

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(革新的中分子創薬技術の開発)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 中分子薬剤による難聴治療を目指したギャップ結合創薬の創生
(英語) Development of gap junction therapy for hearing loss with middle-molecule drug

研究開発実施期間: 平成 30 年 6 月 4 日～令和 3 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 神谷 和作
(英語) Kazusaku Kamiya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人順天堂 順天堂大学 大学院医学研究科耳鼻咽喉科学・准教授
(英語) Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University, Faculty of Medicine,
Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

遺伝性難聴において半数以上の要因を占めるのがギャップ結合を形成するコネキシン 26(CX26)遺伝子、GJB2 の変異による遺伝性・感音性難聴である。当研究班は CX26 変異型難聴の発症機構の発見、アデノ随伴ウイルス (AAV) による遺伝子治療実験に成功、さらに iPS 細胞から蝸牛と同様の機能と病態持つ CX26 ギャップ結合プラーク形成細胞への分化誘導法を開発した。本課題では、これまで開発した疾患モデル細胞、その分化誘導法、疾患モデル動物等を活用し、遺伝性難聴を標的とした中分子医薬品を開発することを目的とした。

これまで新たに GJB2 遺伝子 109G>A/p.V37I 変異による軽度難聴症例等を同定し、日本人の典型的遺伝性難聴における iPS 細胞の樹立が継続している。上記患者に対応した実験動物として GJB2-V37I 変異を持つゲノム編集マウスを作製している。疾患モデル細胞の技術開発として、ES 細胞への添加物の調整により CX26 ギャップ結合構築細胞を大量に作製する技術改良を行った (Front Cell Dev Biol. 2021 ;9:602197)。さらにヒト iPS 細胞とこれまで樹立した CX26 変異難聴患者 iPS 細胞からの CX26 ギャップ結合構築細胞を作成し患者ギャップ結合機能の低下を iPS 細胞を用いて再現することに成功した (Fukunaga, Human molecular genetics, 2021, doi: 10.1093/hmg/ddab097.) (順天堂大学プレスリリース 2021 年 5 月 18 日)。これらの患者由来細胞

を薬剤スクリーニングに活用するため新規のスクリーニング法を開発した。これによりギャップ結合の機能回復を 96 ウェルプレートでの高速自動解析することが可能となり、機能低下や病態レベルを簡便に測定するシステムとして構築された。さらに AMED「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」(BINDS) の支援によって中分子ライブラリの新規中分子化合物のスクリーニングによりギャップ結合機能を回復させる候補化合物がスクリーニングされた。本課題の治療法の適用拡大として老人性難聴における蝸牛ギャップ結合と聴力低下との相関を生化学に解析したところ老人性難聴の初期病態において蝸牛ギャップ結合の崩壊が認められ、ギャップ結合タンパク質が疎水化する生化学的变化が発見された。これにより本課題で開発している治療薬を加齢性難聴へと適用拡大できることが明らかとなった (Tajima, *Experimental & Molecular Medicine*, 2020)。

以下に主な成果を概説する。

「iPS 細胞からの内耳ギャップ結合細胞シートへの作製および中分子薬剤スクリーニング」

①マウス ES 細胞の分化誘導によるギャップ結合形成細胞シートの作製

ES 細胞から効率の良い内耳疾患モデル細胞を開発するため 3 次元培養の最適条件を同定した。本研究では BMP4 に由来した CX26 の発現 (mRNA および small vesicle) が SB の濃度を制御することによって増強されることが推察された。本研究課題の成果は、GJB2 変異型遺伝性難聴に対する根本的な治療法の開発において、薬剤スクリーニングや再生治療、病態解明に必要な細胞を大量かつ効率的に作製するうえで有用なツールになることが期待される。上記の成果は国際雑誌に掲載された (Fukunaga, *Front Cell Dev Biol.* 2021 ;9:602197)。

②ヒト iPS 細胞からコネクシン 26 ギャップ結合構築細胞への分化誘導と GJB2 変異型難聴疾患モデル細胞の開発

本研究では、①ヒト iPS 細胞から CX26 ギャップ結合を構築する細胞 (iCX26GJC) への分化誘導法の開発、および②GJB2 変異難聴患者由来の iPS 細胞から疾患モデル細胞を作製し病態を再現することを目的とした。ヒト iPS 細胞の 3 次元培養により、GJB2 および GJB6 を高発現する培養条件が見いだされた。本邦の GJB2 変異難聴において最も患者数の多い 235delC の変異を持つ患者から樹立した iPS 細胞を用いて、CX26 ギャップ結合構築細胞を作製し、機能性を調べた。その結果、患者由来モデル細胞は健常な細胞由来のモデル細胞に比べ色素の移動距離が優位に短かったことから、ギャップ結合の機能性が著しく低下していることが明らかとなり、GJB2 変異難聴の病態である“ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの低下を再現した。これらの成果は、GJB2 変異型遺伝性難聴に対する変異毎の病態解明、根本的な治療法の開発、薬剤スクリーニング等への応用が期待される (Fukunaga, *Human molecular genetics*, 2021, doi: 10.1093/hmg/ddab097.) (順天堂大学プレスリリース 2021 年 5 月 18 日)。

