

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

くりおか たかおみ

栗 岡 隆 臣

(耳鼻咽喉科学専攻)

防衛医科大学校

平成 28 年度

目 次

第1章 緒言	3-5頁
1.1 研究の背景と意義	
1.2 研究目的	
第2章 実験方法	6-10頁
2.1 センダイウイルス (SeV) ベクター	
2.2 動物	
2.3 外科的処置	
2.4 聴性脳幹反応による聴力閾値測定	
2.5 Green Fluorescent Protein (GFP) の免疫組織化学染色	
2.6 導入効率および有毛細胞生存率の評価	
2.7 定量的 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)	
2.8 統計学的検討	
第3章 結果	11-13頁
3.1 聴力閾値	
3.2 GFP発現部位	
3.3 導入効率	
3.4 有毛細胞生存率	
3.5 qRT-PCR	

第4章 考察	14-20頁
第5章 結論	21頁
第6章 謝辞	22頁
付記	23頁
引用文献	24-29頁
図	30-40頁

第1章 緒言

1.1 研究の背景と意義

近年、内耳障害による難聴、耳鳴の患者は急増の一途を辿っている(1)。特に自衛隊においては、射撃や航空機騒音などに曝される機会も多く、自衛隊員の音響外傷や爆傷に伴う内耳障害は大きな問題となりつつある(2)。これらの内耳障害の病態として、蝸牛有毛細胞の消失や、らせん神経節細胞の変性・消失などが関与していると考えられている(3-5)。通常、音は外耳、鼓膜、中耳の耳小骨へと振動を介して伝わり、内耳に到達する。内耳は蝸牛（聴覚系）と前庭（平衡覚）に分かれているが、蝸牛内の有毛細胞において機械的振動が電氣的信号に変換される。その後、電気信号はらせん神経節細胞から聴覚伝導路を伝わり聴覚中枢に至る（図1）。したがって、蝸牛有毛細胞やらせん神経節細胞などの内耳組織が障害を受けると、中枢に電氣的信号が伝わらなくなるため、聴覚障害を呈するようになる。

哺乳類において障害を受けた蝸牛有毛細胞やらせん神経節細胞は自然に再生しないため、一旦障害が固定すると、回復することは困難である(6)。現状では、突発性難聴に代表される一部の急性内耳障害において、副腎皮質ステロイドが第一選択で投与されているが、治療効果が不十分な症例も多く存在することや(7, 8)、副腎皮質ステロイドによる血糖値や血圧の上昇、胃潰瘍、骨粗鬆症などの様々な副作用にも留意が必要なため、投与に際して慎重な判断が求められる。また、一旦固定した慢性期の内耳障害に対する治療としては、補聴器、人工内耳、脳幹インプラントなどの電子機器に頼らざるを得ないが、完全な聴力回復に至ることはない。したがって、未だに根本的な治療法のない難治性疾患の1つであるため、新しい治療法の研究、開発が期待されている。

近年、内耳障害に対する様々な新しい治療法が報告されつつあるが(9-11)、そ

の中でも遺伝子導入の技術を用いた内耳遺伝子治療は特に有効であるとされている(12)。一般的に遺伝子治療とは正常な遺伝子を目的とする細胞に補うことによって、遺伝子の欠陥を修復・修正する治療のことである。この遺伝子治療では治療遺伝子の運び屋であるベクターが必要であるが、内耳にはリンパ液が豊富に存在することから、投与されたベクターが蝸牛内を急速に拡散しやすいという利点を有している。さらには内耳障害に関わる遺伝子が徐々に解明されつつあり、治療遺伝子を選択しやすいという利点なども考慮すると、遺伝子治療は内耳障害に対する治療戦略の一つになりうる(13)。中でもウイルスベクターを用いた内耳遺伝子治療は特に効果の期待できる治療法と考えられている(14, 15)。これまでは、アデノウイルス(16, 17)、単純ヘルペスウイルス(18)、レンチウイルス(19)、アデノ随伴ウイルス(20)などが広く使用されており、動物モデルにおいて蝸牛有毛細胞やらせん神経節細胞の保護、再生が報告されている。しかし、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指摘されるなど、臨床での使用にはいまだに至っていない。一方、我々が注目したセンダイウイルス (SeV) ベクターはベクター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遺伝毒性が原理的にない極めて安全性の高いウイルスベクターであり、臨床での効果も期待されている(21-23)。これまでにSeVベクターを用いた動物モデルにおける内耳への遺伝子導入は報告があるものの(24)、その導入効率の低さや導入手技に伴う聴力障害などから、実際の内耳障害モデルに対する治療効果の検討は未だなされていない。今後のSeVベクターを用いた臨床応用に向けては、低侵襲かつ高い導入効率を得ることが大きな課題と考えられてきた(24)。

ウイルスベクターを用いて内耳障害を治療するためには、治療遺伝子を効率よく目的とする細胞である蝸牛有毛細胞やらせん神経節細胞などに発現させる

ことが重要である。そのためにはウイルスベクターを蝸牛のどの部位からどのように投与するかが遺伝子の導入効率に大きく影響する。これまでは、蝸牛内への遺伝子導入法として、鼓室階である外リンパ腔への直接投与（蝸牛内注入）が頻繁に用いられてきたが、この投与方法では手技によって内耳障害を招く危険性が高いことが判明している(24)。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方法（経正円窓投与）が理想的であると考えられる。実際の臨床においても、突発性難聴やメニエール病の治療として、副腎皮質ステロイドやゲンタマイシンが経正円窓投与され、一定の治療効果を得ている(25, 26)。しかし、アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターは正円窓膜を透過しないことが報告されており(27-29)、SeVベクターを用いた経正円窓投与についても、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）を正円窓膜に浸透させることで、アデノウイルスベクターの内耳への導入効率を高めることが報告されており、新しい治療法として注目されている(30)。このHAを併用することによって、SeVベクターの内耳遺伝子導入効率を上昇させることができるかどうかについては、未だ明らかではない。

1.2 研究目的

本研究では、SeVベクターを用いた安全で高効率な内耳遺伝子導入法の開発を目的として、経正円窓投与にHA前処置を併用した場合の導入効率、導入部位、および聴覚機能について検討を行った。

第2章 実験方法

2.1 センダイウイルス (SeV) ベクター

SeVのゲノムRNAは、ヌクレオカプシド蛋白 (N)、RNAポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化蛋白 (P)、RNAポリメラーゼのラージサブユニット (L)、ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリックス蛋白 (M)、宿主細胞への侵入に関わる膜融合蛋白 (F)、結合に関わる赤血球凝集/ノイラミニダーゼ (HN) からなる。今回の実験には、感染に必須の膜融合蛋白 (F) をゲノムから欠失している (ΔF) ため、遺伝子導入細胞からほかの細胞へ感染が広がらない非伝播型組み換えベクターSeV/ ΔF を用いた。SeV/ ΔF はIDファーマ社 (Tsukuba, Ibaraki, Japan) から購入し、使用まで -80°C で保管した。SeV/ ΔF の作成は、T7プロモーター下流にF遺伝子欠失型ベクターcDNAを挿入したプラスミド、N、P、L、F、T7RNAポリメラーゼ遺伝子発現プラスミドの6種を細胞にトランスフェクションすることにより行い、さらに回収したベクターはF遺伝子を発現するヘルパー細胞に感染させ、一回分の外来F蛋白を供給することにより増幅させる。これにより、SeV/ ΔF は、一度は感染可能であるが伝播が起きない性質を持つ。実験には、レポーター遺伝子として*Green Fluorescent Protein (GFP)* 遺伝子をコードしたSeV/ ΔF (GFP-SeV/ ΔF)を用い、力価は 1.0×10^8 Cell Infectious Units/mLとした。

2.2 動物

実験動物として、正常な鼓膜を有し、プライエル反射正常な、全61匹の白色モルモット (Hartley系、雌、4週齢) を使用した。動物は、(1) 経正円窓投与群 と (2) 蝸牛内注入群 に分けた。さらに経正円窓投与群は、(i) GFP-SeV/ ΔF 単独投与群 (n=20)、(ii) 生理食塩水単独投与群 (n=5)、(iii) HA (10 mg/mL)

前処置群 (n=6)、(iv) HA (30 mg/mL) 前処置群 (n=20) の4つの群に分けた。蝸牛内注入群は、(v) 蝸牛開窓による注入群 (n=5) と (vi) 正円窓穿刺による注入群 (n=5) の2つの群に分けて評価を行った (図2)。

すべての実験は防衛医科大学校実験動物倫理委員会 (承認番号:14056) および組換えDNA実験安全委員会 (承認番号:2014-19)の承認を得て、それぞれ防衛医科大学校動物実験規則、防衛医科大学校組換えDNA実験安全管理規則に則り実施した。動物に対する各種処置および飼育はバイオセーフティレベル2指定を受けた防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座第3研究室で行った。

2.3 外科的処置

塩酸ケタミン (50 mg/kg) および塩酸メドミジン (1.0 mg/kg) の腹腔内投与にて麻酔を行った後、耳介後部に切開を入れ中耳骨包を露出した。次に中耳骨包に2-3 mmの小孔を作製し、正円窓膜を明視下においた。経正円窓投与におけるGFP-SeV/ Δ F単独投与群および生理食塩水単独投与群では、それぞれをゼラチンスポンジに浸み込ませて正円窓上に留置した。HA前処置群では、ヒアルロン酸 (Sigma H5388; Sigma, St Louis, MO, USA) を滅菌生理食塩水で10 mg/mL もしくは 30 mg/mL に調整し、それぞれをゼラチンスポンジに浸み込ませて正円窓膜上に10分間留置した後に除去した。その後、5 μ lのGFP-SeV/ Δ Fを浸み込ませたゼラチンスポンジを正円窓膜上に留置した。正円窓穿刺による注入群では、5 μ lのGFP-SeV/ Δ Fをハミルトンシリンジ (10 μ l) と30Gの注射針を用いて、正円窓膜から5分間かけて注入した。蝸牛開窓による注入群では、基底回転部分の鼓室階に小孔を作製し、5 μ lのGFP-SeV/ Δ F を5分間かけて注入した。開窓部および中耳骨包の小孔は筋組織で被覆し閉鎖した。

2.4 聴性脳幹反応による聴力閾値測定

塩酸ケタミン (50 mg/kg) および塩酸メドミジン (1.0 mg/kg) の混合麻酔を腹腔内投与して、聴力閾値を測定した。測定には、聴性脳幹反応 (Auditory Brainstem Response : ABR) (Synax 1200, NEC, Tokyo) を用いて、処置前と処置後3日目の聴力閾値を計測した。ABRの刺激音には、4, 8, 16 および 32 kHzの周波数のトーンバースト音を用い、刺激音圧は100 dB sound pressure level (SPL)から10 dBステップで変化させ、ABR波形が観測されなくなるまで記録した。ABR閾値は、II波、III波またはIV波を生じた最小刺激閾値と定義した。

2.5 Green Fluorescent Protein (GFP) の免疫組織化学染色

塩酸ケタミン (50 mg/kg) および塩酸メドミジン (1.0 mg/kg) の混合麻酔後に断頭し、両側の蝸牛を摘出した。蝸牛頂回転付近の骨を除去し、1 mLの4%パラホルムアルデヒドを用いて、蝸牛の正円窓および卵円窓から緩やかに局所灌流をそれぞれ2回ずつ行い、一晩4%パラホルムアルデヒドの中で固定した。翌日から3日間、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を用いて脱灰した。

Whole-mountによる検討を行う蝸牛については、ここでコルチ器を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水で数回洗浄した後、非特異的反応をブロックするために0.1% Triton X-100と5%ヤギ血清に1時間浸した。1次抗体として、GFP抗体 (1:200, A11120, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、有毛細胞の特異的マーカーであるMyosin VIIa抗体 (1:200, Proteus Biosciences, Ramona, CA, USA) を用いて、4°Cで一晩静置した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後に、2次抗体 (1:200; Alexa Fluor, Invitrogen, Eugene, OR, USA) での反応を1時間室温で施行した。さらにリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した後、1% rhodamine-phalloidinを用いて30分間、F-アクチンを染色した。リン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した後、退色防止剤入

り封入剤 (VECTASHIELD with DAPI; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入した。コルチ器におけるGFPの発現は、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C2 system, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

Cross-sectionによる検討を行う蝸牛については、EDTAによる脱灰後に30%シヨ糖液に4°Cで12 時間浸した後、Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)を用いて液体窒素で包埋し、厚さ10 μ mの凍結切片を作成した。染色はwhole-mountと同様の手順で行い、観察にはレーザー顕微鏡 (Axio Imager A1; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) を使用した。

2.6 導入効率および有毛細胞生存率の評価

評価には、GFPとMyosin VIIaもしくはrhodamine-phalloidinにより免疫組織化学染色されたコルチ器を使用した。ImageJ ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて、それぞれの蝸牛全長を計測し、4, 8, 16, 32 kHzの各周波数領域を同定した。それぞれの周波数領域 (100 μ m) におけるGFP陽性細胞数を算出し、全有毛細胞に対する割合を導入効率として算出した。最大到達点の評価には、蝸牛全体の中で正円窓膜から最も離れたGFP陽性細胞を用いて、蝸牛全長に対する到達点の割合 (全長に対する正円窓膜からの割合) を算出した。さらに、各周波数領域での有毛細胞生存数 (100 μ mあたり) を計測し、全有毛細胞数に対する割合を用いて有毛細胞生存率を算出した。

2.7 定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

GFP-SeV/ Δ F単独投与群およびHA前処置群 (30 mg/mL) の内耳組織、脳組織 (内耳道周囲)、中耳粘膜を摘出した。その後、直ちに小片として十分量のRNA later 液 (Ambion, Austin, TX, USA) に浸漬し4°Cで保存した。RNAの抽出には

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いた。使用したプライマーの配列は、GFP-F 5'-CGC ACC ATC TTC-3'、GFP-R 5'-GGT CTT TGC TCA GGG CGG ACT-3'である。プライマーはオリゴ発注システム (Fasmac, Atsugi, Kanagawa, Japan) で購入した。One Step SYBR PrimeScript RT-PCRキット (Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japan) とThermal Cycler Dice Real time System II (Takara Bio) を用いてreal-time RT-PCRを行いmRNAレベルを測定した。すべての反応は同じ条件で3回行った。サーマルサイクラーの条件は、パターン1：逆転写反応：42°C 5分、95°C 10秒、パターン2：PCR反応：40サイクル、95°C 5秒、60°C 30秒、パターン3：融解：95°C 15秒、60°C 30秒、95°C 15秒とした。融解曲線解析により目的とする増幅産物が正しく得られているか確認した。測定したSYBR Green Iの蛍光強度をLight Cycler data analysis software TP 900 ver. 4.02 20 (Takara Bio) の $\Delta\Delta C_t$ 法で解析し、それぞれのサンプルの*GAPDH*の発現量で補正し相対定量した。

2.8 統計学的検討

結果は平均±標準誤差で表し、聴力閾値および導入効率の検討には、one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison testsを用いた。qRT-PCRによるmRNAの比較にはMann-Whitney U-testを用いた。P値が5%未満を統計学的有意とした。

第3章 結果

3.1 聴力閾値

SeVベクターによる内耳遺伝子導入とHA前処置が聴力に及ぼす影響について検討するため、それぞれの処置群において処置前と処置3日後の聴力閾値をABRを用いて測定した(図3)。処置前の聴力は、すべてのグループにおいて同等であった。経正円窓投与の処置3日後において、HA(10、30 mg/mL)前処置群およびGFP-SeV/ Δ F単独投与群は生理食塩水単独投与群と比較して、いずれの周波数においても有意な聴力閾値の上昇を認めなかった。続いて、高い導入効率が期待できる蝸牛内注入法を施行し、処置3日後の聴力閾値を測定したところ、蝸牛開窓注入群では16 kHzと32 kHzで、正円窓穿刺注入群では32 kHzにおいて、経正円窓投与群と比較して有意な聴力閾値の上昇を認めた。以上の結果から、HAとSeVベクターを用いた経正円窓投与法は蝸牛内注入法と比較して聴力低下を引き起こす危険性が低く、安全であることが示唆された。

3.2 GFP発現部位

SeVベクターを用いた経正円窓投与法によるGFPの発現様式と、HA前処置による遺伝子導入効率の変化について検討するため、免疫組織化学染色を施行した。GFP-SeV/ Δ F単独投与群では、投与3日後において基底回転の正円窓膜周囲にのみ少量のGFPの発現を確認できたものの、その発現は限局しており中回転、頂回転では発現を認めなかった(図4)。一方、HA前処置を施行した群では、基底回転から中回転にわたる広範なGFPの発現を認め、特に有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経線維、骨らせん板の線維細胞、ラセン靭帯などで発現が観察された(図5)。HAの濃度差による明らかな発現の差は認めなかった。Cross-sectionによる検討では、HA(30 mg/mL)前処置群において外有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経

線維、基底板でGFPの発現を認めた（図6A）。らせん神経節細胞においても、HA（30 mg/mL）前処置群でGFPの発現は明らかに増加していた（図6B）。

3.3 導入効率

有毛細胞への遺伝子の導入効率を検討するために、GFP陽性有毛細胞数の割合をそれぞれの周波数領域（4, 8, 16, 32 kHz）で計測した。基底回転（32 kHz 領域）において、GFP-SeV/ Δ F単独投与群ではGFPの発現をほとんど認めなかったが、HA前処置群では、いずれの濃度においてもGFP陽性の外有毛細胞および蝸牛神経線維が確認できた（図7A）。外有毛細胞への導入効率は、正円窓から距離の近い32 kHz領域のみHA前処置により有意に上昇を示したが、HAの濃度差による有意な違いは認めなかった（図7B）。一方、内有毛細胞ではHA前処置の有無に関わらずGFPの発現をほとんど認めなかった（図7C）。さらに、正円窓膜から投与されたSeVベクターの蝸牛内での拡散の程度と、HA前処置がその拡散に及ぼす影響を検討するために、GFP陽性細胞の頂回転方向への最大到達点を評価した（図8）。GFP-SeV/ Δ F単独投与群では蝸牛全長の10%程度の拡散を示し、頂回転方向へのSeVベクターの拡散はほとんど認めず基底回転のみであった。一方、HA前処置群では蝸牛全長の30%程度の拡散を示し、中回転方向へのSeVベクターの拡散が有意に上昇したが、HAの濃度による有意な差は認めなかった。

3.4 有毛細胞生存率

SeVベクターによる遺伝子導入とHA前処置が有毛細胞に与える障害の有無について検討するため、処置3日後における外有毛細胞および内有毛細胞の生存率をそれぞれ算出した（図9A, B）。外、内有毛細胞は、いずれの周波数領域においても、明らかな細胞死を認めず、高い生存率を示した。以上の結果から、少

なくとも処置3日後においては、SeVベクターやHAによる有毛細胞への障害は認めず、安全に使用できることが示唆された。

3.5 qRT-PCR

HA (30 mg/mL) 前処置がSeVベクターによる遺伝子導入効率に与える影響を半定量化するため qRT-PCRを施行した(図10)。GFP-SeV/ Δ F単独投与群では、内耳での*GFP* mRNAの発現は、処置3日後でピークとなり、7日後には無治療のレベルまで急速に減少を認めた。一方、HA前処置群では単独投与群の約100倍まで有意に発現量が増加した。発現のピークに関しては、HA前処置群でも処置3日後であり単独群と変化を認めなかったが、HA前処置群では2週間を超えてその発現を有意に延長させることができた。さらに、経正円窓投与におけるSeVベクターの他臓器への移行性と安全性を確認するために、脳と中耳組織での*GFP* mRNAの発現についても検討を行った。処置3日後の脳組織では、HA前処置の有無にかかわらず、*GFP* mRNAの発現を認めなかった。中耳組織においては処置3日後に*GFP* mRNAの発現は増加を示したものの、HA前処置による変化は認めなかった。以上の結果から、SeVベクターの経正円窓投与においては脳組織への移行性はなく安全であると考えられるが、中耳組織では発現を認めるため中耳組織に障害を与えないレポーター遺伝子の選択が必要と考えられた。

第4章 考察

本研究ではSeVベクターを用いた内耳遺伝子導入において、HAによる正円窓膜の前処置が導入効率に与える影響について検討を行った。HA前処置を併用することにより、有毛細胞、らせん神経節細胞、支持細胞、蝸牛神経、らせん靭帯など、広範囲に及ぶ効果的な遺伝子導入が可能であった。また、mRNAの発現は処置3日後で速やかにピークに達し、HA前処置することによってその発現量は約100倍となり、少なくとも処置14日後までその発現は持続した。このような効果を有するHA前処置法は、臨床でも簡単に施行が可能であり、聴力低下や副作用などの危険性も少ないことから、SeVベクターを用いた遺伝子治療と併用することによって将来有望な治療法になりうると考えられた。

ウイルスベクターを用いた遺伝子治療を施行する場合、ウイルスによってレポーター遺伝子の発現部位や発現期間などの特徴が全く異なるため、ベクターの選択は極めて重要である。ベクターの中には、核内に組み込まれることによって効果を発現するものもあり、場合によっては有害な免疫反応が誘導され、細胞毒性や機能障害などを引き起こす可能性があるとして指摘されている(31-33)。また、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターは、内耳移行性に優れ長期間の遺伝子発現が可能であることから、先天的に遺伝子が欠損していることに起因する遺伝性難聴などの治療には理想的であると考えられる(17, 34)。しかし、遺伝性難聴を除く内耳障害の標準治療においては必ずしも長期遺伝子発現は重要ではないと考えられており、むしろ長期的な遺伝子発現に伴う副作用などが懸念される。さらに、内耳障害に対する治療のタイミングとして、その治療効果が高いのは障害後早期であることが知られており、発症後早期の集学的な治療が肝要である(35)。したがって、遺伝子治療を行う場合も、障害後早期に“必要な発現量を”、“必要な期間だけ”遺伝子発現させることが重要である。そ

のような点を考慮した場合、SeVベクターは投与3日後には速やかにピークに達することから治療において速効性が期待できる。さらに、遺伝子発現が永続しないこと、そして副作用の可能性が少ないことなども臨床において利点と考える。また、HA前処置によりその発現量は約100倍に増加し、約2週間程度はその発現量が持続することなども、遺伝性難聴を除く内耳性難聴の治療においては必要十分な発現期間であると考えられる(30)。さらに長期的な遺伝子発現が望まれる場合においては、SeVベクターの反復投与により発現の長期持続が期待できる。しかしながら、聴力については、mRNAの発現がピークとなる投与3日後において閾値上昇を認めなかったものの、長期的に評価を行った場合には、聴力へ影響を及ぼす可能性は否定できないことから、SeVベクターによる長期遺伝子発現が内耳に及ぼす影響については、今後さらなる検討が必要である。

内耳へのウイルスベクターの導入法として、簡便であること、内耳移行性がよいこと、聴力低下をきたさずに目的とする細胞に導入できることが望まれている。従来までは、蝸牛側壁に小孔を作製し、内リンパ液もしくは外リンパ液中にウイルスベクターを直接注入する方法、もしくは正円窓膜から外リンパ液中に直接注入する方法など、直接蝸牛内に注入する蝸牛内注入法が頻繁に用いられてきた。ただし、これらの導入法では、蝸牛内において高い遺伝子発現が期待できるものの、処置に伴う内耳障害や感染などの危険性が高く、手技的にも臨床応用するにはやや煩雑であることが問題とされてきた。そこで今回我々が注目したのが正円窓膜からウイルスベクターを徐放させるアプローチである。骨で覆われた蝸牛へのアプローチを考えた場合、中耳と内耳を隔てる膜様の構造物である正円窓膜は、最も透過性に優れた部位である。この正円窓膜を介してウイルスベクターを内耳へ浸透、拡散させることが可能となれば、本アプローチは安全、簡便、低侵襲で理想的といえるであろう。同様のアプローチは、

実際の臨床でもメニエール病やめまい患者などに対するゲンタマイシン内耳局所投与に用いられている(26)。また、突発性難聴患者に対するステロイド内耳局所投与にも用いられており、その効果が報告されている(25)。しかし、ウイルスベクターが正円窓膜を透過するという報告はこれまでにあるものの(28, 36)、治療効果を発揮するのに必要な遺伝子発現量を蝸牛内で得るのは困難であると考えられてきた(27, 29)。このことは、正円窓膜上に留置したSeVベクターが、蝸牛内の有毛細胞やらせん神経節細胞などにほとんど移行しなかった我々の結果とも一致する(図4)。したがって、この安全性の高い経正円窓投与法を用いて、如何にしてSeVベクターの内耳移行性(正円窓膜透過性)を向上させるかが、大きな課題であると考えられてきた。

正円窓膜の透過性は、分子の大きさ、形状、濃度、脂溶性、および電荷などによって影響される(37, 38)。分子の大きさに関しては、1 μm 程度の小粒子であれば透過できるものの、3 μm では透過できなかつたとチンチラの正円窓膜を用いた動物モデルにおいて報告されている(39)。我々の用いたSeVベクターのサイズはおよそ200 nmであったにも関わらず、正円窓膜の透過を認めなかつた。他のウイルスベクターとサイズを比較してみると、レトロウイルスは100 nm程度、アデノウイルスは70-90 nm程度、アデノ随伴ウイルスは20 nm程度となっており、SeVはサイズの観点からすれば、サイズが大きいことから透過性は劣ることが予想される。しかし、最もサイズの小さいアデノ随伴ウイルスでさえ正円窓膜を透過するのは困難であると報告されていることから(28)、ウイルスベクターの正円窓膜透過性はサイズ以外の要因も大きく関与している可能性が考えられる。

SeVが有する特徴として、GD1a、GTMbおよびGQ1bなどのポリシアロガングリオシドがSeVの受容体であることが知られており、SeVベクターの宿主細胞への感染においてこのポリシアロガングリオシドの発現は重要と考えられている

(40)。これらのポリシアログングリオシドは蝸牛内でもその発現がこれまでに報告されていることから、SeVベクターの内耳遺伝子導入に効力を発揮している可能性が考えられる(41)。内有毛細胞と外有毛細胞の遺伝子導入パターンの違いについても、このポリガングリオシドの発現の違いが関与している可能性が考えられる。また、一般的な内耳障害では、外有毛細胞の方が内有毛細胞よりも障害を受けやすいことから、外有毛細胞の遺伝子導入効率が高いことについては、SeVベクターを用いた本アプローチの利点となりうる。

解剖学的に正円窓膜には3層あり、1) 中耳に面する外上皮層、2) 結合織層、3) 内耳に接する内上皮層、より構成される(42)。外上皮層は密な細胞質と微絨毛を有する明細胞および暗細胞からなる単層であり、細胞同士は強固なタイトジャンクションによって結合している。結合織層は繊維組織、膠原組織、血管およびリンパ管などから成り、内上皮層は疎な細胞間結合と不連続な基底膜から構成される。したがって、ウイルスベクターに対する正円窓膜のバリア機能としては、外上皮層のタイトジャンクションが最も大きな障害となっていると考えられる。これまでに、ヒスタミン、HAおよびコラゲナーゼなどで正円窓膜を前処置することにより、ウイルスベクターの膜透過性が向上したと報告されている(29, 30, 43)。これらの前処置薬剤は正円窓膜の中耳面に接着させることから、主に外上皮層に直接作用していることが予想される。これらの薬剤の中でも、HAは形成外科や眼科領域において臨床で頻繁に使用されていること、また耳鼻科領域では人工内耳の電極挿入時に抵抗を減弱させるために用いられるほか(44)、ステロイドの鼓室内投与に併用されることもあり(45, 46)、内耳において非常に高い安全性を有する薬剤である。

HAは人体に無毒で生体親和性と吸収性に優れ、粘稠性を有する高分子量のムコ多糖類である。今回の我々の結果では、HA前処置によってSeVベクターの内

耳移行性が亢進することが示されたが、その詳細な作用メカニズムに関しては未だに不明な点も多く、様々な要因が複合的に関与しているものと考えられる。まず、HA前処置によってピノサイトーシスによる正円窓膜の透過性が亢進した可能性が考えられる。これは、ベクターが負に帯電することによって、正に帯電した正円窓膜に引き寄せられることによるものである(38, 47-49)。その他、正円窓膜上の浸透圧が変化して透過性が変化した可能性(48)、HAの粘稠性によってSeVベクターの正円窓膜への接触時間が延長したことによる可能性なども考えられる(43)。qRT-PCRによる結果では、発現量の増加だけでなく発現持続時間の延長も認められており、これはHAの粘稠性によって持続的にSeVベクターが正円窓膜から徐放されたことを示唆しているのかもしれない。さらに近年、カチオン化されたSeVが効率よく宿主細胞に導入されることが報告されていることから(50, 51)、HAによるSeVベクターのカチオン化についての効果も検討の余地がある。ただし、蝸牛内にHAとSeVベクターを共に直接注入した場合は、SeVベクターを単独で注入した場合と比較して導入効率に明らかな変化を認めなかったことから(図11)、HAは内耳組織やSeVベクターそのものに作用していると考えerよりは、正円窓膜に作用していると考えer方が妥当であると考えられた。さらに、中耳においてHA前処置効果が認められなかったことも、HAはSeVベクターではなく、正円窓膜そのものに作用したことを示唆している。しかし、これまでの報告ではHAの内耳局所投与後に蝸牛内の形態学的変化は正円窓膜を含めて観察できないとされている(46, 48, 52)。今後は電子顕微鏡による正円窓膜の菲薄化や膜変性、膜破綻などの形態学的変化の有無について、さらに詳細な観察が必要と考えられる。さらに近年、HAがCD44受容体に結合して作用することが報告されており(53)、蝸牛でもCD44受容体の発現が報告されていることから(54)、CD44受容体に関してさらなる検討が必要と考えられる。

HAの濃度に関しては、濃度差による導入効率の変化は認めなかったことから、低濃度（10 mg/mL）で十分に効果が期待できる。また、低濃度のHA前処置によって8 kHzより高音域の内耳細胞に遺伝子導入が可能であったことから、本アプローチは臨床においても内耳障害に対して十分な効果が期待でき、その有用性は高いと考える（図8）。しかし、さらに低音域の治療を目的とした頂回転までの遺伝子導入の達成には、さらなる改良が必要である。

現在、ウイルスベクターを用いた内耳遺伝子治療は、臨床応用に向けた研究が世界中の多くの研究室で施行され、アデノウイルスベクターを用いた内耳障害の臨床治験も進行中である。今回我々は、蝸牛における広範な遺伝子導入効果を示したが、実際の臨床でSeVベクターを内耳障害の遺伝子治療に用いる場合、蝸牛有毛細胞やらせん神経節細胞などの目的とする細胞に特異的に遺伝子を導入する技術が必要となるであろう。レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどを用いる場合は、ウイルスのプロモーターを変更することで、導入細胞を変化させることができる(55)。しかし、SeVベクターはRNAウイルスであることからプロモーターを選択することができない。そこで、SeVベクターでは単鎖抗体などを変換させる手法で導入細胞を変化させることがこれまでに報告されている(56-58)。今後は、蝸牛有毛細胞、支持細胞、らせん神経節細胞などの目的細胞に応じたSeVベクターの改良が必要と考える。

最後に、SeVベクターは他のウイルスベクターと比較して、低い病原性、強力な遺伝子発現、広い宿主性が利点である(59)。さらにRNAウイルスであることから、ベクター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く遺伝毒性が原理的にないことも大きな特徴である。日本では下肢虚血性疾患に対するSeVベクターを用いた遺伝子治療が臨床治験で行われており、感染や炎症なども含めて重大な副作用は報告されていない(60, 61)。以上より、SeVベクターは内耳

障害に対しても安全で有効な治療法として期待できる。

第5章 結論

- ① 経正円窓投与方法を用いた 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。

第6章 謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座塩谷彰浩教授および細部にわたり直接研究のご指導を頂きました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座水足邦雄講師に衷心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

付記

本研究の一部は文部科学省科学研究費基盤(C) (No.26462572)により実施した。

本研究の主旨は第52回Inner Ear Biology (2015年9月ローマ)、第60回日本聴覚医学会総会・学術講演会 (2015年10月東京)において発表した。

本研究は、Gene Therapy (2016) 23, 187-195 に掲載された。

引用文献

1. Lin FR, Niparko JK, Ferrucci L. Hearing loss prevalence in the United States. *Archives of internal medicine*. 2011;171(20):1851-2.
2. Kurioka T, Matsunobu T, Niwa K, Tamura A, Kawauchi S, Satoh Y, Sato S, Shiotani A. Characteristics of laser-induced shock wave injury to the inner ear of rats. *Journal of biomedical optics*. 2014;19(12):125001.
3. Spoenclin H. Retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Acta oto-laryngologica*. 1975;79(3-4):266-75.
4. Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, Niwa K, Endo S, Fujioka M, Shiotani A. ERK2 mediates inner hair cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Scientific reports*. 2015;5:16839.
5. Kurioka T, Lee MY, Heeringa AN, Beyer LA, Swiderski DL, Kanicki AC, Kabara LL, Dolan DF, Shore SE, Raphael Y. Selective hair cell ablation and noise exposure lead to different patterns of changes in the cochlea and the cochlear nucleus. *Neuroscience*. 2016;332:242-57.
6. Hudspeth AJ. How hearing happens. *Neuron*. 1997;19(5):947-50.
7. Conlin AE, Parnes LS. Treatment of sudden sensorineural hearing loss: II. A Meta-analysis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2007;133(6):582-6.
8. Conlin AE, Parnes LS. Treatment of sudden sensorineural hearing loss: I. A systematic review. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2007;133(6):573-81.
9. Kurioka T, Matsunobu T, Niwa K, Tamura A, Satoh Y, Shiotani A. Activated protein C rescues the cochlea from noise-induced hearing loss. *Brain research*. 2014;1583:201-10.
10. Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, Niwa K, Shiotani A. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of noise-induced hearing loss through reducing reactive oxygen species. *Neuroscience research*. 2014;89:69-74.
11. Takeda H, Kurioka T, Kaitsuka T, Tomizawa K, Matsunobu T, Hakim F, Mizutani K, Miwa T, Yamada T, Ise M, Shiotani A, Yumoto E, Minoda R. Protein transduction therapy into cochleae via the round window niche in guinea pigs. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2016;3:16055.

12. Duan M, Venail F, Spencer N, Mezzina M. Treatment of peripheral sensorineural hearing loss: gene therapy. *Gene therapy*. 2004;11 Suppl 1:S51-6.
13. Agrup C, Gleeson M, Rudge P. The inner ear and the neurologist. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007;78(2):114-22.
14. Kesser BW, Lalwani AK. Gene therapy and stem cell transplantation: strategies for hearing restoration. *Advances in oto-rhino-laryngology*. 2009;66:64-86.
15. Luebke AE, Rova C, Von Doersten PG, Poulsen DJ. Adenoviral and AAV-mediated gene transfer to the inner ear: role of serotype, promoter, and viral load on in vivo and in vitro infection efficiencies. *Advances in oto-rhino-laryngology*. 2009;66:87-98.
16. Raphael Y, Frisancho JC, Roessler BJ. Adenoviral-mediated gene transfer into guinea pig cochlear cells in vivo. *Neuroscience letters*. 1996;207(2):137-41.
17. Praetorius M, Brough DE, Hsu C, Plinkert PK, Pfannenstiel SC, Staecker H. Adenoviral vectors for improved gene delivery to the inner ear. *Hearing research*. 2009;248(1-2):31-8.
18. Derby ML, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Corey DP. Gene transfer into the mammalian inner ear using HSV-1 and vaccinia virus vectors. *Hearing research*. 1999;134(1-2):1-8.
19. Han JJ, Mhatre AN, Wareing M, Pettis R, Gao WQ, Zufferey RN, Trono D, Lalwani AK. Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by a lentivirus-derived gene transfer vector. *Human gene therapy*. 1999;10(11):1867-73.
20. Kilpatrick LA, Li Q, Yang J, Goddard JC, Fekete DM, Lang H. Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the scala media of the normal and deafened adult mouse ear. *Gene therapy*. 2011;18(6):569-78.
21. Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Shirakura M, Kanaya T, Yoshizaki M, Hironaka T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M. Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer with preferable properties. *The journal of gene medicine*. 2004;6(10):1069-81.
22. Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, Inoue M. Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *The journal of gene medicine*.

2006;8(9):1151-9.

23. Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *Journal of virology*. 2000;74(14):6564-9.
24. Kanzaki S, Shiotani A, Inoue M, Hasegawa M, Ogawa K. Sendai virus vector-mediated transgene expression in the cochlea in vivo. *Audiology & neuro-otology*. 2007;12(2):119-26.
25. Rauch SD, Halpin CF, Antonelli PJ, Babu S, Carey JP, Gantz BJ, Goebel JA, Hammerschlag PE, Harris JP, Isaacson B, Lee D, Linstrom CJ, Parnes LS, Shi H, Slattery WH, Telian SA, Vrabc JT, Reda DJ. Oral vs intratympanic corticosteroid therapy for idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a randomized trial. *Jama*. 2011;305(20):2071-9.
26. Kaplan DM, Hehar SS, Bance ML, Rutka JA. Intentional ablation of vestibular function using commercially available topical gentamicin-betamethasone eardrops in patients with Meniere's disease: further evidence for topical eardrop ototoxicity. *The Laryngoscope*. 2002;112(4):689-95.
27. Stover T, Yagi M, Raphael Y. Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation. *Hearing research*. 1999;136(1-2):124-30.
28. Jero J, Mhatre AN, Tseng CJ, Stern RE, Coling DE, Goldstein JA, Hong K, Zheng WW, Hoque AT, Lalwani AK. Cochlear gene delivery through an intact round window membrane in mouse. *Human gene therapy*. 2001;12(5):539-48.
29. Wang H, Murphy R, Taaffe D, Yin S, Xia L, Hauswirth WW, Bance M, Robertson GS, Wang J. Efficient cochlear gene transfection in guinea-pigs with adeno-associated viral vectors by partial digestion of round window membrane. *Gene therapy*. 2012;19(3):255-63.
30. Shibata SB, Cortez SR, Wiler JA, Swiderski DL, Raphael Y. Hyaluronic acid enhances gene delivery into the cochlea. *Human gene therapy*. 2012;23(3):302-10.
31. Luebke AE, Foster PK, Muller CD, Peel AL. Cochlear function and transgene expression in the guinea pig cochlea, using adenovirus- and adeno-associated virus-directed gene transfer. *Human gene therapy*. 2001;12(7):773-81.

32. Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:1017-25.
33. Lee MY, Kurioka T, Nelson MM, Prieskorn DM, Swiderski DL, Takada Y, Beyer LA, Raphael Y. Viral-mediated Ntf3 overexpression disrupts innervation and hearing in nondeafened guinea pig cochleae. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2016;3:16052.
34. Atkinson PJ, Wise AK, Flynn BO, Nayagam BA, Richardson RT. Viability of long-term gene therapy in the cochlea. *Scientific reports*. 2014;4:4733.
35. Tabuchi K, Hara A. [Glucocorticoid treatment for cochlear ischemic and acoustic injuries]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho*. 2010;113(11):831-7.
36. Suzuki M, Yamasoba T, Suzukawa K, Kaga K. Adenoviral vector gene delivery via the round window membrane in guinea pigs. *Neuroreport*. 2003;14(15):1951-5.
37. Borkholder DA, Zhu X, Frisina RD. Round window membrane intracochlear drug delivery enhanced by induced advection. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;174:171-6.
38. Goycoolea MV, Muchow D, Schachern P. Experimental studies on round window structure: function and permeability. *The Laryngoscope*. 1988;98(6 Pt 2 Suppl 44):1-20.
39. Goycoolea MV, Muchow DD, Sirvio LM, Winandy RM, Canafax DM, Hueb M. Extended middle ear drug delivery. A new concept; a new device. *Acta oto-laryngologica Supplementum*. 1992;493:119-26.
40. Markwell MA, Svennerholm L, Paulson JC. Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(9):5406-10.
41. Santi PA, Mancini P, Barnes C. Identification and localization of the GM1 ganglioside in the cochlea using thin-layer chromatography and cholera toxin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1994;42(6):705-16.
42. Goycoolea MV. Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathological conditions. *Acta oto-laryngologica*. 2001;121(4):437-47.

43. Chandrasekhar SS, Rubinstein RY, Kwartler JA, Gatz M, Connelly PE, Huang E, Baredes S. Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2000;122(4):521-8.
44. Lehnhardt E. [Placement of intracochlear electrodes with Healon]. *Hno*. 1992;40(3):86-9.
45. Selivanova OA, Gouveris H, Victor A, Amedee RG, Mann W. Intratympanic dexamethasone and hyaluronic acid in patients with low-frequency and Meniere's-associated sudden sensorineural hearing loss. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. 2005;26(5):890-5.
46. Borden RC, Saunders JE, Berryhill WE, Krempl GA, Thompson DM, Queimado L. Hyaluronic acid hydrogel sustains the delivery of dexamethasone across the round window membrane. *Audiology & neuro-otology*. 2011;16(1):1-11.
47. Friberg U, Erwall C, Bagger-Sjoberg D, Rask-Andersen H. Hyaluronan content in human inner ear fluids. *Acta oto-laryngologica*. 1989;108(1-2):62-7.
48. Bagger-Sjoberg D, Holmquist J, Mendel L, Mercke U. Hyaluronic acid in middle ear surgery. *The American journal of otology*. 1993;14(5):501-6.
49. Chen G, Zhang X, Yang F, Mu L. Disposition of nanoparticle-based delivery system via inner ear administration. *Current drug metabolism*. 2010;11(10):886-97.
50. Kaneda Y. Improvements in gene therapy technologies. *Molecular urology*. 2001;5(2):85-9.
51. Kim HS, Kim JS, Lee YK, Koo KH, Park YS. An efficient liposomal gene delivery vehicle using Sendai F/HN proteins and protamine. *Cancer gene therapy*. 2008;15(4):214-24.
52. Bjurstrom S, Slepecky N, Angelborg C. A histopathological study of the inner ear after the administration of hyaluronan into the middle ear of the guinea pig. *Acta oto-laryngologica Supplementum*. 1987;442:62-5.
53. Yin H, Zhao F, Zhang D, Li J. Hyaluronic acid conjugated beta-cyclodextrin-oligoethylenimine star polymer for CD44-targeted gene delivery.

International journal of pharmaceutics. 2015;483(1-2):169-79.

54. Hertzano R, Puligilla C, Chan SL, Timothy C, Depireux DA, Ahmed Z, Wolf J, Eisenman DJ, Friedman TB, Riazuddin S, Kelley MW, Strome SE. CD44 is a marker for the outer pillar cells in the early postnatal mouse inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 2010;11(3):407-18.

55. Stone IM, Lurie DI, Kelley MW, Poulsen DJ. Adeno-associated virus-mediated gene transfer to hair cells and support cells of the murine cochlea. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2005;11(6):843-8.

56. Nakamura T, Peng KW, Harvey M, Greiner S, Lorimer IA, James CD, Russell SJ. Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nature biotechnology*. 2005;23(2):209-14.

57. Zhang T, Wang CY, Zhang W, Gao YW, Yang ST, Wang TC, Zhang RZ, Qin C, Xia XZ. Generation and characterization of a fusion protein of single-chain fragment variable antibody against hemagglutinin antigen of avian influenza virus and truncated protamine. *Vaccine*. 2010;28(23):3949-55.

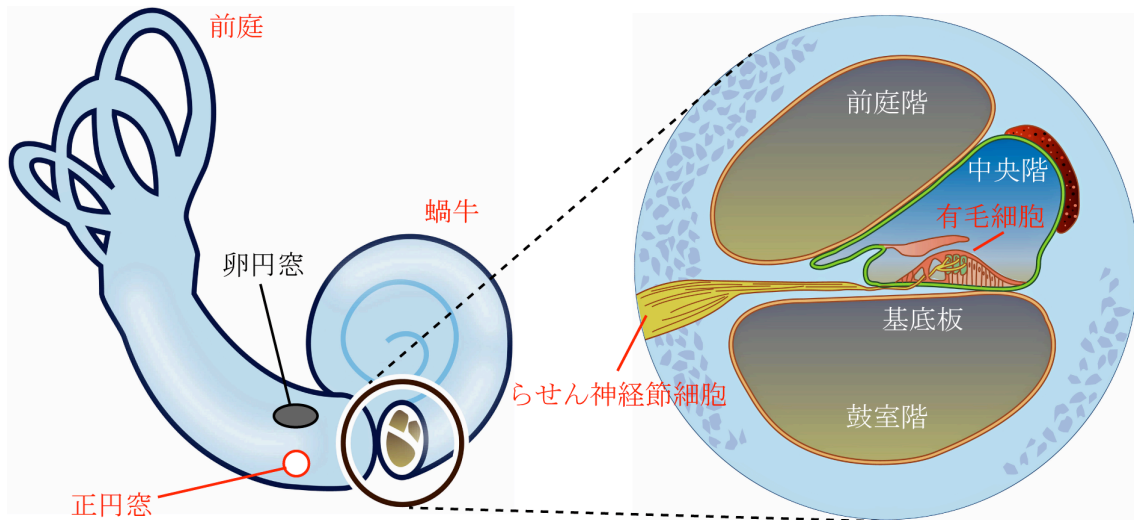
58. Yang X, Hu W, Li F, Xia H, Zhang Z. Gene cloning, bacterial expression, in vitro refolding, and characterization of a single-chain Fv antibody against PreS1(21-47) fragment of HBsAg. *Protein expression and purification*. 2005;41(2):341-8.

59. Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Current gene therapy*. 2012;12(5):410-6.

60. Yonemitsu Y, Matsumoto T, Itoh H, Okazaki J, Uchiyama M, Yoshida K, Onimaru M, Onohara T, Inoguchi H, Kyuragi R, Shimokawa M, Ban H, Tanaka M, Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Maehara Y. DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: a Phase I/IIa open-label dose-escalation clinical trial. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(3):707-14.

61. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circulation research*. 2002;90(9):966-73.

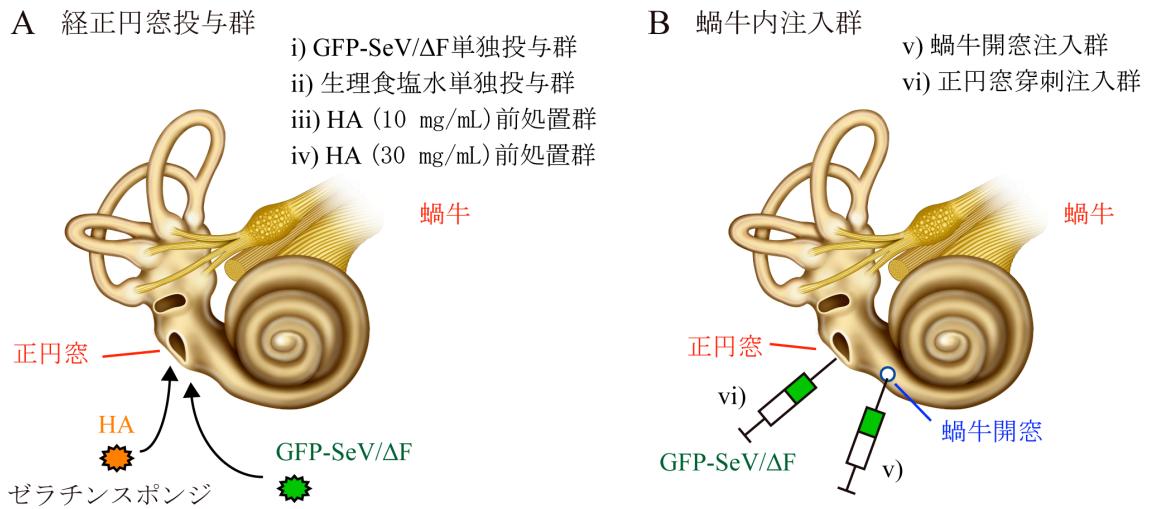
図1



内耳の模式図

内耳は蝸牛（聴覚）と前庭（平衡覚）に分けられ、蝸牛は外リンパ液を満たしている前庭階、鼓室階、および内リンパ液を満たしている中央階から成る。前庭階の基部に卵円窓という小さな膜様構造物があり、中耳のアブミ骨と接していることによって、外界の音信号を前庭階の外リンパへ振動として伝えることができる。さらに、鼓室階の基部にも正円窓と呼ばれる膜が存在し、この2つの膜が音信号という機械的な振動を蝸牛へ伝達する重要な役割を果たしている。中央階の基底板上には有毛細胞が存在し、ここで機械的振動が電気的信号に変換され、らせん神経節細胞を経由して聴覚中枢に伝達される。

図2

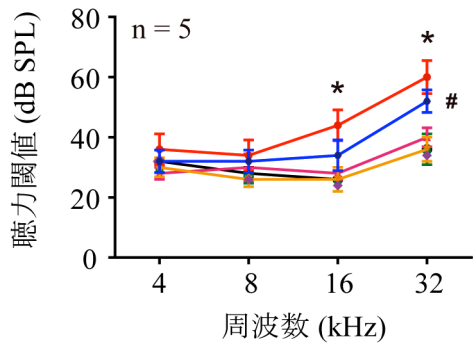


外科的処置の模式図

(A) 経正円窓投与群では、i) GFP-SeV/ Δ F もしくは ii) 生理食塩水を浸み込ませたゼラチンスポンジを正円窓上に留置した。iii, iv) HA前処置群では、HA (10、30 mg/mL) を浸み込ませたゼラチンスポンジを正円窓上に10分間留置して除去した後に、GFP-SeV/ Δ Fを浸み込ませたゼラチンスポンジを留置した。

(B) 蝸牛内注入群では、v) 蝸牛外側壁に小孔を作製して鼓室階に直接注入する蝸牛開窓注入群と、vi) 正円窓穿刺により鼓室階に直接注入する正円窓穿刺注入群を用いた。

図3



経正円窓投与群

- GFP-SeV/ΔF 単独投与群
- 生理食塩水 単独投与群
- HA (10 mg/mL) 前処置群
- HA (30 mg/mL) 前処置群

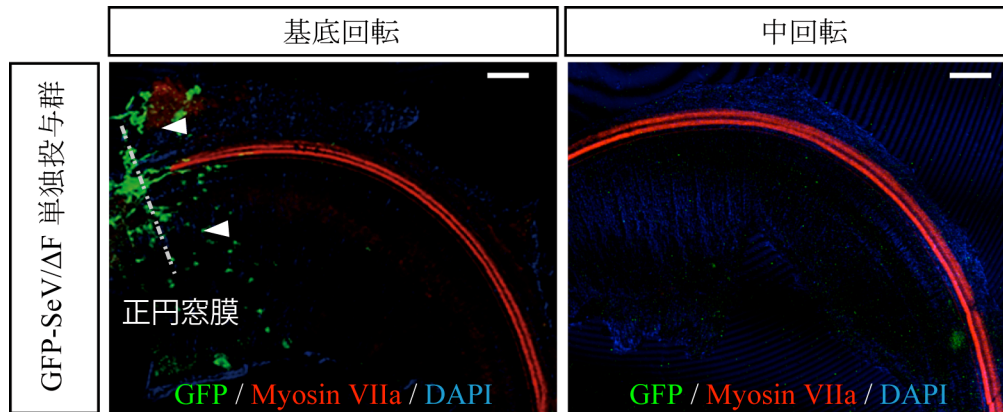
蝸牛内注入群

- 蝸牛開窓注入群
- 正円窓穿刺注入群

ABR による聴力閾値の評価

経正円窓投与群における処置 3 日後の聴力閾値では、いずれのグループにおいても有意な聴力閾値の上昇を認めない。一方、蝸牛内注入群では経正円窓投与群と比較して、高音域において有意な閾値上昇を認める(* $P < 0.05$, 蝸牛開窓注入群 対 経正円窓投与群 ; # $P < 0.05$, 正円窓穿刺注入群 対 経正円窓投与群)。データは平均値 ± 標準誤差を示す。

