

유전성 난청의 진단과 치료

인제대학교 의과대학 일산백병원 이비인후과,¹ 연세대학교 의과대학 이비인후과²
나지나¹ · 정진세²

Diagnosis and Intervention of Genetic Hearing Loss

Gina Na¹, MD and Jinsei Jung, MD, PhD²

¹Department of Otorhinolaryngology, Ilsan Paik Hospital, Inje University College of Medicine, Goyang, Korea; and ²Department of Otorhinolaryngology, Graduate School of Medical Science, Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

– ABSTRACT –

Sensorineural hearing loss (SNHL) is the most common sensory disorder in humans. A wide range of genetic and environmental factors that can cause congenital or late-onset, stable or progressive, age-related, drug-related, noise-causing, post-infection, or traumatic hearing loss leads to the SNHL. More and more comprehensive genetic studies have recently been published in patients with hearing loss in the era of target genome and massively parallel sequencing. Although rehabilitation options, to date, typically have focused on amplification with wearables or implantable devices, intriguing new gene therapy-based strategies to restore and prevent SNHL are actively being investigated using an animal model. Correcting or preventing an underlying genetic cause of hearing loss is ready to become a reality. In this article, several methods for diagnosis and treatment strategies for hereditary hearing loss in progress to date are introduced. (J Clinical Otolaryngol 2021;32:5-19)

KEY WORDS: Genetic hearing loss · Next generation sequencing · Precision medicine · Gene therapy · Gene editing.

서 론

난청은 인간에게 가장 많이 발생하는 감각기관의 장애로 미국과 유럽에서 약 500명의 신생아당 1명에서 발생하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 2021년 현재 세계적으로 15억명의 인구가 난청을 겪고 있고, 이중 약 4억 3천만명은 청각 재활이 필요하며, 2050년에는 7억명까지 증가하여 10명중 1명이 청각 재활을 요할 것으로 추산된다.²⁾ 난청의 원인에는 소음, 이독성 약물, 바이러스나 세균 감염 등의 환경적 요소와 선천적 또는 후천적으로 발현되는 유전적 요소가 있다.

유전성 난청은 일반적으로 증후군성 또는 비증후군성으로 발현되는 단일 유전자 변이에 발생하는 경우가 많고, 멘델리안(Mendelian) 유전법칙을 따르지만 유전과 환경의 영향을 모두 받아 복합적으로 발현되기도 한다. 2021년 현재 비증후군성 난청을 유발하는 유전자는 123개, 그중 상염색체 우성이 51개, 상염색체 열성이 77개, x-염색체 연관이 5개가 발견되었다.³⁾ 난청을 동반하는 증후군은 매우 다양하며, Alport Syndrome, Branchio-Oto-Renal Syndrome, CHARGE Syndrome, Jervell & Lange-Nielsen Syndrome, Norrie Disease, Pendred Syndrome, Perrault Syndrome, Stickler

논문접수일: 2021년 3월 23일 / 논문수정일: 2021년 5월 26일 / 심사완료일: 2021년 6월 4일
교신저자: 정진세, 03722 서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화: (02) 2228-3622 · 전송: (02) 393-0580 · E-mail: jsjung@yuhs.ac

Syndrome, Treacher Collins Syndrome, Usher Syndrome, Waardenburg Syndrome 등이 있다. 소아의 유전성 난청 중 약 30%는 증후군성 난청, 70%는 비증후군성 난청으로 보고되고 있다.⁴⁾

한편, 2003년 인간 유전체 사업(human genome project)으로 약 30억개 염기 서열의 인간 유전체 지도가 완성되고, 2000년대 후반 이후 대용량 염기서열 분석 기술(massive parallel sequencing)이 획기적으로 발전함에 따라 유전성 난청에 대한 연구도 활발히 가속화되고 있다. 이전에는 원인 유전자를 찾기 위해 난청 가계를 이용하여 유전체에서 위치를 확인하고, 그 주변에서 유전자를 찾는 방법(linkage analysis)을 주로 사용했으나, 이제 유전자의 염기서열을 바로 분석하여 원인 유전자를 찾아내게 되었고, 정밀의료(precision medicine)의 시대가 도래했으며, 더 나아가 유전자 치료의 시대를 목전에 두고 있다. 본 종설에서는 유전성 난청의 진단의 기술과 새롭게 떠오르는 치법에 대해 기술하고자 한다.

본 론

유전성 난청의 진단

Sanger Sequencing

1975년 Sanger 박사는 최초로 DNA 서열화 방법을 소개한 이후 2번째 노벨상을 수상하는데, 이후 40여년이 지난 현재에도 Sanger sequencing은 가장 널리 사용되는 방법 중 하나이다.⁵⁾ 현재까지 DNA 서열화의 정확도가 가장 높은 방법이며, 매우 높은 민감도와 특이도를 가진다. Sanger sequencing으로 염기서열을 결정하기 위해서는 재조합 플라스미드가 주형가닥으로 필요한데, 분석할 DNA를 벡터에 재조합 및 클로닝한 다음 단일가닥으로 분리하고 프라이머를 붙여 혼성화시킨 뒤, 네가지 다른 색의 형광표지를 갖는 디옥시뉴클레오티드 삼인산(dNTPs) 및 2디옥시뉴클레오티드 삼인산(ddNTPs)을 중합시켜 분석할 DNA의 상보가닥을 합성하고, 전기영동하여 뉴클레오티드 길이에 따라 합성된 사슬의 3' 말단에서 한 개 단위로 형광표지의 색을 읽어 DNA 염기서열을 결정한다. 현재 이 방법을 통해 하루에 200만 개의 염기를 읽을 수 있다.

난청에 관련된 유전자의 수가 많고 크기가 크기 때문에 모든 후보유전자를 Sanger sequencing으로 읽는 것은 매우 비효율적이다. 하지만 임상적 표현형이 특징적으로 나타나 후보유전자를 한정할 수 있고, 특정 변이가 호발하는 경우에는 Sanger sequencing이 진가를 발휘한다. 예를 들면 청신경병증이 있는 언어발달전기(prelingual), 고심도 난청의 경우 *OTOF* 유전자의 변이,⁶⁾ 전정기능저하를 동반하며 진행성, 늦게 발현된 난청의 경우 *COCH* 변이,⁷⁾ 와우의 형태 이상(incomplete partition)을 동반하며, x-염색체 연관 유전형태를 보일 때 *POU3F4* 변이⁸⁾ 등이 유전형과 표현형의 특징적인 연관성이 보고되고 있고, 특정 인종에서 호발하는 변이(Hotspot mutation)가 있는 경우 그 부위만 시퀀싱을 해보면 된다. 또한 그람 음성 패혈증, 녹농균 집락화(pseudomonas colonization), 다재 내성 결핵에 쓰이는 aminoglycoside에 노출된 이후 진행되는 난청과 모계 유전의 가족력이 있다면 m.1555A>G 스크리닝이 필요하다.^{9,10)} 뿐만 아니라 난청의 표현형이 전형적이지 않더라도 매우 높은 유병율을 보이는 유전자 변이의 경우에도 Sanger sequencing이 도움이 될 수 있는데, 예를 들면 *GJB2* 변이는 세계적으로 가장 높은 빈도의 유전성 난청 원인 유전자로 약 50%의 상염색체 열성 난청의 원인이 된다.¹¹⁾ 상염색체 열성 난청의 원인으로 두번째로 빈번한 *SLC26A4* 변이는 증후군성 또는 비증후군성으로 나타날 수 있으며, 전정도수관 확장을 동반하고 갑상선 goiter가 있는 경우 확인이 필요하다.¹²⁾

차세대 염기서열 분석(Next-Generation Sequencing, NGS)

차세대 염기 서열 분석은 전유전체 산탄 전략(whole genome shotgun strategy)에 일련하여 분석하려는 DNA를 재조합 및 클로닝하지 않고, DNA를 무작위로 잘라 5'과 3' 양끝에 공통 어댑터를 붙인 다음 고히 표면에 한쪽의 어댑터를 결합시킨 뒤 DNA 조각마다 동시에 연속적인 증폭을 통해 서열을 읽을 수 있는 클러스터를 만든다. 여기에 reversible dye terminator를 사용한 중합반응을 일으켜 클러스터마다 나타나는 형광표지를 읽은 뒤, 다시 reversible terminator를 조작하면 다음 염기가 결합할 수 있게 되어 연속적인 염기 서열 정보를 확인할 수 있게 된다. 즉, 차세대 염기서열 분석을

통해 매우 많은 DNA 조각을 동시에 한가지 반응만으로 빠르게 읽을 수 있게 되었다. NGS의 종류에는 읽는 서열의 범주에 따라 전 유전체 서열 분석(whole genome sequencing, WGS), 전 엑솜 서열 분석(whole exome sequencing, WES), 타겟 유전자 패널 분석(targeted gene panel, TGP)이 있다. WES는 단백질을 코딩하는 엑손 서열을 분석하는 방법으로 엑손은 전 유전체 중 1.5%를 차지 하지만, 질환을 유발하는 유전자 변이의 85%는 엑손에 존재하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ WGS는 exon 외에도 intron을 포함한 non-coding 부위를 모두 읽을 수 있으나, 결과가 매우 복잡하고 분석이 어려우며 비용 소모가 크다. TGP는 제조사에서 선별한 일부 유전자만을 분석하는 방법인데, 읽어야 하는 염기서열의 양이 줄어들어 만큼 빠르고 상대적으로 낮은 비용으로 분석할 수 있고, coverage depth가 상대적으로 높으나 패널에 포함되지 않은 유전자의 변이는 탐지가 불가능하므로 새로운 난청 유전자가 발견됨에 따라 지속적인 업데이트가 필요하다. 세계적으로 널리 쓰이는 TGP 중 하나인 OtoSCOPE[®](University of Iowa Hospitals and Clinics, Iowa, USA)를 통해 1,119명의 유전성 난청 환자에서 39%의 진단율이 보고되었는데,¹⁴⁾ 이 연구에는 66개 유전자를 분석하는 OtoSCOPE[®] v4 및 89개 유전자를 분석하는 OtoSCOPE[®] v5가 사용되었다. 가장 최근 버전의 OtoSCOPE[®] v9 패널은 224개의 유전자를 분석할 수 있다.¹⁵⁾ 그밖에도 167개의 유전자를 분석하는 Otogenetics Deafness Gene Panel(Otogenetics, USA)¹⁶⁾, copy number variant를 포함하여 226개 유전자를 분석할 수 있는 CGC genetics 사의 패널¹⁷⁾ 등이 상용화되어 쓰이고 있다. 국내에서는 2017년부터 *GJB2*, *POU3F4*, *SLC26A4*, *TECTA* 4개의 유전자를 포함한 TGP가 1회 급여 수가가 인정되어 본인부담률이 50% 감면되고 있고, 2021년 3월 현재 전국 63개 의료기관에서 실시 승인을 받았다. 실제로 여러 기관마다 다양한 deafness gene panel을 구성해서 유전성 난청 진단 목적으로 활용하여 검사를 시행하고 있다.¹⁸⁾

Chip-Based DNA Sequencing

NGS를 통해 유전체의 서열을 읽고 밝혀지지 않은 변이 유전자를 파악할 수 있는 반면, 고비용, 복잡한 실험

과정, 데이터 해석의 어려움의 문제가 있다면, chip을 이용한 kit를 통해 대량의 유전자의 발현을 동시에 측정할 수 있다. 대표적으로 microarray 기법은 유리 슬라이드 같은 곳에 얹고 있는 유전자의 염기서열을 가진 DNA 조각을 올려 제작한 chip에 형광으로 표지된 cDNA를 결합시켜 형광의 강도로 유전자 발현의 정도를 측정하는데, 서로 다른 형광을 표시하면 두 그룹간 유전자 발현의 차이를 비교할 수도 있다. NGS에 비해 DNA sample을 준비하거나 데이터를 분석하는 것이 수월한 편으로 분석 속도가 빠르고, 비용 소모도 적으며, 샘플이 많을 때 유용한 기술이다.¹⁹⁾ 다른 서열 분석 기법들에 비교하여 탐지할 수 있는 범위가 매우 제한적이나 특정 인구집단에서 흔하게 나타나는 변이를 확인할 때 효용성이 높다. 예를 들면 서유럽에서 유전성 난청 환자 중 *GJB2* 변이로 인한 경우 c.35delG variant가 75%를 차지하고, 영국에서는 *SLC26A4*의 경우 c.707T>C(p.Leu236Pro)와 c.1246A>C(p.Thr417Pro)가 각각 23.1%, 12.8%를 차지하는 것으로 보고되었다.²⁰⁾ 국내에서는 상염색체 열성 비증후군성 난청의 원인 유전자로 *GJB2* 변이가 서양인보다는 적지만 8.2~11.5%로 빈번하며, 이 중 c.235delC가 50%를 차지하는 원인 변이였다. 우리나라를 포함한 동남아시아 국가에서는 특징적으로 *SLC26A4* 변이가 많이 보고되고 있으며, *GJB2* 변이와 비슷하거나 조금 적은 수준으로 알려져 있다.²¹⁻²³⁾ 보고에 따라 다양하지만 *SLC26A4* 변이는 c.2168A>G(p.His723Arg)이 약 40%, splicing variant 인 c.919-2A>G가 약 20%를 차지하고 있으며, 중국과 달리 우리나라와 일본에서는 오히려 p.His723Arg이 더 많이 발견되고 있다.²¹⁻²⁹⁾ 이러한 지역적, 인종적, 유전적 특성을 고려하여 국내에서도 다양한 Chip-based kit가 출시되었다. 2009년 allele-specific primer extension (ASPE)를 이용한 microarray 기법으로 3개 유전자 (*GJB2*, *SLC26A4*, *MTRNR1*)의 7개 변이를 검출,³⁰⁾ 2013년 multiplex SNaPshot minisequencing 반응을 이용하여 3개 유전자(*GJB2*, *SLC26A4*, *MTRNR1*)의 7개 변이를 검출하는 키트가 특허를 획득하였다.³¹⁾ 2016년 개발된 U-TOP[™]HL Genotyping Kit ver1(SeaSun Biomaterials, Daejeon, Korea)는 real time PCR 기반 melting array 기법으로

5개 유전자(*GJB2*, *SLC26A4*, *MTRNR1*, *TMPRSS3*, *CDH23*) 내 11가지 변이를 탐지할 수 있고,³²⁾ 이어서 2020년 ver2에서 추가적인 5개 유전자(*OTOF*, *COCH*, *ATP1A3*, *MPZL2*, *TMC1*) 11개 변이를 탐지하는 키트가 식약처 허가를 통과하였다.³³⁾ 현재 ver1과 ver2는 건강보험 급여 수가를 인정받았으며(고시 제2020-194호), 기준은 다음과 같다: 가) 선천성 난청이 확진된 경우, 나) 중이가 정상이지만 난청이 확진된 유소아, 다) 난청을 동반하는 증후군 환자, 라) CT, MRI에서 내이 기형이 확진된 경우, 마) 원인불명의 진행성 난청 환자, 바) 가족 중 유전성 난청이 확인된 환자가 있으며, 동일 질환이 의심되어 실시한 경우. 일본의 경우 13개 유전자의 46개 변이를 탐지할 수 있는 Invader assay가 2012년부터 건강보험이 적용되고 있고, 2015년부터는 target gene의 massively parallel DNA sequencing을 병용하여 19개 유전자의 154 변이로 확장되어 시행되고 있다.³⁴⁾ 중국의 microarray 기법을 이용한 DNA fluidic array인 CapitalBio-Miami-Oto-Array(CapitalBio Corporation, Beijing, China)는 5개 유전자(*GJB2*, *SLC26A4*, *GJB3*, *MTRNR1*, *MTTS*) 9개 변이를 약 4시간에 \$30 미만의 비용으로 검출할 수 있다.¹⁹⁾

유전성 난청의 치료

유전자 치료 (Gene Therapy)

유전자 치료 모델

유전자 치료 모델을 선택하는데 있어 난청을 일으키는 유전 형태, 즉 변이로 영향을 받은 단백질의 기능 변화의 본질을 고려할 필요가 있다. 상염색체 열성 유전 형질의 경우 대부분 영향을 받은 단백질의 기능을 부분적으로 또는 완전히 잃게 되는 기능 손실(loss of function) 변이가 발생한다. 이는 유전자 변형으로 일부 또는 전체가 제거되거나, 유전자의 발현이 저하되거나, 전사된 단백질의 구조를 변경시켜 그 기능을 바꾸게 된다. 반면 상염색체 우성 유전형질의 결과는 기능 손실과 기능 획득(gain of function)이 모두 가능하다. 영향을 받은 allele은 단백질의 활성을 증가시키기도 하고, 새로운 기능을 제공하기도 하며, 부적절한 시기나 위치에서 발

현을 야기하지만, 일부 유전자의 우성 변이는 기능 손실(loss of function)을 일으키기도 한다. 예를 들면 정상적인 기능을 위해 두 allele에서 만든 단백질이 모두 필요한 경우, 한 개의 wild type allele에서 만든 단백질만으로는 기능이 부족하여 충분한 유전 산물이 생성되지 않아 변이 형질을 일으킨다. 이런 경우를 haploinsufficiency라고 한다. 또, 우성 형질의 변이 allele이 단백질의 구조를 변형시켜 다른 wild type allele에서 만든 단백질의 기능을 방해하는 경우가 있는데, 이를 dominant negative라고 하고, 마치 loss of function 변이에서의 표현형과 유사한 형태로 발현된다. *KCNQ4* 유전자의 변이에 의해 potassium 이온 채널의 기능 저하가 대표적인 예이다.³⁵⁻³⁸⁾

유전자 대체 (Gene Replacement)

가장 전통적인 유전질환의 치료법으로서 loss-of-function 질환에서의 유전자 발현을 증가시켜 기능을 회복하는 방법이다. 기능을 손실한 유전자 변이의 경우, 수정시켜 정상적으로 작동하도록 만든 cDNA를 표적 세포에 전달하여 변이 유전자를 대체할 수 있다. 이는 열성 유전으로 인한 loss of function 변이 형질을 나타내는 경우에 적합하다. 수정 유전자를 전달하는 시기도 중요한데, 만약 태아의 발달과정에서 중요한 역할을 하는 유전자라면 정상 청각 경로의 발달에 회복 불가능한 지장을 일으킬 수도 있다. 즉, 유전자 대체가 성공적으로 이루어지기 위해서는 변이가 발현될 때까지의 시간적 여유가 필요하고, 특히 성인기에 난청의 진행이 시작된다면 주입된 유전자는 대상자의 일생에 가까운 시간 동안 발현이 유지되어야 한다. 이를 위해서 여러 번에 걸쳐 치료 유전자를 주입하는 방법을 고려해 볼 수도 있다. 우성 유전 형질을 보이는 변이의 경우에는 유전자 대체보다는 다른 접근법을 고려해야 하겠다. 현재까지 유전자 대체를 통해 동물모델에서 난청의 회복을 증명하는 다양한 보고들이 있었고, 현재 전임상 및 임상 초기 단계에서 *OTOF* 등의 유전자에 대한 유전자 치료법 개발이 연구 중에 있다.³⁹⁾

유전자 침묵(Gene Silencing)