③中分子医薬品の大規模スクリーニング技術の開発

難聴患者由来 iPS 細胞や内耳への分化誘導法を薬剤スクリーニングに活用するため、ギャップ結合を指標にした新規のスクリーニング技術を開発した。これによりギャップ結合の機能回復を 96 ウェルプレートでの高速自動解析することが可能となり、機能低下や病態レベルを簡便に測定するシステムとして構築された。この技術は「ギャップ結合機能制御剤のスクリーニング法」として特許出願した (特願 2019-149966)。この技術を用いて薬剤スクリーニングを施行した結果、すでに既存化合物から 5 種類以上の候補化合物が同定された。再現性や濃度依存性も確認されたため、動物への投与実験に進んでおり、一部で聴力回復を示すデータが得られている。さらに AMED「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」(BINDS) の支援によって中分子ライブラリの新規中分子化合物のスクリーニングを行った。

「GJB2 変異型難聴患者の選抜」 「難聴患者 iPS 細胞の樹立」

GJB2 変異型難聴の疾患モデルとなる iPS 細胞樹立のための対象となる患者の選抜を行った。順天堂医院および東京医科大学において聴力検査、遺伝子検査により、日本人における GJB2 変異型難聴に典型的な症例を選抜した。iPS 細胞樹立の対象としては、日本人や東アジア人で最も頻度が高い GJB2 変異は 235delC (p.L79fs)変異、09G>A/p.V37I 変異、G45E+Y136X 変異である。順天堂医院では GJB2 遺伝子の 109G>A/p.V37I 変異により軽度難聴を示す症例、USH2A 遺伝子変異により中等度難聴を示す症例、SLC26A4 遺伝子変異により高度難聴を示す症例、CDH23 遺伝子変異により高度難聴を示す 2 症例が確認されている。東京医科大学では 2 3 例に遺伝学的検査を施行し、そのうち 10 例に先天性難聴に関わる遺伝子変異が検出された。内訳としては、GJB2 遺伝子変異が 6 例、CDH23 遺伝子変異が 2 例、SLC26A4 遺伝子変異が 1 例、ミトコンドリア遺伝子変異が 1 例であった。インフォームド・コンセントの後、患者血液 (5cc) を採取した。血液から T 細胞を分離・増殖させ、T 細胞ストックを保存した。同細胞への初期化遺伝子の導入により iPS 細胞を樹立した。聴力解析と遺伝子解析の結果、対象患者が選抜され、GJB2 [235delC]、[V37I]、[G45E-Y136X]の iPS 細胞が樹立された。これらは日本人で典型的な GJB2 変異を持つホモ接合体の患者を主とする。同家系由来の同遺伝子変異の兄弟。同家系由来のホモ接合体およびヘテロ接合体の姉弟も含まれている。更に他の遺伝性難聴としてアッシャー症候群 2 型の USH2A 遺伝子の変異を持つ難聴患者からの iPS 細胞を樹立した。日本人に典型的な GJB2 変異に関しては、未分化マーカーや核型解析等の解析を行い疾患モデル細胞となり得る品質の細胞株であることを確認するデータが得られた。

さらに上記と同様に、GJB2 変異において日本人で 3 位の発生頻度を持つ G45E-Y136X 変異のホモ接合体難聴患者 (弟) およびヘテロ接合体の健聴保因者 (姉) の姉弟において iPS 細胞を樹立し、性状解析の結果を論文報告した(Fukunaga, Stem Cell Research, 2021 53:102290.)。

「GJB2 変異患者に対応したゲノム編集マウスの作製」

これまでの当グループの研究では病態が極めて重篤な GJB2 遺伝子欠損マウス (GJB2-KO) および GJB2 優性阻害変異トランスジェニックマウス(GJB2-R75W-Tg)が用いられてきた。しかし実際に東アジア人種に蔓延する GJB2 変異では、GJB2 V37I ミスセンス変異等による中等度難聴が非常に多い。本研究ではゲノム編集マウスによって中等度難聴等の典型症例を再現することにより、従来の遺伝子欠損モデルより現実的で治療難度の低い聴覚障害に初期目標を設定し、遺伝子治療の最適条件を効率的に検討する。

本研究ではまず日本人 GJB2 変異患者においてアレル頻度が第 2 位であり東アジア人種全体に蔓延する GJB2 V37I 変異のゲノム編集マウスを作製する。さらに第 1 位と第 3 位の変異である GJB2 235 delC、GJB2 G45E/Y135X のゲノム編集マウスを作製する。これらの交配により、日本人において頻度の高い GJB2 ヘテロ接合体変異動物を作製する。作製したマウスの聴力評価、内耳組織学的評価を行い、内耳遺伝子治療開発のための最適な難聴モデル動物の開発を目指す。

GJB2 変異ゲノム編集マウスの作製と内耳機能解析

CRISPR/CAS9 システムにより GJB2 変異ゲノム編集マウスを作製する。以下の優先順位によりゲノム編集マウスを作製する。

1. 日本人のアレル頻度第 2 位の GJB2 V37I 変異マウス (中等度難聴が予想される)
2. アレル頻度第 3 位の GJB2 G45E/Y135X 変異マウス (中等度～高度難聴が予想される)
3. アレル頻度第 1 位の GJB2 235delC 変異マウス (高度～重度難聴が予想される)
4. 上記の掛け合わせ交配によりヘテロ接合体マウスを作製する。

上記難聴モデルマウスの聴覚機能を聴性脳幹反応 (ABR)、やギャップ結合を指標にした内耳機能解析により評価する。これにより遺伝子治療実験のために現実的な聴力障害レベル、特に中等度難聴を持つマウスを初期目標として選抜する。日本人の GJB2 変異で最も頻度の高い GJB2 235delC のゲノム編集マウス作製のためのデザインと CRISPR/Cas9 による個体作製を進めた。標準系統である C57BL/6N 背景のマウ

ス受精卵にエレクトロポレーション法でゲノム編集を行い、ファウンダー世代(F0)のマウスを取得した。得られたマウスから次世代を産出したところ、生殖細胞系列への伝播が検出され、ヘテロ点変異マウスの樹立が確認された。

「クライオ電子顕微鏡解析による患者 CX26 ギャップ結合の構造解析」

本項目では蝸牛ギャップ結合のクライオ電子顕微鏡解析のために Connexin26 および Connexin30 タンパク質を生成し、ナノディスクの合成を行った。

Connexin26 および Connexin30 の遺伝子コード領域はバキュロウイルス-昆虫細胞系にて発現させるため、バキュロウイルス発現用プラスミドにサブクローニングされた。これらを用いて作製したバキュロウイルスは昆虫細胞 Sf9 に感染させ組換えタンパク質の発現条件を検討した。CX26 についてはタンパク質精製後、ナノディスク再構成を行った。ここで用いたナノディスク再構成は AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業で研究開発された技術を導出したもので、事業間連携による成果である。

Mutation of the Gap Junction Beta 2 gene (GJB2) is the most frequent cause of hereditary deafness worldwide and accounts for up to 50% of non-syndromic sensorineural hearing loss. GJB2 encodes connexin (Cx) 26, a component in cochlear gap junction. We demonstrated that the drastic disruption of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex composed of Cx26 and Cx30 are critical pathogenesis starting before hearing onset (Kamiya, Journal of Clinical Investigation, 2014;124(4):1598–1607). As effective therapeutic tool, Adeno associate virus (AAV) were used for the GJB2 gene transfer and restoration of GJP (Iizuka, Human Molecular Genetics. 2015, 24(13):3651-61). By differentiation of iPS cells, we generated the Cx26-expressing cells with large gap junction plaque as cochlear cells. Furthermore, these cells from CX26-deficient mice recapitulated the drastic disruption of GJPs, the primary pathology of GJB2-related hearing loss (Fukunaga, Stem Cell Reports, 2016, 7(6), 1023–1036). To establish the disease model cells from the patients with GJB2 related hearing loss, we developed human iPS cells from the patients with Japanese and East Asian typical GJB2 mutations, GJB2 V37I, G45E/Y136X and 235delC. By using disease model cells, we established a GJP based drug screening system with high throughput imaging cytometer. For the disease modeling, we developed a novel strategy to differentiate induced pluripotent stem (iPS) cells into functional CX26-GJP-forming cells (Fukunaga, Human Molecular Genetics. 2021 doi: 10.1093/hmg/ddab097. Ahead of print). To establish the disease model cells from the patients, we generated human iPS cells from the patients with Japanese and East Asian typical GJB2 mutations, GJB2 V37I, G45E+Y136X and 235delC. To utilize disease model cells for the drug development, we established a gap junction-based screening system with high throughput imaging cytometer. This screening system will enable us to develop the drugs for GJB2 related hearing loss.