

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) GJB2 変異型難聴における軽度変異型および重度変異型の患者 iPS 細胞を用いた
難聴重症化メカニズムの解明
(英語) Study of GJB2 associated hearing loss with patient iPS cells with mild and
profound phenotype

研究開発実施期間: 令和3年5月26日～令和6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

和文:

遺伝性難聴の50%以上が内耳のギャップ結合を形成する Connexin (CX) 26 遺伝子 (GJB2) の変異を原因とするが、多様な難聴病態を示す同疾患に対する変異型・聴力レベルに応じた各々の分子病態の相違は解明されていない。当グループは GJB2 変異型難聴の発症機構として「ギャップ結合複合体崩壊」という分子病態を解明し、同病態が有効な創薬指標となることを見出した。次いで iPS 細胞から GJB2 変異型難聴の標的となる内耳細胞を作製し、病態を再現する疾患モデル細胞を開発した。また日本人の GJB2 変異型難聴の約8割を占める三大 GJB2 変異型である 235de1C (重度難聴型、国内アレル頻度1位)、V37I (軽度難聴型、国内アレル頻度2位)、G45E-Y136X (中等度/高度難聴型、国内アレル頻度3位) の患者から iPS 細胞を樹立してきた。加えてギャップ結合修復薬のスクリーニング技術を開発し、「ギャップ結合創薬」の基盤技術を構築してきた。本研究ではこれまで当グループが樹立した日本人の三大 GJB2 変異を持つ患者 iPS 細胞を用いた比較病態解析により、各患者に最適な治療戦略を開発するための変異型別の詳細な病態解明を目的とした。以下に主な成果を概説する。

- ・新規の難聴患者 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い、GJB2-235de1C と GJB2-V37I を併せ持つ難聴患者を初めてリクルートすることができた。対象変異患者からの同意を得て採血を行っており、近日中に iPS 細胞が樹立できる予定である。

- ・iPS 由来疾患モデル細胞の製造法の改良

当グループは以前にヒト iPS 細胞から内耳支持細胞の性質を持つ CX26 ギャップ結合構築細胞 (iCX26GJC) の分化誘導法を開発している (Fukunaga et al. *Hum Mol Genet*, 2021)。この手法では細胞間にびまん性のギャップ結合が形成される。本研究では誘導法にさらに改良を加え、CX26 と CX30 が共に凝集した、より実際の内耳細胞に近いギャップ結合プラークを再現することに成功した。これによりギャップ結合プラークのサイズや形態の詳細な比較が可能となった。またスフェロイド作製法の改良により内耳支持細胞の簡便な大量培養法を確立した。これはスクリーニングや生化学的解析など大量の疾患モデル細胞を要する研究に大いに貢献することが期待される。

- ・ギャップ結合プラークの形状比較解析

改良した分化誘導法により製造した健常者および難聴患者由来の内耳支持細胞についてギャップ結合プラークを観察した結果、V37I (軽度難聴型) では健常者に比べてギャップ結合プラークのサイズが縮小するのに対し、235de1C (重度難聴型) ではギャップ結合プラークが全く形成されないことを確認し、難聴の重症度に応じた分子病態の違いを明らかにした。

- ・重度難聴型モデル細胞におけるギャップ結合の遺伝子治療

上記の研究より 235de1C ではギャップ結合プラークが全く形成されないことが重度の難聴を引き起こしていると考えられた。そこで当グループが内耳遺伝子治療用に開発した改変型アデノ随伴ウイルス (特許出願済み) を用いて 235de1C 疾患モデル細胞に正常 GJB2 遺伝子を導入したところ、凝集型のギャップ結合プラークが形成され、GJB2 変異型難聴に対する遺伝子治療の有用性を示すことに成功した。

- ・ギャップ結合プラークの物質透過機能の比較解析

内耳におけるギャップ結合の主な役割はカリウムイオンなどの物質輸送とされる。そこで疾患モデル細胞におけるギャップ結合の物質透過機能を dye transfer assay により評価した。健常者および G45E-Y136X ヘテロ保因者 (正常聴力) と比べ、G45E-Y136X ホモ患者 (中等度/高度難聴型) では中程度、235de1C (重度難聴型) では高度に物質透過性が低下しており、重症度と一致した物質透過機能の機能不全が確認された。すなわち本疾患モデル細胞は機能的にも各変異型の病態を再現しており、医薬品開発のモデル細胞としての有用性が示された。

- ・難聴変異による CX26 の疎水性変化

当グループは以前の AMED 事業において、聴力が低下した老齢マウスの内耳でギャップ結合の崩壊および CX26 のタンパク質疎水化が起きていることを発見した (Tajima, *Experimental & Molecular Medicine*, 2020)。本研究では GJB2 変異が CX26 の疎水性に与える影響について調べた。トランスジェニック細胞 (HeLa-CX26) と LLPS (液-液相分離) 法を用い、重度難聴の原因となる GJB2 の優性阻害変異 (R75W) により CX26 が親水性から疎水性へとシフトすることを発見した。老齢マウスの内耳で見られたのと同様の生化学的変化であり、GJB2 変異がギャップ結合の異常を引き起こす分子メカニズム解明の手がかりとなる知見である。

