

平成21年4月2日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791237

研究課題名（和文）GJB2 遺伝子保因者における歪成分耳音響放射障害の分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanism of disturbed distortion product in carriers of GJB2 mutation

研究代表者

中澤麻美（NAKAZAWA ASAMI）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60384111

研究成果の概要：

いわゆる聴力正常者についての難聴遺伝子スクリーニングは行われてきたが、それらで検出された変異保因者の subclinical な解析は症例数が少なかった。今回、多数の検体を解析することによって得られる *GJB2* 遺伝子の保因者での DPOAE を用いた有毛細胞の機能障害についての知見を得ることができた。ヒトの *GJB2* 遺伝子変異に等価の動物モデルを作成して、ヒトの保因者を反映しているヘテロのマウスを解析することで *GJB2* 遺伝子の蝸牛における分子メカニズムの解明に貢献できた。

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	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

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、難聴遺伝子、DPOAE、聴性脳幹反応検査

1. 研究開始当初の背景

先天聾は1000出生に1人の頻度で発生し、先天性の感覚器障害としては非常に高頻度の疾患である。その半数は遺伝的な原因であると言われている。聴覚の形成には様々な分子が関与しており、遺伝性難聴の原因遺伝子も様々であるが、特

に重要なのがギャップジャンクション蛋白遺伝子である。ギャップジャンクションは有毛細胞へのK⁺イオンの供給と排出のルートになっていると考えられている。1997年、Kelsellらは家族性の先天聾家系において初めてCx26遺伝子（*G*

*JB2*遺伝子)の変異を同定した。我々の研究グループは日本人においても常染色体劣性遺伝を示す先天聾の2~3割が*GJB2*遺伝子変異によるものであり、235delCという一塩基欠失のcommon mutationが明らかとなり、遺伝子変異のスクリーニングが容易であることを報告した (Am J Med Genet 90:141-145, 2000)。さらに、遺伝子変異の解析は従来煩雑な手技を要し多検体の処理は困難であったが、*GJB2*遺伝子の変異に対する簡便なスクリーニング法も開発した (Laryngoscope 114:1299-1304, 2004)。

一方、我々が開発した *gjb2* 遺伝子改変マウスでは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 12:995-1004, 2003)。Cx26 はコルチ器の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ている。

2. 研究の目的

GJB2 遺伝子によってコードされる Cx26 は、コルチ器内の微小なイオン環境の維持に関与している可能性が示唆されている。*GJB2* 遺伝子変異の保因者においては、コルチ器内のイオン環境の微細な異常のため、有毛細胞の軽微な機能障害や単発的な変性が発生している機序が考えられる。そこで、このような外有毛細胞の微細な病態を①感度の高い DPOAE で検出し、②耳鳴り、聴覚過敏などの徴候との関連を調べる。

次に、条件付ノックアウト法を利用した *gjb2* 遺伝子欠損マウスを作製して、そのヘテロと正常マウスの聴性脳幹反応と DPOAE による聴力解析の比較を行う。ま

た騒音負荷による蝸牛の易受傷性の程度を検討し、*GJB2* 遺伝子の内耳機能に果たす分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

遺伝子解析の方法としては、PCR 直接シーケンスにより全翻訳領域を解読する方法が代表的であるが、この方法では、PCR、アガロースゲル電気泳動によるバンドの分離、アガロースゲルからの精製、サイクルシーケンス反応、シーケンサーによる解析という手順が必要で、費用的にも労力的にも多数の検体の処理は困難である。*GJB2* 遺伝子については、アジア人に特徴的な高頻度変異が同定されており (Am J Med Genet 2000)、この高頻度変異に絞ったスクリーニングを行う。ミスマッチプライマーを用いたアレル特異的増幅を行いその増幅数を ABI 7700 で蛍光検出する検査系を開発しており、PCR 反応を行うだけで多数の検体について高頻度変異の検出が可能である。

Cre-loxP 系を用いたコンディショナル・ノックアウト (条件依存性標的遺伝子組換え) による *gjb2* 遺伝子欠失マウスの作成し、聴力における機能解析を加え、ヘテロマウスの DPOAE も検討する。

