

201122092A

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)

早期遺伝子診断後の臨床応用を目指した遺伝性難聴の
高効率内耳細胞治療法の開発

平成23年度 総括分担研究報告書

研究代表者 神谷 和作

平成24(2012)年 5月

目 次

II. 総括研究報告

早期遺伝子診断後の臨床応用を目指した遺伝性難聴の高効率内耳細胞治療法の開発 -----	3
神谷和作	

II. 分担研究報告

1. 遺伝性難聴の遺伝子解析

: 先天性難聴での GJB2 の遺伝子変異解析-新たな COMMON MUTATION の確立 -----	13
林千江里 池田勝久	

2. 遺伝性難聴モデルマウスの開発

: P0-Cre マウスによる内耳特異的 Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作 製 -----	16
美野輪治	

4. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 1

: Connexin26 変異遺伝子の強制発現によるギャップ結合の分子イメージング -----	19
神谷和作	

5. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 2

: Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおけるコルチ器周囲細胞のアポ トーシスと細胞増殖における異常 -----	24
井下綾子 神谷和作 池田勝久	

6. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 3

: Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおける蝸牛コネキシン 26 タンパ ク質相互作用因子の変化 -----	27
村木美帆 神谷和作	

7. 遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 4

: Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスの蝸牛プロテオーム解析によるコ ルチ器および蝸牛外側壁構成タンパク質の変化 -----	31
村木美帆 神谷和作	

8. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 1 : 骨髄間葉系幹細胞および蝸牛線維細胞変性における走化性因子およびその受容体に関する遺伝子発現解析 -----	35
小川佳奈 神谷和作	
9. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 2 : 骨髄間葉系幹細胞および蝸牛線維細胞変性組織からの走化性因子 MCP1 および走化性因子レセプターCCR2 の遺伝子クローニング -----	39
小川佳奈 神谷和作	
10. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 3 : 骨髄間葉系幹細胞の効率的蝸牛組織導入法の開発 -----	48
神谷和作	
11. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 4 : Connexin26 欠損マウス蝸牛組織へのウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の検討 -----	53
飯塚崇 池田勝久	
12. 内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 5 : ウイルスベクターを用いた前庭組織への遺伝子導入法の検討 -----	55
岡田弘子 飯塚崇 池田勝久	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	59

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）
総括研究報告書

早期遺伝子診断後の臨床応用を目指した遺伝性難聴の
高効率内耳細胞治療法の開発
研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

研究要旨

遺伝性難聴は約1,600出生に1人（本邦では約年間700人に相当）と高頻度に発症し聴覚と言語発育の著しい障害を引き起こす極めて高度なQOLの低下をもたらす。遺伝性難聴の根本的治療法は長年にわたり研究されており、近年では再生医療の遺伝性難聴への応用が大きく期待されている。研究代表者神谷は、蝸牛線維細胞を標的とし薬剤により誘発した難聴モデルの再生治療実験を昨年初めて成功し報告している（Kamiya et al. *Am. J. Pathol.* 2007）。しかし遺伝性難聴に関しては未だ根本的治療の道を開く研究成果は皆無である。

本研究では我々が開発した蝸牛線維細胞変性を有するヒト非症候性難聴 DFN3 モデル、Brn4 欠損マウス（Minowa, Ikeda et al. *Science* 1999）、並びに世界で最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子であるコネキシン 26 (Cx26) 遺伝子変異の疾患モデルとして開発した遺伝子欠損(Cx26KO)マウスおよび優性阻害型トランスジェニック(Tg)マウス（*Hum Mol Genet.* 2003）を新規治療法の対象として用いることとした。Brn4 および Cx26 はいずれも前述した新規移植法のターゲットである蝸牛線維細胞に主に発現しているため、これら三種類の遺伝性難聴モデル（Brn4KO, Cx26KO, Cx26Tg）に対し、研究代表者が開発した有効性の高い幹細胞移植法を適用するという最も成功の可能性が高い組み合わせにより、これまで成功例のない遺伝性難聴に対する根本的治療法の開発を試みた。

研究代表者が開発した骨髄間葉系幹細胞移植法では、移植前に蝸牛線維細胞のみに軽度な可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を置換することを可能とした。また、近年新規に開発され成体細胞から樹立可能な新規多能性幹細胞 iPS 細胞もその多分化能から将来的な応用性が高く内耳移植への適用も非常に有効であると予想される。これらの幹細胞を遺伝性難聴マウスへの新規細胞移植法に適応することにより単に細胞を補うだけでなく遺伝子変異を持つ異常細胞を正常細胞に置換するという全く新しい観点での方法論の発展が期待できる。将来的には多様な遺伝性難聴患者に対し、薬物治療、遺伝子治療、組織移植とは異なり、組織損傷の種類と度合いに対応した低リスクで高い効果を持つ治療法の開発が期待できる。

現在までの主な研究では、ヒト遺伝性難聴で最も高頻度に発生する難聴原因遺伝子である Gjb2(コネキシン 26 遺伝子)の内耳特異的欠損マウスを完成させ、ヒト遺伝性難聴と病態がほぼ一致した遺伝性難聴モデルであることを機能および病理解析により確認している。同マウスは現存する遺伝性難聴モデルの中で最もヒト遺伝性難聴と病態が近似していると考えられ、新規治療法開発の研究に最適であると考えられた。さらに同モデルマウスおよび正常マウスを用いた骨髄間葉系幹細胞移植の検討により蝸牛組織内への細胞導入率を飛躍的に高める方法が開発された。これを応用しさらに効果を増強させることにより遺伝性難聴における正常細胞への細胞置換法が確立し、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善が一層現実化すると考えられる。

上記の方法を用いて新規開発した 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。

A. 研究目的

感音性難聴の原因は多岐にわたるが、近年の遺伝子改変動物開発技術の向上や多種のモデル動物の開発により多くの病態メカニズムが解明に近づいている。全ての先天性疾患の中でも頻度の高い遺伝性難聴においては、難聴家系や突然変異難聴マウスの遺伝子解析によって多くの遺伝性難聴原因遺伝子が同定されている。初期に発見された遺伝性難聴の原因の多くは内耳有毛細胞の変性または機能的・形態的異常であったため多くの研究者が有毛細胞を中心に難聴の病態メカニズム解明に取り組んできた。哺乳類の有毛細胞は再生能力を持たないため遺伝子導入などによる有毛細胞再生の誘導も盛んに研究されてきた。その一方で内耳への細胞移植による有毛細胞の修復の試みも行われているが、特殊なリンパ液で満たされた内耳の構造的な特徴から、聴力を保持しつつ標的部位に移植細胞を到達させ分化させることは容易ではない。そのため有毛細胞の修復には多種のモデル動物を用いた多くの検討実験が必要と考えられる。近年有毛細胞以外にも蝸牛線維細胞などの機能異常が単独で難聴病態の引き金となることも明らかとなっており多様な治療戦略が求められている。幹細胞の損傷部への移動能力や組織環境（ニッチェ、niche）による分化誘導を十分に検討すれば細胞治療は内耳組織変性に対する治療にも応用可能と考えられる。著者らの報告では実験的に蝸牛線維細胞のみに傷害を与えたラットへ半規管外リンパ液を経由した細胞液還流法を用いることにより、損傷部の修復と聴力回復率を高めることに成功した。現在はヒト疾患に近い遺伝性難聴モデル動物への骨髄間