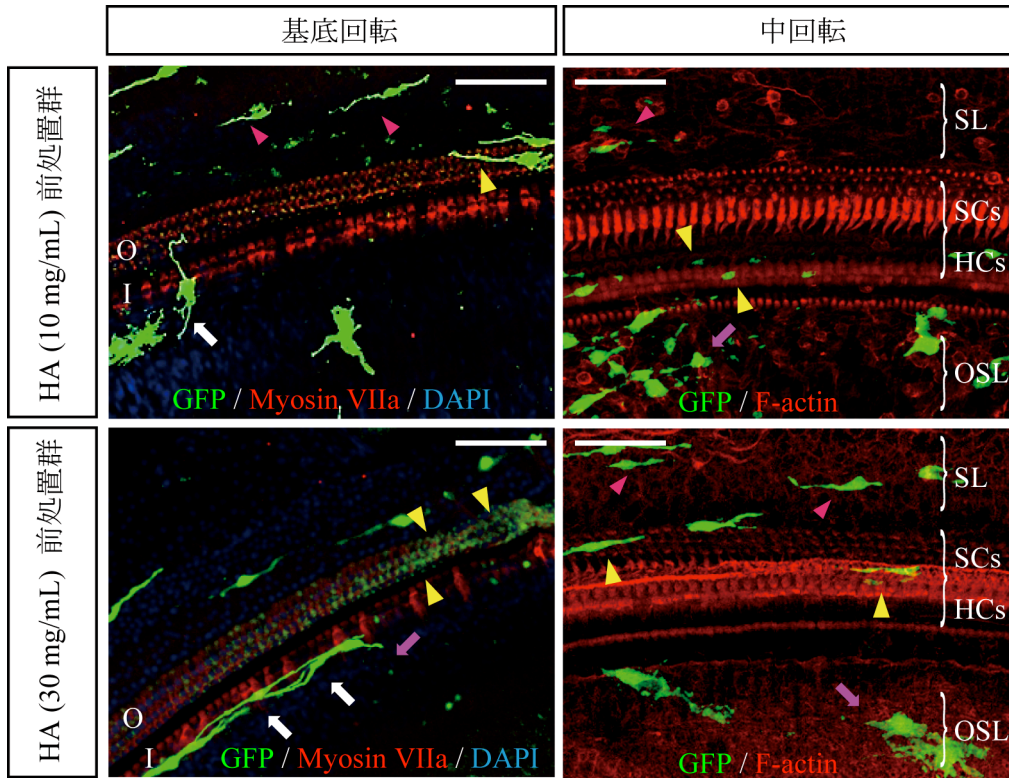
図4



GFP-SeV/ Δ F単独投与群における内耳遺伝子導入

単独群における GFP の発現は、基底回転の正円窓膜周囲（白矢尻）のみであり、中回転での発現はほとんど認めない。Scale bar = 50 μ m。

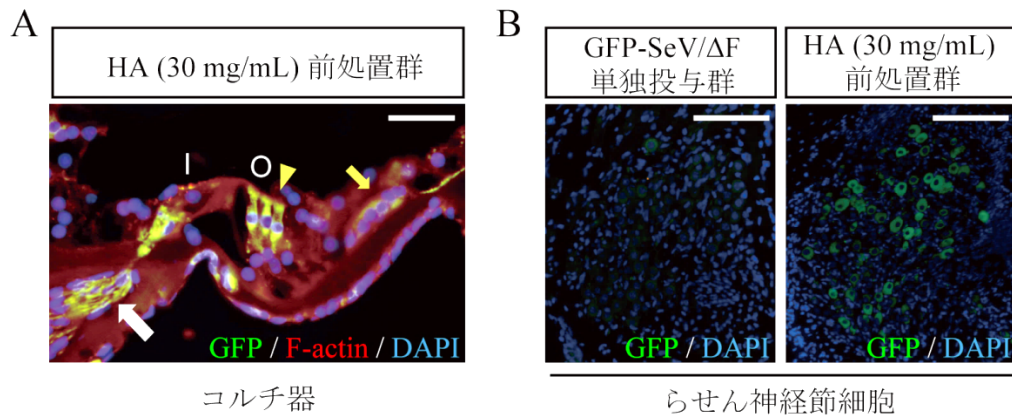
図 5



HA前処置による内耳遺伝子導入

HA 前処置を施行したいずれの群でも、基底回転から中回転に至る広範な GFP の発現を認め、特に有毛細胞および支持細胞（黄矢尻）、らせん靭帯（桃矢尻）、蝸牛神経線維（白矢印）、および骨らせん板の線維細胞（桃矢印）において発現を強く認める。I, 内有毛細胞；O, 外有毛細胞；HCs, 有毛細胞；OSL, 骨らせん板；SCs, 支持細胞；SL, らせん靭帯。Scale bar = 50 μ m。

図6

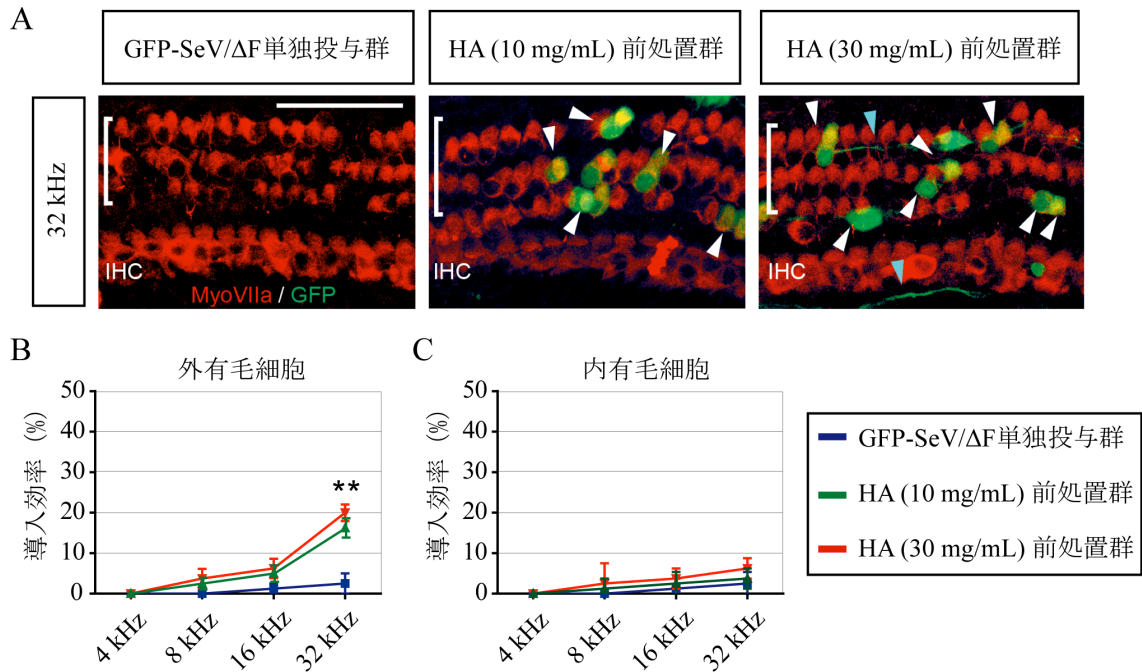


コルチ器およびらせん神経節細胞におけるGFPの発現

(A) HA 前処置群の cross-section では、外有毛細胞（黄矢尻）、支持細胞（黄矢印）、基板、および蝸牛神経線維（白矢印）において GFP の発現を認める。

(B) らせん神経節細胞において、HA 前処置群で GFP の発現を強く認める。I, 内
有毛細胞 ; O, 外有毛細胞。Scale bar = 50 μ m。

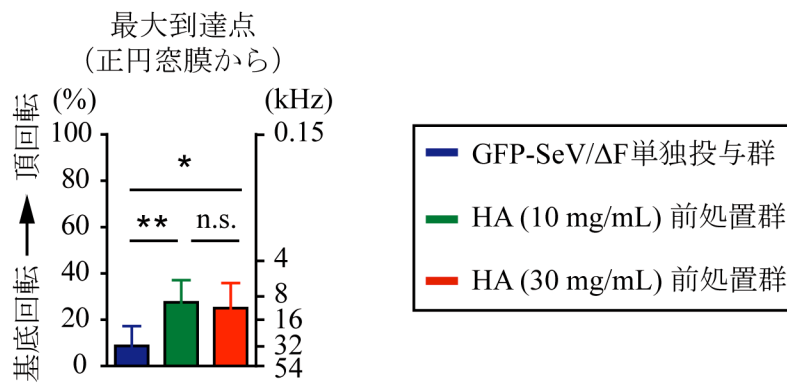
図7



有毛細胞における遺伝子導入効率

(A) 写真は、蝸牛基底回転(32 kHz領域)における有毛細胞を示す。単独群ではGFPの発現を認めないが、HA前処置群では、いずれの濃度においても外有毛細胞(白矢尻)および蝸牛神経線維(青矢尻)において、GFPの発現を認める。白枠は外有毛細胞を示す。IHC, 内有毛細胞。Scale bar = 50 μm。 (B) 外有毛細胞への導入効率は、32 kHz領域のみHA前処置群(10、30 mg/mL)において有意に上昇する(** P<0.01)。 (C) 内有毛細胞では、HA前処置群でもGFPの発現を認めない。データは平均値±標準誤差を示す。

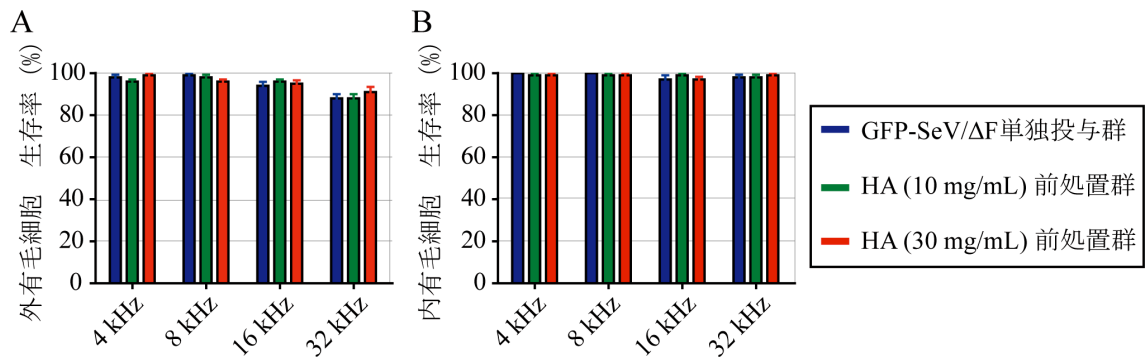
図8



SeVベクターの最大到達点

単独群では、頂回転方向へのSeVベクターの拡散についてほとんど認めないが、HA前処置群では拡散が有意に上昇する (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s. 有意差なし)。HAの濃度差による有意な差は認めない。データは平均値±標準誤差を示す。

図 9

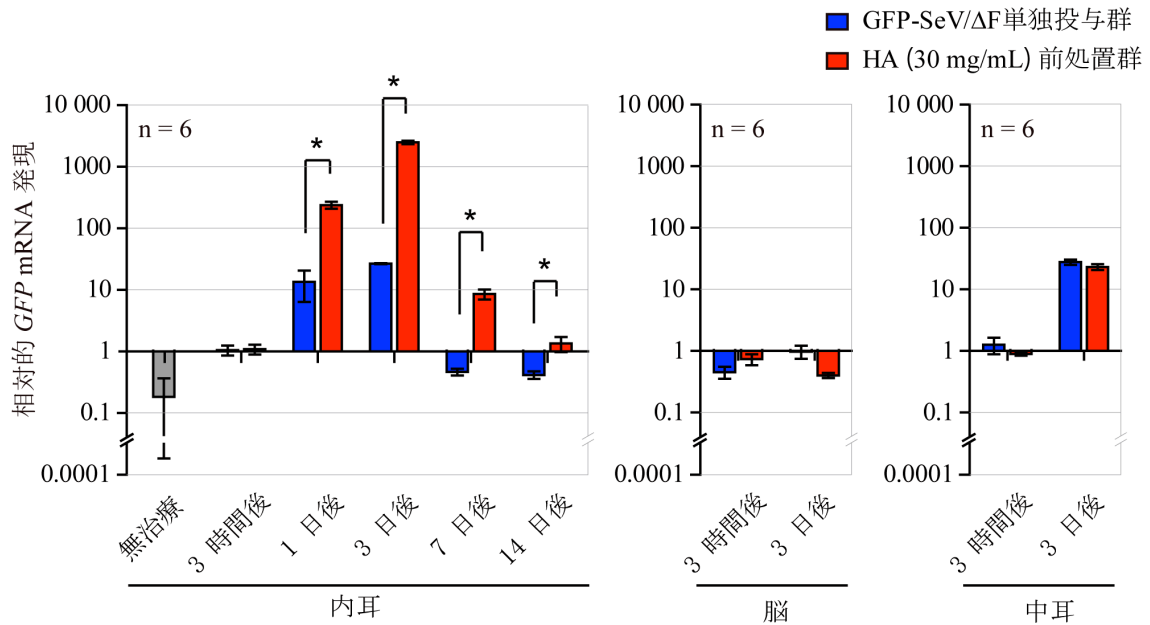


遺伝子導入処置後の有毛細胞生存率

(A、B) いずれの周波数領域においても、外・内有毛細胞は高い生存率を示す。

データは平均値±標準誤差を示す。

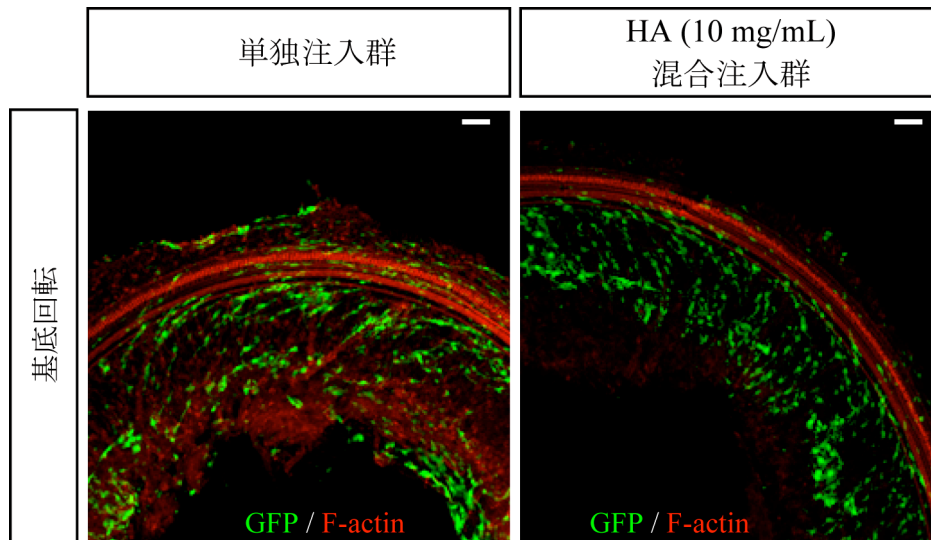
図10



qRT-PCRによる内耳、脳、中耳でのGFP mRNAの発現

(内耳) 単独群でのGFP mRNAの発現は、処置3日後でピークとなる。一方で、HA前処置群では単独群の約100倍の発現量となり、有意に増加する(* P<0.05)。発現のピークに関しては、HA前処置群でも処置3日後で単独群と変化を認めない。ただし、単独群では速やかに発現量が減少し処置7日後には無治療のレベルまで減少するのに対し、HA前処置群では2週間以上その発現効果を持続させることができる。(脳) 処置3日後の脳組織では、HA前処置の有無にかかわらず、GFP mRNAの発現に変化を認めない。(中耳) 処置3日後にGFP mRNAの発現は増加を認めるものの、HA前処置による変化は認めない。データは平均値±標準誤差を示す。

図11



HAとSeVベクターを混合して蝸牛内注入した場合の遺伝子導入効果

HA (10 mg/mL)をベクターに混合して注入した群では単独注入群と比較して、導入効率に大きな変化を認めない。図は基底回転領域を示す。Scale bar = 50 μ m。