

令和元年6月3日現在

機関番号：14401  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2018  
課題番号：17K16911  
研究課題名(和文)内耳聴覚・平衡機能におけるEpiphyganの働き

研究課題名(英文)Function of Epiphygan in murine inner ear

## 研究代表者

花田 有紀子(Hanada, Yukiko)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：70734044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内耳に特異的に発現するEpiphyganのノックアウトマウスにおいて特に16kHz以上の高音域において聴覚閾値が上昇していることを明らかにし、Epiphyganが聴覚において重要な役割を果たしていることを示した。ノックアウトマウスの内耳形態に明らかな野生型マウスとの相違は認められなかった。またFGF12(Fibroblast growth factor 12)に関する検討も実施し、前庭神経節やらせん神経節などに特異的に発現しており、ノックアウトマウスでは聴覚閾値が上昇していた。また、何らかの平衡機能障害が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

Epiphyganが正常聴覚に必要な遺伝子であることを明らかにしたことで、難聴遺伝子の研究の一端として今後社会に役立つ可能性を考えている。また、同じcDNAライブラリから着目したFGF12のノックアウトマウスが平衡覚検査で異常所見を示していることから、めまい疾患のモデルマウスとして今後のめまい研究に役立つ可能性を考えている。

研究成果の概要(英文)：We revealed that Epiphygan knockout mice exhibited an elevated hearing threshold above 16 kHz frequency. This study suggests that Epyc is necessary for normal auditory function. However, no obvious difference in morphology was observed between Epyc KO and WT cochleae. Furthermore, we have revealed that FGF12 (Fibroblast growth factor 12) expression in vestibular and spiral ganglia, and FGF12 knockout mice exhibited increased auditory brainstem response thresholds and deficits in rotarod and balance beam performance tests.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳 聴覚 平衡覚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 新たな難聴遺伝子を特定することを目標とし、私は公開されている cDNA ライブラリから、内耳に特異的に発現しており現時点で難聴や内耳奇形との関連の報告がないものを難聴遺伝子の候補として 12 種類ピックアップした。このうち Epiphycan という遺伝子の mRNA が蝸牛に特異的かつ豊富に発現し、蝸牛コルチ器支持細胞に局在していることをすでに明らかにしていた。さらに詳しく機能を解析するため、私は CRISPR/Cas9 システムを用い Epiphycan ノックアウトマウスを作成した。Epiphycan ノックアウトマウスの蝸牛コルチ器組織切片の H-E 染色ではに明らかな形態異常は認めなかった。Epiphycan の内耳における機能を明らかにするために、Epiphycan ノックアウトマウスを用いた実験系を計画した。

(2) 同じ cDNA ライブラリからピックアップした FGF12 (Fibroblast growth factor 12) についても、その mRNA がラセン神経節・前庭神経節に局在していることより聴覚・前庭覚に重要な働きをしていることが示唆され、Epiphycan と同様の方法でその内耳における機能を明らかにすることとした。

### 2. 研究の目的

内耳に特異的かつ豊富に発現する遺伝子を特定し、ノックアウトマウスを用いてその遺伝子の蝸牛および前庭における機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究には C57BL/6J マウスの雄 7 週齢を使用した。

(1) Epiphycan ノックアウトマウスの内耳形態を野生型マウスと比較した。Phalloidin 染色により有毛細胞の形態を、Neurofilament 染色により神経線維の形態について詳細に観察した。

(2) Epiphycan ノックアウトマウスと野生型マウスの聴覚を聴性脳幹反応検査を用いて測定し、比較した。

(3) FGF12 の In situ hybridization 用の cRNA probe を作成し、野生型マウスの内耳組織切片を用いて In situ hybridization を行い、FGF12 mRNA の内耳における局在を明らかにした。また FGF12 の特異的抗体を用いて免疫染色を行い、FGF12 タンパクの内耳における局在を明らかにした。

(4) CRISPR/Cas9 システムを用い FGF12 ノックアウトマウスを作成した。

(5) FGF12 ノックアウトマウスの内耳形態を H-E 染色・Phalloidin 染色を行って観察し、野生型マウスと比較した。

(6) FGF12 ノックアウトマウスと野生型マウスの聴覚を聴性脳幹反応検査を用いて測定し、比較した。また、平衡覚についても Rota-rod test や Balance beam test を用いて測定し比較した。

### 4. 研究成果

(1) Phalloidin 染色を行い Epiphycan ノックアウトマウスの有毛細胞形態を野生型マウスと比較したが、頂-基底回転まで明らかな違いは認められなかった (図 1)。また、Neurofilament 染色で蝸牛神経線維の形態を比較したが、明らかな違いは認められなかった (図 2)。

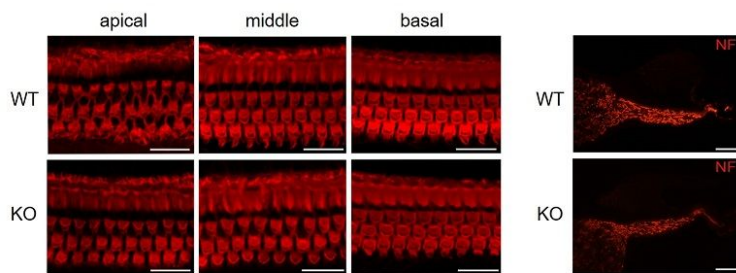


図1 Epiphycanノックアウトマウス(KO)の内耳有毛細胞形態

図2 Epiphycanノックアウトマウス(KO)の蝸牛神経線維形態

(2) 聴性脳幹反応検査を行い、Epiphycan ノックアウトマウスの聴覚を野生型と比較した。16kHz 以上の音域でノックアウトマウスに有意な聴覚閾値上昇を認めた (図 3)。

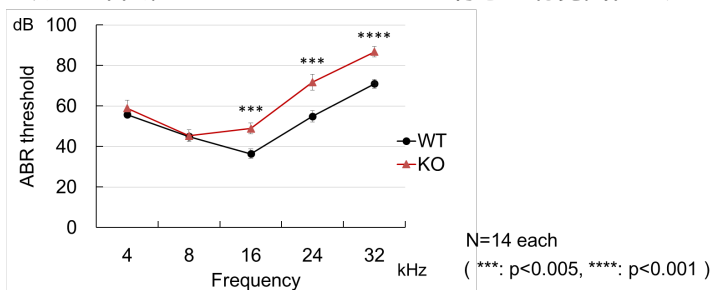


図3 EpiphycanノックアウトマウスのABR(聴性脳幹反応)

N=14 each  
(\*\*\*: p<0.005, \*\*\*\*: p<0.001)

以上の結果より、私は Epiphycan が正常聴覚に重要な働きをしていることを明らかにしたが、ノックアウトマウスの蝸牛形態については明らかな異常を認めず、そのメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

(3) FGF12 の特異的 probe を作成し、野生型マウスの内耳組織切片を用いて In situ hybridization を行った。FGF12 mRNA は前庭神経節およびらせん神経節に発現していた(図4)。また、FGF12 の特異的抗体を用いて免疫染色を行った。FGF12 タンパクは前庭神経節・らせん神経節・有毛細胞直下に至る神経線維に発現していることが明らかとなった(図5)。

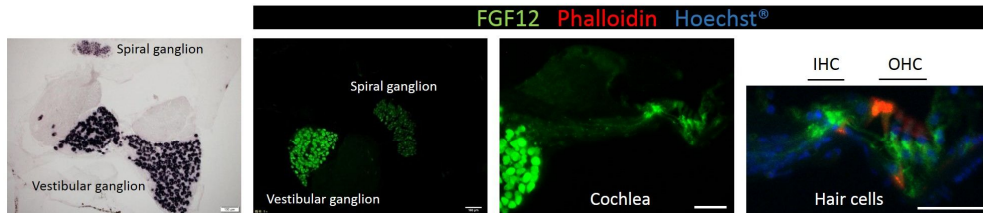


図4 FGF12 内耳組織切片の In situ hybridization 図5 FGF12 内耳組織切片の免疫染色

(4) FGF12 の内耳における機能を明らかにするため、Epiphycan と同様に CRISPR/Cas9 システムを用い FGF12 ノックアウトマウスを作成した。1塩基が欠損した配列のマウスを選択した。Western blotting で内耳における FGF12 タンパクの欠失を確認した(図6)。

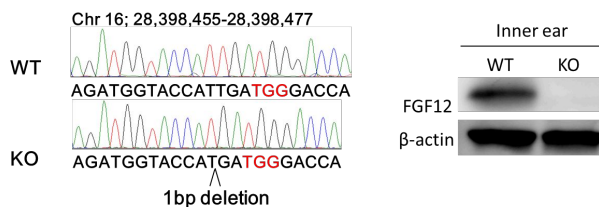


図6 FGF12ノックアウトマウスの作成およびWestern blottingによる確認

(5) FGF12 ノックアウトマウスの内耳形態を H-E 染色・Phalloidin 染色を行って観察した。野生型マウスと比較して蝸牛形態には明らかな違いは認めず、らせん神経節の神経細胞密度も野生型との有意差は認めなかった(図7)。有毛細胞形態も野生型マウスと同様であった(図8)。

