

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20207

研究課題名(和文)内耳聴覚・平衡機能におけるIDOの働き

研究課題名(英文)Function of IDO in adult mice inner ear

研究代表者

花田 有紀子(Hanada, Yukiko)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70734044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はcDNAライブラリの検索により着目したEpiphycanという遺伝子がIDOよりも内耳に豊富かつ特異的に発現していることを明らかにし、この遺伝子について内耳での働きを検討することにした。EpiphycanのmRNAは他の組織に比べ内耳に豊富かつ特異的であり、蝸牛組織の支持細胞に局在していた。ノックアウトマウスを作成したところ、野生型マウスに比べて中音域から高音域にかけて聴力閾値が上昇していた。ノックアウトマウスにおいて明らかな組織学的な相違は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：By analysing one of published cDNA library about inner ear, we focused on Epiphycan as enriched transcript in mice inner ear. We revealed Epiphycan mRNA was expressed more abundant and more specific in adult mice inner ear than IDO, that we focused on at first. Quantitative RT real-time PCR revealed that Epiphycan mRNA expression level was highest in the inner ear compared to another tissue. In situ hybridization revealed that Epiphycan mRNA were localized in supporting cells, inner sulcus cells and outer sulcus cells in adult mice inner ear. We generated Epiphycan knockout mice and determined that hearing thresholds of knockout mice were higher at the medium and high tone than those of wild type control mice. Epiphycan knockout mice cochlea seemed to have normal morphology.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：聴覚

## 1. 研究開始当初の背景

(1)最近になり、cDNA ライブラリ内の情報から新たな難聴遺伝子が発見されている。私は内耳に特異的かつ豊富に発現している遺伝子が先天性難聴の原因ではないかと考えた。公開されている内耳 cDNA ライブラリを検索し、IDO に着目してその内耳における機能を明らかにすることを目標とした。

(2)IDO の内耳における局在を検討した結果、同じ cDNA ライブラリから着目した Epiphycan がより内耳に豊富かつ特異的に発現していることが分かった。そのため、Epiphycan のノックアウトマウスを作成しその内耳における働きを検討する方針とした。

## 2. 研究の目的

内耳に特異的に発現する遺伝子を同定し、その内耳における局在を明らかにする。ノックアウトマウスを用いてその遺伝子の聴覚発達および維持における働きを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)公開されている内耳 cDNA ライブラリ (RIKEN full-length enriched, adult inner ear cDNA library) から複数の遺伝子をピックアップし、マウス内耳 cDNA を用いた Reverse transcription PCR でそれらの遺伝子が内耳に発現しているかを確認した。実験には C57BL/6J 系統の 7 週齢の雄マウスを使用した。

(2)遺伝子それぞれについて in situ hybridization 用の probe を作成した。野生型マウスの内耳組織切片を用いて in situ hybridization を行い、内耳組織に特異的かつ豊富に発現する遺伝子を複数見出し、さらなる検討を行う対象とした。

(3)Epiphycan が最も内耳組織に特異的に発現していたため、定量 PCR を用いて他組織における発現量との比較を行った。また、内耳障害モデルマウスから採取した cDNA を用いて定量 PCR を行い、カナマイシンおよびフロセミドの投与による内耳障害後の mRNA 発現量の変化を検討した。

(4)CRIPSR/Cas9 法を用いて Epiphycan ノックアウトマウスを作成した。その聴覚機能を聴性脳幹反応検査で検討した。内耳凍結切片を作製し H-E 染色を行うことで、ノックアウトマウスと野生型マウスの組織形態を比較した。

## 4. 研究成果

(1)cDNA ライブラリの検索から 13 種類の候補遺伝子をピックアップした。それぞれの遺伝子について野生型マウス内耳 cDNA を用い

た Reverse transcription PCR を行い、すべての候補遺伝子が内耳に発現していることを確認した。

(2)13 種類の遺伝子について probe を作成し、野生型マウス内耳組織切片を用いて in situ hybridization を行った。その結果、IDO は内耳組織での発現および局在を確認することができなかった。Epiphycan はコルチ器支持細胞・内らせん溝細胞・外らせん溝細胞・root cell に強く発現していた。有毛細胞や血管条、らせん神経節には発現は認められなかった。

幼若マウスの内耳組織を用いて in situ hybridization を行い、幼若マウスにおいても成年マウスと同様の部位に局在していることを明らかにした。

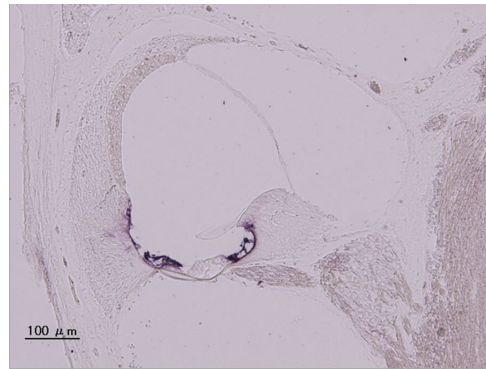


図1 In situ hybridization (Epiphycan, antisense probe) (7週野生型マウス)