유전자 침묵은 변이 유전자의 발현을 차단하기 위한

접근법으로 이형 접합 우성형질 변이에 적용할 수 있다. 즉, 변이 allele의 발현을 차단하여 wild type allele의 발현을 방해하지 않는 것만으로도 변이 형질이 나타나는 것을 극복할 수 있게 되는 것이다. 유전자 침묵은 genome, 전사, 전사 후 단계에 모두 적용할 수 있다. 전사 단계에서는 히스톤 단백질의 변형을 유도하거나, RNA polymerase 나 transcription factor 같은 전사 복합체와의 결합을 억제시켜 mRNA가 전사되지 않도록 한다. 이를 위해 유전자 가위로 잘 알려진 CRISPR/Cas9 나⁴⁰⁻⁴²⁾ zinc finger 등을 이용해 epigenetic modification을 일으킬 수 있다.^{15,16)} RNA 가공 과정인 전사후 단계에서 나타나는 RNA interference(RNAi)를 활용하여 유전자 발현을 차단시켜 침묵을 일으킬 수 있다.¹⁷⁾ RNAi는 noncoding RNA가 표적 mRNA를 분해하고 단백질 합성을 저해하여 유전자 발현을 조절하는 정상적인 생물학적 과정인데, 이는 mRNA에 상보적인 두 종류의 작은 RNA인 microRNA(miRNA)와 small interfering RNA(siRNA)를 통해 이루어진다. miRNA와 siRNA가 표적 mRNA를 조절하는 방식은 매우 유사하지만, 기원이 다르다는 차이가 있다. miRNA가 긴 단일가닥 RNA로부터 기원하는 반면, siRNA는 외부유래 바이러스나 내부 유래 DNA로부터 두 가닥의 RNA(ds-RNA)로부터 기원한다. 둘 다 결국 RNA induced silencing complex(RISC)라고 하는 리보단백질 복합체를 구성하여 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 분해하거나 번역을 저해시킨다. RNAi는 진핵세포내에 정상적으로 존재하는 표적 특이적인 반응으로, wild type이나 off target sequence에 영향을 주지 않고 선택적으로 dominant 변이 서열을 조작할 수 있다.^{43,44)} 유전성 난청에서는 anti-sense oligonucleotide(ASO)에 의한 돌연변이 유전자 침묵을 이용한 난청 개선 효과가 어서중후군 동물모델에서 여러 차례 증명된 바 있다.^{45,46)}

유전자 편집(Gene Editing)

유전자 편집 기술이 발달하면서 내이 안에서 직접 정확하게 유전체를 조작하는 연구법이 부상하고 있다.⁴⁷⁾ 이는 Nuclease에 기반한 효소를 조작하여 단일 또는 이중가닥의 DNA가 표적 유전체에 찾아가 도입된 다음 세포내에 내재되어 있는 DNA 복구를 일으키는 방

식이다. 세포내에서 DNA 복구는 비상동성 말단연결(nonhomologous end-joining, NHEJ)과 homology-directed repair(HDR) 두가지 방식으로 이루어진다. NHEJ는 비특이적이고 무작위로 small indel의 손상을 복구시켜 frameshift나 premature stop sequence, 단백질의 truncation을 일으킬 수 있다. 반면, HDR은 내부 혹은 외부에서 유래한 주형(template)에 따라 특정한 DNA 손상부위를 복구한다. 이를 이용해 고유한 유전자 서열을 정확하게 조작할 수 있고, 심지어 DNA를 부수지 않고도 직접적인 변성(mutagenesis)을 일으킬 수 있다.⁴⁸⁾ 유전자 편집을 위해서는 Zinc finger, TALENs, meganucleases, CRISPR/Cas9 등이 이용된다.⁴⁹⁻⁵²⁾ 2012년 세균의 적응면역에 관여하는 CRISPR/Cas9가 유전자 가위로 발표된 이후, Zinc finger, TALENs, meganucleases 등의 기존 단백질질을 이용한 기술보다 획기적으로 간편하고, 표적 서열을 찾는데 필요한 guided RNA(gRNA)가 20 bp로 매우 작아 손쉽게 유전자 조작이 가능해졌다. 또한 CRISPR/Cas9는 하나의 세포에 동시에 여러 개의 유전자를 공략하기 위해 여러 개의 gRNA를 전달시켜 다중화(multiplexing)할 수도 있다.⁵³⁾ 이러한 공로를 인정받아 2020년에는 연구자들이 노벨화학상을 수상하기도 하였다. Cas nuclease가 표적 부위에 찾아가기 위해서는 절단부위에서 3~4 bp 아래쪽 표적주형의 반대가닥에 존재하는 짧은 protospacer adjacent motif(PAM)이 필요한데, PAM 특이성을 수정한 CRISPR nuclease의 발전에 힘입어 off target activity를 감소시키며 유전자 조작이 더욱 정확해지고 있다.^{54,55)} 최근에는 David Liu 등에 의해 특정 핵산을 치환할 수 있는 유전자 가위, 즉 base editor 및 prime editor 등이 개발되어 유전질환의 새로운 치료법을 제시하고 있다.⁵⁶⁾

벡터(Vectors)

생체 내 조직으로 유전물질을 전달하기 위해 다양한 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터가 개발되었다. 대부분의 바이러스 벡터는 복제기능이 없고, 질병이 유발되지 않으며, 캡시드 내에 치료를 위한 DNA를 탑재하기 위해 고유한 유전체의 일부가 삭제된다. 모든 바이러스 벡터는 유전물질의 전달 능력과 발현 유지 기간에 한

계가 있으므로 전달 벡터의 선택은 유전자 치료 결과에 영향을 미치게 된다. 하지만 벡터의 종류 자체보다는 치료의 질적인 요소가 결과에는 더욱 중요하다.

Lentivirus 벡터(LV)는 Retroviridae 계열로 human immune deficiency virus type 1이나 feline immunodeficiency virus를 기반으로 한다. 최대 8 kb의 외부 DNA를 수용할 수 있을만큼 적재력이 뛰어나고, 분열하거나 분열하지 않는 세포 모두에 효율적으로 유전물질을 전달할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 LV는 코르티관 내 유모세포에 대한 표적능력이 다소 부족한 것으로 여겨지는데, *in vivo* 실험에서 발달 중인 otocyst에 LV를 주입하였을 때 외유모세포와 지지세포에서 약한 유전체 전달이 관찰되었고, 내유모세포에서는 발현이 검출되지 않았으며,⁵⁷⁾ 성인 기니피그의 와우내로 LV를 관류시켰을 때에도 외림프공간에 제한적으로 발현되었으며,⁵⁸⁾ 정원창을 통해 주입시에도 유사한 결과를 보이는 한편,⁵⁹⁾ 청력을 손상시키는 cochleostomy 후 내림프에 주입시야 stria vascularis, 코르티관, 나선신경절에 발현이 유도 되었다.⁶⁰⁾

Adenovirus(AdV)는 Adenoviridae 계열이며, 36 kb의 이중가닥 DNA를 포함한다. 분열하거나 분열하지 않는 세포를 포함하여 다양한 종류의 세포를 감염시킬 수 있고, 높은 강도로 장기간 도입 형질을 발현시킬 수 있어 유망한 벡터로 손꼽힌다.⁶¹⁾ 또한 AdV 고유 유전자를 삭제하여 최대 36 kb까지 유전물질을 적재할 수 있고, 면역반응을 현저히 낮춰 유전자 발현을 더욱 연장시킬 수 있다.⁶²⁾ 내이 세포에서 AdV에 대한 감수성은 coxsackievirus, adenovirus receptor와 $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrin의 co-receptors 존재 여부에 따라 결정되며,⁶³⁾ 외림프 또는 내림프 공간에 AdV 관류시 공간내의 세포에서 발현이 된다.⁶⁴⁾ 인간의 전정 상피세포 배양 조직에서도 1세대와 2세대 AdV type 5는 유모세포와 지지세포 모두를 효율적으로 표적화 하였고,⁶⁵⁾ lateral epithelial ridge에 Math1(Atoh1) 전사인자 전달을 성공,⁶⁶⁾ 내유모세포에서 heat shock protein 70의 과발현을 유도하는 데에도 성공적인 결과를 보이는 등⁶⁷⁾ 인간 내이세포를 표적으로 한 유전자 치료에 한걸음 가까이 다가가는데 큰 역할을 하였다.

Adeno-associated virus(AAV)는 Parvoviridae

family에 속하며, 복제가 불가능한 작은 adenovirus-dependent virus로 유전자 전달을 위한 바이러스성 벡터로 큰 주목을 받고 있다. AAV 유전자는 4.8 kb이고, 숙주 세포내에서 캡시드를 녹인 뒤 고분자량의 circular concatemer를 형성하여 안정된 형태의 episome 형태로 존재하거나, 숙주 세포의 유전체에 통합될 수도 있다.⁶⁸⁾ AAV는 질병을 유발하지는 않지만 일부 인구집단에서는 약 50%까지 면역력이 있을 정도로 소아기에 흔히 감염되므로^{69,70)} 면역력이 있을 경우 AAV를 이용한 임상시험에서 배제되게 되는데, 이는 AAV 연구결과를 왜곡할 수 있는 여지가 있다.⁷¹⁾ 인간에서 발견되는 AAV 혈청형은 12가지이며, *in vivo* 연구에서 내이에서는 AAV 1-4, 7, 8이 발견되고, 내유모세포에서는 AAV1-3, 5, 6, 8이, 외유모세포와 지지세포에는 AAV1이 감염되기도 하였다.^{72,73)} 또한 Claudius 세포, spiral ganglion과 inner sulcus 세포들에서 AAV5가 발견되었고,^{74 75)} 마우스 내, 외유모 세포로 분화되는 progenitor 세포에 AAV2/1이 형질도입을 일으키거나,⁵⁷⁾ 기니피그의 내유모세포에 AAV2/2가 효과적이었던 보고가 있다.⁷⁶⁾ 하지만 가장 큰 단점인 AAV의 4.8 kb 밖에 되지 않는 작은 적재 용량을 극복하기 위한 해결책으로 split AAV 벡터를 이용하는 방법이 연구되고 있다. 먼저 AAV의 concatemerization을 이용하는데 5' 방향 반쪽 transgene의 3' 끝에 splicing donor를 붙이고, 3' 방향 반쪽 transgene의 5' 끝에 splicing acceptor를 붙여 2개의 반쪽짜리 transgene이 담긴 concatemer를 transplicing시켜 최종 messenger RNA(mRNA)를 만들고, 하나의 단백을 합성하는 방법이 있다. 이러한 dual gene 수송법은 4.8 kb보다 큰 유전체를 전달하기 위해 여러 동물모델에서 성공적이었으나,^{77,78)} 내이 유전자 치료에는 적용되지 않았다. 두번째 방법으로 intein-mediated protein splicing을 이용하는 데, 표적단백의 N-terminal과 C-terminal 조각에 각각 trans-acting split-intein을 붙여 인코딩한 후 하나의 세포에 두 종류 transgene을 주입하고, 두 intein을 포함한 단백질 각각 발현되면 하나의 intein assembly를 만들며, 두 표적 단백질 조각을 정확하게 ligation한 뒤 intein assembly는 자체적으로 splicing 되게 된다.⁷⁹⁾ 이런 방법으로 Duchenne muscular dystrophy 마

우스 모델에서 Becker-form dystrophin의 split-gene 이 AAV1 벡터를 이용해 효과적으로 발현되었고,⁸⁰⁾ 2개의 AAV 벡터를 이용한 split Cas9 단백질의 세포 배양도 보고되었다.⁸¹⁾ 최근 두 연구에서 otoferlin KO 마우스에 otoferlin cDNA를 운반하기 위해 분할 바이러스 벡터를 이용하여 표적 내유모세포의 절반 이상에서 dual transduction이 이루어졌고, 단백질 발현이 wild-type의 30%까지 회복되었으며 청각기능의 일부도 회복되었다.^{82,83)}

Anc80L65는 AAV로부터 인공적으로 합성된 벡터로 AAV 진화적 조상의 combinatorial library(Anc80Lib)를 효과적으로 대표하는데, 생산성 면에서 AAV2보다는 효율적이나, AAV8보다는 저조한 편으로 실제 임상 적용하기 위해서는 제약이 있다.⁷¹⁾ 하지만 Anc80L65는 murine 모델의 근육, 망막, 간조직에서 형질 도입 능력이 가장 강력한 AAV8보다 높은 효과를 보였고, 내 유모세포의 형질 도입에도 뛰어난 효율성을 보였다.⁸⁴⁾ 출생초기 쥐의 정원장을 통한 전달시 다른 AAV serotype에 비교해 2~3배 적은 용량만으로도 90%까지 내, 외유모세포에 형질이 전달되었다. 성인 쥐에서는 canalostomy로 전달시에는 비록 외유모세포에는 도달이 적었으나, 내유모세포의 거의 100%에서 형질 전달이 되어 Anc80L65는 현재까지 내이의 유모세포에 형질 도입률이 가장 높은 벡터이다.⁸⁵⁾ 또한 와우의 유모세포뿐 아니라, 전정기관의 type I과 type II 유모세포에도 형질 전달이 성공적으로 나타났으며, 안정성 측면에서도 쥐의 ABR, DPOAE, 전정기능에 장애를 일으키지 않아, 비록 대형 동물에서도 이러한 효과가 입증되어야 하겠지만, 내이의 유전자 치료에 매우 유용할 것으로 기대를 모으고 있다.⁸⁴⁾

AAV2.7m8도 AAV로부터 인공적으로 합성된 벡터이며, AAV2 캡시드 단백질 서열의 588번째에 10개의 아미노산이 삽입되어 제조되었다. 신생아 쥐의 후반고리관을 통해 벡터를 전달후 4주째에 와우의 전체에 걸쳐 내유모세포의 약 84%, 외유모세포의 약 83%에서 전달율을 보여 매우 효율적인 벡터중 하나이다.⁸⁶⁾ 전정기관의 전달율은 상대적으로 낮았으나, Anc80L65와 마찬가지로 ABR역치, 전정기능에 장애를 일으키지는 않았다. 벡터의 전달 경로나 사용된 promoter의 종류에 따라 전

달율은 차이를 보일 수 있으나, AAV2.7m8은 전정기관을 보존하며, 와우에 특이적인 형질 전달시 유용하게 쓰일 수 있겠다.

Exo-AAV(Exosome-Associated AAV)는 바이러스를 exosome에 결합시켜 AAV의 형질 도입율을 높인 벡터이다. Exosome은 세포간 통신의 주요한 구성요소 중 하나로 나노미터 크기의 세포막의 분비소포이다. *In vitro*에서 내유모세포의 65%, 외유모세포의 50%의 전달율이 나타났고, *in vivo*에서는 정원장이거나 cochleostomy를 통해 내유모세포의 95%, 외유모세포의 50%의 전달율이 나타났으며, 마우스모델에서 청력과 전정기능을 개선하였다.⁸⁷⁾ 하지만 exosome은 RNA를 포함한 여러 단백질과 핵산을 운반하고, 완전히 밝혀지지 않았으나 여기에는 세포간 통신에 주요한 역할을 하는 물질을 포함하며, 결국 표적 세포의 기능이나 전사체의 수정, 또는 암을 포함한 신호전달 체계의 비정상적 활성화를 일으킬 수도 있다.⁸⁸⁾ 따라서 AAV 벡터와 함께 적용을 위해서는 인공합성의 exosome 이용이 적합할 수 있다.⁸⁹⁾

비바이러스성 벡터로는 cationic liposome, dendrimer, nonliposomic polymer 등이 있다. 이러한 인공 화합물은 비생물학적 환경에서 제조할 수 있고, 비면역원성을 보이며 생물학적으로 안전하다. 바이러스벡터만큼 널리 사용되지는 않으나, 바이러스성 벡터보다 우수한 측면도 존재한다.

Cationic bilayer liposome(CL)은 음전하를 띠는 DNA와 RNA를 세포내로 전달하는데 효과적으로 세포 외 효소나 항체로부터 수화물을 안정적으로 보호한다. 또한 양전하를 띠기 때문에 음전하인 세포의 원형질막에 반하여 endocytosis를 개시하고, endosome으로부터 내용물을 유리시키는데 효과적이다. 낮은 세포독성을 보이는 다양한 양이온성 지질 제형이 개발되어 왔는데, 흔히 쓰이는 Lipofectamine 2000은 내유모세포에 세포독성이 있는 것으로 알려져 핵산을 모세포에 전달하는 목적으로는 널리 쓰이지 않는다.⁹⁰⁾ 반면 RNAiMAX와 Lipofectamine 2000은 유전자 조작 단백질인 Cre recombinase 및 Cas9:sgRNA 복합체를 외유모 세포에 전달하는데 사용되었고, Lipofectamine 2000이 가장 효율적이었는데, 비록 일부 세포 손실이 관찰되었으나, 외

유모세포의 90%에서 Cre-mediated 재조합 및 20%에서 Cas9-mediated 유전자 변형이 일어났다.⁹¹⁾ Cas9를 이용할 때 동일한 서열을 갖는 유전체 부위를 반복 조작하여 off target effect를 일으킬 수 있으므로 장기적으로 발현시키는 데에 무리가 있다는 점에서, 유전자 편집 시 단백을 암호화하는 DNA를 전달하기보다는 비바이러스성 벡터를 사용한 단백질 전달이 더 유리할 수 있다.

Dendrimer는 central core에서 분지하는 monomeric subunit 형태의 가치가 많이 달린 nanometer 크기의 물질로 그 core 및 분지하는 monomer, 표면의 화학물질의 조합을 통해 다양한 크기와 구조의 핵산에 적절히 결합할 수 있게 된다.⁹²⁾ DNA-dendrimer superfect나 hyperbranched polylysine nanoparticle 복합체를 정원창에 주사하여 코르티기관내 세포들에 전달이 성공적으로 보고되었다.

Polyamine nonliposomal transfection agent는 핵산, 히스톤 단백질과 같은 비독성 세포단백, 소량의 polyamine polymer 복합체를 기반으로 한다. 그중 하나인 Mirus TransIT는 유전자를 Rosenthal's canal과 내유모세포에 전달하였다.⁹³⁾ 하지만 linear polyethylenimine nanoparticles⁹⁴⁾나 poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticle⁹⁵⁾은 내이 세포독성을 보이는 것으로 나타났다.

운반체를 매개로 한 유전자 전달방법 외에도 전기장을 매개로 한 DNA 전달(electroporation)도 시도되고 있다. 와우에 삽입된 전극에서 발생한 고압 전기장은 일시적으로 세포막을 파괴하여 세포외부의 DNA가 세포내로 들어갈 수 있는 구멍을 만든다. Electroporation은 높은 효율과 면역반응이 없다는 장점이 있으나, 와우내 전극을 삽입하고 전기 자극시 발생하는 조직 손상의 단점이 있다. 동물실험에서 Neurog1, NeuroD1, Sox2 전사인자의 이소성 발현에 효과적이었고, 출생 초기 와우의 nonsensory region에서 신경세포의 형성을 유발함이 관찰되었다.⁹⁶⁾ 또한 인공와우 전극을 이용한 Close-field electroporation으로 기니피그에서 BDNF를 코딩하는 naked DNA를 외림프 공간내의 mesenchymal 세포로 전달하여 위축된 spiral ganglion의 재생이 시도되었다.⁹⁷⁾

전달 방법(Delivery)

유전자 치료의 목적지인 와우, 반고리관, 이석기관은 결국 측두골의 골성 미로내에 간혀 있는데, 특히 림프순환도 최소화되어 있고, 혈액-미로장벽에 의해 혈액과도 분리되어 있어 *in vivo* 실험시 신생아 쥐에서만 치료물질의 전달이 효과적이라는 한계를 보인다.⁹⁸⁾ 결국 유전자치료를 적절한 바이러스 역가를 도달시키기 위해 벡터를 내이에 직접 국소주입 하게 되는데, 그 방법은 다음과 같다.

정원창막(Round window membrane)

정원창막은 3개의 층으로 구성되어 있고, 외림프 공간으로 통하는 입구로 인공와우 전극을 넣는 곳이기도 하며, 현재까지 동물모델에서 가장 많이 사용되는 접근법이다. 외림프 누출로 인한 청력 손실에 대한 우려가 있으나, 근막 등의 조직으로 막아 이를 예방할 수 있다. 다만 와우의 전체에 바이러스 벡터를 골고루 분포시키기가 어려워 결과적으로 형질이 도입된 마우스에서는 base to apex로 전달의 농도차가 발생하게 된다.⁹⁹⁾

Canalostomy

Kawamoto 등이 개발한 후반고리관을 개창하고, cannula를 공통각 방향으로 향하여 벡터를 주입하는 방법이다.¹⁰⁰⁾ 청력의 손상이 적지만 벡터의 전달이 와우에 충분히 도달하지 못할 수도 있다. Cannula의 방향을 ampulla 쪽으로 향하는 방법으로 수정되어 시행되기도 한다.⁸⁵⁾ 최근 이러한 접근법을 통해 *KCNE1* 돌연변이 마우스에서 유전자 치료의 높은 효율을 확인한 바 있다.¹⁰¹⁾

와우개창(Cochleostomy)

와우의 기저부분을 개창하여 유전자를 scala media의 내림프에 직접 전달한다. 청력을 악화시킬 수 있다는 단점이 있는데, 연구자에 따라 그 보고가 다르게 나타나고 있다. Chien 등은 AAV8 벡터를 정원창막과 와우개창을 통해 전달 후 효과를 비교하였는데, 와우개창시 청력손실이 나타났으나 전달율은 유사하였다.¹⁰²⁾ 대조적으로 Kilpatrick 등은 AAV8을 이용한 전달시 와우개창술에서 전달율이 높았고, 32 kHz 이상 고주파에서 청력

손상이 간소하게 나타났으나, 수술 후 1개월 후에는 32 kHz 미만의 중, 저주파수에서 청력에 영향을 주지 않았다.¹⁰³⁾ 다만, 이 방법은 기술적으로 어려워 줄기세포 이식이나 유모세포 재생시 적합한 방법이 될 것으로 보인다.

Round window membrane with canal fenestration

성인 마우스에서 정원창막을 통한 전달은 base to apex의 농도차를 유발하기 때문에 이를 극복하기 위해 주입량을 늘리게 된다면 이로 인한 청력 손실이 발생할 수 있다.⁹⁹⁾ 정원창막과 후반고리관을 동시에 개창함으로써 개창부위가 통풍구 역할을 하여 와우의 전구간에 걸쳐 주입된 벡터가 고르게 분포시킬 수 있다. 다만 이로 인한 일시적인 전정기능의 저하가 유발될 수 있고, 수술 후 다음날까지 쥐에서 안전이 관찰되었으나, 이후 비정상적인 회진행동은 유발되지 않았다.

Preliminary results with genetic hearing loss

유전성 난청을 일으키는 유전자는 300여 가지 이상이 발견되었고,³⁾ 각각 유전 방식이 다르며, 표현형의 발생과 진행속도가 다르게 나타난다. 많은 난청 유전자가 내이의 발생, 구조, 기능에 중요한 역할을 담당하지만, 유전자 치료의 훌륭한 표적이 되지는 못하는 경우가 대부분이나, 일시적 발현을 보이거나 세포 생존에 필수적이며, 발생의 특정한 시기에 핵심 역할을 하는 몇몇 유전자들이 유전자 치료 개발을 위한 동물연구의 표적이 되었다.

Vglut3(SLC17A8)

Vglut3(SLC17A8) 변이는 다양한 난청 인구 집단에서 약 1.6%의 원인이 되며, 상염색체 우성으로 유전된다.¹⁴⁾ *Vglut3* 유전자는 글루타메이트를 synaptic vesicle로 수송하는데 필수적인 vesicular glutamate transporter(V-GLUT3)를 코딩하고, 인간에서 *Vglut3*의 missense 변이는 진행성 고주파성 난청(DFNA25)을 유발한다.¹⁰⁴⁾ *Vglut3* KO 마우스의 와우에 *Vglut3* cDNA를 AAV를 매개로 전달하였던 연구는 최초의 성공적인 포유류 유모세포의 유전자 치료였다.⁷³⁾ 이들은 AAV2/1을 이용해 P1~12일의 마우스 와우에 유전자를 주입하여 ABR과 acoustic startle reflex가 2주 이내에 회복되었음을 보

였고, 내유모 세포의 afferent ribbon synapse의 형태도 부분회복을 보였다. 다만 이때 사용한 벡터는 광범위한 활성을 갖는 promoter를 포함하였음에도 불구하고, 도입된 유전자는 내유모세포에서만 발현되었다.

TMC1

TMC1 변이는 난청 인구집단의 약 2.3%에서 발생하는 것으로 보고되었고, 일부 집단에서는 유전성 난청의 4~8%를 차지하기도 하며, 상염색체 우성(DFNA36) 또는 상염색체 열성(DFNB7/11)으로 유전된다.^{14,105)} *TMC1* 유전자는 유모세포 다발의 apex에 위치하며, transduction에 관여하는 TMC1 단백을 코딩한다.¹⁰⁶⁾ 열성 loss of function 모델인 *TMC1* KO 마우스와 인간 DFNA36 모델인 베토벤 마우스(*Bth*), 두 종류의 마우스 모델에서 AAV2/1을 이용한 유전자 전달 연구가 보고되었다.⁷²⁾ KO 모델에서 P0-P2에 AAV2/1-TMC1 벡터를 주입시 내유모세포에서 mechanotransduction이 80~90% 회복되었으나, *in vitro*에서는 외유모세포에서도 발현이 되었음에도 불구하고, DPOAE가 회복되지 않았다. *Bth* 마우스에서 AAV2/1-TMC2 벡터를 전달했을 때 내유모세포의 청각 기능과 생존이 관찰되었고, 이를 통해 *TMC1*과 *TMC2* 유전자가 서로 중복되는 기능을 갖거나 부분적으로 대체가 가능하다는 가설을 뒷받침하였다. 다만 startle response가 회복되지는 않았으며, dominant variant의 형질을 전환하기 위한 다른 방법이 필요할 수 있음을 시사한다. Shibata 등은 *Bth* 마우스의 형질을 억제하기 위해 miRNA를 AAV 벡터를 이용해 초기 발달단계 마우스에 단일 와우내 주입하였다.⁴³⁾ 이는 대조군에 비해 유모세포 생존율이 높았고, 난청의 발생을 35주까지 늦추었다. *Vlut3* 유전자 전달로 난청 발현이 억제되었던 마우스가 7주차부터 난청이 다시 진행되었음을 고려할 때⁷³⁾ 상대적으로 장시간 효과가 유지되었음을 알 수 있다. 최근 Gao 등은 신생아 *Bth* 마우스의 와우로 CRISPR-Cas9 전달을 통해 청각 기능이 호전시켰는데, 특히 cationic lipid nanoparticle인 Lipofectamine 2000을 결합하여 세포 투과성을 향상시켰다.¹⁰⁷⁾ 이 연구는 최초로 CRISPR/Cas9 을 상염색체 우성형질의 난청을 교정하기 위해 도입하였다.

WHRN(Whirlin)

WHRN은 증후군성 난청을 보이는 Usher type 2의 원인 유전자중 하나로, 상염색체 열성으로 유전되며 난청 집단의 0.5%에서 발견된다.¹⁴⁾ 유모세포 내의 cytoskeletal 단백질중 하나인 Whirlin을 코딩하는데, 길이가 다른 두종류의 isoform이 있고, stereocilia의 다른 부위에서 발견되며, 변이로 인해 두 isoform이 부족해지면 stereocilia의 길이가 짧아져 고심도 난청을 유발한다.¹⁰⁸⁾ 이 단백질은 다른 3종류 단백질(USH2A, GPR98, PDZD7)과 tetramer complex를 이뤄 stereocilia의 ankle link에 위치하고, myosin 15a 단백질과 상호작용하여 stereocilia의 길이를 연장하는 기능을 한다.¹⁰⁹⁾ KO 마우스에서 AAV8-whirlin cDNA 처리된 마우스는 stereocilia의 형태는 회복했으나, 재생된 stereocilia의 길이나 수, 낮은 바이러스 감염률, isoform의 불균일한 발현으로 정상적인 청각기능을 회복하지는 못했다.¹¹⁰⁾ 하지만 후속연구에서 후반고리관을 통한 AAV8-whirlin 주입 후 청력 및 전정 기능의 일부가 회복되었음이 보고되어, 두 isoform 모두로 vector의 전달효율을 높인다면 기능회복을 더 높일 수 있을 것으로 보인다.¹¹¹⁾

USH1C(Harmonin)

