

論文の要旨

申請者 栗岡 隆臣

研究論文題目

ヒアルロン酸を用いたセンダイウイルスベクターによる内耳遺伝子導入に関する研究

1. 背景と目的

内耳障害のほとんどは不可逆的であり、有効な治療法のない難治性疾患である。内耳障害に対する様々な治療法がこれまでに報告されているが、中でもウイルスベクターを用いた遺伝子治療は特に治療効果が高いとされている。これまでのウイルスベクターを用いた報告では、高効率な遺伝子導入が可能である反面、ウイルスによる細胞毒性や免疫応答などの副作用が問題とされてきた。一方、センダイウイルス (SeV) ベクターはゲノムが細胞質にとどまり宿主染色体との相互作用がないことから、極めて安全性の高いウイルスベクターである。

遺伝子導入の方法としては、蝸牛内へ直接注入するアプローチが主流であるが、導入手技によって内耳障害を招く危険性が高い。そこで、低侵襲かつ安全なベクターの導入法として、正円窓膜を介してベクターを中耳から内耳へ徐放させるのが理想的と考えるが、その導入効率は低いことが予想される。しかし近年、ムコ多糖類の一種で生体において主要な細胞外基質の構成成分であるヒアルロン酸 (HA) で正円窓膜を前処置することによって、アデノウイルスベクターの内耳導入効率が上昇すると報告されている。

そこで今回我々は、HA による正円窓膜の前処置を併用した SeV ベクターによる内耳遺伝子導入について、導入効率、導入部位、および聴覚機能について評価を行い、HA 前処置の有用性について検討する。

2. 対象と方法

実験には 4 週齢の白色モルモット (Hartley 系、雌) を用いた。GFP-SeV/ Δ F (1×10^8 Cell Infectious Units/mL) を単独で含浸させたゼルフォームを正円窓膜上に留置する群 (単独群) と、HA (10、30 mg/mL) を正円窓膜上に 10 分間留置した後に GFP-SeV/ Δ F を留置する群 (HA 前処置群) に分けて、処

置後 3 日目の聴覚機能と GFP の内耳での発現について検討した。さらに、qRT-PCR により内耳における GFP mRNA の発現量を経時的に定量化した。

3. 結 果

単独群は生理食塩水投与群と比較して聴力の悪化を認めず、SeV ベクターの安全性が示された。また、HA 前処置群は前処置を施行しなかった群と比較して聴力の悪化を認めず、HA 前処置に関しても安全であることが示された。

導入効率に関して、**単独群**では正円窓膜の周囲にのみ少量の GFP の発現を認め、基底回転の一部に限局していた。一方、HA 前処置群では中回転に至る広範な GFP の発現を認め、外有毛細胞やらせん神経節細胞でも発現が増加した。遺伝子導入に伴う明らかな有毛細胞の障害は認めず、また HA 濃度の違いによる導入効率の差も認めなかった。

蝸牛内における GFP mRNA の発現量は、処置後 3 日目でピークとなり、HA 前処置群では単独群の**約 100 倍**の発現量を認めた。

4. 考 察

今回我々は、HA による正円窓膜の前処置により SeV ベクターの内耳移行性を改善させることができた。実際の耳科診療においても、HA は突発性難聴に対するステロイド鼓室内投与に併用され、治療成績の改善が報告されている。作用機序に関しては、(1)浸透圧変化、(2)正円窓膜の透過性向上、(3)HA の粘度による正円窓膜との接着率向上、などが考えられている。投与 3 日目で速やかに発現のピークに達することから**治療においては速効性が期待でき**、また約 2 週間程度は発現量が持続することなども、内耳性難聴の治療においては必要十分な発現期間と考えられる。経正円窓投与における SeV ベクターと HA 前処置の併用については、聴力低下を認めなかったことから安全性の高い治療法であり、今後の治療遺伝子を用いた治療効果の検討が期待される。

5. 結 論

- ① 経正円窓投与法を用いた SeV ベクターと HA 前処置による内耳遺伝子導入は、聴力低下をきたさない安全で簡便な手技であった。
- ② HA による正円窓膜の前処置により、SeV ベクターを安全かつ効果的に有毛細胞やらせん神経節細胞などへ導入できた。
- ③ SeV ベクターによる遺伝子導入では、処置後 3 日目に内耳組織内の発現がピークとなり、HA 前処置でその発現量は**約 100 倍**に上昇した。