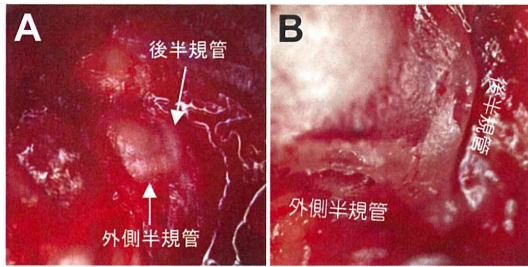
葉系幹細胞に取り組んでいる。また、サル類を用いた細胞移植アプローチの検討も今後応用性を高めるためには非常に重要であるため現在、カンクイザルによる検討を行っている。各種のモデル動物の特徴を考慮した細胞移植実験検討を積み重ねることにより、将来的には有毛細胞も標的とした多様な難聴に対する聴力回復も不可能ではないと考えられる。

B. 研究方法

マウス骨髄間葉系幹細胞調整および標識

生後 8 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨を摘出、細胞培養液での骨髄還流により骨髄細胞を得た。同細胞に EGFP（緑色蛍光）または DsRed1（遠赤色蛍光）発現レトロウイルスにより標識した。

正常マウスおよび遺伝子改変マウス（Connexin26 R75W-Tg, Connexin26 KO）を麻酔後、後半規管および外側半規管に小孔を開け、外側半規管より半規管膨大部へ向けて微小チューブを挿入。1 X 10⁵ cells in 20μl の間葉系幹細胞細胞液を 10 分間の注入により還流する。移植後 1 週間毎に聴力を聴性脳幹反応（ABR）および歪成分耳音響放射（DP-OAE）により測定。細胞移動を観察するため HcRed1 標識した間葉系幹細胞細胞液を移植 2 週間後に追加投与する実験群を設ける。移植 4 週間後に蝸牛を採取する。上記と同様の方法で移植 6 週間までの長期モニタリングを平行して行った。

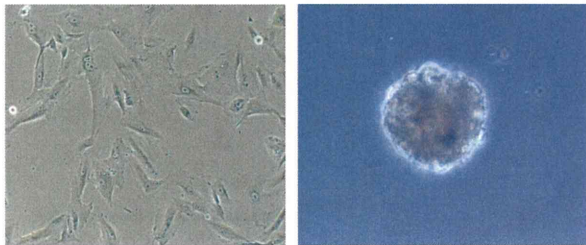


A. 経半規管細胞移植時の成熟マウス半規管。B. 後半規管および外側半規管に細胞液を還流するための小孔を開け一方に微小チューブを挿入し細胞液を注入、もう一方より外リンパ液を排出する。

C. 研究結果

移植用幹細胞の樹立

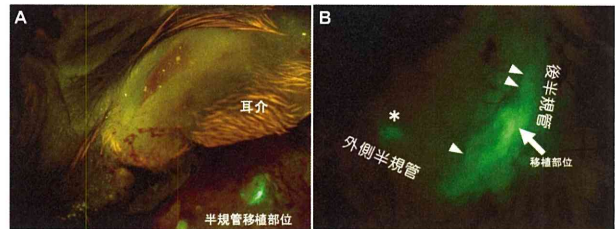
まず C57BL/6 マウス由来 H1/A 骨髄間葉系幹細胞株に EGFP 遺伝子をレトロウイルスにて発現させ、安定的に強い緑色蛍光を持つ細胞をクローニングした。さら H1/A より遠赤色光を発する HcRed 発現細胞も同様の方法にて作成し移植用細胞を樹立した。



マウスへ骨髄間葉系幹細胞およびリンパ液漏出を防ぐために使用した細胞塊。

骨髄間葉系幹細胞の幹細胞の経半規管移植後半規管および外側半規管に小孔をあけ、後半規管より 2×10^5 cells を還流し、小孔の修復のために MSC の無接着培養により作成した細胞塊 (cell sphere、上図) を小孔部に挿入することにより術後のリンパ液の漏出を抑えた。同方法により挿入された移植細胞塊は術後 2 週間においても半規管組織内において維持、さらには進展し

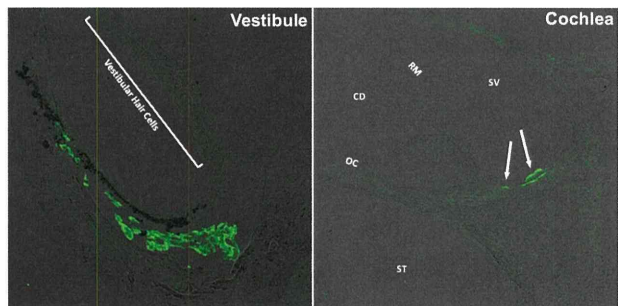
ていることが確認されている (図)。



マウスへの骨髄間葉系幹細胞塊移植 2 週間後の移植部蛍光実体顕微鏡像 (A) および拡大像 (B)。耳後部切開により半規管を露出し、移植細胞塊が拒絶されずに生着していることを確認。さらに移植部位より播種性に進展し、コロニーを形成 (矢頭)。後半規管から外側半規管にも移行している (*)。

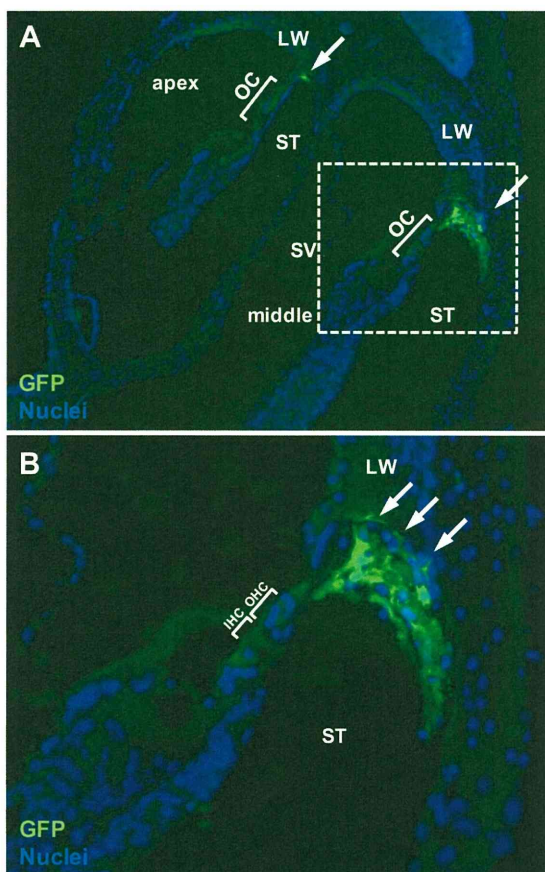
移植細胞の検出

経半規管移植後の組織を抗 GFP 抗体での免疫蛍光染色により移植細胞の組織進入を解析したところ、前庭線維細胞組織内、蝸牛ラセン板縁組織内に移植細胞の生着を確認した。移植後の聴力を術後 8 週間までモニタリングしたが、手術による聴力低下は正常動物でも難聴モデルにおいても見られなかった。現在、細胞導入効率を向上させるために Rho 活性化剤で細胞運動・浸潤を高めることが知られる LPA(Lysophosphatidic acid)を幹細胞と同時に投与を行っている。同薬剤による導入効率の向上は現在のところ認められていない。しかしミトコンドリアトキシンである



内耳有毛細胞近傍に侵入した骨髄間葉系幹細胞
前庭 (Vestibule) および蝸牛 (Cochlea) の有毛細胞近傍の組織内に侵入していることが確認された。このような組織侵入率を飛躍的に高める検討を行っており、着実に導入効率が高まっている。Vestibular hair cell: 前庭有毛細胞、Cochlear hair cell: 蝸牛有毛細胞

3NP で蝸牛に軽度損傷を与えたマウスでは導入効率が大きく上昇した。



3NP で蝸牛外側壁 (Lateral Wall, LW) にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞 (GFP 標識、緑) の細胞侵入促進に成功した。3NP 投与により外側壁において走化性因子の発現が誘導されることも確認されているため、蝸牛鼓室階 (Scala Tympani, ST) の外リンパ液において浮遊していた細胞が外側壁側に誘導され外側壁組織内に侵入したと考えられる。

(A) 蝸牛頂回転 (apex) および中回転 (middle) の鼓室階側から外側壁へ細胞が接着し侵入している (矢印)。

(B) A点線枠の拡大像。複数の細胞が外側壁組織内へ浸潤している (矢印)。OC: Organ of Corti (コルチ器), IHC: Inner Hair Cell (内毛細胞), OHC: Outer Hair Cell (外毛細胞), SV: Scala Vestibuli (前庭階)。この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。

骨髄間葉系幹細胞誘導因子の解析

蝸牛線維細胞の修復に関わる遺伝子のスクリーニングを目的として 3NP 投与後蝸牛外側壁組織の DNA マイクロアレイ解析が行われ、発現上昇因子として単球走化活性因子 MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) がスクリーニングされた (Kamiya et al. *Am J Pathol.* 2007)。我々は MCP1 およびその受容体である CCR2 に関し RT-PCR によりそれらの発現動態を解析した。その結果、蝸牛線維組織損傷における MCP1 の急激な発現上昇およびそれに引き続く MCP1 受容体である CCR2 の発現上昇が確認された。蝸牛組織での MCP1 の mRNA 発現は 3NP 投与後 1 日で急激に上昇し 3 日目に低下するが高発現状態を保っている。CCR2 は 1 日目よりも 3 日目に上昇することが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞においても CCR2 の mRNA 発現が確認され、同細胞が MCP1 によって誘導され得ることが示された。



蝸牛線維細胞および骨髄間葉系幹細胞における 3NP 投与後の MCP1 とその受容体 CCR2 の mRNA 発現の変化

Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作製

これまで作製された Connexin26 floxed マウスと P0-Cre トランスジェニックマウスとの選抜・交配により内耳特異的に Connexin26 が欠損するコンディショナルノックアウトマウスが完成した。これまでの欠損マウスは全身で Cx26 が欠損するため胎生致死であったが、今回開発されたマウスは聴力以外は正常な表現型をもつ。高度に聴力低下を有するが平衡感覚や他の生体機能はほぼ正常であり、Cx26 変異を持つヒト遺伝性難聴モデルとして理想的なモデル動物であることが示された。

Connexin26 コンディショナルノックアウトマウス、および Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスへの骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 移植

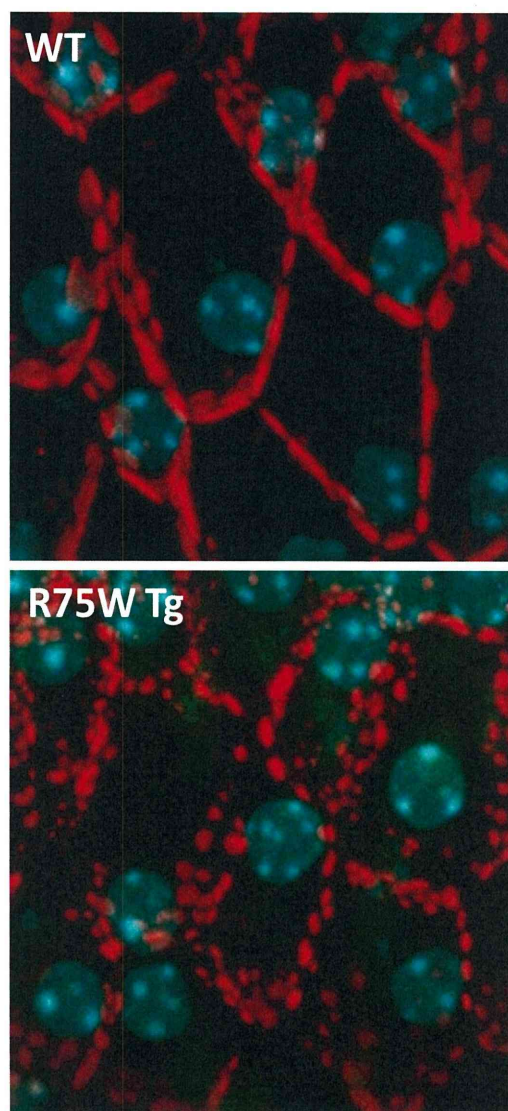
上記二種類の遺伝性難聴モデルに対し、前述した MSC 移植が行われた。前述したように手術によるさらなる聴力低下は見られなかったが、現在のところ、無処置の移植では聴力が改善した例は見られていない。前述した 3NP 投与後の移植や、MCP1, MCP 1 受容体遺伝子の導入移植細胞を用いることにより導入細胞数の飛躍的な上昇が期待でき、これにより聴力改善も期待できると考えられる。

Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおける新たな難聴分子病態の発見

我々は遺伝性難聴モデル Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスの詳細な分子病態解析を行った結果、ま

つに新しい分子病態変化を発見した。

Connexin26 は蝸牛のギャップジャンクションを形成し蝸牛内のイオン輸送で重要な機能を担うと考えられてきたが、これまでは同遺伝子変異での難聴はイオン輸送の機能低下によるものという認識しか持たれていなかった。しかし蝸牛にはイオン輸送を担うタンパク質はCx26以外にもCx30やCx43などほぼ同一箇所にも局在するタンパク質発現の代償機能などを考慮すると、Cx26のみの異常によりギャップジャンクション機能が

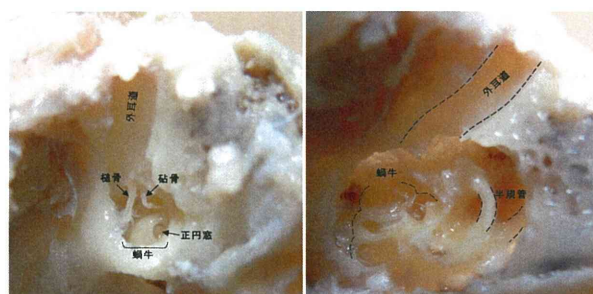


遺伝性難聴の新たな分子病態の発見
ギャップジャンクションプラークの崩壊・断片化

低下することを説明することは困難であった。しかし本研究で我々は新たな病態として、Connexin26の変異により、ギャップジャンクションの複合体ユニットであるギャップジャンクションプラークの形成に生後初期から異常が発生することを発見した。通常は図にあるように線上の長いプラークによって五角形または六角形の細胞構造を形成するがR75W変異を持つトランスジェニックマウスの蝸牛ではギャップジャンクションプラークが分裂し円形または楕円形の多数の小プラークが散在していることが確認された。同現象は我々が作製したConnexin26コンディショナルKOマウスのギャップジャンクションプラークにおいても確認された。これは全く新しい難聴分子病態であり、初代培養やin vitro分子イメージングによって詳細なメカニズムを解析している(分担研究報告書にて報告)。

カニクイザル内耳における細胞投与アプローチの検討

マウス内耳への細胞移植研究によって得られた技術をヒトへ応用するため、現在カニクイザルを用いた細胞投与アプローチの検討を行っている。ホルマリン固定された成熟カニクイザル頭部および安楽殺直後のカニクイザルを用い、ヒト鑿骨手術の手技と同様、耳後部より削開し半規管を露出させ、マウスと同様に移植用の小孔を開けることが可能であった。下図には我々が検討したカニクイザルの解剖像を示しており、ヒトと極めて類似した構造であることがわかる。



成熟カニクイザルの内耳 A. 上顎側より削開し外耳道、耳小骨、蝸牛を露出した。B. さらに内耳周囲を削開し蝸牛内部および半規管を露出した。ヒトとほぼ同様の内耳構造およびその周囲構造を示す。(神谷和作、池田勝久 耳鼻咽喉科臨床 2010 補 126, 1-5)

考察

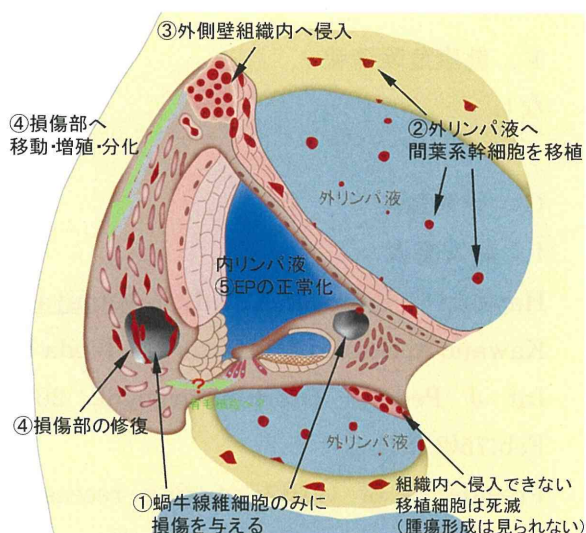
本研究において骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織導入効率の大きな上昇が確認されたが、走化性因子の遺伝子発現解析のデータと総合すると、以下のような細胞誘導メカニズムが必要であると考えられる（右図）。

1. 蝸牛外側壁に軽度な損傷を与える。2. 1日後より走化性因子MCP1のmRNA発現は3NP投与後1日に急激に上昇。その後外リンパ液へ投与されたMSCも細胞表面にMCP1受容体であるCCR2を発現しているため、3. 外側壁側へ誘導され、侵入を始める。4. 損傷を修復するため移動・増殖・分化により外側壁組織内部において生着。

このメカニズムを応用しMSCにMCP1およびCCR2の発現プラスミドを移植細胞内で強発現させることにより、生体内での自然な細胞誘導反応を増強させ、蝸牛内へのMSCの導入効率を飛躍的に高める方法を確立できると考えられる。

既にMCP1およびCCR2の条件付き発現プラスミドが完成しており、次段階としてはこれらの遺伝子をMSCへ導入・安定株を樹立し、MCP1発現MSCおよびCCR2発現MSCを段階的に蝸牛内へ投与し各遺伝子を発現制御することにより細胞導入率が飛躍的に高まり、正常細胞の導入により聴覚機能が改善させることが十分期待できる。

また、我々はヒト遺伝性難聴で最も高頻度に発生する難聴原因遺伝子であるGjb2(コネキシン26遺伝子)の内耳特異的欠損マウスを完成させ、ヒト遺伝性難聴と病態がほぼ一致した遺伝性難聴モデルであることを機能および病理解析により確認している。同マウスは現存する遺伝性難聴モデルの中で最もヒト遺伝性難聴と病態が近似



蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞移植での損傷部の修復および推測された移植細胞の移動経路。(Kamiya et al. *Am J Pathology* 2007, 神谷和作 *医学のあゆみ 特集・細胞治療 update* 2009)

していると考えられ、我々の新規治療法開発の研究に最適であると考えられた。同マウスに上記の細胞導入システムの効果を増強させて用いることにより、遺伝性難聴における正常細胞への細胞置換法が確立し、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善が徐々に現実化すると考えられる。

E. 結論

1. 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た。
2. 骨髄間葉系幹細胞のマウス内耳への導入法を改良し、蝸牛組織への細胞導入効率を飛躍的に高める方法を開発した。
3. 新規開発したコネキシン26欠損マウスへのCCR2遺伝子導入間葉系幹細胞(MSC-CCR2)の導入。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kamiya K, Kawano A, Suzuki M, Hattori N, Ikeda K. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011 Feb;75(2):211-4.

Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children.

Yan D, Kamiya K (Co-first), Ouyang XM, Liu XZ.

Analysis of subcellular localization of Myo7a, Pcdh15 and Sans in Ush1c knockout mice.

Int J Exp Pathol. 2011 Feb;92(1):66-71.

神谷和作、池田勝久 実験動物を用いた内耳細胞治療研究へのアプローチ *耳鼻咽喉科臨床*(2010)補 126:1-5

Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutani K, Fujii M, Matsunaga T.

Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid.

Neurochem Int. 2010 56(3):487-94.

Kasai M, Hayashi C, Iizuka T, Inoshita A, Kamiya K, Okada H, Nakajima Y, Kaga K,

Ikeda K Vestibular function of patients with profound deafness related to GJB2 mutation *Acta Oto-Laryngologica* 2010 130(9):990-5

Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura HO, Shinkawa H, Ikeda K, Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission, *Neuroscience.* 2009;164(3):1312-9

神谷和作、池田勝久 実験動物を用いた内耳細胞治療研究へのアプローチ *耳鼻咽喉科臨床* 2010 補 126, 1-5

神谷和作 難聴に対する細胞治療法の開発 *医学のあゆみ 特集号・細胞治療 Update*, 2009 Vol229, No.9, 863-867

Kazusaku KAMIYA, Cell therapy targeting cochlear fibrocytes, *Otology Japan* 2009, 19(3):214-218

Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, Ikeda K, Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice. *Int J Audiol.* 2009;48(8):576-81.

A. INOSHITA, T. IIZUKA, H. OKAMURA, A. MINEKAWA, K. KOJIMA, M. FURUKAWA, T. KUSUNOKI, K. IKEDA, Postnatal

development of the organ of Corti in dominant-negative *GJB2* transgenic mice, *Neuroscience* 156 (2008) 1039–1047.

noninvasive In Vivo Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea. Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K.

Human Gene Therapy 19(4):384-90. 2008.

Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, Okamoto Y, Kouike H, Komatsuzaki R, Kusano R, Nakagawa S, Satoh H, Fujii M, Matsunaga T. Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes.

American Journal of Pathology 2007, 171(1):214-26

2. 学会発表

Kazusaku KAMIYA, Katsuhisa IKEDA
Cochlear Gap-Junction plaque is disrupted by dominant-negative Connexin26 mutation.
EMBO meeting, 2010年9月 バルセロナ

神谷和作、池田勝久 コネキシン26優性阻害変異を伴うギャップ結合プラークの分子イメージング
日本耳鼻咽喉科学会総会 2010年5月 仙台

Intracochlear Injection of Adeno-Associate Virus. Vector to a Mouse Model Created by a

Conditional. Knockout of *Gjb2* Gene. Takashi Iizuka and Hideki Mochizuki et al. ARO midwinter meeting 2010

Hiroki Kasagi et al. Transplantation of bone marrow Mesenchymal stem cell into neonatal, adult and aged mouse cochlea. 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2010年2月 米国 アナハイム

Hiroko Okada et al. Injection of virus vector targeting vestibule in mice , 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2010年2月 米国 アナハイム

