

機関番号：3 2 6 2 0
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2009～2010
課題番号：2 1 8 9 0 2 5 1

研究課題名（和文）ギャップ結合分子の変異体での外有毛細胞の収縮能と歪耳音響放射の解離の機序

研究課題名（英文）

Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission.

研究代表者

峯川 明 (MINEKAWA AKIRA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：4 0 5 4 9 2 8 4

研究成果の概要（和文）：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チンを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チ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。これまでの実験施設では建築物由来の電気的ノイズの影響が大きく、正確な 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マウス聴覚生理の改良を進めており聴性脳幹反応（ABR）での電気的ノイズは大きく減少した。さらに DPOAE 設備を再構築し上記トランスジェニックマウスでの正確な聴覚機能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）：

Mutations in the connexin26 gene (GJB2) are the most common genetic cause of congenital bilateral non-syndromic sensorineural hearing loss. Transgenic mice were established carrying human Cx26 with the R75W mutation that was identified in a deaf family with autosomal dominant negative inheritance [Kudo T et al. (2003) Hum Mol Genet 12:995-1004]. A dominant-negative Gjb2 R75W transgenic mouse model shows incomplete development of the cochlear supporting cells, resulting in profound deafness from birth [Inoshita A et al. (2008) Neuroscience 156:1039-1047]. The Cx26 defect in the Gjb2 R75W transgenic mouse is restricted to the supporting cells; it is unclear why the auditory response is severely disturbed in spite of the presence of outer hair cells (OHCs). The present study was designed to evaluate developmental changes in the *in vivo* and *in vitro* function of the OHC, and the fine structure of the OHC and adjacent supporting cells in the R75W transgenic mouse. No detectable distortion product otoacoustic emissions were observed at any frequencies in R75W transgenic mice throughout development. A characteristic phenotype observed in these mice was the absence of the tunnel of Corti, Nuel's space, and spaces

surrounding the OHC; the OHC were compressed and squeezed by the surrounding supporting cells. On the other hand, the OHC developed normally. Structural features of the lateral wall, such as the membrane-bound subsurface cisterna beneath the plasma membrane, were intact. Prestin, the voltage-dependent motor protein, was observed by immunohistochemistry in the OHC basolateral membranes of both transgenic and non-transgenic mice. No significant differences in electromotility of isolated OHCs during development was observed between transgenic and control mice. The present study indicates that normal development of the supporting cells is indispensable for proper cellular function of the OHC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000円	315,000円	1,365,000円
2010年度	950,000円	280,000円	1,230,000円
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000円	595,000円	2,595,000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・外有毛細胞・耳音響反射 (DPOAE) ・プレスチン・パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

先天聾は1000出生に1人の頻度に発生し、その半数が遺伝性的原因である。我々は日本人において*GJB2*遺伝子変異が先天聾の20～30%を占めていることを明らかにした (*Am J Med Genet* 90:141-145, 2000)。

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、

マウスに特化した計測装置を独自に開発する。また*gjb2*遺伝子異常でこれまで解析されていなかった外有毛細胞の収縮能を*in vitro*で検討し、画期的な研究成果がきたいできる。本研究は*gjb2*遺伝性難聴の分子病態・機序を直接に解明する突破口を切り開き、画期的な技術を駆使している。これらの画期的な企画はこれまで全く創造されていない極めて独創性の高い研究である。この技術が臨床に適用されると、聴覚医学に新しい局面を迎えることができる。難聴に悩み、苦しむ数百万人の患者への大きな福音となり、国民生活の質的向上をもたらす極めて有意義な研究である。

2. 研究の目的

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支持細胞の障

害と二次的な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)。さらに、支持細胞の障害は出生後の発達不全が要因であることも明らかにした (Neuroscience 156:1039-1047, 2008) 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。

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. 外有毛細胞の収縮蛋白プレスチンの免疫染色

内耳組織のホールマウントおよびパラフィン切片のプレスチン抗体染色を行い共焦点顕微鏡にて解析および立体構築。電子顕微鏡の観察と伴に収縮能に関して構造学的知見を得る。

3. 外有毛細胞の収縮能の測定

Gjb2 変異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 を用い、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 (Sol1 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。

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チンを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チ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 6 件)

1. Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saitoh T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K. Bacteriology of recurrent exacerbation of postoperative course in chronic rhinosinusitis in relation to asthma Auris Nasus Larynx

- 査読有
Epub ahead of print、2011、1312-1319
2. Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saitoh T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K.
Relationship between olfactory acuity and peak expiratory flow during postoperative follow-up in chronic rhinosinusitis associated with asthma
Ann Otol Rhinol Laryngol
査読有、119(11)、2010、576-581
3. Ikeda K, Sakai Y, Haruyama T, Misawa N, Misawa N, Hori S, Kusunoki T, Furukawa M, Yokoi H, Yokoi N, Ichihari Y, Kawano K, Matsumoto F, Hayashi C, Narui Y, Iizuka T, Ito S, Inoshita A, Kasai M, Saito T, Minekawa A, Oba S, Cho Y.
Bacterial contamination of multiple-use atomizers commonly used in Japan.
Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 61:193-196, 2009
査読有
4. 眼症状をきたした副鼻腔真菌症
廣津幹夫, 池田勝久, 楠威志, 加瀬香, 峯川明
耳鼻咽喉科臨床(0032-6313)補冊
124Page113(2009.06)査読無
5. 当科における内視鏡下副鼻腔ナビゲーション手術の検討
加瀬香, 廣津幹夫, 峯川明, 楠威志, 池田勝久
耳鼻咽喉科臨床(0032-6313)補冊
124Page80(2009.06)査読有
6. PVDF フィルムを用いた内視鏡下副鼻腔手術における眼球動作の計測および臨床応用
峯川明, 加瀬香, 池田勝久
耳鼻咽喉科臨床(0032-6313)補冊
124Page78(2009.06)査読無
7. 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
8. 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

峯川 明 (MINEKAWA AKIRA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 40549284