

### 三輪 徹 氏の学位論文審査の要旨

論文題名

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)

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ていない。そこで遺伝性難聴の治療開発として、ポリアルギニンを用いた蛋白質導入と、エレクトロポレーション法によって(ヒト遺伝性難聴の原因である)コネキシン 30(Cx30)の遺伝子導入を行って、その影響を検討した。

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エレクトロポレーションを行った。蛋白質・遺伝子を導入した胎仔は、組織学的検討と生後の聴力検査を行った。

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が、24 時間後には導入蛋白質は認めなくなった。さらに、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できた。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。

これらの結果より、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が、導入期間は導入後 24 時間以内と短く、遺伝性難聴に対する治療としては不十分であった。遺伝子導入では、ターゲット遺伝子である 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ており、胎生期内耳に正常遺伝子を導入する治療が有効である可能性を示した。

審査では、1) 対象疾患の原因遺伝子の多様性、2) 胎生期に遺伝子導入する臨床的意義、3) タンパク質・遺伝子の導入の功罪、4) 遺伝子発現の継続性とその限界、5) 対象疾患の臨床症状が出現するメカニズムなどについて質疑がなされ、申請者からは概ね的確な解答がなされた。

本研究は、遺伝性難聴に対する新たな治療概念の確立に寄与できる研究成果であり、学位の授与に相応しい研究と評価された。

審査委員長 視機能病態学担当教授