・疾患モデル細胞の発現プロファイリング

遺伝子レベルでの異常を解明するために疾患モデル細胞の RNA-seq 解析を行い、235delC（重度難聴型）における発現変動遺伝子を同定した。一方、発現プロファイルから内耳以外の細胞も多数含まれることが示唆され、本細胞に対してはバルクでの解析に限度があることが明らかとなった。そこで健常者および重度難聴患者由来のモデル細胞に対し single cell RNA-seq 解析を行った。クラスタリングにより内耳支持細胞と考えられるクラスターが同定された。そこでクラスターごとに発現プロファイルを比較し、重度難聴における複数の発現変動遺伝子を同定した。本解析によりバルクでの RNA-seq では解析困難だった GJB2 変異型難聴における遺伝子発現レベルの変化を明らかにすることができた。

・疾患モデル細胞ギャップ結合の電気生理学的解析

電気生理学的解析によりギャップ結合細胞間コミュニケーション機能をパッチクランプ法により評価した。本モデル細胞での解析例は過去になく、通常の培養細胞に対する手法では測定できなかった。そこで酵素解離と再播種、シール形成の条件を工夫し、測定手法を新たに確立した。同手法を用いて健常者と難聴患者の比較を行い、235delC（重度難聴型）において電気的活動が有意に低下していることを明らかにした。また疾患モデル細胞における電気生理学的な変化をより詳細に調べるために、微小電極アレイ（MEA）による解析を行った。iPS 細胞から分化誘導した内耳支持細胞を MEA プレートに播種し、培地および各種阻害剤の存在下で電気的活動を測定した。健常者由来の分化細胞においてギャップ結合由来の電気的活動を検出することに成功し、測定条件を確立した。

以上のように、本研究では GJB2 変異型難聴患者から樹立した疾患 iPS 細胞を活用することで、国内の 8 割を占める典型的変異型について比較解析を行い、各変異型の特徴や差異を明らかにした。これにより GJB2 変異型難聴の各変異型に最適化した創薬スクリーニングが可能となり、世界初となる GJB2 変異型難聴の治療薬開発に向け大きく進展した。GJB2 変異型難聴は世界最大の遺伝性難聴型であり国内にも 3 万人の患者がいると推定されるが、現時点で治療法は存在せず、治療薬の社会的ニーズは大きい。

難聴治療薬の開発は近年加速しており、最近では OTOF 遺伝子の遺伝子治療による遺伝性難聴の治療成功例が相次いで報告されている。しかし医薬品による難聴の治療はいまだに達成されていない。内耳への遺伝子治療は手術が必要であるのに対し、中分子・低分子の医薬品は経口投与や注射による鼓室内投与が可能であり、侵襲性が低いというメリットがある。また多くの企業は OTOF 遺伝性難聴を含む内耳有毛細胞の疾患を第一の標的としており、当グループの様に内耳支持細胞を主な標的とする企業や研究グループはいまだ存在しない。当グループは GJB2 変異型難聴の治療薬開発と実用化に向け世界をリードしており、本研究成果によりそのリードをさらに広げることができたと考えている。

英文：

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 have demonstrated that the degradation of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex composed of CX26 and CX30 are critical pathogenesis starting at the embryonic days (Kamiya, *J Clin Invest*, 124(4):1598–1607, 2014). For the disease modeling, we developed a strategy to differentiate induced pluripotent stem (iPS) cells into functional CX26-GJP-forming cells that exhibit physiological properties typical of the developing cochlea (Fukunaga, *Hum Mol Genet*, 30(15):1429–1442, 2021). 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. These patients normally show mild, moderate/severe and profound hearing loss respectively. In this study, we performed the comparative analysis among these typical mutations and

elucidate the mechanism of aggravation in hearing loss in order to develop the optimal treatment strategy for each patient. First, we improved the method for differentiation of iPS cells into CX26-GJP-forming cells. Cells prepared by the new method had condensed GJP at the cell-cell boundaries, which reproduced well the cochlear supporting cells, allowing a detailed comparative analysis of GJP. We used the new method to observe GJP in disease model cells derived from V37I and 235delC patients and revealed differences in molecular pathogenesis according to the severity of hearing loss. We showed that GJP in 235delC cells could be recovered by adeno-associated virus-mediated delivery of the normal *GJB2* gene, indicating efficacy of gene therapy for GJB2-related hearing loss. Gap junction intercellular communication (GJIC) in the disease model cells was evaluated by dye transfer assay. It showed that GJIC was reduced in proportion to the severity of hearing loss. Reduction of GJIC in 235delC cells was further confirmed by patch clamp electrophysiology. To understand the underlying mechanism, we performed bulk and single-cell RNA-seq and found several differentially expressed genes in 235delC cells.

By utilizing disease iPS cells established from patients with GJB2-related hearing loss, this study clarified the characteristics and differences of each mutation type. This enabled drug screening optimized for each *GJB2* mutation type and made significant progress towards the development of the world's first therapeutic drug for *GJB2*-related hearing loss.