

ングシステムにより動態解析する条件検討を行い、標的とする GJP の焦点位置から Z 軸方向上下に $2\mu\text{m}$ ずつの範囲を $1\mu\text{m}$ 間隔で 5 枚の画像を撮影し、10 分間隔で画像取得し、撮影後に標的をとらえた Z 面を選抜して動画を再構成することにより GJP の *in vitro* 分子イメージングシステムを構築した。この解析により、Cx26-R75W 変異タンパク質で構成された GJP が正常に比べ位置の安定性が非常に脆弱であることが示唆された。

D. 考察

Connexin26は蝸牛のギャップジャンクションを形成し蝸牛内のイオン輸送で重要な機能を担うと考えられてきたが、これまでは同遺伝子変異での難聴はイオン輸送の機能低下のみが原因であるという認識しか持たれていなかった。しかし蝸牛にはイオン輸送を担うタンパク質はCx26以外にもCx30やCx43などほぼ同一箇所、同一細胞に局在しタンパク質発現の代償機能などを考慮すると、Cx26のみの異常によりギャップジャンクション機能が低下することを説明するのは困難であった。しかし本研究で我々は新たな病態として、Connexin26の変異により、ギャップジャンクションの複合体ユニットであるギャップジャンクションプラークの形成に生後初期から異常が発生することを発見した。通常は線上の長いプラークによって五角形または六角形の細胞構造を形成するがR75W変異を持つトランスジェニックマウスの蝸牛ではギャップジャンクションプラークが分裂し円形または楕円形の多数の小プラークが散在していることが確認された。同現象は我々が作製したC

onnesxin26コンディショナルKOマウスのギャップジャンクションプラークにおいても確認された。

この新たな病態メカニズムを解析するためにGap Junction Plaque (GJP) の分子イメージングシステムが構築された。これによりGJPの詳細な分子動態の解析が可能となり、新たな分子病態の解明が期待できる。本研究で発見されたCx26-R75W変異体のGJPの局在不安定性は、変異によって生じたGJPのタンパク質複合体の形成変化が、膜タンパク質の位置の局在安定性を担う細胞骨格系や裏打タンパク質との結合に影響を与え、その結果細胞膜上において流動的になったと考えられる。

E. 結論

本研究では遺伝性難聴の新たな分子病態としてギャップジャンクションプラークの分断化を発見し、このメカニズムを解明するため、ギャップジャンクションプラークの*in vitro*分子イメージングシステムをCx26-GFP融合タンパク質によって構築した。これによりCx26-R75W変異体の局在不安定性が明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

神谷和作、池田勝久 コネキシン26優性阻害変異を伴うギャップ結合プラークの分子イメージング

日本耳鼻咽喉科学会総会 2010年5月 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

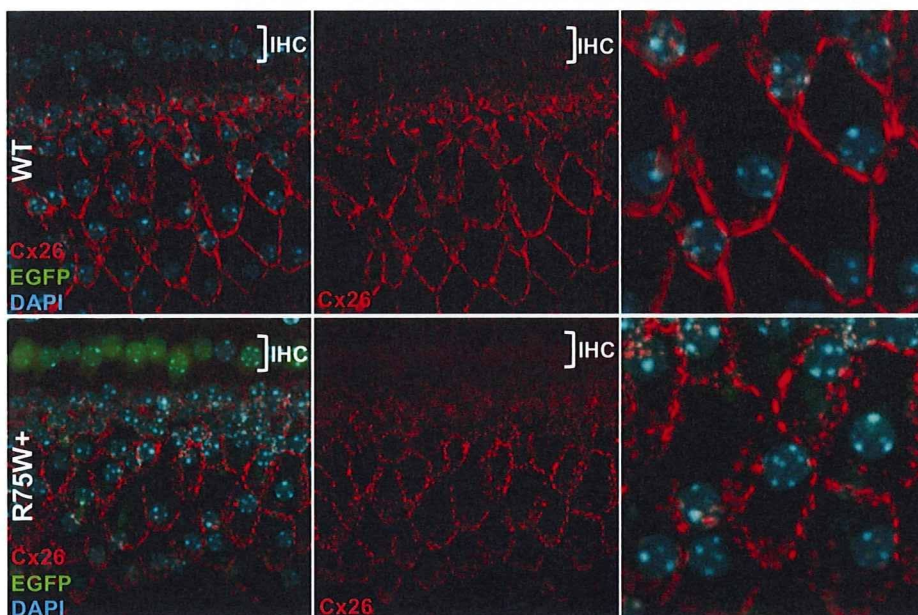


図 1. 遺伝性難聴の新たな分子病態として発見された Gap Junction Plaque の異常。野生型 (WT) において直線状に形成される Gap Junction Plaque は R75W 変異マウスの蝸牛内溝細胞では分裂し細かい円形の小ブランクとして散在している。

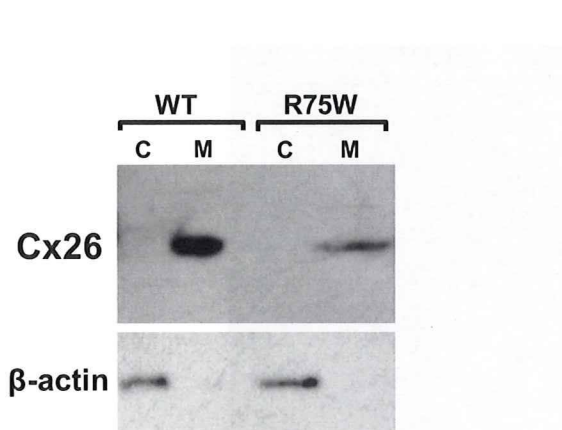


図 2. 各蝸牛組織における Cx26 の western blotting 像。両サンプルとも細胞質 (C) ではなく細胞膜 (M) に局在している。タンパク質の内在化は見られず Cx26 タンパク質は野生型と同じように細胞膜に組み込まれている。R75Wで Cx26 のタンパク質量は減少していた。

