

平成 14 年 3 月 31日

厚生大臣 坂口 力 殿

---

住 所  
フリカ<sup>ナ</sup>  
研究者 氏 名 池田<sup>いけだ</sup> 勝久<sup>かつひさ</sup>

(所属施設 東北大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学分野 )

平成 13 年度厚生科学研究費補助金 ( 感覚器障害 研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : ノックアウトマウスを用いた遺伝性難聴の発現機構の解析と治療の新戦略 ( H12-感覚器-009 )

国庫補助金精算所要額 : 金 17,000,000 円也

---

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況  
特になし
8. 健康危険情報  
特になし

## 別添1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=感覚器障害研究事業

研究課題名=ノックアウトマウスを用いた遺伝性難聴の発現機構の解析と治療の新戦略

国庫補助金精算所要額（円）=17,000,000 円

研究期間（西暦）=2000-2002

研究年度（西暦）=2001

主任研究者名=池田勝久（東北大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学分野）

分担研究者名=美野輪治（理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター）、大島猛史（仙台逓信病院耳鼻咽喉科）、松原洋一（東北大学大学院医学系研究科小児医学遺伝病学分野）

研究目的=近年の分子生物学の進歩により、これまでに20の非症候性難聴の原因遺伝子が同定されている。しかしながら、難聴遺伝子の同定が基本的には難聴家系のリンケージ解析によるいわゆるreverse geneticsによってなされており、またヒト内耳を生理的条件下で解析することの困難性から、他の難聴遺伝子の機能解析は相同遺伝子からの類推にもとづいたin vitroの発現系で行われているがin vivoでの解析は不十分なのが現状である。我々は、ヒトで同定された難聴遺伝子をマウスでノックアウトし、そのマウスの形態学的電気生理学的解析、免疫学的解析また分子生物学的解析を行い、それらの遺伝子の内耳における機能を解明する。また、実際の臨床の場において、遺伝性難聴が疑われる患者に対し難聴遺伝子の検索を行い、遺伝子診断の実用化を目指す。

研究方法=

1) 遺伝子変異マウスの作製と解析

1. *Gjb2*ノックアウトマウスの作成と解析

Cre recombinase 存在下で *Gjb2* 遺伝子翻訳領域が切り取られるようなコンストラクトを作成し、ES細胞に相同組換えにより導入した。ネオマイシンによる選別を行いサザンブロット法により組替え体を同定した。ES細胞をB6マウスの胚盤胞へ注入してキメラマウスを作製した。続いてB6マウスと戻し交配を行いF1マウスを得た。Cre recombinase を持つトランスジェニックマウスと交配させ、遺伝子欠失マウスを同定し解析に供した。

2. *GJB2*トランスジェニックマウスの作成と解析

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connexin26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について、生後2週及び生後7週でABR（聴性脳幹反応）による聴力評価と、光学顕微鏡および電子顕微鏡による組織学的解析を行った。また、生理学的解析として内リンパ電位の測定、ローターロッド試験を行った。

3. *Brn 4*マウスの加齢による難聴の解析

老齢（生後1年）の*Brn 4*ノックアウトマウスと老齢（生後1年）の野生型コントロールマウスを実験対象として、聴性脳幹反応（ABR）を測定した。組織学的観察には4%パラホルムアルデヒドによる外リンパ灌流で4℃、一晚固定した。その後、脱灰、脱水、パラフィン包埋し、各種の抗体による免疫組織を行った。

2) 難聴患者の遺伝子解析

対象はタイ・バンコクの聾学校に通学するタイ人の小児難聴児及びその家族12家系17人。*GJB2*遺伝子の翻訳領域678塩基をカバーするプライマーペアを作成し、PCR増幅、直接シーケンシングした。

結果と考察=

1) 遺伝子変異マウスの作製と解析

### 1. *GJB2* ノックアウトマウスの作成と解析

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。

### 2. *GJB2* トランスジェニックマウスの作成と解析

2系統の変異マウスが誕生した。いずれも生後2週より約100dBの高度難聴を示した。内リンパ電位は正常範囲だった。形態学的には、コルチトンネルの無形成とDeiter細胞の変形といったコルチ器支持細胞の形成障害を認め、週齢が進むと有毛細胞とらせん神経節の脱落を生じた。蝸牛外側壁のらせん靭帯線維細胞および血管条、前庭平衡器には形態学的異常を認めなかった。有毛細胞に変性を生じる以前から高度難聴を示し、支持細胞の障害により有毛細胞の活動が障害されるものと考えられた。支持細胞に異常を生じる機序は不明で今後の解析が必要だが、connexin26が細胞の増殖分化のコントロールに何らかの役割を果たしていることが想像された。

### 3. *Brn 4* マウスの加齢による難聴の解析

大部分のメスヘテロ接合体マウスは平均 50.3dB の閾値であるのに対し、ほぼ 1/3 のメスヘテロ接合体マウスは平均 96.3 dB の閾値であり、高度難聴であった。ヘマトキシリン・エオジン染色では、ABR 高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、Reissner 膜と外側壁の接合部位が剥離していた。免疫組織化学染色では、ABR 高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において螺旋靭帯の II 型線維細胞及び血管条の基底細胞における connexin26 蛋白と関連蛋白である connexin31 蛋白の発現量が低下していることが認められた。また、Na,K-ATPase と Na-K-Cl 共輸送体の発現量が減少している所見も認められた。これらの蛋白の発現量が極めて減少することにより、内耳においてはイオン輸送の重要な経路の障害もたらされ、遺伝性難聴が惹起されるものと考えられた。

#### 2) 難聴患者の遺伝子解析

タイ人先天性難聴者12家系17人中、3家系4人に *GJB2* 遺伝子変異を認めた。変異の種類は、235delC, W24X, M34L だった。235delC 変異は、日本人と同様のハプロタイプと連鎖していた。

結論=これまで不可能とされてきた *GJB2* モデルマウスの作成に成功した。モデルマウスは高度難聴を示した。組織学的解析の結果、コルチ器の形成障害を認め、コルチ器が主な病変部位であることが判った。

厚生科学研究研究費補助金

感覚器障害 研究事業

ノックアウトマウスを用いた遺伝性難聴の発現機構の解析と治療の新戦略

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 勝久

平成14(2002)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
ノックアウトマウスを用いた遺伝性難聴の発現機構の解析と治療の新戦略	1
池田勝久	
II. 分担研究報告	
1. <i>Gjb2</i> ノックアウトマウスの作成と解析	3
美野輪治	
2. DFN3モデルマウスに関する研究	4
大島猛史	
3. <i>GJB2</i> 遺伝子変異による難聴の解析	5
松原洋一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	7
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

（総括）研究報告書

ノックアウトマウスを用いた遺伝性難聴の発現機構の解析と治療の新戦略

主任研究者 池田勝久

東北大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学分野助教授

研究要旨

ヒトで同定された難聴遺伝子をマウスでノックアウトし、そのマウスの形態学的電気生理学的解析、免疫学的解析また分子生物学的解析を行い、それらの遺伝子の内耳における機能を解明した。その結果、*GJB2* のモデルマウスはノックアウトマウス、トランスジェニックマウス共に先天的な高度難聴を示し、トランスジェニックマウスについて詳細に解析した結果、コルチ器の変性が主病変であり螺旋靭帯には変化を認めなかった。*Brn 4* ノックアウトマウスの加齢による影響を解析し、connexin26, 31, Na, K-ATPase と Na-K-Cl 共輸送体の発現低下が難聴の原因となっていることを示した。

分担研究者

美野輪治 理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター主任研究員  
大島猛史 仙台逡信病院耳鼻咽喉科科長  
松原洋一 東北大学大学院医学系研究科小児医学遺伝病学分野教授

A. 研究目的

近年の分子生物学の進歩により、これまでに20の非症候性難聴の原因遺伝子が同定されている。しかしながら、難聴遺伝子の同定が基本的には難聴家系のリンケージ解析によるいわゆる reverse genetics によってなされており、またヒト内耳を生理的条件下で解析することの困難性から、他の難聴遺伝子の機能解析は相同遺伝子からの類推にもとづいた in vitro の発現系で行われているが in vivo での解析は不十分なのが現状である。我々は、ヒトで同定された難聴遺伝子をマウスでノックアウトし、そのマウスの形態学的電気生理学的解析、免疫学的解析また分子生物学的解析を行い、それらの遺伝子の内耳における機能を解明することにした。また、実際の臨床の場において、遺伝性難聴が疑われる患者に対し難聴遺伝子の検索を行い、遺伝子診断の有用性を検討することにした。

B. 研究方法

1) 遺伝子変異マウスの作製と解析  
1. Cre recombinase 存在下で *Gjb2* 遺伝子翻訳領域が切り取られるようなコンストラクトを作成し、ES細胞に相同組換えにより導入した。ネオマイシンによる選別を行いサザンブロット法により組替え体を同定した。ES細胞をB6マウスの胚盤胞へ注入してキメラマウスを作製した。続いてB6マウスと戻し交配を行いF1マウスを得た。Cre recombinase を持つトランスジェニックマウスと交配させ、遺伝子欠失マウスを同定し解析に供した。聴性脳幹反応で聴力閾値を測定し、内耳を採取、パラフィンまた

はエポキシに包埋した。パラフィンに包埋したサンプルをヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、免疫組織染色で解析した。

2. 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 connexin26 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 C57bl/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, RTPCR 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について、生後2週及び生後7週で ABR (聴性脳幹反応) による聴力評価と、光学顕微鏡および電子顕微鏡による組織学的解析を行った。また、生理学的解析として内リンパ電位の測定、ローターロッド試験を行った。

3. 相同組換え法によって作成した *Brn 4* ノックアウトマウスの加齢による影響を解析した。老齢 (生後1年) の *Brn 4* ノックアウトマウスと老齢 (生後1年) の野生型コントロールマウスを実験対象として、ネンプタール腹腔麻酔下にて聴性脳幹反応 (ABR) を測定した。組織学的観察には4%パラホルムアルデヒドによる外リンパ灌流で4℃、一晚固定した。その後、0.12M EDTA で脱灰、エタノールによる脱水、パラフィン包埋し、各種の抗体による免疫組織を行った。

2) 難聴患者の遺伝子解析  
対象はタイ・バンコクの聾学校に通学するタイ人の小児難聴児及びその家族12家系17人。*GJB2* 遺伝子の翻訳領域678塩基をカバーするプライマーペアを作成し、PCR増幅、直接シーケンシングした。

C. 研究結果

1) 遺伝子変異マウスの作製と解析

1. *GJB2* ノックアウトマウスの作成と解析

*Gjb2* 遺伝子欠失マウスと同腹の野生型をそれぞれ1匹ずつ機能解析した。

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。

## 2. *GJB2*トランスジェニックマウスの作成と解析

2系統の変異マウスが誕生した。いずれも生後2週より約100dBの高度難聴を示した。内リンパ電位は正常範囲だった。形態学的には、コルチトンネルの無形成とDeiter細胞の変形といったコルチ器支持細胞の形成障害を認め、週齢が進むと有毛細胞とらせん神経節の脱落を生じた。蝸牛外側壁のらせん靭帯線維細胞および血管条、前庭平衡器には形態学的異常を認めなかった。

## 3. *Brn 4*ノックアウトの解析

ABR:大部分のメスヘテロ接合体マウスは平均50.3dBの閾値であるのに対し、ほぼ1/3のメスヘテロ接合体マウスは平均96.3dBの閾値であり、高度難聴であった。

HE染色：ヘマトキシリン・エオジン染色では、老齢(生後1年)の野生型マウス及びABR低閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛組織像は正常であるのに対し、ABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、Reissner膜と外側壁の接合部位が剥離していた。

