

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861420

研究課題名(和文) コネキシン26変異を伴う遺伝性難聴病態におけるプログラム細胞死の解析

研究課題名(英文) Analysis of the programmed cell death in postnatal organ of Corti of Connexin 26 related hereditary deafness.

研究代表者

井下 綾子 (AYAKO, INOSHITA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00514762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GJB2変異型難聴の病態解明と治療法開発を目的とし、GJB2変異難聴モデルマウスの生後発育におけるコルチ器の形成過程の変化に焦点を当てた組織学的解析を主に行った。通常の生後発達の際は、プログラム細胞死によってコルチ器の立体構造が構築されるが、GJB2の優性変異 R75Wを導入したトランスジェニックマウスにおいては、正常発達に起こるアポトーシスによるプログラム細胞死が遅延し、コルチ器は一時的に過形成の状態になることが示された。

研究成果の概要(英文)：The greater epithelial ridge (GER) is a developmental structure in the maturation of the organ of Corti. Situated near the inner hair cells of neonatal mice, the GER undergoes a wave of apoptosis after postnatal day 8 (P8). We evaluated the GER from P8 to P12 in transgenic mice that carry the R75W + mutation, a dominant-negative mutation of human gap junction protein, beta 2, 26 kDa (GJB2) (also known as connexin 26 or CX26). In both non-transgenic (non-Tg) and R75W +mice, some GER cells exhibited apoptotic characteristics at P8. In the GER of non-Tg mice, both the total number of cells and the number of apoptotic cells decreased from P8 to P12. In contrast, apoptotic cells were still clearly evident in the GER of R75W +mice at P12. In R75W +mice, therefore, apoptosis in the GER persisted until a later stage of cochlear development.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝性難聴 GJB2 コネキシン26 優性阻害変異 プログラム細胞死 アポトーシス コルチ器 トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

### GJB2 遺伝子変異難聴の蝸牛形態 ~ 研究開始当初までに判明していたこと

先天性難聴は 2,000 人に1人と高頻度でその半数が遺伝性である。そのうち GJB2(コネキシン 26)遺伝子変異は日本人で最も高頻度の原因遺伝子で、早期発見と治療方針を決定する上で本質的な発症原因の探求が重要である。しかし、ヒトの内耳では生検や侵襲的な生理学的検査は困難なため、ヒトの GJB2 遺伝子変異と等価の動物モデルを我々の研究グループは世界に先駆け *gjb2* 遺伝子の優性阻害効果を示す変異体マウス (Tg) を開発した (Hum Mol Genet. 2003)。

### 研究開始当初、過去の我々の研究から示唆されること

Tg マウスの生直後から 2 週齢までのコルチ器評価を企画した結果、8 日齢ですでにコルチトンネル (TC) の消失と外有毛細胞 (OHC) の変性を認めた。我々のこれまでの研究において、Tg マウスの蝸牛は、生後の発達障害により早期からコルチ器の細胞骨格異常を認めるために、高度難聴を呈することが実証された。具体的には、8 日齢では、コルチトンネルの骨格を形成する、柱細胞内のマイクロチュブリンの形成不良を認めた (Inoshita A, et al. Neuroscience, 2008)。

また以上の結果から新たに、Tg マウスのコルチ器において Greater epithelial ridge (GER) の過形成が示唆された。通常 GER は未熟な内耳組織に存在し、生直後から蝸牛内有毛細胞の更に内側に認められ、成熟後の蝸牛では消失する。GER では通常、生後 6 日頃を境に急激なアポトーシスが生じ、

蝸牛成熟後に消失する。これまでの我々の一連の結果から、Tg マウスでは GER 内でのアポトーシスの異常が示唆されたことは、非常に興味深いものであった。

そこで、Tg マウスのコルチ器の GER を中心として、更に解明することは極めて必要な研究と考えた。

本研究の独創的特色は、GJB2 遺伝子変異モデルマウス (Tg) における、GER の評価は未だなされておらず、今回の我々の企画は全く斬新な発想であることである。また、様々な研究所で難聴モデルマウスを用いた報告はされているが、生後直後から 2 週齢までという発達過程での評価はまれである。これまでの我々の研究から、Tg マウスにおける内耳コルチ器の組織学的変化は、生後に生じることが解明された。したがって、生直後の幼若マウスのコルチ器形態を、GER に焦点を絞って更なる研究を行うことは、非常に有意義である。

難聴発症を予防・軽減するためには、GER 細胞のアポトーシスが生直後に出現し、生後 6-8 日に終了することがひとつのポイントである。GJB2 遺伝子変異による先天性難聴児は、高度難聴を呈し、補聴器や人工内耳の適応となる症例が多いのが現状である。

本研究によって難聴発症のメカニズムが細胞レベルで解明されることで、アポトーシス促進因子の注入といった新たな治療法の確立につながる。本研究は幼少時から高度難聴に苦しむ国内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と考え、企画した。

## 2 . 研究の目的

*GJB2* 遺伝子変異は、日本人で最も高頻度で、かつ高度難聴を呈する先天性難聴の原因遺伝子であるが、本質的な発症原因がいまだ不明である。本研究では、*GJB2* 遺伝子変異モデルマウスの内耳の組織学的評価を行い、難聴の原因・病態を把握し治療法を検討することを目的とする。癌抑制作用が知られているコネクシン遺伝子の変異による高度難聴モデルマウスにおいて、発達期のアポトーシス(プログラム細胞死)と細胞増殖の異常が関わることを示し、その分子病態解析を明らかにするものである。具体的には、*GJB2* 遺伝子変異モデルマウスの内耳コルチ器細胞骨格異常の評価、生直後から成熟期までの内耳発達過程におけるアポトーシスの評価、分子細胞レベルでの難聴治療法の確立である。

## 3 . 研究の方法

- 1) 透過型電子顕微鏡を用いて GER 細胞内のアポトーシスを評価する。
- 2) H-E 染色切片を用いて GER 内の合計細胞数、GER 内のアポトーシス細胞数、GER 面積を測定する。
- 3) アポトーシス実行因子である活性型 caspase3 の GER での発現を免疫染色で確認する。
- 4) コルチ器三次元構築を薄切連続切片の組織学的観察とコンピュータによる再構築作業で解析する。

### Tg マウスの蝸牛コルチ器の組織学的検証

1. マウス内耳検体の摘出・処理  
十分にマウスを麻酔後、内耳を摘出し組織学

的検査(光学顕微鏡、電子顕微鏡、免疫染色)のための処理と切片の作成を行う。

### 2. 透過型電子顕微鏡での観察・検討

GER 細胞内の形態学的評価を行う。特に細胞内の核において、アポトーシスに特徴的な所見であるクロマチン凝縮の有無を確認する。

### 3. H-E 染色切片での観察・検討

光学顕微鏡 100 倍率下で、GER 内の合計細胞数と、その内のアポトーシス細胞数を測定する。デジタル光学顕微鏡下に、コンピュータ計測ソフトである NIS Elements-D を用いて、GER 面積を測定する。得られた細胞数と面積のデータはコンピュータソフトに入力し、Tg マウスとコントロール(野生型)を比較し統計学的に検討する。

### 4. GER での Caspase3 の発現を確認・評価

内耳の凍結切片を作成し、抗 Caspase3 抗体を入手し蛍光抗体法にて免疫染色を行う。上記1~3の組織学的検証から、Tg マウスの GER ではアポトーシス異常が存在すると推察する。当マウスではアポトーシス実行因子である Caspase3 がどう発現するか、組織学的結果と照らし合わせて評価する。

### Tg マウスの蝸牛コルチ器の三次元構築

コルチ器三次元構築を薄切連続切片の組織学的観察と、コンピュータによる再構築作業で解析する。

### 分子細胞レベルでの難聴治療法の検討

アポトーシス促進因子である Caspase を Tg マウスの内耳へ注

入する。注入対象 Tg マウスは、生後 5～8 日あたりを考慮する。

Caspase 注入後は、聴性脳幹反応を用いて聴力の改善の有無を評価する。

生後 14 日頃にマウスの内耳を摘出し組織切片を作成する。

Caspase 注入によってコルチ器の形態、GER のアポトーシス細胞数、面積に変化が表れるか評価する。

#### 4 . 研究成果

通常生後発達の際は、プログラム細胞死によってコルチ器の立体構造が構築されるが、臨床において検出される *GJB2* の優性変異 R75W を導入した Tg マウスにおいては、8 日齢と 12 日齢を評価した結果、正常発達に起こるアポトーシスによるプログラム細胞死が遅延し、コルチ器は一時的に過形成の状態になることが示された。

この現象は特にコルチ器近傍の GER において顕著にみられ、このことによってコルチ器の圧排が生じ、有毛細胞の機能低下とコルチトンネルの消失の原因となっていることが示唆された。これらの結果は遺伝学専門誌にて報告された。(Inoshita et al., BMC genetics 2014, 15(1):1-8)

これらの結果から、*GJB2* 変異型難聴では GER 領域のプログラム細胞死が遅延していることによりコルチ器形成が異常となり、これが聴覚受容機能の低下の一因となる新たな病態の可能性が示唆された。以下に具体的な研究結果を記す。

#### 1) 透過型電子顕微鏡を用いて GER 細胞内のアポトーシス評価。

12 日齢における、内耳コルチ器の GER 領域を正常体と Tg マウスと比較、評価した。

Tg マウスでは、GER 領域内の核クロマチン凝縮像が認められ、アポトーシスの存在が示唆された。一方、正常体では、アポトーシス性の変化は認められなかった(図 1)。

#### 2) H-E 染色切片を用いて GER 内の合計細胞数、GER 内のアポトーシス細胞数、GER 面積の測定。

8 日齢、10 日齢、12 日齢の正常体と Tg マウスを比較した。

12 日齢の Tg マウスにおいて、12 日齢の正常体と比べて、GER 内の細胞数と、GER 内のアポトーシス細胞数が有意に大きかった。

また、12 日齢の Tg マウスでは、12 日齢の正常体マウスと比べて、GER 面積が有意に大きかった。

#### 3) アポトーシス実行因子である活性化型 caspase3 の GER での発現を免疫染色で確認する。

11 日齢の正常体と Tg マウスの内耳コルチ器を評価した。

正常体では、Caspase3 の発現が乏しかったが、Tg マウスでは高度に発現していた。

#### 4) コルチ器三次元構築を薄切連続切片の組織学的観察とコンピュータによる再

構築作業による解析。

11 日齢の正常体と Tg マウスの内耳コルチ器を評価したところ、正常体では、Caspase3 の発現が乏しかったが、Tg マウスでは高度に発現していた(図 2)。

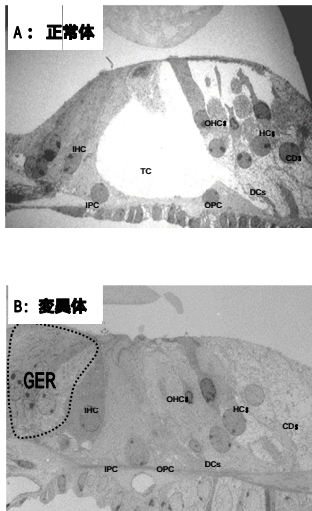


図 1 : 12 日齢のコルチ器全体像(電子顕微鏡)

A: 正常体、B: 変異体、B ではコルチトンネル(TC)の形成を認めず、また GER の過形成を示唆。

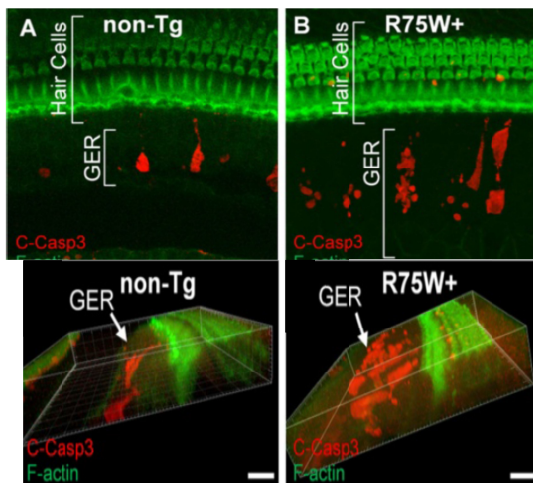


図 2 : 内耳 GER 内の Caspase3 発現(赤色)

正常体(A)と比べ、変異体(B)では GER 内の Caspase 3 の発現が豊富である(生後 12 日)。

(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 5 件)

【睡眠とアンチエイジング】、井下 綾子、葛西 隆敏

**アンチエイジング医学 日本抗加齢医学雑誌** (査読無) 12 巻 4 号 Page362-369(2016.08)

【学業も含めて、小児におけるいびきを伴う睡眠呼吸障害 (sleep disordered breathing:

SDB)は、どのような影響を及ぼすのでしょうか?、井下綾子、鈴木雅明、睡眠医療 (査読無) 9 巻 4 号 Page

Postoperative nasal packing might contribute to nocturnal desaturation for patients with low body mass index or low nasal resistance. Inoshita A, (他 5 名、

**1 番**

目). **J Otol Rhinol.**( 査読有 )S1:1 (2015)

Dominant negative connexin26 mutation R75W causing severe hearing loss influences normal programmed cell death in postnatal organ of Corti. Inoshita A, (他 5 名、**1 番目**), **BMC Genet.** 3;15:1 (2014)

Craniofacial anatomical risk factors in men with obstructive sleep apnea and heart failure: a pilot study. Inoshita A, Kasai T, (他 9 名、**1 番目**)、**Sleep Breath.** (査読有)18(2):439-45 (2014)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

井下 綾子 ( INONSHITA, Ayako )  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：01234567