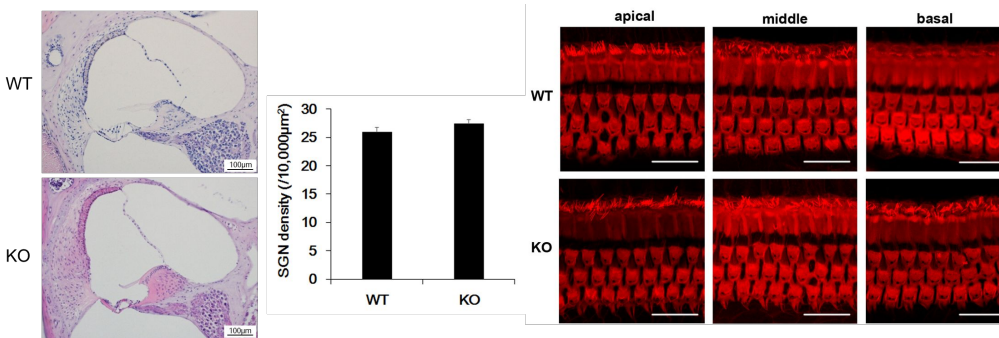


図7 FGF12ノックアウトマウスの蝸牛形態およびらせん神経節密度

図8 FGF12ノックアウトマウスの蝸牛有毛細胞形態

(6) FGF12 ノックアウトマウスと野生型マウスの聴覚を聴性脳幹反応検査を用いて比較したところ、8kHz 以上の音域においてノックアウトマウスの聴覚閾値上昇を認めた(図9)。また、前庭覚に関する行動試験では FGF12 ノックアウトマウスで有意な平衡覚の低下が観察された(図10)。

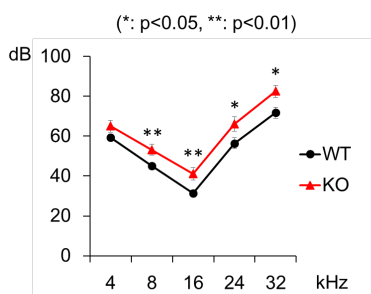


図9 聴性脳幹反応検査(ABR)

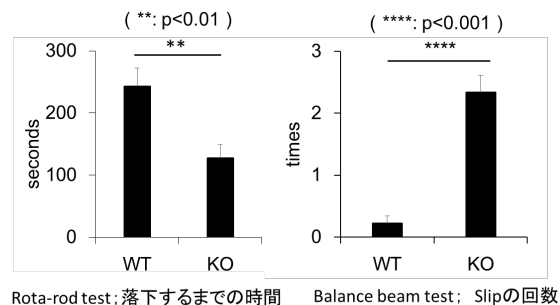


図10 平衡覚に関する行動試験

これらの結果より、FGF12 はらせん神経節・前庭神経節・内耳神経線維に発現しており、FGF12 ノックアウトマウスの機能検査では聴覚閾値上昇および平衡覚低下を示した。以上より FGF12 は正常聴覚および平衡覚において重要な働きをしていることが明らかとなった。その詳細なメカニズムについては今後検討が必要である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

花田 有紀子、中村 雪子、大園 芳之、石田 雄介、滝本 泰光、谷口 学、大畠 和也、小山 佳久、今井 貴夫、森鼻 哲生、近藤 誠、佐藤 崇、猪原 秀典、島田 昌一、Fibroblast growth factor 12 is expressed in spiral and vestibular ganglia and necessary for auditory and equilibrium function、Scientific Reports、査読有、8 巻、2018、11491

DOI: 10.1038/s41598-018-28618-0

花田 有紀子、中村 雪子、石田 雄介、滝本 泰光、谷口 学、大園 芳之、小山 佳久、森鼻 哲生、今井 貴夫、太田 有美、佐藤 崇、猪原 秀典、島田 昌一、Epiphygan is specifically expressed in cochlear supporting cells and is necessary for normal hearing、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、492 巻、2017、379-385

DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.092

〔学会発表〕(計 1 件)

花田 有紀子、Inner ear-enriched transcript Epiphygan is necessary for normal auditory function、Inner Ear Biology Workshop、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。