成熟したマウス有毛細胞へアデノ随伴ウイルスを単独及び複数投与した際の遺伝子導入効率について

○大道亮太郎¹⁾²⁾, 吉村豪兼²⁾³⁾, 前田幸英¹⁾, 假谷 伸¹⁾

1) 岡山大学病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科,

2) Molecular Otolaryngology and Renal Research Laboratories, the University of Iowa, USA,

3) 信州大学 耳鼻咽喉科

【目的】

近年、単一遺伝子変異による疾患に対して、アデノ随伴ウイルス（以下 AAV）を用いた遺伝子治療は非常に有望な治療法の 1 つとして注目されている¹⁾。内耳への遺伝子治療の課題のひとつが標的細胞に対する導入遺伝子の運搬方法である。我々は単独投与時及び dual vector strategy（以下 Dual）を使用した際の AAV の蝸牛内の発現効率を調べた。Dual 法とは、比較的サイズの大きい遺伝子を導入する際に、2 つのベクターに分割する方法である。サイズの大きな遺伝子を内耳に導入する方法として、臨床応用にむけて有用と考えられる。

【方法】

AAV1、AAV2、AAV8、AAV9 および AAV Anc80（以下 Anc80）を使用した。濃度は $3.75\text{--}3.80 \times 10^{12}$ GC/mL に揃えた。4 週齢の C3H/FeJ マウスに全身麻酔下に Yoshimura の開発した新規注射法を利用して、AAV を蝸牛内に単独及び Dual で $1.0\mu\text{L}$ 投与した²⁾。術後 2 週間目に聴性脳幹反応で術後耳、非術後耳の聴力を評価後、側頭骨を採取し、whole mount immunohistochemistry を行った。蝸牛頂から 3 領域に分けて、各々の導入効率や有毛細胞生存数を測定し統計学的検討を行った。

【結果】

単独投与時に内毛細胞への良好な感染効率を示したのは、AAV2（96.7%）と Anc80（99.5%）であった。また AAV8 と AAV9 も比較的良好な感染効率を示したが、AAV1 は不良であった。外毛細胞では、AAV2 が良好な感染効率を示した（83.9%）。Anc80 はある程度感染したが（43%）、AAV1、AAV8、AAV9 はほとんど感染しなかった（<5%）。AAV1、AAV2、AAV9、Anc80 の群では聴力低下を認めなかった。AAV8、Anc80 で細胞生存数の有意な減少を認めた。Dual では、AAV2 同士、AAV2 と AAV9、AAV9 同士を検討した。AAV2 同士では内毛細胞（96.9%）と外毛細胞（65.6%）ともに良好な同時感染を示し、明らかな聴力障害・細胞毒性も認めなかった。一方で AAV2 と AAV9、AAV9 同士では有意に感染効率は低下した。

【結論】

AAV2 は single および dual の両方で非常に有望なベクターであると考えられた。

【文献】

1) Omichi R, Shibata SB, Morton CC, et al: Gene therapy for hearing loss. Human molecular genetics 2019; 28: R65–R79.

2) Yoshimura H, Shibata SB, Ranum PT, et al: Enhanced viral-mediated cochlear gene delivery in adult mice by combining canal fenestration with round window membrane inoculation. Scientific reports 2018; 8: 2980.

蝸牛感覚上皮への遺伝子導入

外有毛細胞

内有毛細胞

AAVベクタータイプ2をRWM+CF法（本文参照）で投与し、蛍光遺伝子を導入した。90%以上の効率で有毛細胞への導入がえられた。