

平成 21 年 6 月 30 日現在

研究種目：萌芽研究  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19659441  
 研究課題名（和文）難聴遺伝子改変技術を利用したコルチ器の三次元構築の分子基盤の解明  
 研究課題名（英文）Molecular basis of three-dimensional structure resolution using transgenic technology of deafness gene

研究代表者  
 池田 勝久（IKEDA KATUHISA）  
 順天堂大学・医学部・教授  
 研究者番号：70159614

## 研究成果の概要：

先天聾は1000出生に1人の頻度に発生し、その半数が遺伝性の原因であり、日本人において *GJB2* 遺伝子変異が重要であることが知られている。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。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、変異コネキシン 26 マウスを作成した。聴性脳幹反応検査ならびに蝸牛の組織学的検討から *Gjb2* 優性阻害変異マウスの蝸牛は生後の発育障害により高度難聴を呈することが判明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,200,000	0	1,200,000
総計	3,100,000	0	3,100,000

## 研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉頭科学

キーワード：先天聾、*Gjb* 遺伝子、優性的阻害効果、聴性脳幹反応検査

## 1. 研究開始当初の背景

我々は世界で初めてヒト非症候性遺伝性難聴のノックアウトマウス (*brn-4*) を作成し機能解析を報告した (*Science* 285:1408-1411, 1999)。この研究はヒト非症候性遺伝性難聴である DDFN3 の原因がラセン靭帯の線維細胞の変性にあることが証明

されただけでなく、内リンパ電位の形成に線維細胞が不可欠であるという新しい内耳の生理学的機能を明らかにした。内リンパ電位の形成には線維細胞に発現するコネキシン (Cx) 26 の関与が示唆されたが、Cx26 をコードする *gjb2* 遺伝子改変マウスではラセン靭

帯や血管条は機能的にも形態学的にも正常であり、コルチ器のリンパ液を満たしている間隙（コルチリンパ）の形成不全が認められた（*Hum Mol Genet* 12:995-10904, 2003）。Cx26 はコルチ器も支持細胞に発現していることが判っているので、*gjb2* 遺伝子の異常が支持細胞の分化・機能発現とコルチリンパ液の恒常維持に作用することが推察される。従って、*gjb2* 遺伝子を改変したマウスを利用して、コルチ器の三次元構築形成に必須な発生・発達過程の分子メカニズムを解明する企画を立案した。

## 2. 研究の目的

GJB2 遺伝子は蝸牛の音受容に必須なイオン( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ )やエネルギー分子(ATP, IP3, cAMP)の通路として働く、ギャップ結合蛋白であるコネキシン 26 をコードする遺伝子である。ヒト患者の蝸牛病態解析は困難であるため、Gjb2 優性阻害変異マウス(Tg マウス)を用いて電気生理学的および形態学的に解析し、疾患の病態を解明する。【方法】Tg マウスについて生後 5~14 日である聴覚発達過程における聴力評価(聴性脳幹反応検査; ABR、耳音響放射; DPOAE)と組織学的評価(電顕)を行った。

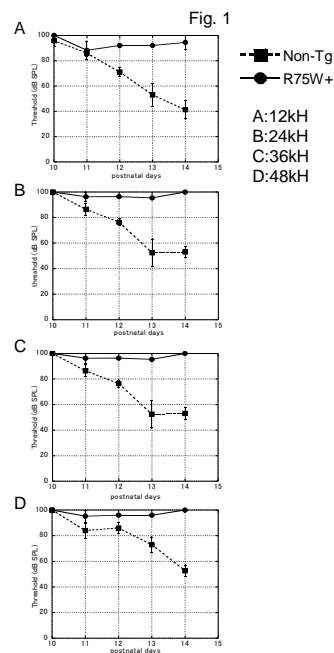
## 3. 研究の方法

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、各組織で変異コネキシン 26 を発現させるようにした。ノックアウトマウスが胎生致死であることが知られているので、プロモーターと変異遺伝子の間に loxP 配列を挿入し、変異体の発現が Cre recombinase で調節されるように設計した。直鎖化したベクターを受精卵に注入し、偽妊娠状態の雌 C57b1/6 の子宮に戻した。その結果得られたマウスを Cre recombinase を有するトランスジェニックマウスと交配し、PCR, RT-PCR 法により内耳で変異遺伝子が発現している個体を選別した。変異を発現している個体 (Tg マウス) について生後 5~14 日である聴覚発達

過程における聴力評価(聴性脳幹反応検査; ABR)と組織学的評価(電顕)を行った。

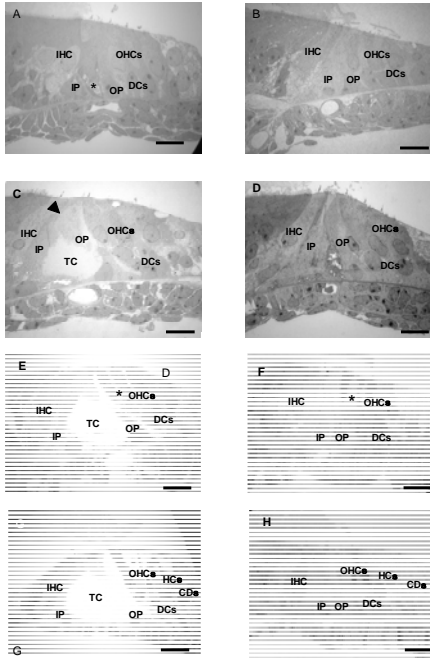
## 4. 研究成果

(1) 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 では生後の聴覚発育過程でほとんど反応を認めなかった (図 1)。



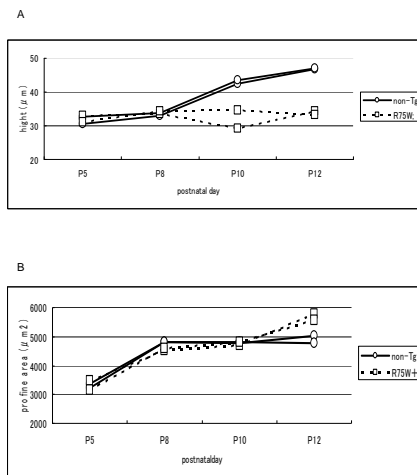
(2) 電顕による組織学的な変化として①Tg マウスではコルチトンネルの形成不全、②外有毛細胞神経終末形成不全、③コルチ器高の伸長不全、④コルチ器の断細胞面積増加が特徴的であった (図 2)。コルチトンネルは柱細胞の細胞骨格の発達により内・外柱細胞の細胞間の開大が生じ形成される。Tg マウスでは柱細胞内の microtubules の形成不全を認めコルチトンネル形成不全の原因と考えられた。外有毛細胞の神経終末は通常外有毛細胞を支持するダイテルス細胞の細胞質が消退することにより形成される。Tg マウスではダイテルス細胞が外有毛細胞周囲を占拠するため神経終末は形成されなかった。

Fig. 2



(3) 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に一定であった。Tg マウスのコルチ器細胞断面積は有意な増加を認め、支持細胞の膨化を示唆した(図3)。

Fig. 3



ABRならびに蝸牛の組織学的検討から *Gjb2* 優性阻害変異マウスの蝸牛は生後の発育障害により高度難聴を呈することが判明した。

## 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3件)

- ① Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, Kojima K, Ichinohe A, Suzuki Y, Aoki Y, Kobayashi T, Matsubara Y Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet* 12: 995-1004, 2003
- ② Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K. Noninvasive In Vivo Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea. *Human Gene Therapy* 19(4):384-90. 2008.
- ③ Inoshita A, Iizuka T, Okamura HO, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K. Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *Gjb2* transgenic mice. *Neuroscience* 156(4):1039-47. 2008.

[学会発表] (計2件)

- ① Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K. Noninvasive In Vivo Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea. *The 32<sup>nd</sup> Association for Research Otolaryngology*, 2009.
- ② Inoshita A, Iizuka T, Okamura HO, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K. Postnatal

development of the organ of Corti in dominant-negative Gjb2 transgenic mice. The 32<sup>nd</sup> Association for Research Otolaryngology, 2009.

[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

池田 勝久 (IKEDA KATUHISA)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70159614

### (2) 研究分担者

古川 正幸 (HURUKAWA MASAYUKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20359524

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80317487

### (3) 連携研究者

神谷 和作 (KAMIYA KAZUSAKU)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：10374159

楠 威志 (KUSUNOKI TAKESHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30248025