

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390454

研究課題名（和文）In vivo patch 法による prestin 導入再生内耳の直接的機能解析

研究課題名（英文）Direct functional analysis of prestin transfected inner ear using in vivo patch method

研究代表者

欠畑 誠治 (KAKEHATA SEIJI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90261619

研究成果の概要：C57BL/6J マウス内耳外有毛細胞(OHC)における prestin 発現様式は、発達段階早期に OHC 細胞膜に発現してから maturation とともに機能を獲得するという、これまでラットなどで知られていたものとは全く異なる、新しい様式であることがわかった。また、正常聴力獲得のために必要な prestin 電荷密度は $9,400 e^-/\mu m^2$ 以上であることが示唆された。

Gjb2 優性ネガティブ変異遺伝子改変マウスにおいても同様の発現様式であることが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2007年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：内耳再生、コルチ器、外有毛細胞、prestín、運動能、パッチクランプ法、キャパシタンス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における極めて鋭敏な音受容機構は、内耳における外有毛細胞 (OHC) 運動能がもたらす“蝸牛増幅機構”によっている。OHC 運動能は、その細胞側壁に存在する prestin の変形によることが解明されつつある。内耳再生医療のメインターゲットは最も受傷性の高い OHC 運動能の回復である。

再生された OHC が“蝸牛増幅機構”に及ぼす質的効果については全く検討され

ていない。

2. 研究の目的

直接 prestin 遺伝子 Pres の形質導入したコルチ器細胞、特に prestin 高発現 OHC を用いて再生医療への応用のための機能的検討を行うことを目的としている。

そのために、遺伝子改変モデル動物として最も用いられている動物種であるマウスに

おける prestin 発現様式を解析し正常聴力に必要な prestin 発現量を推定する必要がある。さらに Dynamic Image Analysis System (DIAS) を用いて細胞形態の経時的変化を詳細に解析する。

3. 研究の方法

マウス OHC の prestin 発現量・運動能の計測

生後 5 日目 (P5) から生後 18 日目 (P18) までの C57BL/6J マウス、P9 から P18 までの *Gjb2* 優性ネガティブ変異遺伝子改変マウス (R75W+) 及び non-transgenic マウスより、OHC を単離しパッチクランプ法にて膜容量、nonlinear capacitance (NLC), linear capacitance および prestin 電荷密度を測定する。

DIAS を用いて P16 での運動能を計測する。

発達に伴う prestin mRNA の発現量の解析

生後 5 日目 (P5) から生後 18 日目 (P18) までの C57BL/6J マウスの頂回転より蝸牛を取り出し、1mg/ml の trypsin で 10 15 分間 (室温) 酵素処理した後、急性単離する。

発達に伴う prestin mRNA の発現量を評価するために P5 から P18 のコルチ器を用いて two step の RT-quantitative PCR (QPCR) を行う。PCR 条件は 94 (30 秒) 60 (30 秒) 72 (1 分) で、primer は prestin : TGGGGTCAAACAAAGCGGGCAAACCAAAAACCATCAGG C および GAPDH : AGGTCGGTGTGAACGGATTTC、TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA を使用する。増幅の特異性は melting curve の解析と電気泳動によって確認し、データは GAPDH との相対発現量で評価する。

4. 研究成果

(1) C57BL/6J マウス OHC の prestin 発現量の計測

P5 から P18 までの OHC を用いて、パッチクランプ法にて膜容量の変化と prestin 電荷密度を測定した。Prestin は P6 より発現しその電荷密度は P18 でプラトーに達し、 $10,956 e^- / m^2$ であることが昨年度の研究でわかっていた。OHC の運動能を反映する DPOAE を測定したところ、P11 以降で反応が見られ P14 で mature level に達すること、聴性脳幹反応 (ABR) においても P14 で mature level に達することから、正常聴力獲得のために必要な prestin 電荷密度は P14 における $9,400 e^- / m^2$ 以上であることが示唆された。この値が、機能再生のための目標値となる。

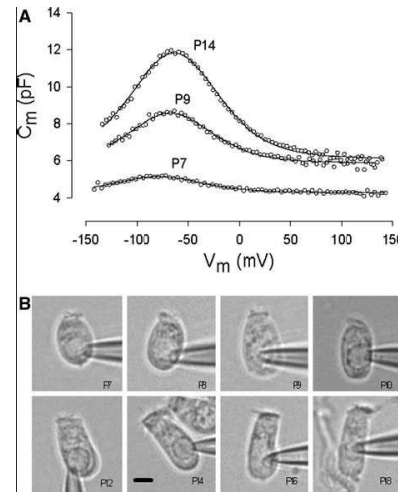


図 1

NLC は p7 以降急速に増大する。

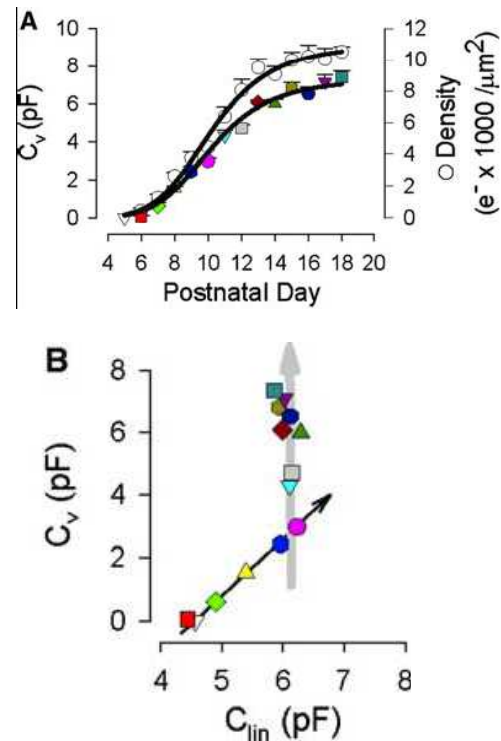


図 2

Prestin 電荷密度は p18 でプラトーに達する。Clin は p10 以降不変である。

(2) C57BL/6J マウス OHC の発達に伴う prestin mRNA の発現量の解析

P5、P8、P10、P15 の4点での結果ではP10にRNAの発現のピークがあることが示唆された(図3)。

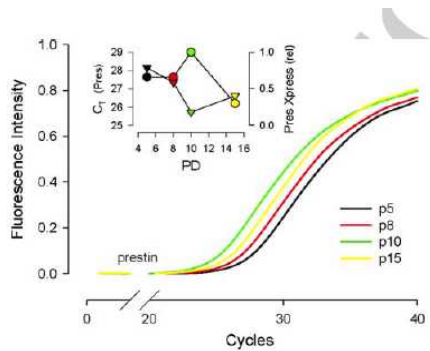


図3

Prestin mRNA の経時的発現量の変化
(P5、P8、P10、P15)

(3) *Gjb2* 優性ネガティブ変異遺伝子改変マウス (R75W +) 及び non-transgenic マウス OHC の prestin 発現量の計測

P9 から P18 までの OHC を用いて、パッチクランプ法にて膜容量, nonlinear capacitance (NLC), linear capacitance を測定した。Prestin は P9 ですでに発現しており、その電荷密度は P18 でプラトーに達した。R75W + 及び non-transgenic マウスで prestin 発現様式に有意な差は認められず、C57BL/6J マウス OHC での発現様式と同一であった。また、R75W+ 及び non-transgenic マウス共に免疫染色にて OHC 膜上に prestin が同程度に染色された。さらに DIAS を用いて P16 での運動能を計測した。細胞長変化は電位依存性であり、最大変化率は 3.85% であった。このことから、われわれの仮説が確認されたと同時に、prest in の発現様式は *Gjb2* 優性ネガティブ変異遺伝子改変によって影響を受けないことが示された。

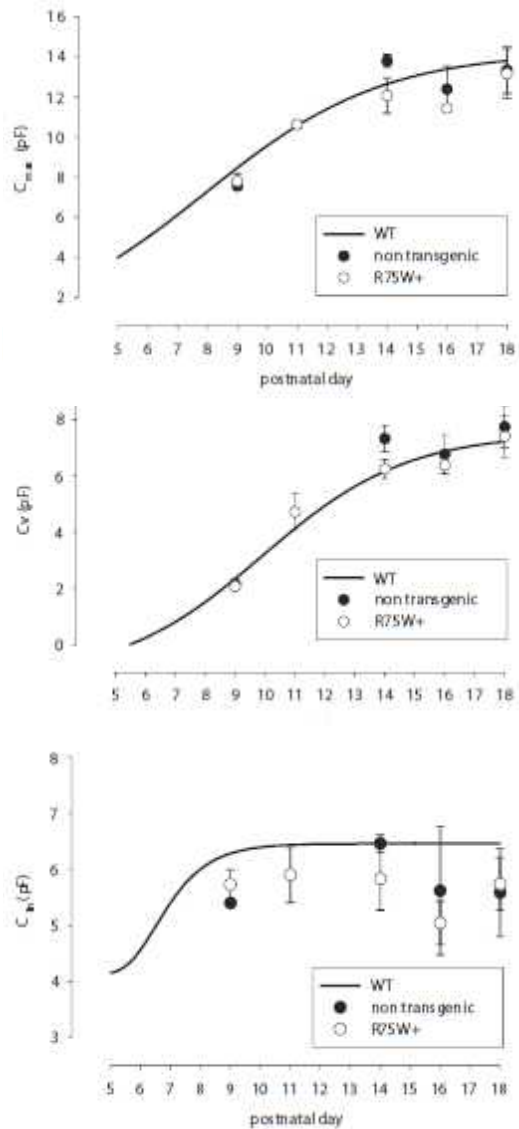


図4

R75W + 及び non-transgenic マウスにおける膜容量, NLC, LC の変化

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)

Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura H, Shinkawa H, Ikeda K. Cochlear Outer Hair Cells in a Dominant-Negative Connexin26 Mutant Mouse Preserved Non-Linear Capacitance in spite of Impaired Distortion Product Otoacoustic Emission. *Neuroscience*, *in press*. 査読有

Abe T, Takehata S, Kitani R, Maruya SI, Navaratnam D, Santos-Sacchi J, Shinkawa H. (corresponding author) Developmental expression of the outer hair cell motor, prestin, in the mouse. J Membr Biol 215: 49-56, 2007. 査読有

He DZ, Zheng J, Kalinec F, Takehata S, Santos-Sacchi J. Tuning in to the amazing outer hair cell: membrane wizardry with a twist and shout. J Membr Biol, 209(2-3):119-34. 2006. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

Abe T, Takehata S et al, Developmental Expression of the Outer Hair Cell Capacitance in a Dominant-Negative Connexin26 Mutant Mouse. 32nd MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, MD, USA, 2009.2.14-20

Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Takehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura H, Shinkawa H, Ikeda K. Cochlear Outer Hair Cells in a Dominant-Negative Connexin26 Mutant Mouse Preserved Non-Linear Capacitance in spite of Impaired Distortion Product Otoacoustic Emission. 32nd MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, MD, USA, 2009.2.14-20

阿部尚央、欠畑誠治他、Gjb2 変異マウスにおける蝸牛外有毛細胞の運動能の解析、第18回日本耳科学会総会学術講演会、2008年10月16日、神戸

峯川、阿部尚央、欠畑誠治他、幼若期のGjb2変異マウスの歪耳音響放射の測定および外有毛細胞の機能評価について、第18回日本耳科学会総会学術講演会、2008年10月16日、神戸

Kitani R, Takehata S, Murakoshi M, Wada H, Maruya S, Abe T, Shinkawa H: The Direct Effects of Cholesterol and M_{cd} On Outer Hair Cell Motility and Capacitance. 31st MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Phoenix, Arizona, USA, 2008.2.19-21

Kitani R, Takehata S, Murakoshi M, Wada

H, Shinkawa H: The direct effects of cholesterol on outer hair cell motility, The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics-Audition and Vision, Shanghai, China, 2006.11.3-7

Kitani R, Takehata S, Murakoshi M, Wada H, Abe T, Shinkawa H: The effects of cholesterol on outer hair cell motility, INNER EAR BIOLOGY Workshop, Montpellier, France, 2006.9.17-20

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

欠畑 誠治 (KAKEHATA SEIJI)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90261619

(2)研究分担者

上野 伸哉 (UENO SHINYA)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00312158

丸屋 信一郎 (MARUYA SHIN-ICHIRO)

国際医療福祉大学・大学病院・講師

研究者番号：90396408

南場 淳司 (NAMBA ATSUSHI)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50361027

木谷 令 (KITANI REI)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80436047

(3)連携研究者