USH1C 변이는 선천성 난청, 전정 기능 저하, 망막 색소병증을 주증상으로 하는 상염색체 열성유전 형태의 Usher 증후군 type 1을 일으키는데, 변이의 종류, 즉 point mutation, exon의 expansion, multiexon continuous deletion에 해당하는지에 따라 표현형의 정도가 다르게 나타난다.^{46,112)} 난청집단에서는 약 0.3%에서 발생하는 것이 보고되었다.¹⁴⁾ 마우스 내이의 유모세포에서 발현이 되고, harmonin 단백을 코딩하며, 3개의 isoform을 만든다. Harmonin-b는 stereocilia에 존재하여 sans protein을 통해 myosin 7a와 안정한 3차 복합체를 형성하고, 또한 cadherin-23 및 procadherin-15 와도 상호작용한다.¹¹³⁾ 이를 통해 stereocilia의 발달 및 정렬상태의 유지를 촉진하는 scaffold를 형성하는데 harmonin 단백질의 이상은 모세포 다발의 구조를 망가트려 난청을 초래한다. Harmonin-a는 유모세포 시냅스부위에 위치하여 칼슘채널을 유지시켜 synaptic

transmission에 관여하는 것으로 여겨진다. Lentz 등은 마우스모델에서 c.216G9A 변이가 일으키는 splicing defect를 antisense oligonucleotide(ASO)를 복강 내 단일 주사하여 교정하였다.⁴⁶⁾ ASO가 생체 내에서 흡수되는데에는 장벽이 존재하지만, 몇 가지 화합물을 붙여 endocytosis 시 세포 친화성을 높일 수 있게 된다.¹¹⁴⁾ ASO를 주사한 쥐에서 harmonin 발현이 증가하였고, stereocilia의 배열이 호전되었으며, 저주파 청력(8-16 kHz) 및 전정기능을 향상시켰다. P13까지는 전정기능이 개선이 관찰되었으나, P16에는 전정기능의 악화가 시작된 반면, 청력 개선 효과는 1회 투약 이후 6개월까지 지속되었다. 후속연구에서는 동일한 c.216G9A 모델에서 출생초기 두 형태의 harmonin 단백질 AAV2/Anc80 벡터 및 CMV promoter 조절을 통해 정원장을 거쳐 내이로 전달되어 유전자 대체가 성공적으로 이루어졌다.¹¹⁵⁾ 주입 후 P0-1 시기에는 청각, 전정 기능 및 mechanotransduction을 상당히 회복하여, 일부 쥐에서 ABR 역치가 wild type과 비슷한 정도까지 호전되었고, 6주까지 유모세포 손상은 매우 감소한 상태로 유지되었으며, 정상 계단형태의 hair bundle이 관찰되었다.

USH3A(Clarin-1)

USH3A는 일반적으로 언어발달 후에 나타나는 진행성 난청, 실명, 전정기능 저하를 증상으로 하는 Usher 증후군 type 3의 유일한 원인 유전자이다.¹¹⁶⁾ USH3A는 코르티기관과 spiral ganglion에서 발현되며, Clarin-1을 코딩하고, 이 단백질은 mechanotransduction과 presynaptic ribbon assembly의 조절자 역할을 한다.¹¹⁷⁾ György 등은 AAV9 캡시드 변이체인 PHP.B를 이용해 Clarin-1을 코딩하는 유전자를 신생아쥐에 전달하여 청력을 회복하였고, 최초로 영장류(Cynomolgus Monkey)에 AAV9-PHP.B-GFP를 정원장에 1회 주입하여 7주 뒤 벡터가 코르티기관, spiral ligament, limbus, stria vascularis에서 발현된 것을 관찰하였다. 특히 내, 외유모세포 각각에 92%의 전달율을 보였다. 다만 두번째 영장류 실험에서는 벡터의 주입량을 줄였는데, 이때에는 내이의 벡터의 형질 전달이 관찰되지 않아, 대형 포유류에서 정원장을 통한 주입법 및 전달 농도에 따른 전달율에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

GJB2(Connexin26)

GJB2 변이는 전세계적으로 유전성 난청의 가장 흔한 원인이며, 상염색체 우성(DFNA1) 또는 열성(DFNB1) 형태로 유전되고, 난청집단에서 약 21.5% 원인을 차지하는 것으로 보고되었다. *GJB2* 유전자는 transmembrane protein인 Cx26을 코딩하여 세포사이 물질 교환기능을 하는데, 이 단백질은 코르티기관과 stria vascularis의 세포들을 연결하는 역할을 하는 지지세포에서 많이 발현된다.¹¹⁸⁾ 높은 유병율을 보이는 *GJB2* 변이는 유전자 치료의 잠재적인 목표중 하나로 여겨지나, 이런 큰 관심에도 불구하고 *GJB2* 변이의 germline mutation의 경우 자궁내 치사를 보여 연구가 매우 제한적이었다. Maeda 등은 RNAi를 이용해 dominant negative mutation인 p.R75W의 발현을 억제하였다. 먼저 마우스 체내로 *GJB2*-R75W-eGFP를 발현하는 플라스미드를 형질감염시켜 dominant negative 형태의 청력손실을 유발하고, 이후 p.R75W 변이를 침묵시키는 RNAi를 전달하여 교정하였다.¹¹⁹⁾ Yu 등은 AAV1 벡터를 이용해 *GJB2* 결핍 와우에 *GJB2* 서열을 전달하여 세포사멸과 spiral ganglion neuron 퇴화를 감소시켰으나, 청각 기능을 호전시키지는 못했는데, 이는 AAV1의 전달 효율이 높지 않고 기능적 회복을 보이는 시기 이후(P0-1)에 주입하였기 때문으로 여겨진다.¹²⁰⁾ Iizuka 등은 조건부 *GJB2* KO 마우스에 AAV5를 이용해 주산기 주입을 하여 일부 와우내 구조와 ABR 역치를 호전시켰다.¹²¹⁾ Takada 등은 adenovirus를 이용해 BDNF를 *GJB2* KO 마우스의 와우 기저부 Rosenthal's canal에 전달하여 신경기능을 호전시키기도 하였다.¹²²⁾

결 론

앞서 기술한 동물모델의 성공사례를 통해 향후 유전성 난청의 유전자 치료에 대한 가능성을 짐작할 수 있다. 현재까지 비증후군성 유전성 난청에 대한 유전자 치료의 임상시험이 시작된 적은 없으나,¹²³⁾ 난청 외 다른 질환에서는 유전자치료의 임상시험 및 FDA 승인이 진행되기도 하였다. Leber's congenital amaurosis에서 유전자 치료 후 3년간 시력이 유지되었고, 현재 voretigene neparvovec-rzyl(Luxturna[®])이 2017

년 FDA 허가를 받아 임상에서 쓰이고 있다.¹²⁴⁾ 또한 Spinal muscular atrophy를 일으키는 SMN1 유전자의 치료제인 onasemnogene abeparvovec(Zolgensma[®]) 등이 2019년 FDA 허가를 받았다. 인간을 대상으로 한 임상시험에서 절대 간과해서는 안 되는 부분이 안정성 문제이며, 주입기술, 벡터, 외부 유래 유전자의 안전성이 포함된다. 청각기관은 손상에 매우 취약하며, 내이액의 매우 적은 용량(<100uL)을 고려하여 주입할 양과 속도를 신중히 결정해야 한다. 이에 따른 약리적 독성연구 또한 필수적이다. 또한 표적세포뿐만 아니라, 비표적세포에서 외부 유래 유전자가 발현되었을 때의 안정성에 대한 연구도 필요하다. 벡터나 치료유전자로부터 유래된 단백질에 대한 면역반응이나 형질 발현 시기가 짧아 재치료가 필요할 때 면역 반응의 심화 여부 등도 고려 대상이다. 이러한 잠재적인 위험과 이점을 뚜렷하게 정립하고 평가하여 최적의 임상연구 설계를 해야 하며, 환자와 의료진 사이의 정보교환이 충분히 이루어져야만 할 것이다.

중심 단어: 유전성 난청, 차세대 염기서열 분석, 정밀의학, 유전자 치료, 유전자 편집.

REFERENCES

- 1) Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991;630:16-31.
- 2) WHO. Deafness and hearing loss. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss#:~:text=A%20person%20who%20is%20not,moderate%2C%20severe%2C%20or%20profound>
- 3) Van Camp G SR. Hereditary Hearing Loss Homepage. <https://hereditaryhearingloss.org>. Accessed 19 Mar 2021.
- 4) Smith RJ, Bale JF, Jr., White KR. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 2005;365(9462):879-90.
- 5) Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94(3):441-8.
- 6) Rodriguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, et al. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat* 2008;29(6):823-31.
- 7) Jung J, Kim HS, Lee MG, Yang EJ, Choi JY. Novel COCH p.V123E mutation, causative of DFNA9 sensorineural hearing loss and vestibular disorder, shows impaired cochlin post-translational cleavage and secretion. *Hum Mutat* 2015;36(12):1168-75.

- 8) Vore AP, Chang EH, Hoppe JE, Butler MG, Forrester S, Schneider MC, et al. Deletion of and novel missense mutation in POU3F4 in 2 families segregating X-linked nonsyndromic deafness. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131(12):1057-63.
- 9) Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993;4(3):289-94.
- 10) Bitner-Glindzicz M, Rahman S. Ototoxicity caused by aminoglycosides. *BMJ* 2007;335(7624):784-5.
- 11) Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med* 2002;4(4):258-74.
- 12) Na G, Lee JM, Lee HJ, Jeong Y, Jung J, Choi JY. Effect of cochlear implantation on hearing fluctuation in patients with biallelic SLC26A4 variants. *Audiol Neurootol* 2021;26(2):111-20.
- 13) Rabbani B, Mahdiah N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 2012;57(10):621-32.
- 14) Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet* 2016;135(4):441-50.
- 15) Snowden AW, Gregory PD, Case CC, Pabo CO. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Curr Biol* 2002;12(24):2159-66.
- 16) Luo H, Schmidt JA, Lee YS, Oltz EM, Payton JE. Targeted epigenetic repression of a lymphoma oncogene by sequence-specific histone modifiers induces apoptosis in DLBCL. *Leuk Lymphoma* 2017;58(2):445-56.
- 17) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-11.
- 18) Nam GS, Rim JH, Choi JY, Gee HY, Choi JR, Lee ST, et al. The TECTA mutation R1890C is identified as one of the causes of genetic hearing loss: a case report. *BMC Med Genet* 2019;20(1):57.
- 19) Yan D, Xiang G, Chai X, Qing J, Shang H, Zou B, et al. Screening of deafness-causing DNA variants that are common in patients of European ancestry using a microarray-based approach. *PLoS One* 2017;12(3):e0169219.
- 20) Tsukada K, Nishio SY, Hattori M, Usami S. Ethnic-specific spectrum of GJB2 and SLC26A4 mutations: their origin and a literature review. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015;124 Suppl 1:61S-76S.
- 21) Dai P, Huang LH, Wang GJ, Gao X, Qu CY, Chen XW, et al. Concurrent hearing and genetic screening of 180,469 neonates with follow-up in Beijing, China. *Am J Hum Genet* 2019;105(4):803-12.
- 22) Yuan Y, Li Q, Su Y, Lin Q, Gao X, Liu H, et al. Comprehensive genetic testing of Chinese SNHL patients and variants interpretation using ACMG guidelines and ethnically matched normal controls. *Eur J Hum Genet* 2020;28(2):231-43.
- 23) Shin JW, Lee SC, Lee HK, Park HJ. Genetic screening of GJB2 and SLC26A4 in Korean cochlear implantees: experience of soree ear clinic. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2012;5 Suppl 1:S10-3.
- 24) Jung J, Lee JS, Cho KJ, Yu S, Yoon JH, Yung Gee H, et al. Genetic Predisposition to Sporadic Congenital Hearing Loss in a Pediatric Population. *Sci Rep* 2017;7:45973.
- 25) Bae JW, Kim DB, Choi JY, Park HJ, Lee JD, Hur DG, et al. Molecular and clinical characterization of the variable phenotype in Korean families with hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *PLoS One* 2012;7(8):e42463.
- 26) Park HJ, Lee SJ, Jin HS, Lee JO, Go SH, Jang HS, et al. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. *Clin Genet* 2005;67(2):160-5.
- 27) Kim BG. SLC26A4 Mutations in Korean population. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery* 2014;57(11):733-7.
- 28) Lee KY, Choi SY, Bae JW, Kim S, Chung KW, Drayna D, et al. Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean deafness patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;72(9):1301-9.
- 29) Shin JW, Lee SC, Lee HK, Park HJ. Genetic screening of GJB2 and SLC26A4 in Korean cochlear implantees: experience of soree ear clinic. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2012;5 Suppl 1(Suppl 1):S10-3.
- 30) Choi SY, Kim YE, Ahn DB, Kim TH, Choi JH, Lee HR, et al. Construction of a DNA chip for screening of genetic hearing loss. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2009;2(1):44-7.
- 31) Sagong B, Baek JI, Oh SK, Na KJ, Bae JW, Choi SY, et al. A rapid method for simultaneous screening of multi-gene mutations associated with hearing loss in the Korean population. *PLoS One* 2013;8(3):e57237.
- 32) Han KH, Kim AR, Kim MY, Ahn S, Oh SH, Song JH, et al. Establishment of a flexible real-time polymerase chain reaction-based platform for detecting prevalent deafness mutations associated with variable degree of sensorineural hearing loss in Koreans. *PLoS One* 2016;11(9):e0161756.
- 33) Lee SY, Oh DY, Han JH, Kim MY, Kim B, Kim BJ, et al. Flexible real-time polymerase chain reaction-based platforms for detecting deafness mutations in Koreans: a proposed guideline for the etiologic diagnosis of auditory neuropathy spectrum disorder. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(9).
- 34) Mori K, Moteki H, Miyagawa M, Nishio SY, Usami S. Social health insurance-based simultaneous screening for 154 mutations in 19 deafness genes efficiently identified causative mutations in Japanese hearing loss patients. *PLoS One* 2016;11(9):e0162230.
- 35) Rim JH, Choi JY, Jung J, Gee HY. Activation of KCNQ4 as a therapeutic strategy to treat hearing loss. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22(5):2510.
- 36) Jung J, Choi HB, Koh YI, Rim JH, Choi HJ, Kim SH, et al. Whole-exome sequencing identifies two novel mutations in KCNQ4 in individuals with nonsyndromic hearing loss. *Sci*

- Rep 2018;8(1):16659.
- 37) Jung J, Lin H, Koh YI, Ryu K, Lee JS, Rim JH, et al. Rare KCNQ4 variants found in public databases underlie impaired channel activity that may contribute to hearing impairment. *Exp Mol Med* 2019;51(8):1-12.
 - 38) Shin DH, Jung J, Koh YI, Rim JH, Lee JS, Choi HJ, et al. A recurrent mutation in KCNQ4 in Korean families with non-syndromic hearing loss and rescue of the channel activity by KCNQ activators. *Hum Mutat* 2019;40(3):335-46.
 - 39) Askew C, Chien WW. Adeno-associated virus gene replacement for recessive inner ear dysfunction: Progress and challenges. *Hear Res* 2020;394:107947.
 - 40) Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell* 2014;159(3):647-61.
 - 41) Thakore PI, D'Ippolito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods* 2015;12(12):1143-9.
 - 42) Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013;152(5):1173-83.
 - 43) Shibata SB, Ranum PT, Moteki H, Pan B, Goodwin AT, Goodman SS, et al. RNA interference prevents autosomal-dominant hearing loss. *Am J Hum Genet* 2016;98(6):1101-13.
 - 44) Maeda Y, Fukushima K, Nishizaki K, Smith RJ. In vitro and in vivo suppression of GJB2 expression by RNA interference. *Hum Mol Genet* 2005;14(12):1641-50.
 - 45) Jan A, Karasinska JM, Kang MH, de Haan W, Ruddle P, Kaur A, et al. Direct intracerebral delivery of a miR-33 antisense oligonucleotide into mouse brain increases brain ABCA1 expression. [Corrected]. *Neurosci Lett* 2015;598:66-72.
 - 46) Lentz JJ, Jodelka FM, Hinrich AJ, McCaffrey KE, Farris HE, Spalitta MJ, et al. Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nat Med* 2013;19(3):345-50.
 - 47) Zou B, Mittal R, Grati M, Lu Z, Shu Y, Tao Y, et al. The application of genome editing in studying hearing loss. *Hear Res* 2015;327:102-8.
 - 48) Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016;533(7603):420-4.
 - 49) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337(6096):816-21.
 - 50) Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2011;11(1):11-27.
 - 51) Chen K, Gao C. TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *J Genet Genomics* 2013;40(6):271-9.
 - 52) Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 2010;79:213-31.
 - 53) Farooq R, Hussain K, Tariq M, Farooq A, Mustafa M. CRISPR/Cas9: targeted genome editing for the treatment of hereditary hearing loss. *J Appl Genet* 2020;61(1):51-65.
 - 54) Hirano S, Nishimasu H, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9. *Mol Cell* 2016;61(6):886-94.
 - 55) Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, Zheng Z, et al. Broadening the targeting range of Staphylococcus aureus CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol* 2015;33(12):1293-8.
 - 56) Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol* 2020;38(7):824-44.
 - 57) Bedrosian JC, Gratton MA, Brigande JV, Tang W, Landau J, Bennett J. In vivo delivery of recombinant viruses to the fetal murine cochlea: transduction characteristics and long-term effects on auditory function. *Mol Ther* 2006;14(3):328-35.
 - 58) Han JJ, Mhatre AN, Wareing M, Pettis R, Gao WQ, Zufferey RN, et al. Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by a lentivirus-derived gene transfer vector. *Hum Gene Ther* 1999;10(11):1867-73.
 - 59) Pietola L, Aarnisalo AA, Joensuu J, Pellinen R, Wahlfors J, Jero J. HOX-GFP and WOX-GFP lentivirus vectors for inner ear gene transfer. *Acta Otolaryngol* 2008;128(6):613-20.
 - 60) Wei Y, Fu Y, Liu S, Xia G, Pan S. Effect of lentiviruses carrying enhanced green fluorescent protein injected into the scala media through a cochleostomy in rats. *Am J Otolaryngol* 2013;34(4):301-7.
 - 61) Shu Y, Tao Y, Li W, Shen J, Wang Z, Chen ZY. Adenovirus vectors target several cell subtypes of mammalian inner ear in vivo. *Neural Plast* 2016;2016:9409846.
 - 62) Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005;12 Suppl 1:S18-27.
 - 63) Husseman J, Raphael Y. Gene therapy in the inner ear using adenovirus vectors. *Adv Otorhinolaryngol* 2009;66:37-51.
 - 64) Venail F, Wang J, Ruel J, Ballana E, Rebillard G, Eybalin M, et al. Coxsackie adenovirus receptor and alpha nu beta3/alpha nu beta5 integrins in adenovirus gene transfer of rat cochlea. *Gene Ther* 2007;14(1):30-7.
 - 65) Kessler BW, Hashisaki GT, Fletcher K, Eppard H, Holt JR. An in vitro model system to study gene therapy in the human inner ear. *Gene Ther* 2007;14(15):1121-31.
 - 66) Yang J, Cong N, Han Z, Huang Y, Chi F. Ectopic hair cell-like cell induction by Math1 mainly involves direct trans-differentiation in neonatal mammalian cochlea. *Neurosci Lett* 2013;549:7-11.
 - 67) Takada Y, Takada T, Lee MY, Swiderski DL, Kabara LL, Dolan DF, et al. Ototoxicity-induced loss of hearing and

- inner hair cells is attenuated by HSP70 gene transfer. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015;2:15019.
- 68) Yang J, Zhou W, Zhang Y, Zidon T, Ritchie T, Engelhardt JF. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol* 1999;73(11):9468-77.
- 69) Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122(1):23-36.
- 70) Calcedo R, Wilson JM. Humoral immune response to AAV. *Front Immunol* 2013;4:341.
- 71) Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, et al. In silico reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep* 2015;12(6):1056-68.
- 72) Askew C, Rochat C, Pan B, Asai Y, Ahmed H, Child E, et al. Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice. *Sci Transl Med* 2015;7(295):295ra108.
- 73) Akil O, Seal RP, Burke K, Wang C, Alemi A, During M, et al. Restoration of hearing in the VGLUT3 knock-out mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron* 2012;75(2):283-93.
- 74) Chien WW, Monzack EL, McDougald DS, Cunningham LL. Gene therapy for sensorineural hearing loss. *Ear Hear* 2015;36(1):1-7.
- 75) Jero J, Mhatre AN, Tseng CJ, Stern RE, Coling DE, Goldstein JA, et al. Cochlear gene delivery through an intact round window membrane in mouse. *Hum Gene Ther* 2001;12(5):539-48.
- 76) Konishi M, Kawamoto K, Izumikawa M, Kuriyama H, Yamashita T. Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J Gene Med* 2008;10(6):610-8.
- 77) Fine EJ, Appleton CM, White DE, Brown MT, Deshmukh H, Kemp ML, et al. Trans-spliced Cas9 allows cleavage of HBB and CCR5 genes in human cells using compact expression cassettes. *Sci Rep* 2015;5:10777.
- 78) Cao M, Khan JA, Kang BY, Mehta JL, Hermonat PL. Dual AAV/IL-10 plus STAT3 anti-inflammatory gene delivery lowers atherosclerosis in LDLR KO mice, but without increased benefit. *Int J Vasc Med* 2012;2012:524235.
- 79) Topilina NI, Mills KV. Recent advances in in vivo applications of intein-mediated protein splicing. *Mob DNA* 2014;5(1):5.
- 80) Li J, Sun W, Wang B, Xiao X, Liu XQ. Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated in vivo gene therapy. *Hum Gene Ther* 2008;19(9):958-64.
- 81) Truong DJ, Kuhner K, Kuhn R, Werfel S, Engelhardt S, Wurst W, et al. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res* 2015;43(13):6450-8.
- 82) Al-Moyed H, Cepeda AP, Jung S, Moser T, Kugler S, Reisinger E. A dual-AAV approach restores fast exocytosis and partially rescues auditory function in deaf otiferlin knock-out mice. *EMBO Mol Med* 2019;11(1).
- 83) Akil O, Dyka F, Calvet C, Emptoz A, Lahlou G, Nouaille S, et al. Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(10):4496-501.
- 84) Landegger LD, Pan B, Askew C, Wassmer SJ, Gluck SD, Galvin A, et al. A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. *Nat Biotechnol* 2017;35(3):280-4.
- 85) Suzuki J, Hashimoto K, Xiao R, Vandenbergh LH, Liberman MC. Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. *Sci Rep* 2017;7:45524.
- 86) Isgrig K, McDougald DS, Zhu J, Wang HJ, Bennett J, Chien WW. AAV2.7m8 is a powerful viral vector for inner ear gene therapy. *Nat Commun* 2019;10(1):427.
- 87) Gyorgy B, Sage C, Indzhykuliaan AA, Scheffer DI, Brisson AR, Tan S, et al. Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. *Mol Ther* 2017;25(2):379-91.
- 88) Bakhshandeh B, Kamaledin MA, Aalishah K. A Comprehensive review on exosomes and microvesicles as epigenetic factors. *Curr Stem Cell Res Ther* 2017;12(1):31-6.
- 89) Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1525-41.
- 90) Ren LL, Wu Y, Han D, Zhao LD, Sun QM, Guo WW, et al. Math1 gene transfer based on the delivery system of quaternized chitosan/Na-carboxymethyl-beta-cyclodextrin nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2010;10(11):7262-5.
- 91) Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2015;33(1):73-80.
- 92) Shcharbin DG, Klajnert B, Bryszewska M. Dendrimers in gene transfection. *Biochemistry (Mosc)* 2009;74(10):1070-9.
- 93) Praetorius M, Pfannenstiel S, Klingmann C, Baumann I, Plinkert PK, Staecker H. [Expression patterns of non-viral transfection with GFP in the organ of Corti in vitro and in vivo. Gene therapy of the inner ear with non-viral vectors]. *HNO* 2008;56(5):524-9.
- 94) Zhou H, Ma X, Liu Y, Dong L, Luo Y, Zhu G, et al. Linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles are ototoxic to the cultured sensory epithelium of neonatal mice. *Mol Med Rep* 2015;11(6):4381-8.
- 95) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Ishihara T, et al. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005;115(11):2000-5.
- 96) Puligilla C, Dabdoub A, Brenowitz SD, Kelley MW. Sox2 induces neuronal formation in the developing mammalian cochlea. *J Neurosci* 2010;30(2):714-22.
- 97) Pinyon JL, Tadros SF, Froud KE, AC YW, Tompson IT, Crawford EN, et al. Close-field electroporation gene delivery using the cochlear implant electrode array enhances the bionic ear. *Sci Transl Med* 2014;6(233):233ra54.
- 98) Shibata SB, Yoshimura H, Ranum PT, Goodwin AT, Smith RJH. Intravenous rAAV2/9 injection for murine cochlear gene delivery. *Sci Rep* 2017;7(1):9609.

- 99) Yoshimura H, Shibata SB, Ranum PT, Smith RJH. Enhanced viral-mediated cochlear gene delivery in adult mice by combining canal fenestration with round window membrane inoculation. *Sci Rep* 2018;8(1):2980.
- 100) Kawamoto K, Oh SH, Kanzaki S, Brown N, Raphael Y. The functional and structural outcome of inner ear gene transfer via the vestibular and cochlear fluids in mice. *Mol Ther* 2001;4(6):575-85.
- 101) Wu X, Zhang L, Li Y, Zhang W, Wang J, Cai C, et al. Gene therapy via canalostomy approach preserves auditory and vestibular functions in a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome type 2. *Nat Commun* 2021; 12(1):697.
- 102) Chien WW, McDougald DS, Roy S, Fitzgerald TS, Cunningham LL. Cochlear gene transfer mediated by adeno-associated virus: comparison of two surgical approaches. *Laryngoscope* 2015;125(11):2557-64.
- 103) 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 Ther* 2011;18(6):569-78.
- 104) Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, et al. Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet* 2008;83(2):278-92.
- 105) Hilgert N, Alasti F, Dieltjens N, Pawlik B, Wollnik B, Uyguner O, et al. Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clin Genet* 2008;74(3):223-32.
- 106) Pan B, Geleoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, et al. TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron* 2013;79(3):504-15.
- 107) Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh WH, Pan B, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature* 2018;553(7687): 217-21.
- 108) Ebrahim S, Ingham NJ, Lewis MA, Rogers MJC, Cui R, Kachar B, et al. Alternative splice forms influence functions of whirlin in mechanosensory hair cell stereocilia. *Cell Rep* 2016;15(5):935-43.
- 109) Belyantseva IA, Boger ET, Naz S, Frolenkov GI, Sellers JR, Ahmed ZM, et al. Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat Cell Biol* 2005;7(2):148-56.
- 110) Chien WW, Isgrig K, Roy S, Belyantseva IA, Drummond MC, May LA, et al. Gene therapy restores hair cell stereocilia morphology in inner ears of deaf whirler mice. *Mol Ther* 2016;24(1):17-25.
- 111) Isgrig K, Shteamer JW, Belyantseva IA, Drummond MC, Fitzgerald TS, Vijayakumar S, et al. Gene therapy restores balance and auditory functions in a mouse model of usher syndrome. *Mol Ther* 2017;25(3):780-91.
- 112) Ouyang XM, Yan D, Du LL, Hejtmancik JF, Jacobson SG, Nance WE, et al. Characterization of Usher syndrome type I gene mutations in an Usher syndrome patient population. *Hum Genet* 2005;116(4):292-9.
- 113) Yan J, Pan L, Chen X, Wu L, Zhang M. The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(9):4040-5.
- 114) Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2016;44(14):6518-48.
- 115) Pan B, Askew C, Galvin A, Heman-Ackah S, Asai Y, Indzhykulian AA, et al. Gene therapy restores auditory and vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1c. *Nat Biotechnol* 2017;35(3):264-72.
- 116) Adato A, Vreugde S, Joensuu T, Avidan N, Hamalainen R, Belenkiy O, et al. USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses. *Eur J Hum Genet* 2002;10(6):339-50.
- 117) Gopal SR, Chen DH, Chou SW, Zang J, Neuhauss SC, Stepanyan R, et al. Zebrafish models for the mechanosensory hair cell dysfunction in Usher syndrome 3 reveal that clarin-1 is an essential hair bundle protein. *J Neurosci* 2015; 35(28):10188-201.
- 118) Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol* 2006;576(Pt 1):11-21.
- 119) Maeda Y, Fukushima K, Kawasaki A, Nishizaki K, Smith RJ. Cochlear expression of a dominant-negative GJB2R75W construct delivered through the round window membrane in mice. *Neurosci Res* 2007;58(3):250-4.
- 120) Yu Q, Wang Y, Chang Q, Wang J, Gong S, Li H, et al. Virally expressed connexin26 restores gap junction function in the cochlea of conditional Gjb2 knockout mice. *Gene Ther* 2014;21(1):71-80.
- 121) Iizuka T, Kamiya K, Gotoh S, Sugitani Y, Suzuki M, Noda T, et al. Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 2015; 24(13):3651-61.
- 122) Takada Y, Beyer LA, Swiderski DL, O'Neal AL, Prieskorn DM, Shivatzki S, et al. Connexin 26 null mice exhibit spiral ganglion degeneration that can be blocked by BDNF gene therapy. *Hear Res* 2014;309:124-35.
- 123) ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. Accessed 19 Mar 2021.
- 124) Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012;130(1):9-24.