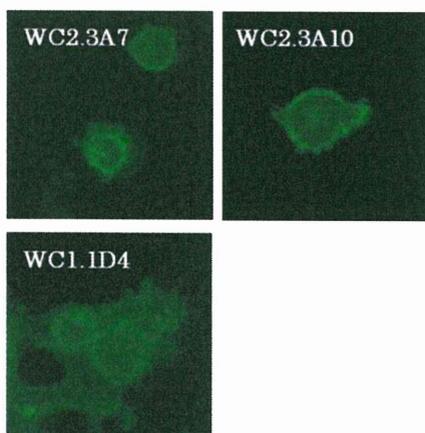


図 32. 野生型 Pendrin 定常発現株 HEK293 細胞の抗 FLAG 抗体での免疫染色

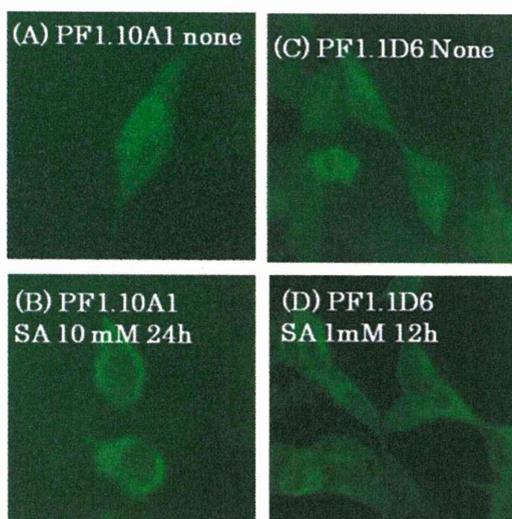


図 33. 変異体 P123S 定常発現株 HEK293 細胞の FLAG 抗体での免疫染色. (A), (C) サリチル酸ナトリウム投与前, (B), (D) サリチル酸ナトリウム投与 12 時間後

間培養したところ, 図 33 (B)および(D)に示すように, Pendrin 変異体 P123S タンパクは, 細胞膜上へ移行していることが分かる.

従来の方法では, Pendrin プラスミド DNA をトランスフェクションし, その後サリチル酸ナトリウムを投与, 免疫染色を行うことにより Pendrin の細胞内局在を評価してきたが, 今回用いた方法では, G418 によるスクリーニングとその後のクローニングを行うことにより, Pendrin を

高発現している細胞株を樹立することができた.

細胞株の特徴として, 野生型 Pendrin 定常発現株は細胞膜に Pendrin の局在が確認されたのに対し, Pendrin 変異体 P123S 定常発現株は細胞質の核周辺に Pendrin の蓄積がみられた. これに 12 時間のサリチル酸ナトリウム添加を行うと, 細胞質の Pendrin の減少と, 細胞膜での Pendrin の増加が確認された.

また, サリチル酸ナトリウムを 12 時間より短い時間で投与した場合にも, Pendrin の局在変化が確認 (1 時間, 6 時間でも局在変化) された.

以上の結果から, Pendrin 変異体 P123S 定常発現株は, 本研究におけるトランスフェクションのステップが不要であり, 実験開始から短時間で薬剤投与を速やかに行い, 迅速に評価することができるため, 様々な化合物を用いたアッセイにおいて有用であることが考えられる.

C.9. 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

C.9.1. 特別講義の実施

聴覚障害者を描く映画「ゆずり葉」を上映後, 医学的および薬学的立場から聴覚障害について特別講義 I 「基礎を知り, 臨床を知り, 患者さんの心を知る」を仙台医療センター耳鼻咽喉科織田潔先生と東北大学大学院薬学研究科平塚真弘先生に講義していただいた.

また, 茨城大学教育学部で所属する養護教諭養成課程の院生および学部生や, 茨城県内の養護教諭などに約 150 名に対して, 特別講義 II 「難聴児の支援～発達段階に合わせて～」を長野県難聴児支援センターの前田麻貴先生に講義していただいた.

C.9.2. 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

重度の聴覚障害を持つ患児とその保護者に対して, 人工内耳に関する情報やガイダンス, 手術前の検査, 手術後の人工内耳機器の調整や管