4. 研究成果

(1) 代表的な症例

症例

8歳女児

7歳時、学校の検診で難聴を指摘され近医受診、両側の感音性難聴あり、精査加療目的に当科紹介。

既往歴: 特記すべきことなし。

家族歴: 血縁者に難聴者なし。

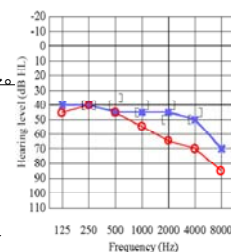
鼓膜所見正常

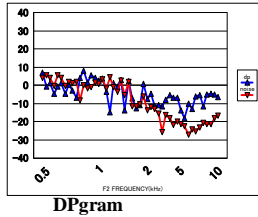
TG: 両A型

標準純音聴力(右図):

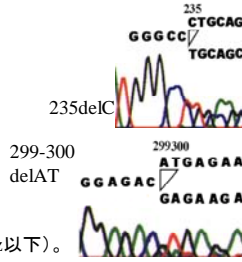
両側40~50dB

水平~高音漸傾感音性難聴





DPOAE: DPLレベルの低下(特に5kHz以下)。
 (左上図は右耳のDPグラム)
 ABR: 閾値75dB, I波潜時右1.42秒左1.66秒、I-V波潜時右3.87秒左3.95秒(正常範囲)。
 GJB2遺伝子解析の結果、235delC(右上段)と299-300delAT(右下段)の複合ヘテロであった。
 3年間経過をフォローしているが、聴力の変動はない。

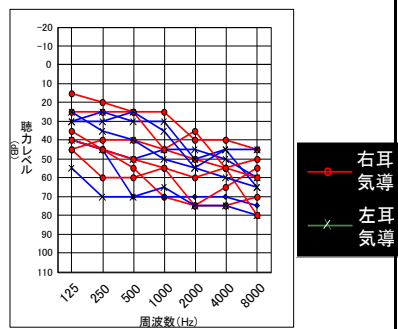


(2) 軽度～中等度難聴における聴力像と GJB2 変異の検討

軽度～中等度難聴者の解析結果の結果

患者	性別	年齢	家族歴	聴力(dB) (4分法)	変異
					Allele 1/Allele 2
1	女	8	なし	45.6	235delC/299-300delAT
2	男	33	なし	51.8	235delC/V37I
3	女	21	なし	37.5	V37I/R143W
4	女	34	なし	65.0	V37I/normal
5	女	39	なし	68.8	V37I/normal
6	女	18	姉一人	31.9	235delC/M195V
7	男	5	妹一人	63.8	V37I/R143W

(3) 聴力像 (オーディオグラム) の検討



聴力: 水平または高音漸傾の軽度から中等度難聴

(4) GJB2 ノックアウトマウスの解析

聴性脳幹反応: *Gjb2* 欠失マウスでは最大 100dB のクリック音刺激でも脳幹反応を得ることができなかった。一方、野生型では I ~ V 波の明瞭な聴性脳幹反応を認め、閾値は 30dB 以下であった。

Cx26 と Cx30 蛋白の免疫組織: 蝸牛での Cx26 蛋白の発現を免疫組織で比較すると、野生型ではラセン靭帯と spiral limbus の線維細胞とコルチ器の支持細胞に発現していた。一方、変異体ではラセン靭帯の線維細胞に弱い染色性を認めるのみで、他の部位ではほとんど発現していないことが確認された。Cx30 蛋白は全体的に Cx26 よりも染色性は弱い、同様の発現様式で、両者に違いはなかった。Cx26 の発現が変異体で選択的に欠損していると判断できる。

H&E染色: 欠失マウスでは spiral limbus の線維細胞の減少が認められた。またコルチ器の構造がやや虚脱している所見が得られた。血管条、ラセン靭帯の線維細胞、ラセン神経節細胞、ライスネル膜、蓋膜などは両者に明らかな違いは認めなかった。

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 32nd 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 32nd 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

中澤麻美 (NAKAZAWA ASAMI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60384111

(2) 連携研究者