

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2007～2009

課題番号：19791188

研究課題名（和文）：前庭有毛細胞のKCNQ4変異によって前庭平衡機能障害が本当に引き起こされないのか

研究課題名（英文）：Will KCNQ4 mutation in vestibular hair cell affect the vestibular equilibrium system?

研究代表者：近江 永豪（OMI EIGO）

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50375242

## 研究成果の概要（和文）：

分子生物学的実験、組織学的実験準備に当たって、KCNQ4 ノックアウトマウスを作成するために、学外との共同研究の提携を検討した。しかし、ノックアウトマウスを用いる共同研究を拒否された。前庭有毛細胞の活性化伝達に欠かせない $\alpha$ 1D カルシウムに変更し、ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの調達、飼育の準備を始めたが、ノックアウトマウス作成の進行も難航し、予定通りに進まないため、マウスの前庭有毛細胞に加齢によって細胞数の変化、また電気生理学における機能的変化について実験系に変更した。それぞれ年齢別の2群のSAM-P1マウス、Wisterマウスの前庭有毛細胞を対象に、実験を進めた。現段階では、コントロール群の、若年（P7～14）SAMマウスとWisterマウスにおいて、それぞれの $g_{KL}$ カリウムチャンネルにおける電気生理学的機能変化は見られないことが分かった。これからは、対象群の高齢（生後24ヵ月～36ヵ月）SAM-P1マウスとWisterマウスについて進め、検討しているところである。

## 研究成果の概要（英文）：

Collaboration with foreign researcher has been proposed to create KCNQ4 knock-out mouse in order to start the microbiological and immunohistochemical experiments initially. However, the proposal was refused. Knock-out mouse of alpha-1D calcium channel which plays an important role in activation of signal transduction of vestibular hair cell, was then carried out. Unfortunately, good yield could not be obtained as planned. Therefore, without any delayed, an alternative project was shifted to focus on the change in numbers and physiology of vestibular hair cell due to ageing by using SAM-P1 and Wister mice in different age (older and young group respectively). So far, physiologically, the  $g_{KL}$  channel showed no different in between 2 control young groups (P7~P14). Our next step is by using the physiological fact of these control groups will be compared with the old groups (24-month~36-month-old) and this project is still in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉学

キーワード：生理学、神経科学、生体分子

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患による難聴は加齢に伴って急激に進行する。代表的な無症候性常染色体優性遺伝疾患、DFNA2の進行性感音性難聴に関わっていると知られているのはKCNQ4の遺伝子変異である。KCNQ4は内耳の有毛細胞に分布しているMタイプのカリウムチャンネルである。近年KCNQ4ノックアウトマウスを用いて、蝸牛の外有毛細胞における難聴の発生机序について様々な実験がされてきた。KCNQ4変異・欠如の外有毛細胞は慢性的な脱分極化が続くため、長期に渡って衰退し、進行性難聴が引き起こされると言われている。また、前庭のタイプI有毛細胞にもKCNQ4の発現が認められたが、その変異・欠如による前庭症状が見られないと報告されている。しかし、前庭のタイプI有毛細胞のKCNQ4変異・欠如は、なぜ前庭平衡感覚の症状が呈さないのかについて依然と解明されていない。そして、KCNQ4変異・欠如によって本当に前庭平衡機能障害を来さないのかについても細胞レベル、または動物モデルを使って、マクロレベルにおいて未だ証明されていない。

2. 研究の目的

KCNQ4変異・欠如の生後マウスの発達段階における前庭(I, II)有毛細胞の病態変化について検討することが目的である。また、KCNQ4変異・欠如の前庭有毛細胞によって本当に前庭平衡障害が引き起こされるのか。一方、もし引き起こされなければ、その理由は何かについて、KCNQ4ノックアウトマウスを用いて病態を解明し、検討したい。

