

学位論文抄録

胎生期内耳(耳胞)への遺伝子導入による遺伝性難聴の治療
(Gene therapy of congenital hereditary hearing loss utilizing
embryonic gene transfer into the otocyst)

三輪 徹

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻頭頸部感覚病態学

指導教員

湯本 英二 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻頭頸部感覚病態学

学位論文抄録

【目的】先天性難聴の50%以上は遺伝子異常が原因であるが、未だ原因に即した遺伝性難聴の治療法は存在しない。内耳原基である耳胞に遺伝子や蛋白質、細胞を導入することは、遺伝性難聴の治療において、魅力的な方法である。これまでウイルスベクターを用いて遺伝子導入を試みたが、蝸牛への導入効率が低いことが問題点であった。そこで、以下の2つの方法を用いて耳胞への蛋白質、遺伝子の導入効率・導入期間について検討を行い、遺伝性難聴の治療開発を行うこととした。一つは、ポリアルギニンを用いた蛋白質導入、もう一つは電トロポレーション法による遺伝子導入である。標的とした遺伝子は、ヒト遺伝性難聴の原因であるコネキシン30(Cx30)をコードするGJB6である。

【方法】妊娠マウスの開腹を行い、胎生11.5日の耳胞へポリアルギニンを付加した蛋白質あるいは遺伝子を注入し、遺伝子を注入した胎仔には電トロポレーションを行った。蛋白質を導入した胎仔は、注入後3、6、12、18、24時間経過した時点で、遺伝子を導入した胎仔は、生後の内耳機能・形態を評価するため、帝王切開を行い、代理母に飼育させ、生後30日に聴力検査および組織学的検討を行った。

【結果】ポリアルギニンを付加した蛋白質は、耳胞の内耳原基細胞へ導入された。導入率のピークは6~12時間であり、24時間後には導入した蛋白質は認められなかった。導入された部位は、予定感覚領域を含む胎生期内耳の細胞質とその周囲の細胞であり、蛋白質導入したマウスには、機能的にも形態的にも内耳障害を認めなかった。正常マウスの耳胞へCx30遺伝子を標的とするshort hairpin RNA (shRNA-Cx30)を導入することで、Cx30遺伝子をノックダウンし、内耳特異的難聴マウスを作製した。また、shRNA-Cx30と、それに耐性をもつように遺伝子を改変したCx30遺伝子を同時に導入することで、難聴の発現が抑制された。さらに、Cx30ノックアウトマウスの耳胞へCx30遺伝子を導入することで、成熟蝸牛内にCx30蛋白質の発現が認められ、難聴の発現が抑制された。

【考察】ポリアルギニンを用いた耳胞への蛋白質導入が効率的かつ安全であることを示した。しかしながら、導入期間は導入後24時間以内と短く、一時的な蛋白質の過剰発現の実験には利用できないものの、遺伝性難聴に対する遺伝子治療という目的には不十分な発現時間であった。電トロポレーション法を用いた遺伝子導入では、Cx30遺伝子が欠失した難聴モデルマウスの耳胞内へ、正常遺伝子を導入することで、難聴の発現が抑制された。遺伝子欠失により引き起こされた難聴は、胎生期内耳に正常遺伝子を導入することにより、治療が可能であることを示した。さらに、RNA干渉法を用い、内耳特異的なCx30発現抑制による難聴マウスを作製した。従来の内耳特異的ノックアウトマウスを作製するよりも安価に、そして短期間に難聴モデルのマウスを作製することができると思う。

【結論】ポリアルギニンを用いた耳胞への蛋白質導入法を確立し、さらに電トロポレーション法を用いた遺伝子導入により、遺伝子欠失による遺伝性難聴の治療が正常遺伝子の導入により可能であることを示した。また、RNA干渉法を用いた内耳特異的Cx30発現抑制による難聴マウスの作製に成功した。