免疫組織化学染色：老齢(生後1年)の野生型マウス及びABR低閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、螺旋靭帯のII型線維細胞及び血管条の基底細胞におけるconnexin26蛋白と関連蛋白であるconnexin31蛋白の発現量が多いのに対し、ABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛においてこれらの蛋白の発現量が低下していることが認められた。そのうえ、老齢(生後1年)の野生型マウス及びABR低閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、螺旋靭帯の螺旋靭帯のII型線維細胞及び血管条の辺縁細胞におけるNa, K-ATPaseとNa-K-Cl共輸送体の発現量が多

いのに対し、ABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛においてこれらの蛋白の発現量が減少している所見も認められた。

## 2) 難聴患者の遺伝子解析

タイ人先天性難聴者12家系17人中、3家系4人に*GJB2*遺伝子変異を認めた。変異の種類は、235delC, W24X, M34Lだった。235delC変異は、日本人と同じハプロタイプと連鎖していた。

## D. 考察

*GJB2*遺伝子変異は、遺伝性難聴の中でもっとも高頻度で重要である。しかし、以前作成されたノックアウトマウスが胎盤の機能不全により胎生致死で、これまでその病態は明らかにされていなかった。今回我々は、Cre-loxP系を用いて組織特異的に遺伝子をノックアウトすることにより、世界で初めて*GJB2*変異マウスを作成することに成功した。モデルマウスはいずれも高度難聴を示し、ヒトと同じ表現型だった。組織学的解析の結果、コルチ器支持細胞の形成が障害されており、支持細胞の形成障害によって感覚細胞である有毛細胞の機能が障害されて難聴を来す機序が示唆された。一方、これまで主病変と思われてきた螺旋靭帯の線維細胞においては、形態的に変化を認めず、内リンパ電位も正常で、蝸牛外側壁のポタシウムイオン輸送系の障害の所見は無かった。これらの所見は、*GJB2*遺伝子変異と難聴に関する研究と臨床に、非常に有用な情報である

## E. 結論

これまで不可能とされてきた*GJB2*モデルマウスの作成に成功した。モデルマウスは高度難聴を示した。組織学的解析の結果、コルチ器の形成障害を認め、コルチ器が主な病変部位であることが判った。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Late-onset hearing loss in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness: Morphologic and immunohistochemical analysis. An-Ping Xia, Toshihiko Kikuchi, Osamu Minowa, Yukio Katori, Takeshi Oshima, Tetsuo Noda, Katsuhisa Ikeda

*Hearing Res.* (in press)

*GJB2* (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. Takayuki Kudo, Katsuhisa Ikeda, Takeshi Oshima, Shigeo Kure, Maliwan Tammasaeng, Suchitra Prasansuk, and Yoichi Matsubara. *Otol. Neurotol.* 22: 858-861 (2001)

### 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

## （分担）研究報告書

*Gjb2*ノックアウトマウスの作成と解析

分担研究者 美野輪治

理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター主任研究

## 研究要旨

Connexin26 (Cx26) ギャップ結合蛋白をコードする *GJB2* 遺伝子はヒトの遺伝性難聴の主な原因遺伝子である。難聴遺伝子の機能解析と難聴の機序の解明を目的として、Cre-LoxP 系を用いた conditional knockout により、蝸牛における Cx26 ギャップ結合蛋白を選択的に欠失したマウスを作成した。変異型マウスは高度難聴を示し、ヒト *GJB2* 遺伝子変異による難聴のマウスモデルとなることが示唆された。

## A. 研究目的

欧米人種において、先天性難聴の半数は *GJB2* 遺伝子変異によるものであることが知られている。その聴力障害の発生機序は、コルチ器支持細胞から外側壁線維細胞をつなぐギャップジャンクションの障害により内リンパへの K<sup>+</sup>イオンリサイクルが障害されるためではないかと推測されている。しかしながら、患者において形態学的生理学的には十分に解析されていない。以前作成されたノックアウトマウスは胎盤の機能不全により胎生致死で、内耳の解析は不可能だった。今回、我々は、胎生致死をさけるため Cre-loxP 系を用いた conditional knockout によりノックアウトマウスを作成し、形態学的、生理学的に解析することにした。