(3)定量 PCR を用いて Epiphycan の内耳と他組織での発現量を比較した結果、Epiphycan は蝸牛に特異的かつ豊富に発現していることを明らかにした。蝸牛の他には精巢および骨に発現を認めたが、蝸牛と比較すると発現量は少なかった。前庭神経節にはほとんど発現を認めなかった。また、カナマイシンおよびフロセミドの単回投与で内耳障害を与えたマウスの内耳 cDNA を用いて定量 PCR を行った。その結果、内耳障害後に蝸牛における Epiphycan mRNA の発現量が 2 倍以上に上昇することを明らかにした。

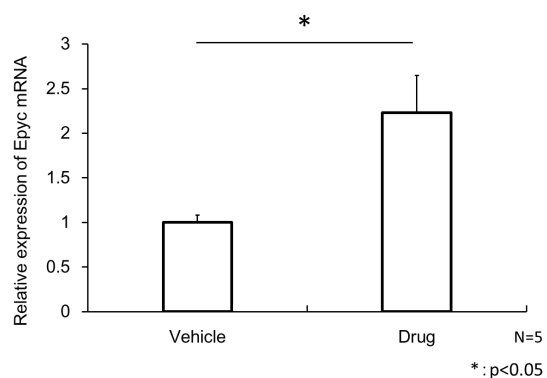


図2 内耳障害後の Epyc mRNA 発現量の変化

(4)NPO 法人発生工学研究会に依頼し、CRISPR/Cas9 system を用いて Epiphycan ノックアウトマウスを作成した。Epiphycan の Exon4 において 2 塩基が欠損しているマウスを選択し、継代によりホモノックアウトマウスを確立した(図3)。ウエスタンブロッティング法により、ノックアウトマウスの内耳組織で Epiphycan タンパクが発現していないことを確認した(図4)。Epiphycan ノックアウトマウスの聴覚機能を聴性脳幹反応検査を用いて測定したところ、16kHz、24kHz および 32kHz で野生型マウスに比べて聴覚閾値が上昇していることがわかった(図5)。

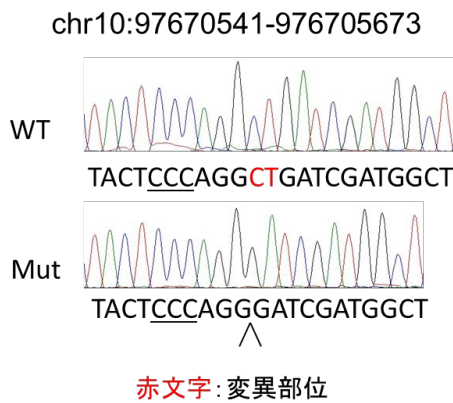


図3 遺伝子変異マウスの塩基配列

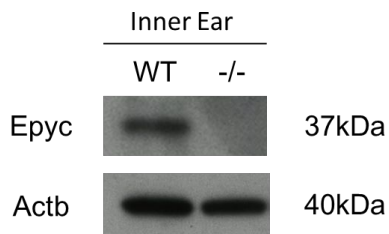


図4 ウエスタンブロッティング

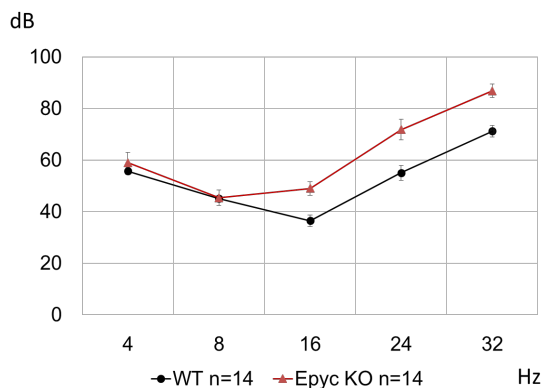


図5 聴性脳幹反応検査(ABR)

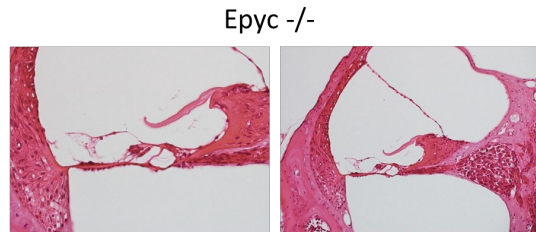
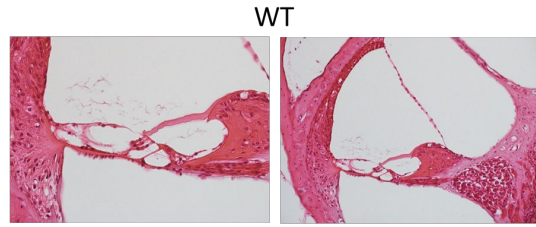


図6 蝸牛組織切片 H-E染色

また、私はノックアウトマウスの組織切片を作製し H-E 染色を行って形態を観察し、野生型マウスと比較した(図6)。その結果、ノックアウトマウスと野生型マウスの組織形態に明らかな相違は認められなかった。

本研究で Epiphycan の欠失が難聴を引き起こすことが確認できたが、そのメカニズムについては、さらなる検討が必要であると考え

#### 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

花田 有紀子 (HANADA, Yukiko)

大阪大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭  
頸部外科 医員

研究者番号：70734044

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )