

平成22年3月31日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20890219
 研究課題名（和文） Gjb2 遺伝子優性阻害変異マウスの発育段階におけるコルチ器の機能と微細構造
 研究課題名（英文） Postnatal Developmental Expression in *Gjb2* Transgenic Mice of the Organ of Corti
 研究代表者
 井下 綾子（INOSHITA AYAKO）
 順天堂大学・医学部・助教
 研究者番号：00514762

研究成果の概要（和文）：

日本人の先天性難聴原因遺伝子の中で最多である *GJB2* 遺伝子変異(コネキシン26)の発症原因の探求を目的とした。*GJB2* 遺伝子変異モデルマウスの聴覚発育段階での内耳の機能・組織学的評価の結果、高度難聴およびコルチ器形成不全を認めた。これらは柱細胞内の microtubules 形成や GER のアポトーシス遅延との関与が判明し、将来的な *GJB2* 遺伝子変異難聴の根本的治療確立に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

A strikingly high proportion of congenital bilateral nonsyndromic sensorineural deafness cases among Japanese have been linked to mutations in the *GJB2* coding for the connexin26. We aimed to evaluate the postnatal development of the organ of Corti in *GJB2* mutations model mice. The mice showed incomplete development of the cochlear pillar cells and delayed apoptosis in GER. The present findings contribute strongly to one of basic remedies for the congenital deafness caused by *Gjb2* mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：*GJB2* 遺伝子変異、コネクシン 26、先天性難聴、コルチ器、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は2,000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*(コネクシン 26) 遺伝子変異は日本人で最も高頻度の原因遺伝子である。*GJB2* 遺伝子変異による先天性難聴の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解明はされていないため、その探求が重要であると考えた。

2. 研究の目的

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て、*gjb2* 遺伝子の優性阻害効果を示す変異体マウス(Tg マウス)を開発し、生後2週、7週齢での評価を行った。しかしながら聴覚の成熟過程での詳細な検討はなされていないためこのマウスの生直後から2週齢までのコルチ器評価を企画した。

3. 研究の方法

マウスを十分に麻酔後、内耳の摘出を行い、組織学的評価(光学顕微鏡、電子顕微鏡、免疫染色)を行った。聴覚が出現する生後11日以降では聴覚機能検査(ABR、DPOAE)を施行した。

4. 研究成果

(1) 聴覚機能検査

ヒトにおいて *GJB2* 遺伝子変異患者は生下

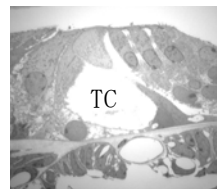
時より高度難聴を呈する。マウスの聴覚は通常生後11日より発現するが、TgマウスのABR、DPOAEでは生後の聴覚発育過程でほとんど反応を認めず、高度難聴を示した。これは、聴覚形成の成熟段階においてすでに、難聴を呈する要因があることが示唆された。

(2) 組織学評価

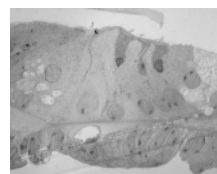
組織学的変化として Tg マウスでは①コルチトンネルの形成不全、②コルチ器高の伸長不全、③GER(greater epithelial ridge, 内側隆起)内のアポトーシス出現の遅延、が特徴的であり以上について詳細に解明した。

① コルチトンネルの形成不全

コルチトンネルは柱細胞の細胞骨格の発達により内・外柱細胞の細胞間の開大が生じ形成される。Tg マウスでは柱細胞内の microtubules の形成不全を認めコルチトンネル形成不全の原因と考えられた。



正常体



Tg マウス

透過電顕(12日齢)

TC: コルチトンネル

② コルチ器高の伸長不全

コルチ器の高さは通常コルチ器の成熟に伴い徐々に増加するが、Tg マウスではコルチトンネル形成不全のため、一定であった。

③ GER 内のアポトーシス出現の遅延

GER とは生直後においてコルチ器支持細胞形成に必要な栄養因子を分泌するエリアで、GER 形成後の生後 5 日頃から通常はアポトーシスが開始し 12 日には終了することが多い。しかし、Tg マウスの GER におけるアポトーシスは生後 8 日より出現し生後 12 日においてもなお存続し、正常体と比してアポトーシスの遅延を示唆した。その結果、Tg マウスでは、GER 面積、GER 全体細胞数、GER 内アポトーシス細胞数において、生後 12 日では有意に高値を示した。

研究結果の重要性:我々はコネクシン 26 が、柱細胞内の microtubules 形成や GER のアポトーシスと関与し、その結果コルチ器形成不全、及び難聴に起因することを世界で初めて示した。今回の我々の結果は、将来的に先天性難聴の根本的治療を確立するために重要であると考えている。

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 3 件)

A. INOSHITA, T. IIZUKA, H. OKAMURA, A. MINEKAWA, K. KOJIMA, M. FURUKAWA, T.

KUSUNOKI, K. IKEDA, Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *GJB2* transgenic mice, *Neuroscience* 156 (2008) 1039-1047.

A. MINEKAWA, T. ABE, A. INOSHITA, T. IIZUKA, S. KAKEHATA, Y. NARUI, T. KOIKE, K. KAMIYA, H. OKAMURA, H. SHINKAWA, K. IKEDA, Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission, *Neuroscience* 164 (2009) 1312-1319.

[学会発表] (計 4 件)

井下綾子、*Gjb2* 遺伝子優性阻害変異マウスの発育段階におけるコルチ器の構造と微細構造、第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会、2008 年 5 月、大阪

井下綾子、*Gjb2* 遺伝子優性阻害変異マウスの発育段階におけるコルチ器の構造と微細構造、第 18 回日本耳科学会総会、2008 年 10 月、神戸

Ayako Inoshita, Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *GJB2* transgenic mice, 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2009 年 2 月, アメリカ, フェニックス

Ayako Inoshita, Postnatal apoptosis of GER in dominant-negative *Gjb2* transgenic mice, 7th Molecular Biology of Hearing and

Deafness, 2009年6月, アメリカ, ボストン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井下 綾子 (INOSHITA AYAKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 00514762

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし