

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791648

研究課題名（和文） GJB2 遺伝子優性阻害変異マウスの生後発育段階における外有毛細胞の細胞機能評価

研究課題名（英文） Functional analysis of cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse.

研究代表者

成井 裕弥（NARUI YUYA）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60453578

研究成果の概要（和文）：

マウスの聴覚の生後の成熟段階での gap 結合に障害に基づくコルチ器支持細胞の変性とそれに付随する二次的な外有毛細胞の変性の詳細な検討は未だなされていない。本研究では、この遺伝性難聴マウスモデルの発育過程での外有毛細胞の細胞機能を評価することを目的とした。ヒトで証明された優性的阻害効果を持つミスセンス変異 R75W を CAG プロモーターに組み込み、各組織で変異 connexin26 を発現させるようにした。同マウスは PCR 法による変異遺伝子同定に加え、導入遺伝子で同時発現する緑色蛍光遺伝子 GFP の発現を口腔や鼻腔内へ GFP 傾向観察用 LED ライト照射により検出、又は採取した尾部を蛍光顕微鏡で観察することによりトランスジェニックマウスを同定する新たな選抜法が作られた（研究協力：神谷和作）。聴覚機能解析については、ABR および別途我々のグループで開発したマウスの歪成分耳音響放射（DPOAE）専用測定機器を用いて確認した。これまでの実験施設では建築物由来の電氣的ノイズの影響が大きく、正確な ABR および DPOAE が測定できなかったため、新たに他の研究棟の実験動物施設内に電気シールドを搭載した防音室を建設した。現在機材の再構築を行いトランスジェニックマウスによる解析を進めており ABR でのノイズは大きく減少した。現在 DPOAE 設備を再構築し幼若マウスでの正確な解析を可能にする測定環境の調整を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) have been used to examine the development of hearing in the rat and gerbil. However, no reports of DPOAE measurement from the onset of hearing in mice are available. Commercially-available components were assembled and adapted to provide a suitable probe microphone and sound delivery system for measuring DPOAE in developing C57BL/6J mice. Furthermore, DPOAE data were compared with the findings of the auditory brainstem response (ABR). DPOAEs were obtained at 8 kHz from 11 days after birth, 20 kHz from 12 days, and 30 kHz from 13 days. Adult-like patterns of DPOAE were obtained 21 days at 8 and 20 kHz, and 28 days at 30 kHz. On the other hand, the ABR thresholds at 12 to 36 kHz appeared between 11 and 12 days and were saturated at 14 days. Based on these data, the onset of measureable DPOAEs in the mouse were earlier than in the rat and gerbil. The maturation of DPOAE in the mouse begins at a lower frequency in the high frequency range. In addition, the ABR threshold reached maturation earlier than DPOAE.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000円	600,000円	2,600,000円
2010年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

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・優性阻害効果・マウス変異体・歪成分耳音響放射・外有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

聴覚医学への分子生物学と分子遺伝学の応用は最先端の話題である。最近のヒトの研究結果から、原因不明の先天性難聴の半数以上が難聴遺伝子の異常によって発症していることが判明した。遺伝子変異による難聴の本質的な発症原因の探求にはヒトの病態と類似した動物モデルを開発することが必須である。我々の研究グループは世界に先駆けて開発した *gjb2* 遺伝子の優性阻害効果を示す変異体を作製し、gap 結合の障害により蝸牛のコルチ器のイオン環境の変化に基づく二次的な外有毛細胞の変性が難聴の原因であることを明らかにした (Hum Mol Genet 12:995-10904, 2003)。しかしながら、マウスの聴覚の生後の成熟段階での gap 結合に障害に基づくコルチ器支持細胞の変性とそれに付随する二次的な外有毛細胞の変性の詳細な検討は未だなされていないのが現況である。そこでこの遺伝性難聴マウスモデルの発育過程での外有毛細胞の細胞機能を評価することを企画した。

2. 研究の目的

内耳を直接生検することや侵襲的な生理学的検査は困難であり、有用な動物モデルの開発は発症機序の解明や根本的治療の確立に

極めて重要である。そこで優性阻害効果による *gjb2* 遺伝子優性遺伝マウス (Hum Mol Genet 12:995-10904, 2003) を確立することができた。今回の研究の学術的な特色は、高度な遺伝子技術を駆使した遺伝子改変法によってヒトで証明された *GJB2* 遺伝子変異をマウスに移入し、ヒトの *GJB2* 遺伝子変異に等価の動物モデルを確立し、難聴発症の機序の分子メカニズムを解明することである。従来のマウスの DPOAE 計測においてはヒトに使用する機器をそのまま使用しているが、ヒトとマウスでは外耳道径や可聴域に大きな違いがあるため、本研究ではマウスに特化した計測装置を独自に開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 歪成分耳音響放射 (DPOAE) の計測

マウス専用の DPOAE 測定機器の開発には以下を含む。

- ・マウスの外耳道に使用できるサイズのアタッチメントの開発
- ・マウスの可聴域に合わせた音の入出力装置の構成
- ・音の入力後のコンピューターによる解析を行うシステムの構成及びプログラミング

2. 細胞膜電位感受性蛍光物質によるコルチ器細胞の活性の評価

摘出コルチ器へ膜感受性蛍光物質(FM1-43)の負荷後、蛍光顕微鏡にて、蛍光強度を測定し、支持細胞と内・外有毛細胞の細胞活性を評価する。

3. 外有毛細胞の収縮能の測定

Gjb2KOマウスを深麻酔下に断頭し側頭骨より Corti 器を摘出する。OHC は酵素処理後 Corti 器から単離する。patch clamp software は jClamp を使い、パッチクランプ法 whole-cell mode で運動能 (prestin-dependent motility) と、運動能の源泉であるモータータンパクの conformational change を反映する capacitance を測定する。

prestin-dependent motility は、CCD カメラ (Hamamatsu) にてとりみ取り込みデジタル録画したものを、画像解析ソフト DIAS (Soll Technologies) を用いて細胞長を経時的に自動測定する。また、capacitance は two sine voltage stimulus protocol にて測定する。細胞外液、内液は ionic blocking solution とし、浸透圧は glucose で調整する (研究協力: 弘前大学欠畑誠治)。

4. 研究成果

我々の研究グループが作製した gjb2 遺伝子の優性阻害効果を示すマウス変異体 (R75W トランスジェニックマウス) では、コルチ器の形成時期より成熟障害を認めていた。外有毛細胞の細胞活性をマウスの歪成分耳音響放射 (DPOAE) 専用測定機器を開発して確認することができた。従来のマウスの耳音響放射 (DPOAE) 計測においてはヒトに使用する機器をそのまま使用しているが、ヒトとマウスでは外耳道径や可聴域に大きな違いがあるため、マウスに特化した計測装置を独自に開発し外有毛細胞の細胞活性を確認することができた。R75W トランスジェニックマウスに

おいては生後どの周波数においても歪耳音響放射 (DPOAE) の反応が確認されなかった。また外有毛細胞の収縮蛋白であるプレスティン免疫組織学的に検討し、R75W トランスジェニックマウスの外有毛細胞の外側壁に野生型と同様のプレスティンの存在が認められた。また同時に、マウスの蝸牛から外有毛細胞を分離・単離してパッチクランプ法を用いて、その収縮能を in vitro 下で検討しているが、電気的運動性にも R75W トランスジェニックおよびノントランスジェニックマウスに成長変化の差は認められなかった。同変異に起因する難聴では個々の外有毛細胞の運動能には障害はなく、組織構築の異常が歪耳音響放射を阻害していることが示唆された。

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 2 件)

1. Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, Ikeda K. Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice. *Int J Audiol.* 2009 48(8):576-81
2. Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura HO, Shinkawa H, Ikeda K. Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission. *Neuroscience* 164:1312-1319, 2009

[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

成井 裕弥 (NARUI YUYA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60453578