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

コネクシン26欠損内耳への細胞治療
 骨髄間葉系幹細胞の大量導入およびギャップ結合の再構築に成功

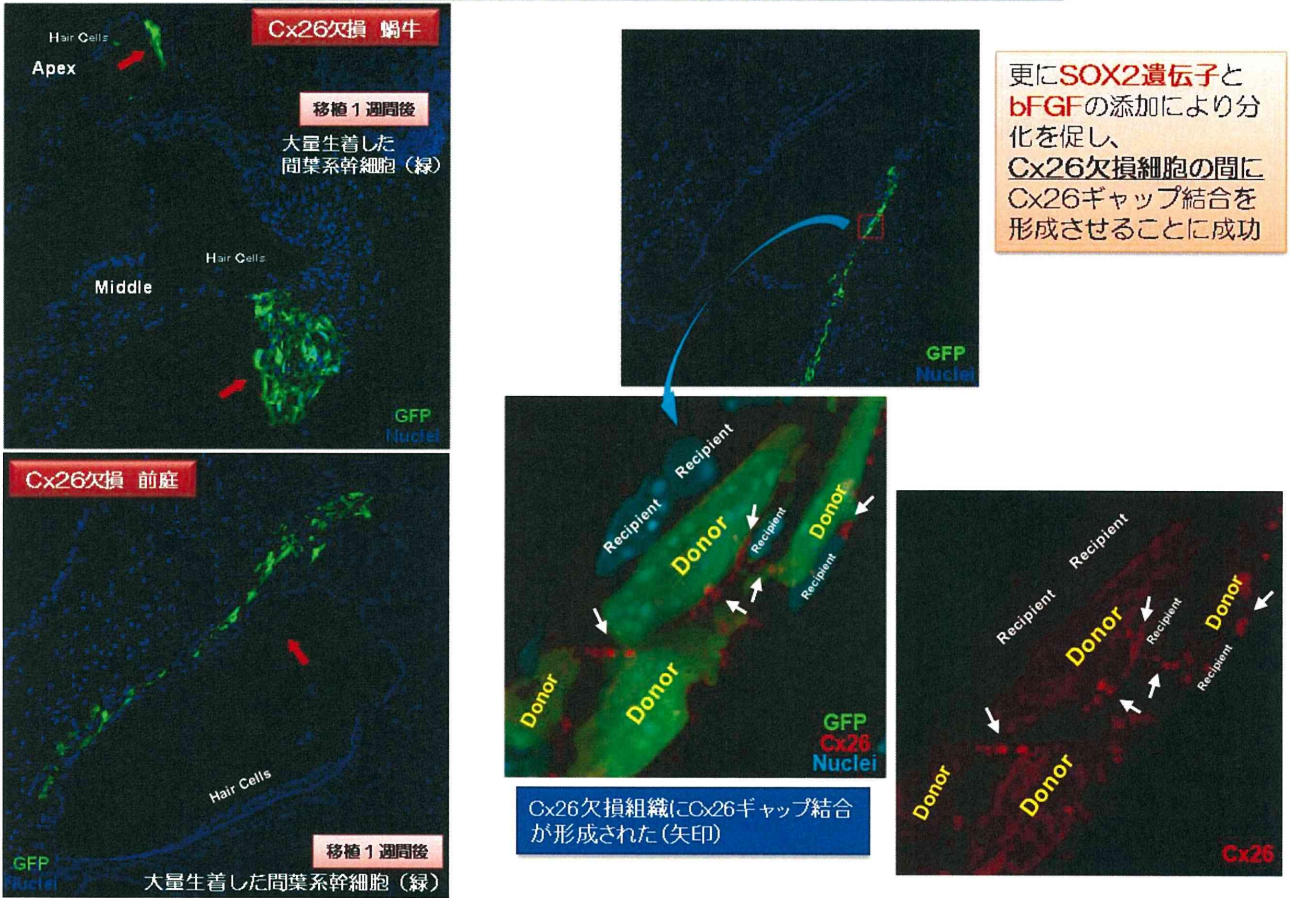


図 新規開発したコネクシン 26 欠損マウスへの CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) の導入。移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

遺伝性難聴の遺伝子解析 1

先天性難聴での GJB2 の遺伝子変異解析：新たな COMMON MUTATION の確立

研究協力者 林千江里 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室助教
研究分担者 池田勝久 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

研究要旨

先天性高度難聴は 1000 出生に 1 人の頻度で発症し、その半数は遺伝性であるとされている。遺伝性難聴の中で最も高頻度に発生する遺伝子変異として知られている Gjb2 遺伝子はコネクシン 26 をコードし、蝸牛のギャップジャンクションを構成する重要な機能を担っている。本研究では当教室における非症候性難聴者を対象に GJB2 遺伝子変異検索を行った。解析した 138 名中 40 名に GJB2 遺伝子変異を認めた。変異の種類別では c.235delC が全変異アレル中 54.2% と最も頻度が高く過去の報告と一致するが、その他の変異比率は過去の日本人患者での報告との間に相違がみられた。

A. 研究目的

先天性高度難聴は1000出生に1人の頻度で発症し、先天性の感覚器障害としては非常に高頻度の疾患である。先天性高度難聴者の約半数は遺伝的素因があると言われている。有毛細胞へのKイオンの供給と排出ルートになっていると考えられているギャップジャンクションは聴覚の形成に最も重要な分子である。それを構成するギャップジャンクション蛋白遺伝子である connexin26 遺伝子(GJB2)は先天性難聴の約 10% に変異が認められるとされ、最も頻度の高い変異遺伝子として広く知られている。これまでの報告から GJB2 遺伝子変異による難聴児は人工内耳による聴力・言語獲得

能力が良好な事や、遺伝子変異パターンから聴力レベルを推測し得ることも報告されており、ますます遺伝子診断による臨床への応用が期待されている。GJB2 遺伝子変異は今日までに約100種類が世界中から報告されている。創始者効果により地域依存性が強く、c.35delG はアメリカ・ヨーロッパ人種に、c.235delC は日本人をはじめとするアジア人種に、c.167delT はヨーロッパユダヤ人種に、R143W はアフリカ系人種にそれぞれ多くの報告がみられる。

今回当教室で非症候性難聴者を対象に GJB2 遺伝子変異検索を行った。過去の報告と比較検討を加えそれを報告する。

B. 研究方法

常染色体劣性遺伝と思われる家族性発症 29 家系の 40 名（家族歴は 3 親等まで調査し、1 家系で 2 名以上の発症で家族性とした）を含む 138 名の非症候性難聴者を対象とした。うち 3 名は後天性中等度難聴者であとの 135 名は先天性高度難聴者であった。

検体は末梢血よりゲノム DNA を抽出し PCR direct sequence 法にて解析を行った。また、コントロール群として正常聴力者 150 名に同様の解析を行った。

C. 研究結果

解析した 138 名中 40 名に *GJB2* 遺伝子変異を認めた。変異の種類別では c.235delC が全変異アレル中 54.2% と最も頻度が高く、その内訳はホモ接合体変異が 14 名、複合ヘテロ接合体変異が 10 名、シングルヘテロ接合体変異が 1 名であった。次いで Y136X/ G45E が 15.3% であった。Y136X/ G45E をホモ接合体でもつ症例を 2 名認めたが、後天性の中等度難聴と先天性高度難聴と、それぞれ聴力レベルに大きく相違があった。過去の報告では c.235delC に次いで多いとされている V37I は (Ohtsuka et al. 2003)、今回 2 名のシングルヘテロ接合体変異を認めるのみでアレル頻度は 2.8% であった。また、R143W も 13.9% と高頻度であった。欧米に多いとされる c.35delG は見られなかった。家族性発症 29 家系では 10 家系に *GJB2* 遺伝子変異を認めた。また、新規変異として R32S (c.94C>A)、P225L (c.674C>T) を認めた。これら 2 つの変異は正常コントロール群には見られなかった。

D. 考察

今回の解析では *GJB2* 遺伝子変異を持つ症例数は全体の 28.9% で非症候性難聴の常染色体劣性遺伝症例中約 30% とされている過去の報告とほぼ同等であった。しかし、c.235delC のアレル頻度は全変異アレル中 54.2% と過去の報告より比較的高頻度に認められた。その一方で V37I が極端に少数であることが今症例の特徴と思われた。要因としては、今症例の殆どが人工内耳施行症例の先天性高度難聴者を対象としていることや、主に関東近郊出身者を対象としており地域依存性による偏りが生じた事などが考えられた。しかし、V37I は当院で施行された正常聴力者 150 名にも 2 名のキャリアーが存在し、アレル頻度は正常聴力者と差がなかった。先天性高度難聴者でこの変異を持つ患者は *GJB2* 以外の原因遺伝子によって発症している可能性が考えられた。また、R143W も過去の報告と比較すると明らかに高頻度であり、ミスセンス変異でありながら先天性高度難聴発症に重要な変異と思われた。

Y136X/ G45E をホモ接合体でもつ症例 2 名の表現型に大きな差異があったことから、この遺伝子変異以外に症状を調節する他の因子の存在が示唆された。この 2 つの変異がシスカトランスかで聴力レベルが異なるとの報告もあり、同変異における表現型発現機序に関しては更に検討する必要があると思われた。新たに見られた変異に関しては、32 番目のアミノ酸であるアルギニンは欧米にて R32C、R32L、R32H と 3 パターンもの変異の報告があり、遺伝子変異のホットスポットと考えられ、R32S は新規遺伝子変異である可能性が高い。

今回変異が検出されなかった患者やシン

グルヘテロ変異のみ検出された患者に関しては今後他の原因遺伝子を解析し、日本人における先天性高度難聴の遺伝子変異の分布および頻度を詳細に分析していく。本研究は順天堂大学老人性疾患病態・治療研究センターとの共同研究である。

E. 結論

非症候性難聴者を対象に*GJB2*遺伝子変異検索を行い解析した結果、138名中40名に*GJB2*遺伝子変異を認め、これを報告した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasai M, Hayashi C, Iizuka T, Inoshita A, Kamiya K, Okada H, Nakajima Y, Kaga K, Ikeda K Vestibular function of patients with profound deafness related to *GJB2* mutation *Acta Oto-Laryngologica* 2010 Early Online, 1-6

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

検出された *Gjb2* 変異およびそのアレル頻度

Amino acid Change	Nucleotide change	Allele (%) n=276
—	c.235delC	39 (54.2)
Y136X/ G45E	c.408C>A/134G>A	11 (15.3)
R143W	c.427C>T	10 (13.9)
—	c.176-191del	5 (6.9)
V37I	c.62G>A	2 (2.8)
T86R	c.257C>G	2 (2.8)
—	c.299-300delAT	1 (1.4)
R32S	c.94C>A	1 (1.4)
P225L	c.674C>T	1 (1.4)
	Total mutation	72 (100)

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

遺伝性難聴モデルマウスの開発

P0-Cre マウスによる内耳特異的 Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作製

研究分担者 美野輪治 理化学研究所筑波研究所

研究要旨

先天性難聴は 2,000 人に 1 人と高頻度でその半数が遺伝性である。そのうち *GJB2*(コネキシン 26) 遺伝子は世界で最も高頻度に変異が検出される遺伝性難聴最大の原因遺伝子で、早期発見と治療方針を決定する上で本質的な発症原因の探求が重要である。ヒトの内耳では生検や侵襲的な生理学的検査は困難なため、最近 *GJB2* 遺伝子に対する遺伝子欠損動物が作成されているが、全身にて遺伝子を欠損させると胎生致死となり、生後の聴力変化や分子病態を解析することが困難であった。本研究に置いて我々は P0-Promoter により制御される Cre recombinase 遺伝子を用いて内耳特異的に *Gjb2* 遺伝子を欠損させるマウスを新規開発し、このマウスの聴覚機能及び内耳病態変化を解析した。その結果、新規に開発された同マウスは聴力以外の機能は正常に発育し、*GJB2* 変異によるヒト遺伝性難聴とほぼ同様の聴力障害と、組織障害を持つことが確認された。

このことから同マウスはヒト難聴の分子病態解析、さらにはヒト遺伝性難聴の新規治療法を開発するために、これまでになかった最適なモデル動物となり得ると考えられる。

A. 研究目的

標的遺伝子組み換え法により、*Connexin26* 遺伝子の Silent-Allele 即ち P フェージ由来の配列である loxP 配列を含み、Cre 酵素の非存在下では、正常な機能を保つ allele を持つマウスを作成した(図 2)。*Connexin26* 遺伝子欠損変異体は、胎生期に致死である事が知られており、Cre 酵素の存在下で初めて欠損する Conditional-Allele を持つ事が、生きた産子を得るためには不可欠である。交配により、この Silent-allele をホモを持つ

マウスを作製し、正常に発生発達することが確認された。

P0-promoter-Cre 遺伝子を transgene として持つ transgenic マウスを導入した。P0 蛋白質は、マウス胚発生の中期から出生にかけて、耳胞、聴覚器に発現するので(図 1.)、聴覚器の細胞に広範に Cre 酵素を発現するマウスを得る事ができると考えられる。

B. 研究方法

Connexin26 Silent allele のホモ接合体マ

ウス (Cx26-conditional-KO マウス) と、P0-Cre transgenic マウスをかけあわせ、ラセン靭帯 Fibrocyte での選択的或はは内耳蝸牛全体に Connexin26 欠損を誘導する事を試みた。Cx26-conditional-KO マウスと P0-Cre マウスの掛け合わせにより、実際に産子が得られ、それらについて聴性脳幹反応(ABR)の測定を行った。

C. 研究結果

聴性脳幹反応：Cx26-Silent-Allele:E/P0-Cre⁺ のマウスは、ABR の測定により、正常聴力と判断されたのに対し、Cx26-Silent-Allele:O/P0-Cre⁺ のマウスは、高度難聴であった(表 1.)。即ち、Cx26 欠失マウスでは最大 100dB のクリック音刺激でも脳幹反応を得ることができなかった。一方、野生型では I-V 波の明瞭な聴性脳幹反応を認め、閾値は 30dB 以下であった。このことは、内耳における Cx26 がヒトの場合と同様にマウス聴覚の成立に不可欠であることを示しており、Cx26-conditional-KO マウスがヒト DFNB1 のモデルとなる可能性を示唆している。更に、このマウスを用いて、形態学的、生理学的解析を組み合わせて適用すれば、EP 生成における Cx26 の役割を解明するための最適なシステムを構築できる事も期待できる。

Cx26 と Cx30 蛋白の免疫組織：蝸牛での Cx26 蛋白の発現を免疫組織と比較すると、野生型ではラセン靭帯と spiral limbus の線維細胞とコルチ器の支持細胞に発現していた。一方、変異体ではラセン靭帯の線維細胞に弱い染色性を認めるのみで、他の部位ではほとんど発現していないことが確認された。Cx30 蛋白

は全体的に Cx26 よりも染色性は弱い、同様の発現様式で、両者に違いはなかった。Cx26 の発現が変異体で選択的に欠損していると判断できる。

H&E 染色：欠失マウスでは spiral limbus の線維細胞の減少が認められた。またコルチ器の構造がやや虚脱している所見が得られた。血管条、ラセン靭帯の線維細胞、ラセン神経節細胞、ライスネル膜、蓋膜などは両者に明らかな違いは認めなかった。

D. 考察

Cre-Lox 系を用いた conditional knockout による Gjb2 欠失マウスを作成することができ、Cx26 の発現を蝸牛においてほとんど認めなかった。Cx30 で代表される他のギャップ結合蛋白は蝸牛で正常に発現しており、Cx26 の発現が選択的に欠損していることが証明された。聴性脳幹反応による聴力検査では変異体では極めて高度な難聴像を示した。ヒトの遺伝性難聴の主要な原因遺伝子である GJB2 遺伝子の異常による病態においては、言語習得前の高度難聴を呈する。今回作成したマウスは、これと極めて類似した表現型を示すことが判明し、ヒト GJB2 遺伝子変異による難聴のマウスモデルとなることが示された。現在までの解析においては、難聴の責任部位の同定や機序の解明が不十分であり、今後のさらなる研究が必要である。

E. 結論

Gjb2 遺伝子を内耳特異的に欠損させることにより、ヒト遺伝性難聴の新規治療法開発のために最適な遺伝子改変モデルマウスが開発された。

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

対立遺伝子 記号
Lox-Cx26-Lox → S
 Cx26 → W

遺伝子型	P0-Cre	ABR 閾値
S/W	-	34.6dB ± 7(n=6)
S/W	+	35.0dB ± 2(n=9)
S/S	-	37.5dB ± 5(n=3)
S/S	+	100dB < (n=6) 97.1dB ± 5(n=6)

表 1. Cx26 コンディショナル・ノックアウトマウスにおける ABR 閾値

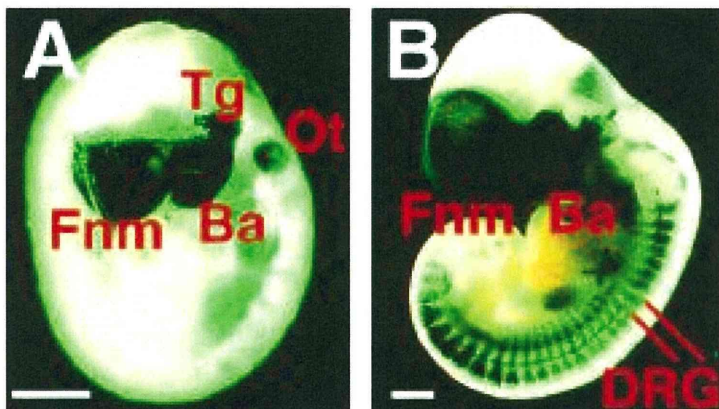


図 1. P0-Cre の耳胞での発現 A: 9.5Ed, B: 11.5Ed bar は 0.5mm

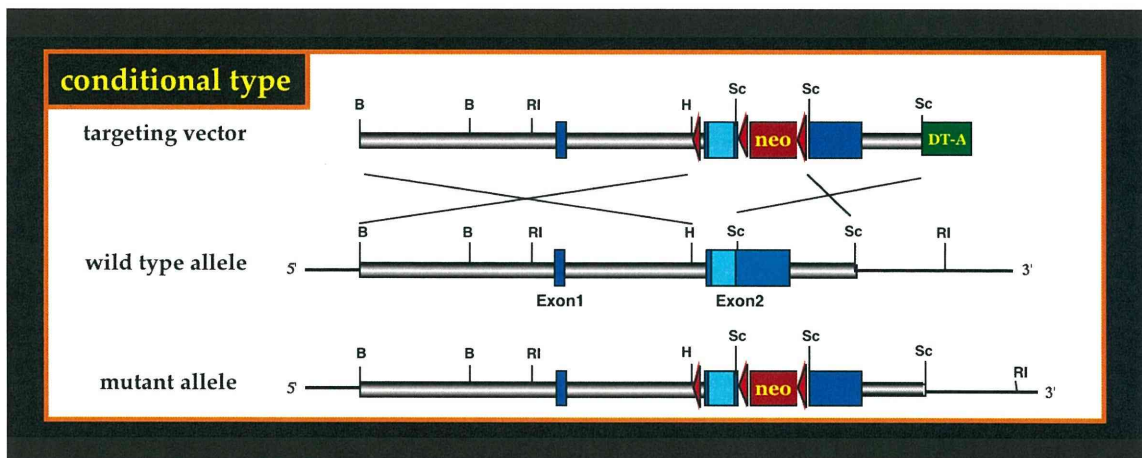


図 2. Connexin 26 遺伝子のコンディショナル・ジーンターゲティング ベクター

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 1

Connexin26 変異遺伝子の強制発現によるギャップ結合の分子イメージング

研究分担者 神谷和作 順天堂大学耳鼻咽喉科学教室

研究要旨

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度に発生し、近年その原因遺伝子の多くが解明されている。その中でもコネキシン 26 をコードする Gjb2 遺伝子は世界で最も発生頻度の高い遺伝性難聴の原因遺伝子として知られている。蝸牛においてコネキシン 26 はコルチ器周辺やラセン靭帯などの細胞でギャップジャンクションを形成し、内リンパ電位を保つための細胞間イオン輸送の役割を担うと考えられている。

我々はこれまでコネキシン 26 の優性阻害変異として知られる R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) の生理学的解析や内耳の形態変化を報告してきた。同マウスは生後初期からの ABR 閾値上昇、DP-OAE (歪耳音響放射) の消失、コルチトンネルの消失や有毛細胞、支持細胞の細胞間隙の消失などがこれまで確認されている。しかし、興味深いこと有毛細胞の形態や単離外有毛細胞の運動機能など、個々の細胞の機能や形態に極度な異常は見られない。このことからコネキシン 26-R75W 変異では、個々の細胞機能だけではなくコルチ器を構成する各細胞の細胞間結合、細胞増殖や細胞極性等の異常がコルチ器全体の機能に影響している可能性も考えられる。

最近我々は R75W-Tg マウスのコルチ器周辺におけるギャップジャンクションの形成変化を解析した。通常コルチ器周囲支持細胞 (特に内溝細胞、境界細胞など) において形成されるギャップジャンクションはタイトジャンクションなどの細胞表面付近に局在する細胞間結合よりも基底側にて結合し周囲の細胞との結合により整然とした 5 角形または 6 角形の左右対称なギャップ結合プラークによる結合様式を示す。しかし R75W-Tg マウスでは正常マウスの細胞間で直線的に形成されていたギャップ結合プラークが多数の円形小プラークに分散していることが示された。このことは R75W 変異を有する異常コネキシン 26 タンパク質がコネキシンにより構成されるギャップジャンクションチャネルの集積を阻害し正常なギャップジャンクション機能の異常や正常細胞配列に影響を与えている可能性を示唆している。本研究ではこの新たな病態の形成メカニズムを解明するため、Connexin26 の *in vitro* 発現系を用いたリアルタイム解析システムを構築した。まず GFP 標識したヒト Connexin26 およびその変異体 R75W を発現する発現プラスミドを構築し HEK293 細胞に遺伝子導入することにより、直線形のギャップ結合プラークを形成させた。このギャップ結合プラークの動態をリアルタイム解析する最適条件を検討し、Cx26-R75W 変異によるギャップ結合プラークの形成・維持過程の経時的変化の解析を行った。