

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16946
研究課題名（和文）コネキシン26変異難聴モデルマウスにおけるプログラム細胞死の異常と治療法の検討

研究課題名（英文）Abnormality of programmed cell death and treatment in connexin26 mutation deafness model mouse

研究代表者
井下 綾子（INOSHITA, AYAKO）
順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00514762
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：GJB2変異型難聴の病態解明と治療法開発を目的に、GJB2変異型難聴モデルマウスの生後発育段階のコルチ器の組織学的解析を行った。通常はプログラム細胞死により正常コルチ器の立体構造が構築されるが、GJB2の優性変異 R75Wを導入したトランスジェニックマウスでは、プログラム細胞死が遅延し、コルチ器は一時的に過形成になることが示された。CX26-R75Wを発現する培養細胞により、同変異がギャップ結合の生化学的特性への影響が示された（Kamiya et al. 投稿準備中）。本研究マウスの受精卵から個体作出を行い繁殖および遺伝子タイピングによる選抜をし、解析用難聴疾患モデルの作出が進んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GJB2の優性変異R75Wを導入したトランスジェニックマウスの8日齢と12日齢では、正常発達に起こるアポトーシスによるプログラム細胞死が遅延し、一時的にコルチ器が過形成の状態になることが示された。特にコルチ器近傍のGERにおいて顕著で、このためコルチ器の圧排が生じ、有毛細胞の機能低下とコルチトンネルの消失の原因となることが示唆された。以上より、GJB2変異型難聴ではGER領域のプログラム細胞死が遅延しているためコルチ器形成が異常となり、聴覚受容機能の低下の一因となる新たな病態の可能性が示唆された。今後はGER領域の遺伝子発現解析でのCX26-R75W変異による発生への影響を解析予定である。

研究成果の概要（英文）：The greater epithelial ridge (GER) is a developmental structure in the maturation of the organ of Corti. Situated near the inner hair cells of neonatal mice, the GER undergoes a wave of apoptosis after postnatal day 8 (P8). We evaluated the GER at P8 and P12 in human gap junction protein, beta 2, 26 kDa (GJB2) (also known as connexin 26 or CX26). In both non-transgenic (non-Tg) and R75W +mice, some GER cells exhibited apoptotic characteristics at P8. In R75W+mice at P12, apoptotic cells were still clearly evident in the GER. In R75W +mice, therefore, apoptosis in the GER persisted until a later stage of cochlear development. Cultured cells expressing CX26-R75W revealed that the mutation affects the biochemical properties of gap binding (Kamiya et al. in preparation). The fertilized eggs of R75W +mice have been selected by breeding and genotyping to create a model of deafness for analysis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：先天性難聴 コネキシン遺伝子 Gjb2 プログラム細胞死 内耳コルチ器

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は2000人に1人と高頻度でその半数が遺伝性である。そのうちGJB2(コネキシン26)遺伝子変異は日本人で最も高頻度の原因遺伝子で、早期発見と治療方針を決定する上で本質的な発症原因の探求が重要である。しかし、ヒトの内耳では生検や侵襲的な生理学的検査は困難なため、ヒトのGJB2遺伝子変異と等価の動物モデルを我々の研究グループは世界に先駆けgjb2遺伝子の優性阻害効果を示す変異体マウス(Tg)を開発した(Hum Mol Genet. 2003)。

Tgマウス生直後から2週齢までのコルチ器評価を企画した結果、8日齢ですでにコルチトンネル(TC)の消失と外有毛細胞(OHC)の変性を認めた。我々のこれまでの研究において、Tgマウスの蝸牛は、生後の発達障害により早期からコルチ器の細胞骨格異常を認めるために、高度難聴を呈することが実証された。具体的には、8日齢では、コルチトンネルの骨格を形成する、柱細胞内のマイクロチューブリンの形成不良を認めた(Inoshita A, et al. Neuroscience, 2008)。

また以上の結果から新たに、Tgマウスのコルチ器においてGreater epithelial ridge(GER)の過形成が示唆された。通常GERは未熟な内耳組織に存在し、生直後から蝸牛内有毛細胞の更に内側に認められ、成熟後の蝸牛では消失する。GERでは通常、生後6日頃を境に急激なアポトーシスが生じ、蝸牛成熟後に消失する。これまでの我々の一連の結果から、TgマウスではGER内でのアポトーシスの異常が示唆されたことは、非常に興味深いものであった。

そこで、Tgマウスのコルチ器のGERを中心として、更に解明することは極めて必要な研究と考えた。

2. 研究の目的

GJB2遺伝子変異は、日本人で最も高頻度で、かつ高度難聴を呈する先天性難聴の原因遺伝子であるが、本質的な発症原因がまだ不明である。本研究では、GJB2遺伝子変異モデルマウスの内耳の組織学的評価を行い、難聴の原因・病態を把握し治療法を検討することを目的とする。具体的には、GJB2遺伝子変異モデルマウスの内耳コルチ器細胞骨格異常の評価、生直後から成熟期までの内耳発達過程におけるアポトーシスの評価、分子細胞レベルでの難聴治療法の確立である。

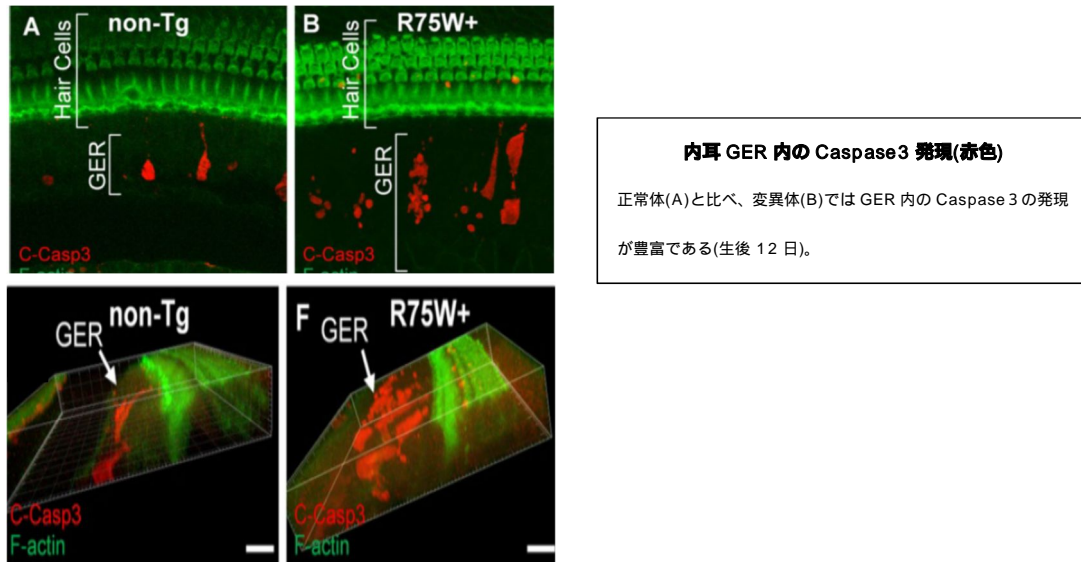
3. 研究の方法

- 1) 透過型電子顕微鏡を用いてGER細胞内のアポトーシスを評価する。
- 2) H-E染色切片を用いてGER内の合計細胞数、GER内のアポトーシス細胞数、GER面積を測定する。
- 3) アポトーシス実行因子である活性型caspase3のGERでの発現を免疫染色で確認する。
- 4) コルチ器三次元構築を薄切連続切片の組織学的観察とコンピュータによる再構築作業で解析する。

4. 研究成果

通常の生後発達の際は、プログラム細胞死によってコルチ器の立体構造が構築されるが、臨床において検出されるGJB2の優性変異R75Wを導入したTgマウスにおいては、8日齢と12日齢を評価した結果、正常発達に起こるアポトーシスによるプログラム細胞死が遅延し、コルチ器は一時的に過形成の状態になることが示された。

この現象は特にコルチ器近傍の GER において顕著にみられ、このことによってコルチ器の圧排が生じ、有毛細胞の機能低下とコルチトンネルの消失の原因となっていることが示唆された。これらの結果は遺伝学専門誌にて報告された。(Inoshita et al., BMC genetics 2014, 15(1):1-8) これらの結果から、*GJB2* 変異型難聴では GER 領域のプログラム細胞死が遅延していることによりコルチ器形成が異常となり、これが聴覚受容機能の低下の一因となる新たな病態の可能性が示唆された。



CX26-R75W を発現する培養細胞により、同変異がギャップ結合の生化学的特性に影響を与えることが示された (Kamiya et al. 投稿準備中)。

本研究にて用いた Tg マウスに関しては、受精卵からの個体作出を行い繁殖および遺伝子タイピングによる選抜を行ない、解析用の難聴疾患モデルの作出が進んでいる。今後の計画としては GER 領域の遺伝子発現解析により CX26-R75W 変異による発生における影響を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoshita A, Kasai T, Matsuoka R, Sata N, Shiroshita N, Kawana F, Kato M, Ikeda K	4. 巻 10(12)
2. 論文標題 Age-stratified sex differences in polysomnographic findings and pharyngeal morphology among children with obstructive sleep apnea.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Thorac Dis.	6. 最初と最後の頁 6702-6710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2018.11.09.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 井下綾子	4. 巻 第32巻第1号
2. 論文標題 OSAへの咽頭手術と口腔筋機能療法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 口腔・咽頭科学会誌	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoshita A, Kasai T, Matsuoka R, Sata N, Shiroshita N, Kawana F, Mato M, Ikeda K	4. 巻 11
2. 論文標題 Sex differences in the development of upper airway morphology: is this the new kid on the block?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis.	6. 最初と最後の頁 2032-2033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2019.08.79.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井下 綾子, 松岡 理奈, 川名 ふさ江, 加藤 光恵, 葛西 隆敏, 池田 勝久
2. 発表標題 閉塞性睡眠時無呼吸症の治療によっててんかん症状が安定した小児症例の検討
3. 学会等名 第43回日本睡眠学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井下 綾子, 佐田 直子, 池田 勝久
2. 発表標題 重度閉塞性睡眠時無呼吸症の治療に苦慮したダウン症児症例
3. 学会等名 第31回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐田 直子, 井下 綾子, 池田 勝久
2. 発表標題 成人重症閉塞性睡眠時無呼吸症の病態的特徴の検討
3. 学会等名 第31回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井下 綾子, 松岡 理奈, 川名 ふさ江, 加藤 光恵, 葛西 隆敏, 池田 勝久
2. 発表標題 小児閉塞性睡眠時無呼吸症の成長段階別性差の検討
3. 学会等名 第14回日本小児耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井下 綾子, 松岡 理奈, 川名 ふさ江, 加藤 光恵, 葛西 隆敏, 池田 勝久
2. 発表標題 小児閉塞性睡眠時無呼吸症の成長段階別性差の検討
3. 学会等名 第44回日本睡眠学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井下 綾子, 佐田 直子, 池田 勝久
2. 発表標題 小兒閉塞性睡眠時無呼吸の診断における終夜経皮的二酸化炭素分圧測定
3. 学会等名 第32回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoshita A, Kasai T, Matsuoka R, Sata N, Shiroshita N, Kawana F, Kato M, Ikeda K
2. 発表標題 Age-stratified sex differences in polysomnographic findings and pharyngeal morphology among children with obstructive sleep apnea.
3. 学会等名 World Sleep 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考