### 3. 研究の方法

1. 分子生物学的実験、組織学的実験準備に当たって、KCNQ4 ノックアウトマウスを作成することとワイルドタイプマウスの調達、飼育の準備を始め、RT-PCR キット、免疫染色に使用する KCNQ 抗体（プライマー、試薬、試験管、ピペットなど）を購入し、対照用のコントロール DNA の注文とマウス内耳（それぞれ前庭と蝸牛）の対象 DNA を作成する。また、電気生理学の実験に関しては、inverted 顕微鏡、EPC-7 パッチクランプ増幅器、DigiData1200 デジタイザー、ノイズフィルター、pClamp9 解析ソフトとそれ用のパソコン、Origin8 のデータ分析ソフトを備える。

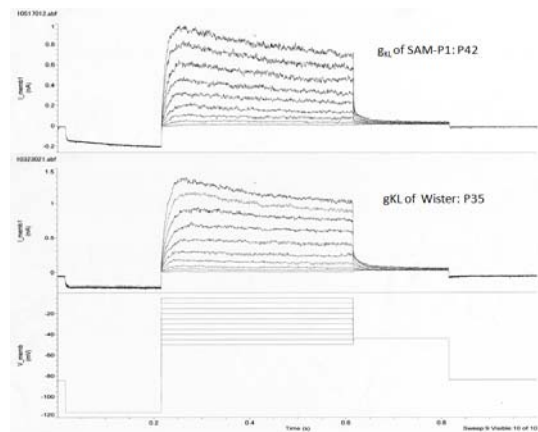
2. それぞれ生後 14 日目、28 日目、16 週目 KCNQ4 ノックアウト及びワイルドタイプマウスを対象にして food deprivation による rail test を用いて平衡感覚機能の評価をする。同様に形態学的変化（KCNQ4 欠如による）を調べるために、immunohistochemistry を用いて、前庭有毛細胞における KCNQ ファミリーの発現を検討する。

3. 続いて、それぞれノックアウト及びワイルドタイプマウス（P14 と P28）の側頭骨を解剖し、内耳の前庭有毛細胞（タイプ I、II）を *in vitro* で全細胞性また細胞膜穿孔性パッチクランプ法にて活性化電流測定定性化と定量化する。KCNQ4 による活動電位の（経時的）変化を測定し、検討する。

4. また、途中研究が計画通りに進まなくなる時に対して、研究方法を分担化にして、まずノックアウトマウスの作成を先に進行させ、常時に KCNQ4（前庭/蝸牛だけでなく、他臓器にも発現されている）に関する文献の引用及び調査をし、KCNQ4 に詳しい国内・国外研究者に相談する。そして、ノックアウトマウス作成成功の検証をした上に、次に前庭有毛細胞の電気生理学的測定を施行する。最後に、マウスの food deprivation による rail test を施行する。

### 4. 研究成果

分子生物学的実験、組織学的実験準備に当たって、KCNQ4 ノックアウトマウスを作成するために、学外（MDC Berlin-Buch、ドイツ）研究者 Thomas Jentsch 氏との共同研究の提携を検討した。しかし、ノックアウトマウスを用いる共同研究を拒否された。そのため、前庭有毛細胞の活性化伝達に欠かせない  $\alpha 1D$  カルシウムに変更し、ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの調達、飼育の準備を始めたが、ノックアウトマウス作成の進行も難航し、予定通りに進まないため、マウスの前庭有毛細胞に加齢によって細胞数の変化、また電気生理学における機能的変化について実験系にあたって、免疫染色に使用する活性化抗体（プライマー、試薬、試験管、ピペットなど）を購入し、年齢別の 2 群の SAM-P1 マウス、Wister マウスを注文し、前庭の有毛細胞を対象に、実験を進めた。現段階では、マウスの前庭有毛細胞に活性化抗体による年齢的变化、有毛細胞数の増減の有無について模索しながら、進行中であるが、コントロール群の、若年（P7~14）SAMマウスとWisterマウスにおいて、それぞれの gKLカリウムチャンネルにおける電気生理学的機能変化は見られない。これからは、対象群の高齢（生後24ヵ月~36ヵ月）SAMマウスとWisterマウスについて進め、検討しているところである。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近江 永豪 (OMI EIGO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 5 0 3 7 5 2 4 2

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: