

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

内耳プロテオーム解析を応用した外リンパ瘻の  
新たな診断法の開発・治療指針の作成

平成17（2005）年度～

平成19（2007）年度

総合研究報告書

主任研究者 池園 哲郎

平成20（2008）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

内耳プロテオーム解析を応用した外リンパ瘻の  
新たな診断法の開発・治療指針の作成

平成17（2005）年度～

平成19（2007）年度

総合研究報告書

主任研究者 池園 哲郎

平成20（2008）年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

内耳プロテオーム解析を応用した外リンパ瘻の  
新たな診断法の開発・治療指針の作成

主任研究者 池園哲郎

----- 1

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 11

### III. 研究成果の刊行物・別刷り

----- 15

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総合研究報告書

内耳プロテオーム解析を応用した  
外リンパ瘻の新たな診断法の開発・治療指針の作成  
主任研究者 池園哲郎 日本医科大学准教授

研究要旨

1. 研究目的

難聴・平衡障害の原因疾患「外リンパ瘻」は迅速に手術治療を行うことで劇的な治療効果が得られる疾患である。本研究の目的は外リンパ瘻の確定診断法を開発して、早期に確定診断し、治癒率の向上をもたらすことにある。

2. 研究方法

背景：内耳性難聴・めまいの原因疾患である外リンパ瘻の症状、検査所見は多彩でありその他の突発性難聴やメニエール病と鑑別が容易ではない。確定診断法が確立しておらず、治癒率の低下をもたらしている。我々は内耳プロテオーム解析を行い、外リンパ瘻の生化学的確定診断マーカーCTPを発見し国内・国際特許出願した。

方法：[1] 検査システムのクオリティーコントロール ウェスタンブロット法による検査システムの至適条件を設定し、クオリティーコントロール（精度管理）を確立する。

[2] 外リンパ瘻診断の精度（diagnostic performance） CTP検出法による外リンパ瘻の診断精度を、STARD statement（STANDARDS for the Reporting of Diagnostic accuracy studies）に準拠して評価する。

[3] 臨床症例の検討 下記分類に従い検討する。1. 頭部外傷性 2. 中耳外傷性 3. 特発性（いわゆる鼻かみ型） 4. 小児変動性難聴 5. 医原性 6. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔 7. 慢性・遅発性外リンパ瘻

[4] POCT(Point of care testing;臨床の現場での検査)の開発。 ELISA法の基礎研究を行う。

[5] CTPの基礎研究。研究協力者のハーバード大学ロバートソン博士と協力し、DFNA9症例のCochlinの

発現を蛋白科学的に検討する。

### 3. 研究結果及び考察

[1] 検査システムのクオリティーコントロール 標品（リコンビナント蛋白）の検出感度下限濃度a (0.27 ng/ well) 及びその1/2濃度bの点の2点を毎回検査サンプルと共に泳動し、精度管理した。希釈外リンパの検出限界は平均0.022  $\mu$  l/well であった。

[2] 外リンパ瘻診断の精度 本検査は下記のように非常に良好な診断精度を有すると評価された。

感受性 91.5% (95%CI , 83.5 - 99.5%)      特異性 98.2% (95%CI, 96.4 - 100.0%)

[3] 臨床症例の検討 前記分類に従って、臨床例の検討を行った。それぞれの疾患カテゴリーで、診断・治療両面にわたり新知見が得られた。（内容略）

[4] POCT(Point of care testing;臨床の現場での検査)の開発。ELISA法を開発中である。本方法は、cut off値の設定により明確な判定基準が設定できることから、検査者の熟練度が低くても施行可能であり、本検査の広い普及が可能となる。

[5] CTPの基礎研究。DFNA9の発症メカニズムを検討した。患者側頭骨標本を用いた免疫染色、プロテオーム解析により沈着している好酸性物質がCochlinそのものであることを証明した。

### 4. 結論

総括 本検査は世界で初めて外リンパ瘻の生化学的確定診断を可能にするものであり、国内外の臨床家、基礎研究者から多くの注目を集めている。今後、本研究成果を広め、国内外でマルチセンタースタディーを行う予定である。外リンパ瘻は的確な診断で大きな治療効果が期待できる疾患である。耳鼻咽喉科・神経耳科の診断が患者のQOL、後遺症の有無を大きく左右する。本研究事業の成果を広く普及させることで大きな具体的な効果が望める。

## 分担研究者

渡邊 淳 日本医科大学第2生化学

(日本医科大学付属病院)

助手

### 1. 研究目的

難聴・平衡障害の原因疾患「外リンパ瘻」は迅速に手術治療を行うことで劇的な治療効果が得られる疾患である。本研究の目的は外リンパ瘻の新たな確定診断法を開発して、早期に確定診断し、治癒率の向上をもたらすことにある。

### 2. 研究方法

背景：内耳性難聴・めまいの原因疾患である外リンパ瘻の症状、検査所見は多彩でありその他の突発性難聴やメニエール病と鑑別が容易ではない。確定診断法が確立しておらず、治癒率の低下をもたらしている。我々は内耳プロテオーム解析を行い、外リンパ瘻の生化学的確定診断マーカーCTPを発見し国内・国際特許出願した。

方法：

[1] 確実にCTPを検出するためには、高い検出感度、特異度が求められる。数種類のポリクローナル (polyAb) を作成し、ウェスタンブロット法による検査システムの至適条件を設定し、クオリティーコントロール (精度管理) を確立する。

[2] 外リンパ瘻の診断精度 (diagnostic performance) CTP検出法による外リンパ瘻の診断精度を、診断に関する研究のガイドラインであるSTARD statement (Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies) に準拠して評価する。

[3] このシステムを用いて臨床症例の検討を行う。対象疾患は、1. 従来の診断基準による、特発性外リンパ瘻疑い例、2. 耳かきによる外傷性鼓膜穿孔、3. 側頭骨骨折、4. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔、5. 小児変動性難聴、6. 医原性等等の術中サンプルを採取してCTPの存在を判定する。

[4] 新規に抗体を作成し、POCT(Point of care testing ;臨床の現場での検査)のためにイミュノクロマト法、ELISA法の基礎研究を行う。

[5] CTPの基礎研究も行う。研究協力者のハーバード大学ロバートソン博士と、the Massachusetts Eye and Ear Infirmary、オランダNijmegenの Radboud University Medical Centerらと、正常内耳ならびにDFNA9症例の Cochlinの発現を蛋白科学的に検討する。

(倫理面の配慮) 検体提供者に対しては試料採取前に研究の趣旨を説明し検体採取による不利益や危険性の無いことを説明、理解を得たうえで同意を得る。本学倫理委員会承認済みである。動物実験は、日本医科大学動物実験倫理委員会の審査を経て許可を受けて行う。動物実験にあたっては、倫理的な動物実験を遂行し、動物の愛護的扱いに留意する。

### 3. 結果

[1] 現在の検査システムのクオリティーコントロール 標品の検出感度下限濃度a (0.27ng/ well) 及びその1/2濃度bの点の2点を毎回検査サンプルと共に泳動し、aが陽性、bが陰性となった検査を精度管理上問題なしと判断して採用した。この方法で良好な再現性が得られ検査の精度管理が可能になった。この方法で得られた希釈外リンパの検出限界は平均0.022  $\mu$ l/well であった。

[2] 外リンパ瘻の診断精度 (diagnostic performance)

外リンパ瘻では診断のゴールドスタンダードが確立しておらず、本検査法のような新規診断法の診断精度を正しく評価することは容易ではない。そこで、我々は下記のようにPLF確実例、non-PLF例を定義して、CTP検査を施行した。診断精度の評価に必要な症例数は統計学的 (power analysis) に算出した。

PLF確定例 が極めてゼロに近い症例 (アブミ骨手術 人工内耳) 伝音難聴の試験的鼓室開放	non-PLF例 (PLFである可能性 (アブミ・蝸牛開窓前、	
CTP陽性	43	1
陰性	4	54

感受性 91.5% (95%CI , 83.5 - 99.5%)

特異性 98.2% (95%CI, 96.4 - 100.0%)

陽性尤度比 50.2

[3] 現行の LCCL 3 抗体を用いたウェスタンブロット法によるCTP検出法の検査結果

上記診断精度を確立したCTP検査法を用いて臨床例の検討を加えた結果を以下に記す。

#### ■外リンパ瘻診断における留意事項

CTP検査は発症早期の方が陽性に出やすく、瘻孔が自然閉鎖すると陰性になる。また、本検査は特異性が高いのが特徴で、検査結果がCTP陽性の場合、間違いなく外リンパ瘻と言ええるが、結果が陰性だった場合下記の可能性が考えられる。

1. 漏出なし 外リンパ瘻ではない
2. 瘻孔が自然治癒した 外リンパ瘻
3. 間欠的漏出であった 外リンパ瘻

4. 漏出外リンパが微量で検出できず

外リンパ瘻

上記を念頭に置いた上で、各カテゴリーにおける検査結果のまとめと、症例の検討、治療方針の概略を記す。

臨床の現場で遭遇する外リンパ瘻の分類

1. 頭部外傷性
2. 中耳外傷性
3. 特発性 (いわゆる鼻かみ型)
4. 小児変動性難聴
5. 医原性
6. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔
7. 慢性 遅発性外リンパ瘻

頭部外傷性

#### 検査結果と症例の検討

難聴の程度、頭部外傷の程度様々だが約3割の症例で陽性であった。骨折が全くないのに聾の2名はともにCTP陽性だった。外傷後の難聴が軽度でも陽性の症例もあり、頭部外傷では外リンパ瘻になりやすいと言える。

当院の人工内耳手術症例 (両側高度難聴) の病歴を調べてみると、30例中2例が交通外傷 (全身打撲、頭部打撲) 後の失聴であった。受傷当時には担当医師から原因不明で治療法が無いと説明されていた。外傷性難聴の原因として外リンパ瘻があることは、北米では有名であるが本邦では、ほとんど認知されていないと思われる。

頭部外傷性外リンパ瘻治療方針

頭部外傷後の難聴では外リンパ瘻を積極的に疑い治療すべきである。CTで異常が無いからと言って、外傷と関連が無い、治療法が無いと思っはいけない。内耳窓閉鎖手術の治療効果については今後の検討課題である。内

耳に骨折があると、将来的に同部位が3rd Mobile Window (Minor LB) となる可能性があり、骨折部位の修復は積極的に行う意義があろう。

2. 鼓膜・中耳外傷 5/14人 陽性

#### 検査結果と症例の検討

本邦では耳かきが日常習慣的に行われており、中耳（鼓膜、耳小骨）外傷の最も多い原因となっている。当然ながら、アブミ骨に耳かきがあたるアブミ外傷が外リンパ瘻をきたしやすい。しかしアブミ付近に鼓膜外傷があっても、外リンパ瘻をきたしているとは限らず、CTP検査で外リンパ漏出をきたしたのか、それとも単にアブミ骨に外力が加わっただけなのか判定できる。外リンパ漏出をきたさなくても、外力が加わっただけで難聴をきたすことは以前より鼓室形成術における合併症などで広く知られており、この場合の原因としては音響外傷、内耳への直接の影響が考えられる。

アブミ骨直達外傷に関して、臨床上役立つ新知見を列記する。

急性例；聴力が正常で、めまいを主訴とするCaseが存在する。また進行性に聴力が悪化しない症例でも、めまいの増悪が病態の進行を敏感に反映する。

慢性化する場合；漏出が続いていてもゆっくりとした漏出なら聾にならない。過去に報告されている通り、長時間放置すればいずれ聾になることが予想される。

#### アブミ骨輪状靭帯損傷・陥入 治療方針

外リンパ漏出の持続があるか否か、すなわちCTP陽性かどうかが決め手となる。

急性例 アブミ骨を整復すべきか否か、迷う症例がある。すなわち輪状靭帯周囲組織が修復されて自然治癒する場合があるからである。受傷後、外リンパの漏出が持続し

ていれば迷わず手術する。

慢性例 外リンパ漏出が続くと、数年の経過で聾になることが予想される。聾になる前にこれを診断して手術を行う必要がある。外傷部位の結合組織が修復され、漏出が停止していれば保存的に治療することも可能である。ただし、ここが3rd Mobile Windowとなっていれば慢性めまいの原因となる。

### 3. 特発性外リンパ瘻

#### 検査結果と症例の検討

本邦の厚労省急性高度難聴研究班 診断基準に基づいて診断された症例である。

病歴上、誘因が一切無い真の特発性外リンパ瘻も存在した。この症例は、水様性耳鳴、聴力・眼振の変動から外リンパ瘻が疑われ内耳窓閉鎖術を行った。突発性難聴と診断されている症例の中に、外リンパ瘻が含まれているのは間違いないことが、初めて科学的に証明されたとと言える。北米では特発性外リンパ瘻が疾患として認められておらず、未だに議論の対象となっている。本邦の厚労省急性高度難聴研究班が診断基準を作成した当初の目的は、突発性難聴の鑑別診断として外リンパ瘻を診断し治療しようということであったが、その目的を側面から支持する結果となった。

特発性外リンパ瘻の発症リスクが高いのは、外気・水圧変動と高度炎症である。具体的には、飛行機搭乗、スキューバダイビング、そして高度炎症を伴う好酸球性中耳炎であった。中耳炎罹患中、もしくは、飛行機を乗り継ぐ間に中耳炎（航空性中耳炎）を発症し、そのまま旅行を続けることで外リンパ瘻が発症した症例があった。また、両側好酸球性中耳炎による高度慢性中耳炎症がある症例で、鼻かみにより突然聾になった症例もあった。



## 特発性外リンパ瘻治療方針

今後早期治療と聴力改善の関係、特発性外リンパ瘻でCTP陽性と確定診断された症例の詳細な解析を行うことで、治療方針を検討する予定である。

4. 小児変動性難聴の中にも外リンパ瘻が存在した。中耳の微細な奇形に伴って外リンパ瘻が発症し、変動性・進行性難聴を呈する可能性があることは以前からピッツバーグ小児病院ブルーストーンが提唱していた。本研究で、この疾患が実際に存在することが証明された。

## 5. 医原性外リンパ瘻

耳鼻咽喉科診療で行われる耳管通気治療による医原性外リンパ瘻と思われる症例を3例経験した。病歴上、通気直後から発症した3症例で、高度難聴となり補聴器を装用した症例、すでに数年前に聾となり人工内耳埋め込み術を行った症例、進行性の高度難聴となり内耳窓閉鎖手術でほぼ正常まで改善した症例である。病歴上通気治療が原因になっていると考えられる。

## 6. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔

中耳真珠腫合併症の内耳瘻孔は5-10%の頻度で存在する。瘻孔の深達度は本疾患の治療を行う上で術後合併症の発症を左右する非常に重要なポイントである。Milewskiは瘻孔の大きさと深度によってこれを3度に分類した。

1度は骨迷路が破壊されても内耳膜が保たれている、2度は内耳膜が開放され(a)外リンパ漏出なく膜迷路は正常、(b)外リンパ漏出があり膜迷路の障害がある、3度は膜迷路の破壊がある、である。実際の術中所見を観察してもその深達度を正確に判定することは難しく、1度なのか2度なのか、実際に漏出があるのかないのか、正確に判定することは困難である。なぜなら瘻孔局所を操

作して正確な判定を行おうとすればそれがすなわち内耳膜損傷、内耳障害をもたらすからである。我々は、外リンパ特異的蛋白CTPにより外リンパ漏出の有無を判定し、内耳瘻孔の深達度診断の参考にすることができた。術中所見で瘻孔が大きく骨欠損が明らかでも、内耳膜が保たれており、外リンパ漏出は見られなかった症例がある一方で、骨欠損が小さくても内耳膜が欠損し、外リンパが漏出していた症例があった。

深達度の正確な判定は、真珠腫による内耳機能障害のメカニズムの解明、術後の機能障害の予測、予防、治療など様々な分野に重要な示唆を与えると思われた。

7. 慢性・遅発性症例が存在することが判明した。

①頭部外傷後、3ヶ月後に感音難聴が悪化し、CTPが陽性であった症例。

②小児期の内耳骨折が原因で、一側聾となり、24歳でめまいが発症し、遅発性内リンパ水腫と診断されていた。30歳時に当科で骨折線を骨パテで埋め、内耳（外リンパ）瘻孔を塞ぐことでめまいが完治した。CTPは陰性であり、外リンパ漏出が停止した状態で3rd mobile windowとなっていたと考えられる。

③交通外傷後、低音障害型難聴とめまい発作を反復し、メニエール病と診断されていた症例は内耳窓閉鎖手術で完治した。CTPは陽性であった。

[4] 今年度作成したIBL-ポリクローナル抗体の品質を検討

昨年度、様々な工夫をこらして作成した抗ペプチドポリクローナル抗体（IBL-B2, IBL-C）は、本検査開始当時使用していたLCCL3抗体と比べて特異性・感受性ともに大きく改善した。この抗体を用いてイミュノクロマト法開発に着手した。イミュノクロマト法では変性処理を

加えないNative CTPを検出するが、基礎研究の結果、本方法は実用化には適さない事が判明した。現在、部分的な変性処理を加えたCTPを検出するELISA法を開発中である。本方法は、cut off値の設定により明確な判定基準が設定できることから検査者の熟練度が低くても施行可能であり、本検査の広い普及が可能となる。

[5] DFNA9の発症メカニズムを検討した。DFNA9患者の内耳組織にはSpiral ligament、limbus等に特徴的な好酸性物質の沈着、それに伴う神経の変性が見られる。我々は、患者側頭骨標本を用いた免疫染色、プロテオーム解析により沈着している好酸性物質がCochlinそのものであることを証明した。

#### 4. 考察 (研究成果の評価)

##### 1) 達成度について

ウエスタンブロット法で、臨床サンプルの検討を開始した。今年度は150検体を検査(国内24病院)さらに韓国の検体を検査し、北米小児病院と共同研究が開始された。検査依頼があった。

当初計画ではH19年度より一般の病院からの検体受付を開始する計画であったが、計画を前倒して、H18年度すでに一般病院からの検体受けを開始した。現在その結果に基づいて治療指針を作製中である。

また、検査の迅速化、のためELISA法の基礎研究を行っている。

##### 2) 研究成果の学術的意義について

我々は外リンパ瘻の診断技術の開発ならびに診断マーカーCTPの基礎研究を同時に進行させている。今まで不可能であった外リンパ瘻の確定診断が世界で初めて

可能になり、その医学的意義は非常に高い。厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班が定めた外リンパ瘻診断基準に基づき診断された「特発性外リンパ瘻」症例からCTPが検出されたことで、従来その存在を疑問視する意見も根強かった特発性外リンパ瘻症例の存在を改めて生化学的に確定診断した。また、以前は難聴の発症機序が特定できなかった様々な症例からもCTPが検出され、その手術時期、手術適応の判断に大きく寄与する事ができる。

今まで原因のはっきりしなかった外傷性難聴、小児の変動性感音難聴、突発性難聴、メニエール病などに外リンパ瘻が含まれている事を明らかにした。さらに、めまいのみで難聴が無い外リンパ瘻も存在し、今までの常識を覆す結果だった。さらに、耳管通気治療による医原性外リンパ瘻と思われる3症例(病歴上、通気直後から発症した症例であり2/3症例がCTP陽性)を経験した。これらの結果は、難聴診断治療のEBM確立に多大なる貢献をすると期待されている。

いままでも主観的な判断に頼っていた外リンパ瘻診断を客観的に診断できればマルチセンタースタディーが可能になり、新たな診断・治療指針作成が可能になる。治癒率の向上はきたるべき超高齢化社会におけるコミュニケーション障害の予防に貢献する。

CTPのプリカーサーであるCochlinの基礎研究の結果、実際のDFNA9臨床例で見られる病理組織学的変化の原因を解明した。この結果は、今後難聴の診断・治療に関して新たな展望を開く重要なものである。

##### 3) 研究成果の行政的意義について

外リンパ瘻は手術により完治が望める疾患である。本検査の普及により早期診断・治療が可能になり、治癒率が大きく改善し、保険医療の適正な運用をもたらす。後

遺障害に悩む症例が減り、健康で労働可能な成人数を増加させる。

難聴・めまい疾患の診断・治療のEBM確立に多大なる貢献をする。その結果、適切な医療が施行され無駄な投薬、通院、入院が減り、医療費の適正使用を推進する。

#### 4) その他特記すべき事項について

平成18年度、厚生労働省感覚器障害研究事業 尤も実り多い研究に選ばれた。

#### 5. 結論 (まとめ)

本検査は世界で初めて外リンパ嚢の生化学的確定診断を可能にするものであり、国内外の臨床家、基礎研究者から多くの注目を集めている。今後、本研究成果を広め、国内外でマルチセンタースタディーを行う予定である。

外リンパ嚢は的確な診断で大きな治療効果が期待できる疾患である。耳鼻咽喉科・神経耳科の診断が患者のQOL、後遺症の有無を大きく左右する。本研究事業の成果を広く普及させることで大きな具体的な効果が望める。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

2005-2007年度

##### 英文原著

1. Li L, Ikezono T, Watanabe A, Shindo S, Pawankar R, Yagi T Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx*, 32(3): 219-223. 2005
2. Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T Expression of

cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL*, 67(5): 252-258. 2005

3. Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr, Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC. Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. *Hum Mol Genet*. 15(7): 1071-1085. 2006
4. Shindo S, Ikezono T, Ishizaki M, Sekiguchi S, Mizuta K, Li L, Takumida M, Pawankar R, Yagi T. Spatiotemporal expression of cochlin in the inner ear of rats during postnatal development. *Neurosci Lett*. 444:148-152. 2008
5. Mizuta K, Ikezono T, Iwasaki S, Arai M, Hashimoto Y, Pawankar R, Watanabe T, Shindo S, Mineta H. Ultrastructural colocalization of cochlin and type II collagen in the rat semicircular canal. *Neuroscience Letters*. 434:104-107. 2008

#### 原著

1. 新藤晋、池園哲郎、八木聡明 迷路気腫を伴った術後性外リンパ嚢の1例 耳鼻咽喉科・頭頸部外科79(10):725-729, 2007

#### 総説

1. 池園哲郎 内耳プロテオーム解析と COCH 遺伝子アイソフォーム 基礎研究の臨床応用をめざして耳鼻咽喉科・頭頸部外科 76(12):838-849. 2004
2. 池園哲郎 外リンパ嚢の診断マーカーとしての Cochlin-Tomoprotein (CTP) 臨床検査 49(11):1259-1263. 2005
3. 池園哲郎 【末梢前庭器から前庭神経核へ 最近の知見】 COCH 遺伝子とめまい Equilibrium Research 64(1):1-11. 2005
4. 池園哲郎 聴力改善手術】外リンパ嚢 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 77(5):162-173. 2005
5. 池園哲郎 【耳鼻咽喉科・頭頸部外科 症候群事典】 Dejerine syndrome(延髄傍正中脳 syndrome) 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 78(5):90-91. 2006

6. 池園哲郎 【耳鼻咽喉科救急医療マニュアル】救急疾患の診断と治療 外リンパ瘻 JOHNS 22(3):345-350. 2006
7. 新藤晋、池園哲郎 DPC に対応したクリニカルパスの実際 耳硬化症 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 78(13):1067-1076. 2006
8. 池園哲郎 COCH 遺伝子と cochlin 蛋白- 外リンパ瘻の診断における有用性 日本耳鼻咽喉科学会専門医通信第90号:14-15. 2007
9. 池園哲郎 【外リンパ瘻の診断と治療】診断におけるコクリンの意義と検査精度・診断精度 ENTONI 94:51-56. 2008
10. 池園哲郎 専門講座 外リンパ瘻 日本耳鼻咽喉科学会会報, 111(10): 676-679. 2008
11. 池園哲郎 【メニエール病を理解する】メニエール病と周辺疾患 急性低音障害型感音難聴 JOHNS 25(6): 895-898. 2009
12. 渡辺行雄、池園哲郎、伊藤壽一、柿木章伸、肥塚泉、鈴木衛、高橋克昌、工田昌也、武田憲昭、土井勝美、山下裕司、青木光広、宇佐美真一、高橋正紘、長沼英明、厚生労働省難治性疾患克服研究事業前庭機能異常に関する調査研究班 メニエール病診断基準 Equilibrium Research 68(2):103-106. 2009
13. 小泉康雄、池園哲郎 乗り物酔いの機序とその予防対策 小児科. 50(5): 629-635. 2009
14. 池園哲郎 【訴えからみためまいの見分け方】外傷後のめまい. ENTONI 102: 53-59. 2009

## 著書

1. 池園哲郎 メニエール病と外リンパ瘻 内耳窓閉鎖術で改善する慢性外リンパ瘻を見逃さないために めまい診療のコツと落とし穴(高橋正紘編):30-31, 中山書店 2005
  2. 池園哲郎 良性発作性頭位めまい症 診療アップデート(日経メディカル編): 132-135, 日経 BP 社 2005
  3. 池園哲郎 外リンパ瘻 今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針第3版(森山 寛 他編):168-169, 医学書院 2008
  4. 池園哲郎 外リンパ瘻 今日の治療指針 2008 年度(山口 徹 編):1096-1097, 医学書院 2008
  5. 池園哲郎 外リンパ瘻感覚器医学ロードマップ 改訂第二版 感覚器障害の克服と支援を目指す 10 年間(日本学術会議 臨床医学委員会 感覚器分科会編):62-65 日本学術会議 2008
2. 学会発表

## 国際学会

1. Ikezono T: Inner Ear Proteomics and its Application as a Novel diagnostic test for

PLF -Impact on the treatment of inner ear diseases. Nippon Medical School-Soul National University Joint Meeting (Tokyo, Japan). June, 2005.

2. Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe, Saito A, Yagi T: Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. The 11<sup>th</sup> Japan-Korea joint meeting of Otorhinolaryngology-Head and neck surgery (Busan, Korea). April, 2006.
3. Shindo S, Ikezono T, Yagi T: Isoform-Specific Analysis of Cochlin in the Developing Rat. The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2007 Annual Meeting & OTO EXPO. (Washington, DC, USA). September, 2007.
4. Shindo S, Ikezono T, Yagi T: Isoform-Specific Analysis of Cochlin in the Developing Rat. The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2007 Annual Meeting & OTO EXPO. (Washington, DC, USA). September, 2007.
5. Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Li L, Pawankar R, Yagi T: A Novel Perilymph-Specific Protein for PLF Diagnosis. The American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation 2007 Annual Meeting & OTO EXPO. (Washington, DC, USA). September, 2007.

## 国内学会

1. 池園哲郎: 臨床セミナー 外リンパ瘻. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 2006. 5.
2. 池園哲郎、新藤晋、李麗淑、相田瑞恵、杉崎一樹、後藤裕一、馬場俊吉、八木聡明: 頭部外傷と内耳障害. 第106回日本耳鼻咽喉科学会. 2005. 5.
3. 池園哲郎、新藤 晋、李 麗淑、松田 帆、小泉 康雄、齋藤 明彦、馬場 俊吉、八木 聡明: 本当にメニエール病か 慢性外リンパ瘻との鑑別診断. 第2回東京メニエール病カンファレンス. 2005. 6.
4. 加藤政利, 野原秀明, 緒方たつ子, 斉藤公一, 本間博, 新藤晋, 池園哲郎, 八木聡明: エア-カロリックテストの検討. 日本医科大学医学会. 2005. 10.
5. 池園哲郎、新藤晋、李麗淑、関根久遠、八木聡明: CTP 検出法を臨床検査として確立するためのクオリティーコントロール. 第63回日本平衡神経科学会 2005. 11.
6. 新藤晋、池園哲郎、李麗淑、八木聡明: 発生過程における Cochlin 発現の検討-ウェスタンブロッティングを用いて-. 第63回日本平衡神経科学会 2005. 11.

7. 池園哲郎：外リンパ瘻の診断と治療 第107回日本耳鼻咽喉科学会 2006. 5.
8. 関根久遠、池園哲郎、松田 帆、中澤裕子、新藤晋、李 麗淑、小泉康雄、齋藤明彦、馬場俊吉、八木聰明：内リンパ水腫疾患と診断されていた慢性外リンパ瘻の2症例. 第6回耳鳴りと難聴の研究会. 2006. 7.
9. 池園哲郎、新藤晋、相田瑞恵、李麗淑、関根久遠、稲井俊太、八木聰明：アブミ骨奇形に伴う小児の変動性難聴. 第16回日本耳科学会. 2006. 10.
10. 新藤晋、池園哲郎、稲井俊太、八木聰明：迷路気腫を伴った術後性外リンパ瘻の一例. 第16回日本耳科学会. 2006. 10.
11. 杉崎一樹、新藤晋、池園哲郎、八木聰明：高度の低天蓋を伴った真珠腫性中耳炎の1例. 第16回日本耳科学会. 2006. 10.
12. 野原秀明、加藤政利、緒方たつ子、齋藤公一、本間博、中澤裕子、新藤晋、池園哲郎、八木聰明：両側前庭機能高度障害症例 日本医科大学医学会 2006. 10.
13. 荒井真木、水田邦博、池園哲郎、橋本泰幸、岩崎聡、渡邊高弘、峯田周幸：CochlinとCollagen type IIのラット半規管での局在 第16回日本耳科学会 2006. 10.
14. 池園哲郎、新藤 晋、李 麗淑、関根久遠、齋藤明彦、八木 聰明：前庭におけるCochlin発現. 第65回めまい平衡医学会. 2006. 11.
15. 関根久遠、池園哲郎、李麗淑、新藤晋、八木聰明：Cochlin mRNAの解析. 第65回めまい平衡医学会. 2006. 11.
16. 池園哲郎、新藤 晋、李 麗淑、関根久遠、小泉康雄、齋藤明彦、小津千佳、杉崎一樹、中村 毅、椎葉恭子、中澤裕子、八木聰明：中耳真珠腫による内耳瘻孔深達度の新しい診断法. 第108回日本耳鼻咽喉科学会. 2007. 4.
17. 櫻井努、工藤毅、二宮洋、古屋信彦、池園哲郎、新藤晋：長期にわたり聴力保存された外リンパ瘻症

- 例 第108回日本耳鼻咽喉科学会総会 2007. 4
18. 杉崎一樹、池園哲郎、新藤 晋、稲井 俊太、渡辺 淳、八木聰明：耳硬化症の3姉妹. 第17回日本耳科学会. 2007. 10.
19. 新藤 晋、池園哲郎、関根久遠、李麗淑、八木聰明：感音成分憎悪のないアブミ骨外傷による外リンパ瘻確実例. 第17回日本耳科学会. 2007. 10.
20. 池園哲郎：外リンパ液・脳脊髄液の漏出によるめまい. 第66回日本めまい平衡医学会総会教育講演. 2007. 11

#### H. 知的財産権の出願状況

特許出願

国内出願中

発明の名称：外リンパ瘻の検出方法

出願番号：特願2003-182860

出願日：平成15年6月26日

出願人：日本医科大学、三菱化学株式会社

外国出願中

国際出願番号：PCT/JP03/08123

出願日：2003年6月26日

指定国：全指定

特許出願

国内出願中

発明の名称：眼振誘発装置

出願番号：特願2005-179515号

出願日：平成17年6月20日

出願人：日本医科大学

## 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版年	ページ
池園哲郎	外リンパ瘻	日本学会 議 感覚器 医学研究連 絡委員会	感覚器医学ロード マップ 感覚器障 害の克服と支援を 目指す10年間 第2版	日本学会 議	2008	p62-65
池園哲郎	外リンパ瘻		今日の治療指針200 8年度	医学書院	2008	p1096-97
池園哲郎	外リンパ瘻		今日の耳鼻咽喉科 ・頭頸部外科治療 指針第3版	医学書院	2008	p168-169
池園哲郎	メニエール病と外リン パ瘻 内耳窓閉鎖術で 改善する慢性外リン パ瘻を見逃さないた めに	高橋正紘	めまい診療のコツ と落とし穴	中山書店	2005	P30-31
池園哲郎	良性発作性頭位めま い症		日経メディカル	日経BP社	2005	P132-135

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
Mizuta K, Ikezono T, Iwasaki S, Araia M, Hashimoto Y, Pawankar R, Watanabe T, Shindob S, Mineta H.	Ultrastructural co-localization of cochlin and type II collagen in the rat semicircular canal.	Neurosci Lett.	21;434(1)	P.104-107.	2008
Shindo S, Ikezono T, Ishizaki M, Sekiguchi S, Mizuta K, Li L, Takumida M, Pawankar R, Yagi T	Spatiotemporal expression of cochlin in the inner ear of rats during postnatal development	Neurosci Lett	444	P.148-152	2008
池園哲郎	外リンパ瘻	日本耳鼻咽喉科学会会報	111(10)	P.676-679.	2008
池園哲郎	トピックス「COCH遺伝子とcochlin蛋白-外リンパ瘻の診断における有用性」	日本耳鼻咽喉科学会専門医通信第90号	21;434(1)	P.14-15.	2007
新藤晋、池園哲郎、八木聡明	迷路気腫を伴った術後性外リンパ瘻の1例	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	79(10)	P.725-729	2007
池園哲郎	【耳鼻咽喉科・頭頸部外科 症候群事典】Dejerine syndrome(延髄傍正中中部syndrome)	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	78(5)	P.90-91	2006
池園哲郎	【耳鼻咽喉科救急医療マニュアル】 救急疾患の診断と治療 外リンパ瘻	JOHNS	22(3)	Pp.345-350	2006
Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuro SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr, Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC.	Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction.	Hum Mol Genet.	15(7)	P.1071-1085	2006
池園哲郎	COCH遺伝子とめまい	Equilibrium Research	64(1)	p.1-11.	2005
池園哲郎	外リンパ瘻	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	77(5)	P.162-173	2005
池園哲郎	外リンパ瘻の診断マーカーとしてのCochlin-Tomoprotein (CTP)	臨床検査	49(11)	P.125-1263	2005

Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T	Expression of cochlin in the vestibular organ of rats.	ORL	67 (5)	P. 252-258	2005
Li L, Ikezono T, Watanabe A, Shindo S, Pawankar R, Yagi T	Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific.	Auris Nasus Larynx,	32 (3)	P. 219-223	2005
池園哲郎	内耳プロテオーム解析とCOCH遺伝子アイソフォーム 基礎研究の臨床応用をめざして	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	76 (12)	p. 838-849.	2004





## Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific

Lishu Li<sup>a</sup>, Tetsuo Ikezono<sup>a,\*</sup>, Atsushi Watanabe<sup>b</sup>,  
 Susumu Shindo<sup>a</sup>, Ruby Pawankar<sup>a</sup>, Toshiaki Yagi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, Tokyo

Received 6 December 2004; received in revised form 21 February 2005; accepted 25 March 2005

### Abstract

The *COCH* gene mutated in DFNA9, murine an autosomal dominant hereditary hearing impairment, encodes Cochlin. Cochlin is also suggested to be the self-antigen of autoimmune sensorineural hearing loss. We previously reported that Cochlin constitutes 70% of the inner ear proteins and is classified into three types of isoform, p63s, p44s, and p40s. To study the specificity of expression of Cochlin isoforms in various organs, here we have investigated expression of the *COCH* gene at both the transcriptional and translational level. *COCH* gene expression was studied by RT-PCR and Southern blot analysis. Cochlin isoforms were studied by Western blot analysis using an isoform specific antibody. At the transcriptional level, *COCH* mRNA was detected only in the inner ear by RT-PCR. Southern blot analysis of RT-PCR products detected a high level of *COCH* mRNA in the inner ear, lower level in spleen, and very low levels in the cerebrum, cerebellum/brain stem, eye, liver and kidney. At the translational level, Western blot analysis showed that a set of isoform, p63s, p44s, and p40s was detected at high levels only in the inner ear. In contrast, multiple proteins were detected at much lower levels in other organs tested. Notably, full-length Cochlin p63s was detected only in the inner ear. Our findings demonstrate that the *COCH* gene is expressed preferentially in the inner ear and that expression of full-length Cochlin p63s is specific to the inner ear. These results will be central to understanding the function of Cochlin and its role in the pathophysiology of DFNA9.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Hereditary hearing impairment; DFNA9; Cochlin; Inner ear; Isoform; Organ specificity

### 1. Introduction

The *COCH* gene, which is mutated in DFNA9 [1–7], an autosomal dominant hereditary sensorineural hearing loss and vestibular disorder, was initially isolated by organ-specific and subtractive approaches [8] and found to be expressed abundantly in the human inner ear [9]. With the aim of elucidating the pathogenesis of DFNA9, we have been focusing on the formation of the different Cochlin isoforms. We have previously shown that Cochlin constitutes 70% of the inner ear proteins and is composed of 16 isoforms that are heterogeneous in charge and size [9]. The Cochlin isoforms can be broadly classified into three types,

p63s, p44s, and p40s, according to their molecular weight. Subsequent studies using Cochlin-specific antibodies have identified a novel short isoform, named Cochlin-tomoprotein, in the perilymph [10].

Since Cochlin has been shown to be a self-antigen of T-cell-mediated inner ear specific autoimmune disease [11], studying the patterns of *COCH* gene expression is also important to elucidate the mechanism of immunological inner ear diseases. To better understand the function of Cochlin and its role in the pathophysiology of DFNA9, here we investigated the specificity of the expression of Cochlin isoforms in various organs. The expression of the *COCH* gene was studied at both the transcriptional and translational level in various organs using highly sensitive detection techniques, RT-PCR and Southern blot analysis to study the expression at the transcriptional level, and Western blot with Cochlin isoform specific antibody and

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3822 2131x6746;  
 fax: +81 3 5685 0830.

E-mail address: tikezono@nms.ac.jp (T. Ikezono).

chemiluminescence detection to study the expression at the translational level.

**2. Materials and methods**

*2.1. Animals*

Tissues from Wistar rats (6-week-old females weighing 150 g) were removed under deep anesthesia with sodium pentobarbital (Nembutal, 50 mg/kg, i.p.). The bovine temporal bones were purchased from a slaughterhouse. This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Nippon Medical School.

*2.2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Total RNAs from various organs of rats were prepared by using an RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from each organ was reverse-transcribed by using Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transcriptase XL (Takara, Tokyo, Japan) and random primers for 10 min at 30 °C, 30 min at 42 °C, and 5 min at 99 °C (1 cycle). PCR was carried out by using Takara Taq (Takara) and the following protocol: a hot start at 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. The length of the RT-PCR product was 639 bp and the following p63s specific primers were used (Fig. 1a): sense primer (5'-GTCCCATTCCCTGTACCTG-3') corresponding to nucl-

eotides 157-176 in the mouse *COCH* cDNA and amino acid (AA) residues 30 to 35/36 (VPIPV(T)(C)); antisense primer (5'-TTACCCCTCGGAAACCTACTT-3') corresponding to nucleotides 774-795 in the mouse *COCH* cDNA and AA residues 236/237-242/243 ((E)VGFRRG(N)). As a negative control (NC), duplicate cDNA templates were prepared as above without AMV Reverse Transcriptase XL and used in equivalent PCR reactions. PCR products were stained with ethidium bromide (Et-Br).

*2.3. Southern blot analysis of RT-PCR products*

The RT-PCR products generated from *COCH* cDNA were separated onto 1% agarose gels and transferred to a Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences). The blot was hybridized with a non-radio isotope probe according to the manufacturer's instructions and detected with the CDP-star kit (Amersham Biosciences). The probe using this assay was derived from a human expressed sequence tag (EST) clone, IMAGE ID 27789, was obtained from Kurabo Co (Osaka, Japan). The *COCH* cDNA was subcloned from lafmid BA into the pGEM-T easy vector (Promega) by PCR using primers S2 (5'-GCCGCTCCCATTGCTATCAT-3'), corresponding to AA residues 27-33 (AAPIAIT); and AS2 (5'-TACTCCAGCATCTACCGTGAAG-3') corresponding to the AA residues 255-262 (FFTVDAGV) (Fig. 1b). The sequence of plasmid pGEM-T-COCH DNA was determined by using the primers S2 and AS2. A digested 708-bp *COCH* DNA was labeled by using an Alkphos direct labeling kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The band densities in the three representative blots were quantified by densitometry (CS Analyzer version 2.0; Atto, Tokyo, Japan)

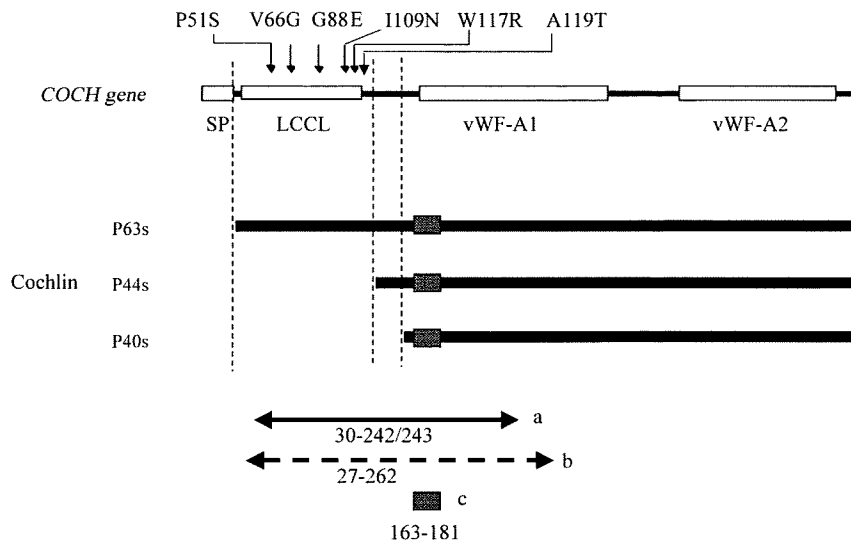


Fig. 1. Antigenic peptide, RT-PCR primer, Southern blot probe and cochlin isoforms. The deduced amino acid sequence of the human *COCH* gene, which encodes the protein Cochlin, shows a predicted signal peptide (SP), followed by a region homologous to a domain in factor C of Limulus, and two vWFA-like domains (vWFA1 and vWFA2). Six missense mutations in the LCCL domain, which cause the DFNA9 deafness and vestibular disorder, are indicated by arrows. (a) The region of the *COCH* cDNA (639 bp) amplified by RT-PCR (AA 30-242/243) contains the LCCL domain. (b) The region of the *COCH* cDNA (a 708 bp) containing human AA 27-262 was used as a probe for Southern hybridization. (c) The peptide sequence corresponding to this region of *COCH* cDNA (AA 163-181) was used as an immunogen to develop an anti-Cochlin antibody.

and the means and standard deviations of relative ratio with the inner ear signal were calculated.

#### 2.4. Anti-Cochlin antibody, gel electrophoresis and Western blot analysis

Generation of an anti-Cochlin antibody, gel electrophoresis and Western blot analysis were performed as previously described [10]. In brief, a 19-mer peptide (KADIA-FLIDGSFNIGQRRF) corresponding to residues 163–181 in the vWF-A1 domain (Fig. 1c) was used to generate an anti-Cochlin antibody (formerly called anti-vWF-A1 antibody). Rabbits were immunized by repeated subcutaneous injections of the keyhole limpet hemocyanin (KLH)-coupled peptide. The serum was purified by a protein column, followed by peptide-affinity chromatography. The specificity of the antibody has been reported previously [10].

We homogenized various rat organs and bovine inner ear in a solubilization mixture containing 0.5% SDS and protease inhibitors. The homogenate was centrifuged and the protein concentration of the supernatant was measured by BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). First, we used 2  $\mu\text{g}$  of the protein from each sample for colorimetric detection. Second, to achieve higher sensitivity, 0.5  $\mu\text{g}$  of inner ear proteins and 50  $\mu\text{g}$  of proteins from other organs were used for chemiluminescence detection. The proteins were resolved by electrophoresis using 15% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated for 2 h with the primary antibody diluted 1:2000 and then incubated for 1 h with a horse radish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG diluted 1:1000. The blots were developed either with 0.5 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in 50 mM Tris Buffer (pH7.6) containing 0.03% hydrogen peroxide or with a chemiluminescence reaction kit (ECL plus, Amersham). The band densities in the three representative blots were quantified by densitometry and the means and standard deviations of relative ratio with inner ear signal were calculated.

### 3. Results

#### 3.1. *COCH* gene expression at the transcriptional level

We analyzed the expression of *COCH* mRNA in various organs by RT-PCR using primers specific to the isoform p63s. *COCH* mRNA was detected in the inner ear, but not in any of the other organs tested (Fig. 2a). Band intensity values after 25 cycles correlated linearly with the amount of template RNA used in the PCR reaction (data not shown). As a loading control, *GAPDH* mRNA was amplified in all organs in similar amounts.

As a more sensitive assay to detect minimal amounts of *COCH* mRNA, we performed Southern blot analysis. A human *COCH* cDNA fragment derived from an EST clone

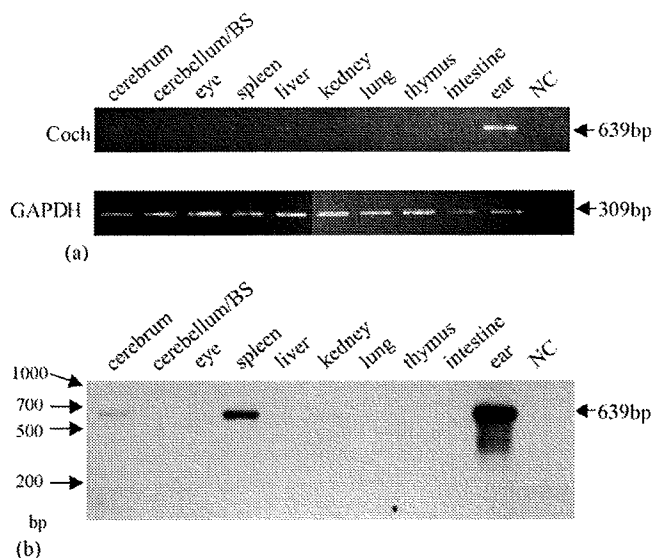


Fig. 2. *COCH* gene expression at the transcriptional level: (a) RT-PCR. PCR products stained with Et-Br. Expression of *COCH* mRNA was detected only in the inner ear, and not in any other organs tested. As a loading control, *GAPDH* was amplified in all organs in similar amounts. (b) Southern blot analysis. *COCH* mRNA was detected in high levels in the inner ear, lower level in spleen ( $77.9 \pm 19.5\%$ ), and very low levels in the cerebrum ( $16.2 \pm 12.0\%$ ), cerebellum/brain stem (BS) ( $1.4 \pm 0.9\%$ ), eye ( $3.9 \pm 0.7\%$ ), liver ( $1.8 \pm 0.6\%$ ) and kidney ( $8.9 \pm 8.5\%$ ). No signals were detected in the lung, thymus or intestine.

was used as a probe. The band densities in the three representative blots were quantified by densitometry. We detected a high level of *COCH* mRNA in the inner ear, lower level in the spleen ( $77.9 \pm 19.5\%$ ), and very low levels in the cerebrum ( $16.2 \pm 12.0\%$ ), cerebellum/brain stem (BS) ( $1.4 \pm 0.9\%$ ), eye ( $3.9 \pm 0.7\%$ ), liver ( $1.8 \pm 0.6\%$ ) and kidney ( $8.9 \pm 8.5\%$ ) (Fig. 2b). No signals were detected in the lung, thymus or intestine.

#### 3.2. *COCH* gene expression at the translational level

We first analyzed an equal amount of proteins (2  $\mu\text{g}$ ) from each organ by Western blot analysis coupled with colorimetric detection (DAB). A set of immunoreactive proteins with sizes of 63, 44 and 40 kDa were observed in the rat and bovine inner ear. In contrast, no immunoreactive proteins were detected in any other organs tested (Fig. 3a).

Next we focused on the cerebrum, cerebellum/BS, eye, spleen, liver, kidney and inner ear, which showed positive signals by Southern blot analysis. We used 100 times more protein (50  $\mu\text{g}$ ) from these organs as compared with the inner ear (0.5  $\mu\text{g}$ ), and used an enhanced chemiluminescence detection technique (ECL plus) to achieve higher sensitivity. A set of immunoreactive proteins with sizes of 63, 44 and 40 kDa were detected at high levels only in the inner ear. In contrast, multiple proteins were detected at much lower levels in other organs tested. Proteins of 200, 90 and 40 kDa were detected in the cerebrum and cerebellum/BS, proteins of 80, 55, 40 and 36 kDa were detected in the spleen and

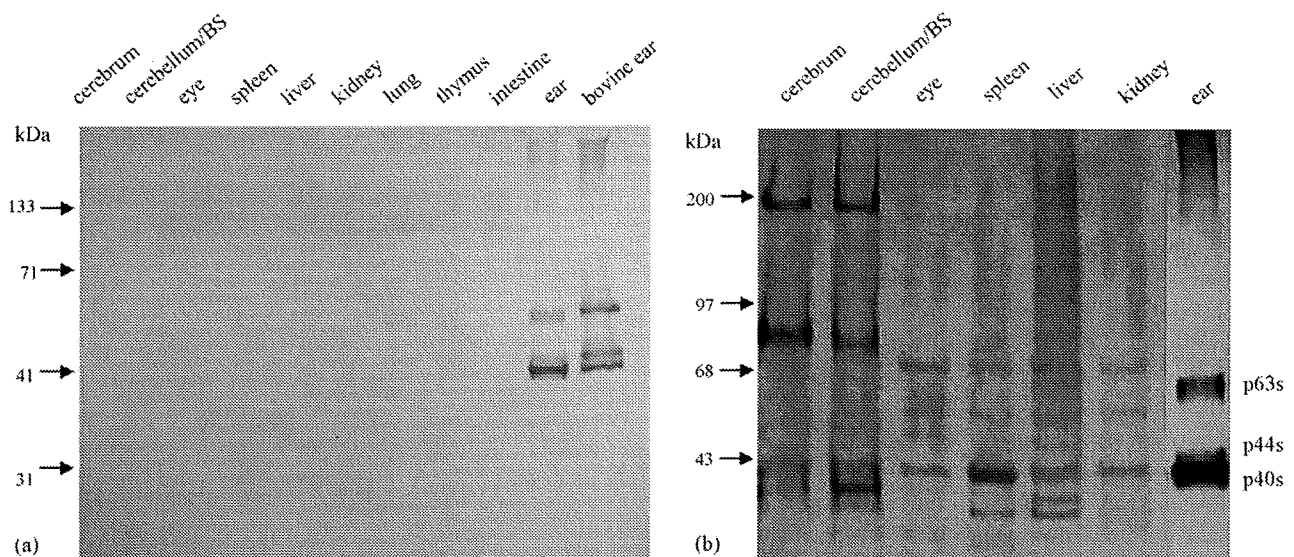


Fig. 3. *COCH* gene expression at the translational level: (a) Equal amounts of proteins (2 ug) were analyzed by immunoblot using colorimetric detection (DAB). A set of immunoreactive proteins of 63, 44 and 40 kDa was observed in the rat and bovine inner ear. In contrast, no immunoreactive proteins were detected in any other organs tested. (b) The organs which showed positive signal in Southern blot analysis, were analyzed at higher sensitivity. We used 100-fold larger amount of proteins (50 ug) of these organs, as compared with the inner ear (0.5 ug), and used enhanced chemiluminescence technique (ECL plus) to achieve higher sensitivity. A set of immunoreactive proteins of 63, 44 and 40 kDa was detected at high levels only in the inner ear. In contrast, multiple proteins were detected at much lower levels in the other organs tested. Proteins of 200, 90 and 40 kDa were detected in the cerebrum and cerebellum/BS, proteins of 80, 55, 40 and 36 kDa were detected in the spleen and liver, and proteins of 80, 55 and 40 kDa were detected in the eye and kidney. Notably, proteins with a molecular mass of 63 kDa corresponding to full-length Cochlin were detected only in the inner ear. We measured intensities of bands in the three representative Western blots. The relative amount of Cochlin in non-inner ear organs were as follows; cerebrum:  $65.7 \pm 32.3\%$  (mean  $\pm$  S.D.), cerebellum/BS:  $58.7 \pm 22.8\%$ , eye:  $14.2 \pm 0.7\%$ , spleen:  $18.0 \pm 14.3\%$ , liver:  $18.8 \pm 12.5\%$ , kidney:  $16.3 \pm 3.3\%$ .

liver, and proteins of 80, 55 and 40 kDa were detected in the eye and kidney. Notably, proteins with a molecular mass of 63 kDa corresponding to full-length Cochlin were detected only in the inner ear (Fig. 3b).

We measured intensities of bands in the three representative Western blots. The relative amount of Cochlin in non-inner ear organs were as follows; cerebrum:  $65.7 \pm 32.3\%$  (mean  $\pm$  S.D.), cerebellum/BS:  $58.7 \pm 22.8\%$ , eye:  $14.2 \pm 0.7\%$ , spleen:  $18.0 \pm 14.3\%$ , liver:  $18.8 \pm 12.5\%$ , kidney:  $16.3 \pm 3.3\%$ .

#### 4. Discussion

The expression of the genes associated with nonsyndromic deafness is, in general, not restricted to the inner ear. For example, the gene encoding Connexin26, which is mutated in *DFNA3* and *DFNB1*, is known to be expressed in the liver, kidney, intestine, lung, spleen, stomach, testis, and brain, as demonstrated by Northern blot analysis [12].

By contrast, the *COCH* gene was initially isolated by inner ear-specific and subtractive approaches [8]. Expression of the human *COCH* gene was previously studied by Northern blot analysis [8] and by a microarray expression profile analysis of the inner ear [13], proteomic analysis [9] which showed that *COCH* is highly expressed in the inner ear, in agreement with our present results. Northern blot analysis of mouse organs detected expression of *COCH*

mRNA at a high level in the spleen, lower levels in the cerebrum, cerebellum/medulla, and thymus, and faint levels in the eye and lung [14], whereas we did not detect mRNA in the thymus and lung tissues in rat by RT-PCR coupled with Southern blot. This discrepancy may be due to species-specific differences in *COCH* expression.

Cochlin expression at the translational level of mouse ear and spleen has also been reported [15]. Using a rabbit polyclonal antibody against the carboxyl terminus of Cochlin (AA residues 529–544), four proteins of 60, 40, 32 and 18 kDa were detected in the mouse inner ear, and two proteins of 45 and 40 kDa were detected in the spleen. The largest protein of 60 kDa detected in the inner ear, presumably the full-length Cochlin, was not detected in the spleen. These data also support our results to show the full-length Cochlin expression is the inner ear specific. There is a difference between the relative amount of mRNA and protein expression. Especially in the spleen, the *COCH* mRNA was 78%, and Cochlin was 0.18% of that of the inner ear. The discrepancy between the amount of mRNA expression and protein product should be due to the posttranscriptional regulation of *COCH* gene expression and protein metabolism, as often seen in other genes [16].

In the present study, the RT-PCR product was designed to include the LCCL domain [17], which is specific to p63s. Southern blot showed that *COCH* mRNA including this domain is expressed in the cerebrum, cerebellum/BS, eye, spleen, liver, kidney; however, the full-length Cochlin p63s