## B. 研究方法

Cre recombinase 存在下で *Gjb2* 遺伝子翻訳領域が切り取られるようなコンストラクトを作成し、ES 細胞に相同組換えにより導入した。ネオマイシンによる選別を行いサザンプロット法により組替え体を同定した。ES 細胞を B6 マウスの胚盤胞へ注入してキメラマウスを作製した。続いて B6 マウスと戻し交配を行い F1 マウスを得た。Cre recombinase を持つトランスジェニックマウスと交配させ、遺伝子欠失マウスを同定し解析に供した。聴性脳幹反応で聴力閾値を測定し、内耳を採取、パラフィンまたはエポンに包埋した。パラフィンに包埋したサンプルをヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、免疫組織染色で解析した。

## C. 研究結果

*Gjb2* 遺伝子欠失マウスと同腹の野生型をそれぞれ 1 匹ずつ機能解析した。

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。

## D. 考察

Cre-LoxP 系を用いた conditional knockout による *Gjb2* 欠失マウスを作成することができ、Cx26 の発現を蝸牛においてほとんど認めなかった。Cx30 で代表される他のギャップ結合蛋白は蝸牛で正常に発現しており、Cx26 の発現が選択的に欠損していることが証明された。

聴性脳幹反応による聴力検査では変異体では極めて高度な難聴像を示した。ヒトの遺伝性難聴の主な原因遺伝子である *GJB2* の異常により言語習得前の高度難聴を呈し、今回作成したマウスと極めて類似した表現型を示すことが判明し、ヒト *GJB2* 遺伝子変異による難聴のマウスモデルとなることが示唆された。現在までの解析においては、難聴の責任部位の同定や機序の解明が不十分であり、今後のさらなる研究が必要である。

## E. 結論

Cre-LoxP 系を用いた conditional knockout により、蝸牛における Cx26 ギャップ結合蛋白を選択的に欠失したマウスを作成した。ヒト *GJB2* 遺伝子変異による難聴のマウスモデルとなることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表



論文発表

学会発表

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 厚生科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)

(総括・分担) 研究報告書

(研究題目)

DFN3モデルマウスに関する研究

(分担) 研究者 大島猛史

東北大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学分野助手

## 研究要旨

1999年に私たちの共同研究グループは遺伝性難聴の動物モデルとして *Brn 4* ノックアウトマウスを作成し、伴性劣性遺伝性難聴 DFN3 において蝸牛外側壁螺旋靭帯の線維細胞の変性が先天性難聴の原因であることを証明した (*Science* 285: 1418-1411, 1999)。一方、臨床のデータより、一部分の DFN3 の女性キャリアが進行性非症候性難聴の症状を示すことが知られていたが、原因は不明のままだった。今回、私たちは老齢 (生後1年) の *Brn 4* ノックアウトマウスについて、聴力評価、組織学の解析を行った。この結果より、女性保因者の難聴の機序を説明することが可能である。

## A. 研究目的

臨床的には、DFN3 の女性保因者の一部が進行性非症候性難聴をしめすことが以前から知られている。今回私たちは、臨床の進行性非症候性難聴の発生機序を解明する目的で、この *Brn 4* (DFN3) 欠失変異の動物モデルの老齢マウスを解析した。

## B. 研究方法

老齢 (生後1年) の *Brn 4* ノックアウトマウスと老齢 (生後1年) の野生型コントロールマウスを実験対象として、ネブタール腹腔麻酔下にて聴性脳幹反応 (ABR) を測定した。組織学的観察には4%パラホルムアルデヒドによる外リンパ灌流で4℃、一晚固定した。その後、0.12M EDTA で脱灰、エタノールによる脱水、パラフィン包埋し、各種の抗体による免疫組織を行った。

## C. 研究結果

ABR: 生後12週のヘテロ接合体マウスはいずれも28dB以下の閾値である (以前のデータ)。老齢 (生後1年) の野生型マウスはC57BL/6系統の影響で平均53.9dBの閾値であるのに対し、ホモマウスは平均100dBの閾値であった。興味深いことに、大部分のメスヘテロ接合体マウスは平均50.3dBの閾値であるのに対し、ほぼ1/3のメスヘテロ接合体マウスは平均96.3dBの閾値であり、高度難聴であった。

HE染色: ヘマトキシリン・エオジン染色では、老齢 (生後1年) の野生型マウス及びABR低閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛組織像は正常であるのに対し、ホモマウス及びABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、Reissner膜と外側壁の接合部位が剥離していた。

免疫組織化学染色: 老齢 (生後1年) の野生型マウス及びABR低閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、螺旋靭帯のII型線維細胞及び血管条の基底細胞におけるconnexin26蛋白と関連蛋白であるconnexin31蛋白の発現量が多いのに対し、ホモマウス及びABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛においてこれらの蛋白の発現

量が低下していることが認められた。そのうえ、老齢 (生後1年) の野生型マウス及びABR低閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、螺旋靭帯の螺旋靭帯のII型線維細胞及び血管条の辺縁細胞におけるNa, K-ATPaseとNa-K-Cl共輸送体の発現量が多いのに対し、ホモマウス及びABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛においてこれらの蛋白の発現量が減少している所見も認められた。

## D. 考察

臨床的には、DFN3の一部の女性保因者に進行性非症候性難聴を生じることが以前から知られている。今回、私たちはこの *Brn 4* (DFN3) 欠失変異の動物モデルの老齢マウスを分析した結果、臨床の女性保因者の聴力と一致していることを示した。組織像ではマウスの蝸牛における、Reissner膜と外側壁の結合部位が剥離していることが判った。

近年、螺旋靭帯の線維細胞はコネキシン26ギャップ結合蛋白によって血管条の基底細胞と連結しており、Na, K-ATPase, Na-K-Cl共輸送体とともに内リンパ形成の主要イオンである $K^+$ イオンの供給の経路であることが提唱されている。従って、*Brn 4* 変異体で認められる線維細胞のイオン輸送体の破綻によって血管条への $K^+$ イオンの供給が阻害され、内リンパ形成に異常が生じたと推定される。ヒトDFN3の混合難聴の感音成分の障害機序を明確に提示している。

## E. 結論

*Brn 4* (DFN3) 欠失変異の動物モデルの老齢マウスを分析した結果、臨床の女性キャリアの聴力と一致していることを示した。老齢のホモマウス及びABR高閾値のメスヘテロ接合体マウスの蝸牛において、これらのCx26, Cx31, Na, K-ATPase及びNa-K-Cl共輸送体蛋白の発現量が極めて減少することにより、内耳においてはイオン輸送の重要な経路の障害がもたらされ、遺伝性難聴が惹起されるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Late-onset hearing loss in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness: Morphologic and immunohistochemical analysis. An-Ping Xia, Toshihiko Kikuchi, Osamu Minowa, Yukio Katori, Takeshi Oshima, Tetsuo Noda, Katsuhisa Ikeda  
*Hearing Research* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 厚生科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)

(分担) 研究報告書

*GJB2* 遺伝子変異による難聴の解析

分担研究者 松原洋一

東北大学大学院医学系研究科小児医学講座遺伝病学分野教授

## 研究要旨

*GJB2* 遺伝子変異は先天性難聴の原因として重要であるが、その難聴の発生機序についてはこれまで解析されていなかった。今回我々は世界に先駆けてモデルマウスを作成し、難聴の発生機序を解析した。その結果、*GJB2* 変異マウスはヒト同様の先天性高度難聴を示し、組織学的解析によりコルチ器支持細胞の変性によるコルチ器の形成障害が難聴の一次的原因であることが判った。これまで障害の一次的部位とされていた螺旋靭帯の線維細胞には、機能的にも形態的にも変化を認めなかった。タイ人先天性難聴者の *GJB2* 遺伝子を解析した結果、日本人に高頻度に見られる 235delC 変異がタイ人にも見られることが判った。

## A. 研究目的

欧米人種において、先天性難聴の半数は *GJB2* 遺伝子変異によるものであることが知られている。平成 12 年度の研究で我々は、*GJB2* 遺伝子変異が日本人の先天性難聴者にも見られ、多くの人種にわたって難聴を引き起こしている重要な遺伝子であることを示した。その聴力障害の発生機序は、コルチ器支持細胞から外側壁線維細胞をつなぐギャップジャンクションの障害により内リンパへの K<sup>+</sup>イオンリサイクルが障害されるためではないかと推測されている。しかしながら、患者において形態学的生理学的には十分に解析されていない。以前作成されたノックアウトマウスは胎盤の機能不全により胎生致死で、内耳の解析は不可能だった。今回、我々は、モデルマウスを作成し、形態学的、生理学的に解析することにした。また、ヒト患者における *GJB2* 遺伝子解析をさらに広範囲におこなった。

## B. 研究方法

1. モデルマウスの作成と解析: 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 connexin26 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について、生後 2 週及び生後 7 週で ABR (聴性脳幹反応) による聴力評価と、光学顕微鏡および電子顕微鏡による組織学的解析を行った。また、生理学的解析として内リンパ電位の測定、ローターロッド試験を行った。

2. タイ人の *GJB2* 遺伝子解析

対象はタイ・バンコクの聾学校に通学するタイ人

の小児難聴児及びその家族 12 家系 17 人。*GJB2* 遺伝子の翻訳領域 678 塩基をカバーするプライマーペアを作成し、PCR 増幅、直接シーケンシングした。

## C. 研究結果

1. モデルマウスの作成: 2 系統の変異マウスが誕生した。いずれも生後 2 週より約 100dB の高度難聴を示した。内リンパ電位は正常範囲だった。形態学的には、コルチトンネルの無形成と Deiter 細胞の変形といったコルチ器支持細胞の形成障害を認め、週齢が進むと有毛細胞とらせん神経節の脱落を生じた。蝸牛外側壁のらせん靭帯線維細胞および血管条、前庭平衡器には形態学的異常を認めなかった。

## 2. タイ人における遺伝子解析

12 家系 17 人中、3 家系 4 人に *GJB2* 遺伝子変異を認めた。変異の種類は、235delC, W24X, M34L だった。235delC 変異は、日本人と同様のハプロタイプと連鎖していた。

## D. 考察

優性的阻害効果のある変異を Cre-loxP で発現調節することにより、従来困難であった *GJB2* のモデル動物を作成し、解析することに成功した。その結果、*GJB2* 変異による蝸牛の障害部位は主にコルチ器であり、螺旋靭帯の線維細胞には変化が無かった。有毛細胞に変性を生じる以前から高度難聴を示し、支持細胞の障害により有毛細胞の活動が障害されるものと考えられた。支持細胞に異常を生じる機序は不明で今後の解析が必要だが、connexin26 が細胞の増殖分化のコントロールに何らかの役割を果たしていることが想像された。

タイ人 *GJB2* 遺伝子の 235delC 変異が日本人と同様の傾向を示したことから、*GJB2* 遺伝子に関してアジア人に共通のバックグラウンドが存在する可能性が示唆された。

## E. 結論

*GJB2* 遺伝子変異による難聴の発生機序は、コルチ器の形成障害とそれともなう有毛細胞の機能障害であることが判った。日本人の高頻度変異である

235delC が、タイ人にも存在することが判った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

*GJB2* (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. Takayuki Kudo, Katsuhisa Ikeda, Takeshi Oshima, Shigeo Kure, Maliwan Tammasaeng, Suchitra Prasansuk, and Yoichi Matsubara. *Otol. Neurotol.* 22: 858-861 (2001)

学会発表

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

(なし)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
An-Ping Xia, Toshihiko Kikuchi, Osamu Minowa, Yukio Katori, Takeshi Oshima, Tetsuo Noda, Katsuhisa Ikeda	Late-onset hearing loss in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness: Morphologic and immunohistochemical analysis.	<i>Hearing Res.</i>			in press
Takayuki Kudo, Katsuhisa Ikeda, Takeshi Oshima, Shigeo Kure, Maliwan Tammasaeng, Suchitra Prasansuk, and Yoichi Matsubara.	<i>GJB2</i> (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand.	<i>Otol. Neurotol.</i>	22	858-861	2001