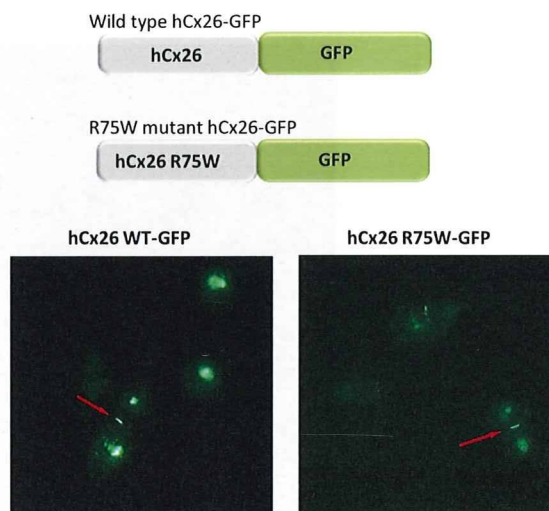


図 3. 上；構築したプラスミドにより発現される GFP 融合タンパク質。下；HEK293 細胞に導入され、発現した Cx26 融合タンパク質。どちらも細胞間に gap junction plaque を構成することができる。

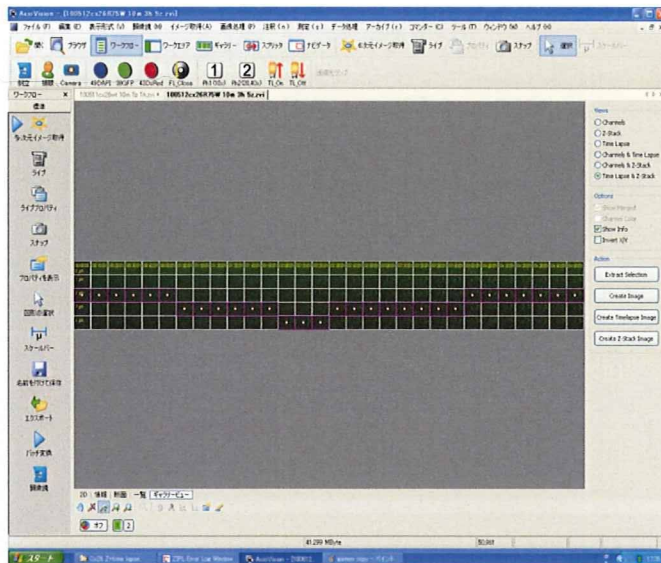


図4. イメージの選抜。標的とする gap junction plaque (GJP) を $1\ \mu\text{m}$ 間隔で5段階の焦点深度にて撮影。これを10分間隔で5時間撮影する。縦に自動制御したZ軸方向の画像を5枚、横軸を時間とし画像一覧を表示。この中から標的GJPの焦点が合ったZ面を選択し動画を再構築。

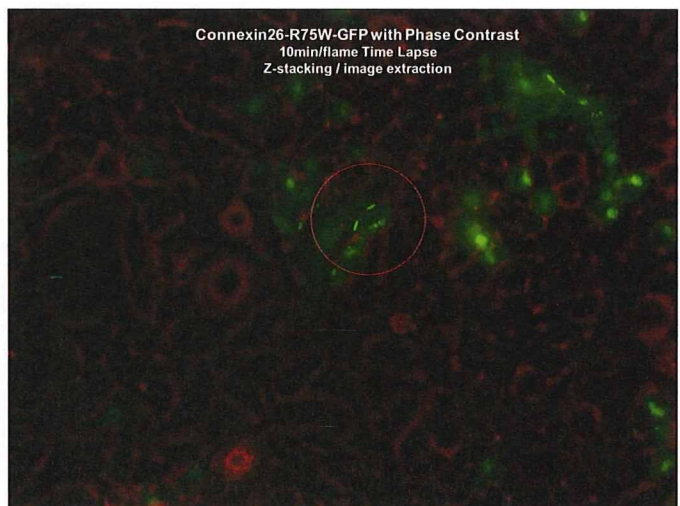


図5. イメージング動画の構築。図4で構築した動画例。赤丸の部分が標的の gap junction plaque。変異体 R75W では激しく移動しプラークの不安定性が示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 2
Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおけるコルチ器周囲細胞の
アポトーシスと細胞増殖における異常

研究協力者 井下綾子 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室助教
研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師
研究分担者 池田勝久 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

研究要旨

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マウスモデルの組織・機能的評価を目的とした。聴覚の成熟過程での詳細な検討はなされていないためこのマウスの生直後から2週齢までのコルチ器評価を行った。組織学上、*GJB2*変異マウスのGERにおけるアポトーシスは生後8日より出現し生後12日においても存続し、正常体と比してアポトーシスの遅延を示唆した。①GER面積、②GER全体細胞数、③GER内のアポトーシス細胞数を*GJB2*変異マウスと正常体を比較した。生後12日において前述の3項目は*GJB2*変異マウスでは有意に高値を示した。

我々はコネキシン26がGERのアポトーシスと関与し、その結果コルチ器形成不全、及び難聴に起因することを世界で初めて示した。今回の我々の結果は、将来的に先天性難聴の根本的治療を確立するためには重要であると考えられる。

A. 研究目的

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て、*gjb2* 遺伝子の優性阻害効果を示す変異体マウス(Tg マウス)を開発し、生後2週、7週齢での評価を行った。

しかしながら聴覚の成熟過程での詳細な検討はなされていないためこのマウスの生直後から2週齢までのコルチ器評価を行った。

B. 研究方法

マウスを十分に麻酔後、マウスの内耳を摘出し組織学的検査(光顕、電顕、免染)を行う。

GER(greater epithelial ridge, 内側隆起)を観察する。GERは生直後においてコルチ器支持細胞形成に必要な栄養因子を分泌するが、形成後の生後5日頃から通常はアポトーシスを呈し12日には終了することが多い。以前のマクロ結果において *GJB2* 変異マウスでは正常体と比しGERの面積が広く、コルチ器形成不全の原因を解明するためにより詳細な研究を要すると考えられた。そこでGERを光顕、電顕にてGER内の細胞の細胞数、面積、アポトーシスの有無に関し日齢を追って評価した。

C. 研究結果

(1)聴覚機能検査

ヒトにおいて *GJB2* 遺伝子変異患者は生下時より高度難聴を呈する。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、DPOAEでは生後の聴覚発育過程でほとんど反応を認めず、高度難聴を示した。これは、聴覚形成の成熟段階においてすでに、難聴を呈する要因があることが示唆された。

(2)組織学評価

組織学的変化としてTgマウスでは①コルチトンネルの形成不全、②コルチ器高の伸長不全、③GER(greater epithelial ridge, 内側隆起)内のアポトーシス出現の遅延、が特徴的であり以上について詳細に解明した。

① コルチトンネルの形成不全

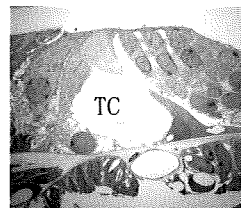
コルチトンネルは柱細胞の細胞骨格の発達により内・外柱細胞の細胞間の開大が生じ形成される。Tgマウスでは柱細胞内のmicrotubulesの形成不全を認めコルチトンネル形成不全の原因と考えられた。

② コルチ器高の伸長不全

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、一定であった。

③ GER内のアポトーシス出現の遅延

GERとは生直後においてコルチ器支持細胞形成に必要な栄養因子を分泌するエリアで、GER形成後の生後5日頃から通常はアポトーシスが開始し12日には終了することが多い。しかし、TgマウスのGERにおけるアポトーシスは生後8日より出現し生後12日においてもなお存続し、正常体と比してアポトーシスの遅延を示唆した。その結果、Tgマウスでは、GER面積、GER全体細胞



正常マウス



Tgマウス

透過電顕(12日齢)

TC: コルチトンネル

数、GER内アポトーシス細胞数において、生後12日では有意に高値を示した。

D. 考察

我々はコネキシン26が、柱細胞内のmicrotubules形成やGERのアポトーシスと

関与し、その結果コルチ器形成不全、及び難聴に起因することを世界で初めて示した。今回の我々の結果は、将来的に先天性難聴の根本的治療を確立するために重要であると考えられる。

E. 結論

本研究において我々は*GJB2*変異マウスのGERでのアポトーシスは生後8日より出現し生後12日においても存続し、正常マウスと比してアポトーシスの遅延を示唆した。このことがコルチ器構造の形成異常の一因であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

A. INOSHITA, T. IIZUKA, H. OKAMURA, A. MINEKAWA, K. KOJIMA, M. FURUKAWA, T. KUSUNOKI, K. IKEDA, Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *GJB2* transgenic mice, *Neuroscience* 156 (2008) 1039–1047.

A. MINEKAWA, T. ABE, A. INOSHITA, T. IIZUKA, S. KAKEHATA, Y. NARUI, T. KOIKE, K. KAMIYA, H. OKAMURA, H. SHINKAWA, K. IKEDA, Cochlear outer hair cells in a

dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission, *Neuroscience* 164 (2009) 1312-1319.

2. 学会発表

井下綾子、*Gjb2* 遺伝子優性阻害変異マウスの発育段階におけるコルチ器の構造と微細構造、第109回日本耳鼻咽喉科学会総会、2008年5月、大阪

井下綾子、*Gjb2* 遺伝子優性阻害変異マウスの発育段階におけるコルチ器の構造と微細構造、第18回日本耳科学会総会、2008年10月、神戸

Ayako Inoshita, Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *GJB2* transgenic mice, 32rd ARO Mid Winter Meeting, 2009年2月、アメリカ、フェニックス

Ayako Inoshita, Postnatal apoptosis of GER in dominant-negative *Gjb2* transgenic mice, 7th Molecular Biology of Hearing and Deafness, 2009年6月、アメリカ、ボストン

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 3

Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおける蝸牛コネキシン 26

タンパク質相互作用因子の変化

研究協力者 村木美帆 東京大学大学院

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

研究要旨

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度に発生し、近年その原因遺伝子の多くが解明されている。その中でもコネキシン 26 をコードする Gjb2 遺伝子は世界で最も発生頻度の高い遺伝性難聴の原因遺伝子として知られている。蝸牛においてコネキシン 26 はコルチ器周辺やラセン靭帯などの細胞でギャップジャンクションを形成し、内リンパ電位を保つための細胞間イオン輸送の役割を担うと考えられている。

我々はこれまでコネキシン 26 の優性阻害変異として知られる R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) の生理学的解析や内耳の形態変化を報告してきた。同マウスは生後初期からの ABR 閾値上昇、DP-OAE (歪耳音響放射) の消失、コルチトンネルの消失や有毛細胞、支持細胞の細胞間隙の消失などがこれまで確認されている。しかし、興味深いこと有毛細胞の形態や単離外有毛細胞の運動機能など、個々の細胞の機能や形態に極度な異常は見られなかった。このことからコネキシン 26-R75W 変異では、個々の細胞機能だけではなくコルチ器を構成する各細胞の細胞間結合、細胞増殖や細胞極性等の異常がコルチ器全体の機能に影響している可能性も考えられる。

最近我々は R75W-Tg マウスのコルチ器周辺におけるギャップジャンクションの形成変化を解析し、同マウスでは正常マウスの細胞間で直線的に形成されていたギャップ結合プラークが分散し、正常と大きく異なる分断された多数の円形小プラークを形成する新たな病態を発見した。このことは R75W 変異を有する異常コネキシン 26 タンパク質がコネキシンにより構成されるギャップ結合チャンネルの集積を阻害し正常なギャップジャンクション機能の異常や正常細胞配列に影響を与えている可能性を示唆している。このメカニズムを解析するため、正常および R75W-Tg マウス蝸牛組織タンパク質より Cx26 抗体での免疫沈降反応を行い Cx26 を含む Gap Junction Plaque のタンパク質複合体のプロテオーム解析を行い、R75W-Tg マウスと正常マウスの間で差のあるタンパク質が同定された。

A. 研究目的

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度に発生し、近年その原因遺伝子の多くが解明されている。その中でもコネキシン 26 をコードする Gjb2 遺伝子は世界で最も発生頻度の高い遺伝性難聴の原因遺伝子として知られている。蝸牛においてコネキシン 26 はコルチ器周辺やラセン靭帯などの細胞でギャップジャンクションを形成し、内リンパ電位を保つための細胞間イオン輸送の役割を担うと考えられている。

我々はこれまでコネキシン 26 の優性阻害変異として知られる R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) の生理学的解析や内耳の形態変化を報告してきた。同マウスは生後初期からの ABR 閾値上昇、DP-OAE (歪耳音響放射) の消失、コルチトンネルの消失や有毛細胞、支持細胞の細胞間隙の消失などがこれまで確認されている。しかし、興味深いこと有毛細胞の形態や単離外有毛細胞の運動機能など、個々の細胞の機能や形態に極度な異常は見られなかった。このことからコネキシン 26-R75W 変異では、個々の細胞機能だけではなくコルチ器を構成する各細胞の細胞間結合、細胞増殖や細胞極性等の異常がコルチ器全体の機能に影響している可能性も考えられる。

これまでの研究において我々は、R75W-Tg マウスのコルチ器周辺におけるギャップジャンクションの形成変化を解析してきた。通常コルチ器周囲支持細胞 (特に内溝細胞、境界細胞など) において形成されるギャップジャンクションはタイトジャンクションなどの細胞表面付近に局在する細胞間結合よりも基底側にて結合し周囲の細

胞との結合により整然とした 5 角形または 6 角形の左右対称なギャップ結合プラークによる結合様式を示す。しかし R75W-Tg マウスは正常マウスの細胞間で直線的に形成されていたギャップ結合プラークが分散し、正常と大きく異なるプラークを形成することが示された。このことは R75W 変異を有する異常コネキシン 26 タンパク質がコネキシンにより構成されるギャップ結合チャンネルの集積を阻害し正常なギャップジャンクション機能の異常や正常細胞配列に影響を与えている可能性を示唆している。つまり異常コネキシン 26 タンパク質が正常のものとは異なる因子と相互作用している可能性が考えられる。従って本研究において、異常コネキシン 26 タンパク質が相互作用している因子を同定し、ギャップジャンクションの機能および構造や正常細胞配列に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

正常マウス及び R75W-Tg マウスから内耳コルチ器と周囲組織を採取し、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent を用いてプロトコールに従いタンパク質抽出を行い、免疫沈降用及びウェスタンブロット用のサンプルとした。免疫沈降用の一部のサンプルは Dynabeads®ProteinG-コネキシン 26 抗体または、crosslinker reagent BS³にて架橋処理した Dynabeads®ProteinG-コネキシン 26 抗体にて免疫沈降を行い、残りのサンプルは Dynabeads® M-270 Epoxy-コネキシン 26 抗体と免疫沈降を行った。全サンプルとも 5~20% Gradient gel にて泳動し銀染色を行った。コントロールと比較して発現の差が見られたバンドを切り抜き、ゲル消化後、

質量解析を行った（プロテオーム解析）。ウェスタンブロット用に分けておいたサンプル及び、免疫沈降を行い Dynabeads に結合しなかった上清は、前述に記載した方法と同様に 5~20% Gradient gel にて泳動し、メンブレンに転写した後、各抗体により処理を行い現像した。

C. 研究結果

正常マウス及び R75W-Tg 内耳コルチ器と周囲組織を用いて Dynabeads®ProteinG-コネキシン 26 抗体と免疫沈降、及び銀染色を行った結果、正常マウス及び R75W-Tg の両者の細胞膜に 20kDa 付近に濃いバンド (No.1) が認められプロテオーム解析の結果、コネキシン 26 であると同定された。また、同様に正常マウス及び R75W-Tg の両者の細胞膜に 75kDa 付近に薄いバンド (No.2) が認められプロテオーム解析の結果ミトコンドリアに局在する、Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) であると同定された。

続いて、同様に、内耳コルチ器と周囲組織を用いて Dynabeads® M-270 Epoxy 及び BS³ にて架橋処理した Dynabeads®ProteinG-Cx26 抗体と免疫沈降を行った結果、両者のバンドにかなり差が認められ、Dynabeads®ProteinG を使用した方が IgG の heavy chain と light chain のバンドが消えてタンパク質同定の効率が高まることが明らかとなった。

正常マウスと R75W-Tg マウスとでいくつか差が見られたバンドを切り抜き、プロテオーム解析を行った結果、薄いバンドは同定できなかったが、20kDa 付近に差が見られたバンド(1)は、コネキシン 26 であると

同定された。

D. 考察

正常マウスと R75W-Tg マウスの内耳コルチ器と周囲組織を用いた Dynabeads®ProteinG-コネキシン 26 抗体との免疫沈降によるプロテオーム解析結果から 20kDa 付近にコネキシン 26 が同定されたが、本来コネキシン 26 は 26kDa であるので、非特異的に結合したのか、もしくはコネキシン 26 の一部が切断された状態で存在している可能性が考えられる。この点に関してはこれまで報告がないため、より詳細な研究が必要である。また、Dynabeads®ProteinG-コネキシン 26 抗体と免疫沈降によるプロテオーム解析結果から 75kDa 付近に Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) が同定された。Mitofilin はミトコンドリアに局在する膜貫通型のタンパク質で、様々なタンパク質と結合し多量体を形成し、ミトコンドリアで行われるエネルギー産生や代謝反応を円滑に行うのに欠かせない因子である。本研究結果より、異状コネキシン 26 は Mitofilin との結合が阻害されている可能性が示唆され、本来のミトコンドリア機能に影響を与えていることが考えられる。また、Dynabeads® M-270 Epoxy 及び BS³ にて架橋処理した Dynabeads®ProteinG-Cx26 抗体を用いた免疫沈降の結果より、BS³ にて架橋処理により非特異性が軽減できることが明らかとなった。

E. 結論

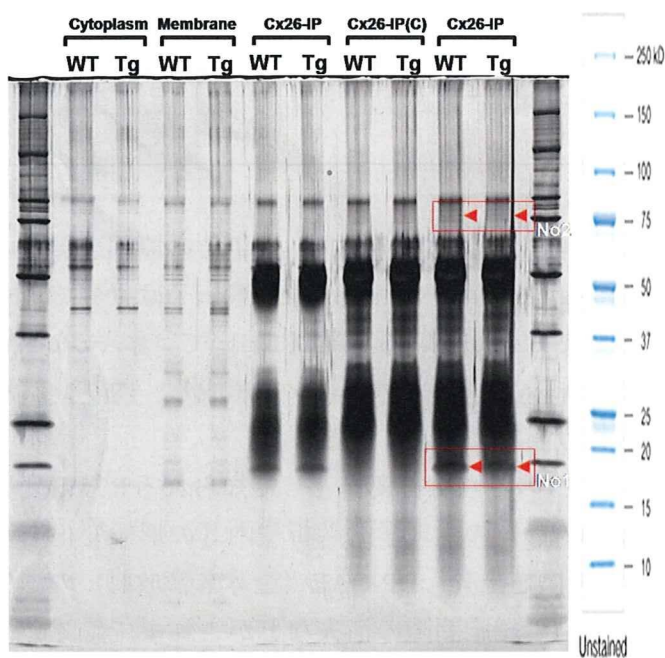
本研究では Cx26 の免疫沈降反応によって、Cx26 R75W-Tg マウスが形成する異常 Gap

Junction 複合体の構成タンパク質を比較し、正常マウスとの明らかな相違を持つタンパク質を同定した。

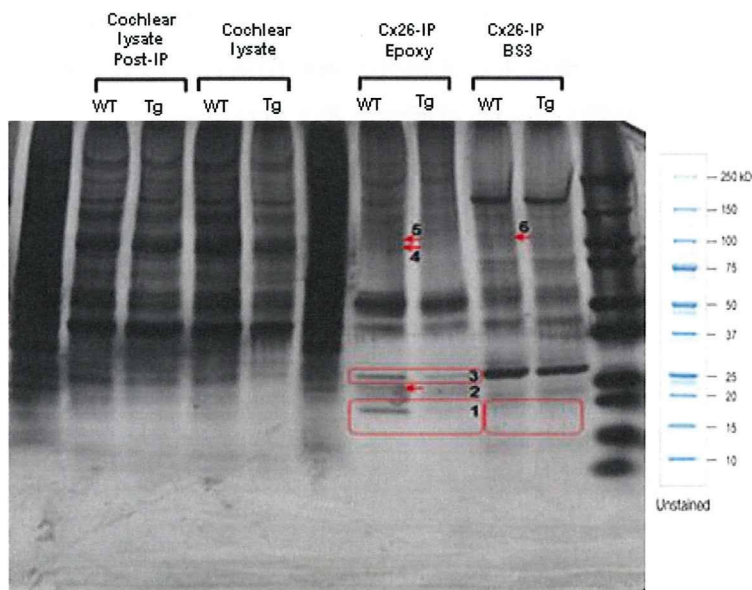
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表

神谷和作、池田勝久 コネキシン26 優性阻害変異によるコルチ器周囲細胞におけるギャップ結合プラークの形成変化
日本耳科学会学術集会 東京 2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況



Cx26 免疫沈降反応によって得られた Gap Junction Plaque タンパク質複合体のプロテオーム解析。
赤枠内、赤矢印、赤矢頭のバンドが切り出され質量解析により候補タンパク質が同定された。



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 4

Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスの蝸牛プロテオーム解析による
コルチ器および蝸牛外側壁構成タンパク質の変化

研究協力者 村木美帆 東京大学大学院生

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

研究要旨

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度に発生し、近年その原因遺伝子の多くが解明されている。その中でもコネキシン 26 をコードする Gjb2 遺伝子は世界で最も発生頻度の高い遺伝性難聴の原因遺伝子として知られている。蝸牛においてコネキシン 26 はコルチ器周辺やラセン靭帯などの細胞でギャップジャンクションを形成し、内リンパ電位を保つための細胞間イオン輸送の役割を担うと考えられている。

我々はこれまでコネキシン 26 の優性阻害変異として知られる R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) の生理学的解析や内耳の形態変化を報告してきた。同マウスは生後初期からの ABR 閾値上昇、DP-OAE (歪耳音響放射) の消失、コルチトンネルの消失や有毛細胞、支持細胞の細胞間隙の消失などがこれまで確認されている。しかし、興味深いこと有毛細胞の形態や単離外有毛細胞の運動機能など、個々の細胞の機能や形態に極度な異常は見られなかった。このことからコネキシン 26-R75W 変異では、個々の細胞機能だけではなくコルチ器を構成する各細胞の細胞間結合、細胞増殖や細胞極性等の異常がコルチ器全体の機能に影響している可能性も考えられる。

本研究では正常マウス、R75W-Tg マウスおよび Cx26 コンディショナル KO マウス由来蝸牛コルチおよび外側壁タンパク質の二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、R75W-Tg マウス、Cx26 コンディショナル KO マウスおよび正常マウスの間で発現量に差のあるタンパク質を解析し、質量分析によりタンパク質を同定した。

A. 研究目的

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度に発生し、近年その原因遺伝子の多くが解明されている。その中でもコネキシン 26 をコードする Gjb2 遺伝子は世界で最も発生頻度の高い遺伝性難聴の原因遺伝子として

知られている。蝸牛においてコネキシン 26 はコルチ器周辺やラセン靭帯などの細胞でギャップジャンクションを形成し、内リンパ電位を保つための細胞間イオン輸送の役割を担うと考えられている。

我々はこれまでコネキシン 26 の優性阻

害変異として知られる R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) の生理学的解析や内耳の形態変化を報告してきた。同マウスは生後初期からの ABR 閾値上昇、DP-OAE (歪耳音響放射) の消失、コルチトンネルの消失や有毛細胞、支持細胞の細胞間隙の消失などがこれまで確認されている。しかし、興味深いこと有毛細胞の形態や単離外有毛細胞の運動機能など、個々の細胞の機能や形態に極度な異常は見られなかった。このことからコネキシン 26-R75W 変異では、個々の細胞機能だけではなくコルチ器を構成する各細胞の細胞間結合、細胞増殖や細胞極性等の異常がコルチ器全体の機能に影響している可能性も考えられる。

これまでの研究において我々は、R75W-Tg マウスのコルチ器周辺におけるギャップジャンクションの形成変化を解析してきた。通常コルチ器周囲支持細胞 (特に内溝細胞、境界細胞など) において形成されるギャップジャンクションはタイトジャンクションなどの細胞表面付近に局在する細胞間結合よりも基底側にて結合し周囲の細胞との結合により整然とした 5 角形または 6 角形の左右対称なギャップ結合プラークによる結合様式を示す。しかし R75W-Tg マウスは正常マウスの細胞間で直線的に形成されていたギャップ結合プラークが分散し、正常と大きく異なるプラークを形成することが示された。このことは R75W 変異を有する異常コネキシン 26 タンパク質がコネキシンにより構成されるギャップ結合チャネルの集積を阻害し正常なギャップジャンクション機能の異常や正常細胞配列に影響を与えている可能性を示唆している。従っ

て本研究において、正常マウスと R75W-Tg マウスの蝸牛においてどのようなタンパク質に差が見られるか二次元電気泳動によるプロテオーム解析を用いて網羅的な解析を行った。

B. 研究方法

正常マウス及び R75W-Tg マウスから内耳コルチ器と周囲組織を採取しラセン神経節および骨組織を除去した、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent を用いてプロトコールに従いタンパク質抽出を行い、それぞれ 9-18% アクリルアミド濃度勾配ゲルを用いて等電点電気泳動を行った。その後、SYPRO Ruby 染色及び銀染色を行った。正常マウス及び R75W-Tg マウスとで差が認められたスポットを切り抜き、ゲル消化後、質量解析を行った (プロテオーム解析)。

C. 研究結果

正常マウス及び R75W-Tg マウスの蝸牛においてプロテオーム解析を行った結果、染色ゲルにいくつか差が見られるスポットが認められた (赤で囲んだスポット; 正常マウスで差があったもの。で囲んだスポット; R75W-Tg マウスで差があったスポット)。一度のプロテオーム解析に、発現の差が見られたスポット、8 個を選択し、二度の解析を行った。一回目の解析結果より、cochlin precursor、ADP-ribosylation factor-like protein 15、Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11、GNA11、Creatine kinase M-type、MYL2、MLC2、Myosin light chain 1/3、TOAD64、Ulip2、Cytocrome c oxidase subunit 6B1、COX6B1、COX6B、Gamma-enolase、ENO2、NSE(enolase neuron specific)、Glial

fibrillary acidic protein isoform 2、以上の10個のタンパク質が同定された。また、二回目の解析結果より Chain A, S642a:isocitrate Complex Of Aconitase、cochlin precursor、H(+)-transporting ATP synthetase、NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial、My11 protein, myosin light chain 1f/3f、以上の5個のタンパク質が同定された。

D. 考察

正常マウス及び R75W-Tg マウスの蝸牛におけるプロテオーム解析結果より、蝸牛組織で最も多く存在するタンパク質である cochlin precursor、また横紋筋に発現し、細胞内の ATP レベルの調節に関与する Creatine kinase M-type、平滑筋のミオシン ATPase の活性に重要とされている MYL2, MLC2、H(+)-transporting ATP synthetase が同定された。これらの結果より R75W-Tg マウスの蝸牛において、異常コネクシン 26 が直接または間接的に細胞内のエネルギー産生に影響を与え、周囲の細胞内機能が減衰している可能性が考えられる。また、海馬ニューロンに発現し、アクソン伸長の際に発現亢進する TOAD64, Ulip2 が同定された。TOAD64 は dihydropyrimidinase-like protein 2

として知られており、老化の進行と共に、記憶や聴力障害が加速したマウスにおいて極めて発現が減少するとされているタンパク質である。本解析結果より、R75W-Tg マウスの蝸牛において dihydropyrimidinase-like protein 2 (TOAD64) の発現が減少していることが明らかとなった。従って、R75W-Tg マウスでは異常コネクシン 26 が他の聴力機能に関与するタンパク質の発現にも影響を及ぼし、結果的に難聴症状を引き起こしていると考えられる。

E. 結論

Cx26 R75W-Tgマウス、Cx26コンディショナルKOマウスおよび正常マウス蝸牛組織の二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、これらの中で発現量に差のあるタンパク質を解析し、質量分析によりタンパク質を同定した。

G. 研究発表

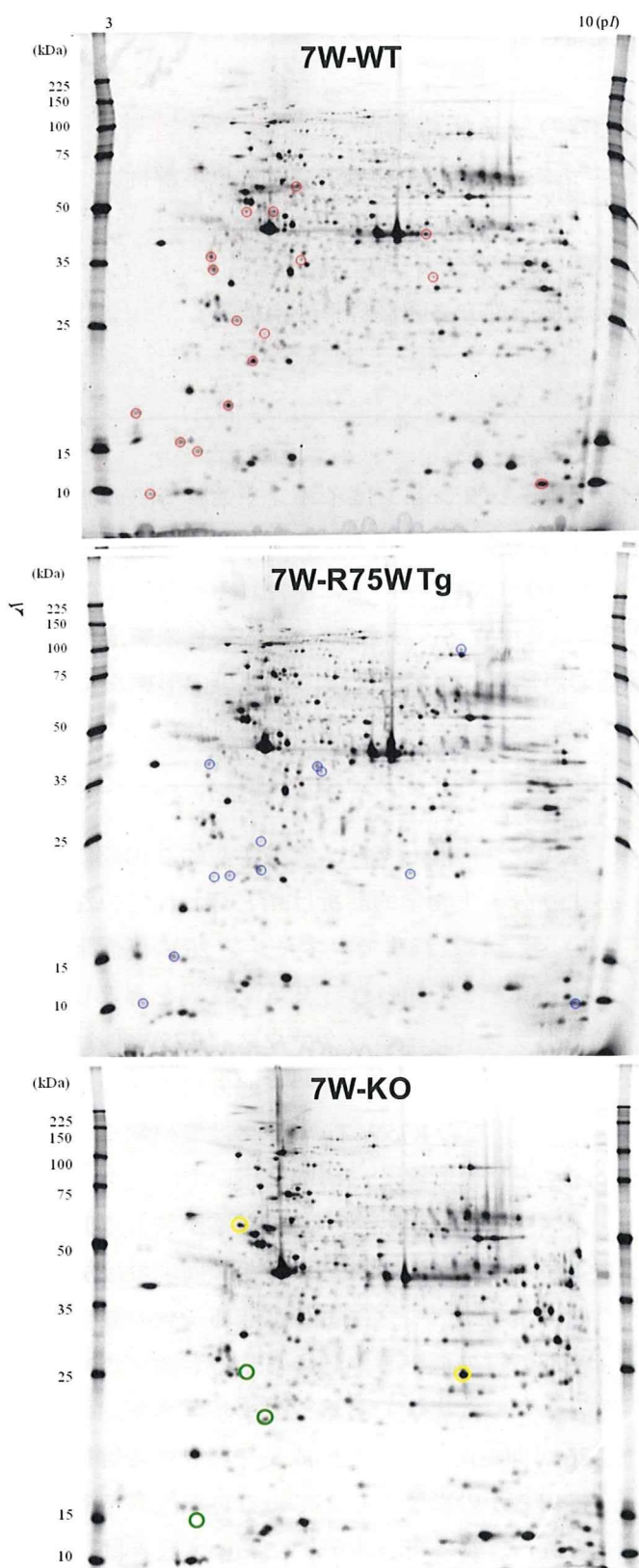
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

蝸牛外側壁およびコルチ器由来タンパク質のプロテオーム解析

二次元電気泳動 SYPRO Ruby 染色



赤：R75WTg において発現が低下しているスポット

青：R75WTg において発現が低下しているスポット

黄：KO および R75WTg のどちらも発現が上昇しているスポット

緑：KO および R75WTg のどちらも発現が低下しているスポット

これらのスポットを質量分析装置にて解析し候補タンパク質が同定された。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

遺伝性難聴モデル動物の分子病態解析 5

Connexin26 優性阻害変異トランスジェニックマウスでの卵巣プロテオーム解析

研究協力者 村木美帆 東京大学大学院

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

研究要旨

隣接する二つの細胞の連絡通路であるギャップジャンクションはイオンや栄養分子の他にプロスタグランジンや cAMP などの情報伝達分子を輸送する重要な役割を有し、卵細胞においては、ギャップジャンクションを介して cAMP の濃度が一定に保たれることにより、減数分裂の進行が制御されている。本研究では正常マウス、コネキシン 26 優性阻害変異を持つトランスジェニックマウスおよび生殖能力が低下した老齢マウスの卵巣の形態およびプロテオーム解析を行い、卵細胞におけるコネキシン 26 の機能と役割を検討した。

A. 研究目的

哺乳類の卵形成において、未成熟卵子とそれを囲む顆粒膜細胞との相互作用は卵の成長・成熟において重要である。隣接する二つの細胞の連絡通路であるギャップジャンクションはイオンや栄養分子の他にプロスタグランジンや cAMP などの情報伝達分子を輸送する重要な役割を有し、卵細胞において、ギャップジャンクションを介して cAMP の濃度が一定に保たれることにより、減数分裂の進行が制御されている。ギャップジャンクションを形成する分子としてコネキシンが知られている。性周期に達した卵巣内において、コネキシン 37、43、26 などが発現しており、卵巣の機能維持に関わっていることが分かっているが、個々のコ

ネキシンに関しては、実験手法的な困難により分子生物学的解析は殆ど行われていない。我々はこれまでコネキシン 26 の優性阻害変異として知られる R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) を用いて生理学的解析や形態変化を報告してきた。この R75W-Tg マウスは繁殖飼育することにより多くの研究に用いてきたが、メス Tg の産子数が低く、繁殖率が著しく低下することが明らかとなった。同現象は加齢によるストレスにより排卵卵子数の減少や卵の質の低下等が認められる老齢マウスとよく似た症状である。つまりコネキシン 26 が卵巣内において卵成長や卵成熟に対して何らかの影響を与えている可能性が考えられる。従って、本研究において我々は、

生殖能力が低下した老齢マウスと比較しつつ、卵細胞におけるコネキシン 26 の機能と役割を検討した。

B. 研究方法

繁殖効率の検討

以下の組み合わせで繁殖を行い妊娠状態・産仔数を比較した。

1. 正常マウス♀ x 正常マウス♂
2. 正常マウス♀ x Cx26 R75W-Tg♂
3. Cx26 R75W-Tg♀ x 正常マウス♂
4. Cx26 R75W-Tg♀ x Cx26 R75W-Tg♂

プロテオーム解析

成熟マウス (8w) と老齢マウス (55w) とでは卵子・顆粒膜細胞においてコネキシン 26 の発現や他のタンパク質の発現に差が見られるか検討を行うため、それぞれの雌マウスに PMSG・hCG を投与し過剰排卵処理を行い、12 時間後、卵子・顆粒膜細胞複合体を採取し、サンプルとした。一部のサンプルは T-PER Tissue Protein Extraction Reagent を用いてプロトコールに従いタンパク質抽出を行い、5~20% Gradient gel にて泳動し銀染色を行った。発現の差が見られたバンドを切り抜き、ゲル消化を行い、質量解析を行った (プロテオーム解析)。

組織学的解析

サンプルは 4%パラホルムアルデヒドにて室温にて 30 分間固定し、PBS + BSA で洗浄後、Cx26 の免疫染色を行った。続いて、卵巣の形態学的解析を行うため成熟マウス (8w)、老齢マウス (55w)、成熟 R75W-Tg マウス (12w)、老齢 R75W-Tg マウス (37w) の雌マウスに、前述に記載したのと同様に

過剰排卵処理を行い、8 時間後に卵巣を採取し、4%パラホルムアルデヒドにて室温にて 1 時間固定し、パラフィン切片として、免疫染色及び HE 染色を行った。

C. 研究結果

成熟マウス (8w) 及び老齢マウス (55w) の卵子・顆粒膜細胞複合体を用いたプロテオーム解析を行った結果、Cx26 については同定されなかったが、卵巣癌の際に発現が上昇することが知られている EEF1A1 と EEF1A2 が同定された。またそれぞれの卵子・顆粒膜細胞複合体における Cx26 の免疫染色法の結果、成熟マウスの一部の顆粒膜細胞にて Cx26 の発現が確認された。

D. 考察

成熟マウス (8w) 及び老齢マウス (55w) の卵子・顆粒膜細胞複合体を用いたプロテオーム解析を行った結果にて同定された EEF1A は G タンパクファミリーメンバーに属し、転写伸長因子 EEF1 を構成する 4 つのサブユニットを構成する一つの因子である。また、全ての真核生物に保存されており、タンパク質の合成や分解などに関与するタンパク質である。ヒト、マウス、ラット、ウサギにおいては二つの EEF1A イソフォームが優先的に発現しており、それらが EEF1A1、EEF1A2 である。これらのタンパク質は組織において極めて異なる発現パターンを示し、EEF1A1 がほぼ全組織にて発現しているのに対して、EEF1A2 は脳、心臓、骨格筋などの細胞増殖が制限された細胞内にて発現が認められている。つまり EEF1A2 は増殖性を持たない細胞のタンパク質合成への関与や、本来の EEF1A の持つ転写活性

作用とは異なる機能を持つことが推測される。また、EEF1A2 は抗アポトーシス作用を有し、癌形成と密接に関わっていることが示されている。特に、卵巣癌や乳癌、肺癌などでの発現亢進が報告されており、細胞の癌化に関わっていることが示唆されている。一般的に加齢によるストレスにより、卵子や顆粒膜細胞の機能低下をもたらすが、その原因として、ストレス除去作用を持つ細胞群の減少やアポトーシスの増加が考えられている。本研究結果において、老齢マウスの卵子・顆粒膜細胞複合体において、EEF1A1 及び EEF1A2 の発現亢進が認められた。卵細胞のように非増殖性細胞において、加齢により EEF1A2 の発現が亢進すると仮定すると、本来 EEF1A が有する転写活性機能よりも EEF1A2 が有する抗アポトーシス作用により、様々な因子により進行するアポトーシスを抑制するように機能していると考えられる。これは高齢女性において、卵巣癌患者が増えている事実と起因する。さらに詳細な検証が必要であるが、EEF1A、特に EEF1A2 が卵細胞の老化に密接に関わっていることが示唆された。また今回のプロテオーム解析により加齢による

Cx26 の発現の差は確認できなかったが、免疫染色法の結果より、若齢の顆粒膜細胞の一部に発現が認められた。発現量が微量であったため、泳動したゲルでのバンドの検出は不可能であったと考えられる。しかし、加齢サンプルでは Cx26 の発現は殆ど認められなかったため、卵子と顆粒膜細胞間での何らかの細胞情報伝達が正常に行えず、その結果卵子の質の低下に繋がったと推測され、卵成長・卵成熟に関して Cx26 の重要性が示唆された。

E. 結論

Cx26 R75W-Tgマウスでは雌のみで繁殖能力が著しく低下しており、卵巣でのCx26変異タンパク質が卵巣機能に影響を与えている可能性が示唆された。

マウス卵巣プロテオーム解析により新たな不妊関連タンパク質候補が同定された。

G. 研究発表

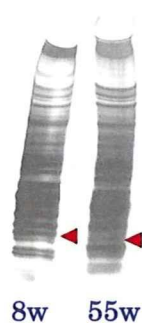
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

	交配パターン	妊娠	産仔数
1	正常マウス♀ x 正常マウス♂	○	良好 (6-8)
2	正常マウス♀ x Cx26 R75W-Tg♂	○	良好 (6-8)
3	Cx26 R75W-Tg♀ x 正常マウス♂	△	不良 (0-1)
4	Cx26 R75W-Tg♀ x Cx26 R75W-Tg♂	△	不良 (0-1)

Cx26 R75W-Tgマウス♀を含む交配パターンでは繁殖率が著しく低下しており、卵巣でのCx26変異タンパク質が卵巣機能に影響を与えている可能性が示唆された。



正常卵巣タンパク質および老齢卵巣タンパク質の比較。
質量解析により発現量に差のあるバンド(矢頭)のタンパク質が同定された。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 1

骨髄間葉系幹細胞および蝸牛線維細胞変性における走化性因子およびその受容体に関する
遺伝子発現解析

研究協力者 小川佳奈 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室講師

研究要旨

骨髄間葉系幹細胞は成体細胞から作成できる多分化能を有する細胞であり、患者の骨髄より樹立することが可能なため既に他臓器において臨床での有用性が確認されており内耳への応用も非常に有効であると考えられる。研究代表者が開発した間葉系幹細胞移植法では、移植前に蝸牛線維細胞のみに軽度な可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を置換することを可能とした。

これまでの我々の骨髄間葉系細胞移植では、人為的損傷を与えた実験モデルでの聴力回復に成功しているが、次段階としてヒト遺伝性難聴の治療を目的として異常細胞から正常細胞への細胞置換療法の検討を行っている。これを成功させるためには大量の多能性幹細胞を蝸牛組織内へ導入させる必要がある。本研究では蝸牛組織内で細胞誘導効率や幹細胞での組織修復を高め得る誘導因子を探索しその発現動態を解明することを目的とした。これまで行ってきた蝸牛線維細胞損傷モデルラットでの DNA マイクロアレイ解析では線維細胞細胞修復に関わる因子として単球走化活性因子 MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) がスクリーニングされた (Kamiya et al. *Am J Pathol.* 2007)。本研究では、RT-PCR での発現動態解析を行い蝸牛線維細胞の軽度損傷により走化性因子 MCP1 の発現が急激に高まり MCP1 受容体である CCR2 も引き続いて発現上昇することが明らかとなった。また骨髄間葉系幹細胞も CCR2 を発現し、同細胞が MCP1 により損傷部に誘導される能力を持つことが明らかとなった。

A. 研究目的

我々が以前報告した繊維細胞損傷モデルラットではミトコンドリア機能阻害剤である 3 ニトロプロピオン酸 (3NP) の局所投与により繊維細胞の損傷と同時に MCP1

などの走化性因子の発現が高まった結果、移植した間葉系幹細胞が損傷部に侵入したと考えられた。

本研究では、RT-PCR を用いて 3 ニトロプロリオン酸 (3NP) の局所投与による、

走化性因子 MCP1 および、走化性因子レセプター CCR2 の発現解析を行うことにより、組織への細胞導入効率を高めるために構築した、後述のテトラサイクリン発現誘導システムを用いた最適な発現誘導時期の検討を行う。

B. 研究方法

マウスの一方の耳の蝸牛内耳正円窓に 3 ニトロプロピオン酸 (3NP) 300mM, 1 μ l を投与した。投与の 1 日後、3 日後に、3NP を投与した側の蝸牛組織、および、その対側の蝸牛組織を摘出し、RNA を抽出した。また、コントロールとして HEK 細胞、MSC 細胞より RNA を抽出した。逆転写により得た cDNA を鋳型に、RT-PCR を行った。鋳型とした cDNA 量の標準化はマウス β -actin 遺伝子で行った。

走化性因子レセプター CCR の発現解析

標準化した cDNA に対し、マウスの走化性因子レセプター CCR2 の遺伝子配列を基に、図 1 のように設計したプライマーセットを用いて RT-PCR 反応を行った。

走化性因子 MCP1 の発現量解

走化性因子レセプター CCR の発現量解析と同様に、図 2 のように設計したプライマーセットを用いて RT-PCR を行った。

C. 研究結果

これまで蝸牛線維細胞の修復に関わる遺伝子のスクリーニングを目的として 3NP 投与後蝸牛外側壁組織の DNA マイクロアレイ解析が行われ、発現上昇因子として単球走化性因子 MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)

がスクリーニングされた (Kamiya et al. *Am J Pathol.* 2007)。

蝸牛線維組織損傷マウスを作製、外側壁およびコルチ器組織の RT-PCR により MCP1 およびその受容体である CCR2 の mRNA の発現動態を解析した結果、蝸牛線維組織損傷における MCP1 の急激な発現上昇およびそれに引き続く MCP1 受容体である CCR2 の発現上昇が確認された (図 3)。蝸牛組織での MCP1 の mRNA 発現は 3NP 投与後 1 日で急激に上昇し 3 日目に低下するが高発現状態を保っている。CCR2 は 1 日目よりも 3 日目に上昇することが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞においても CCR2 の mRNA 発現が確認され、同細胞が MCP1 によって誘導され得ることが示された。

D. 考察

3NP 投与後の MSC 移植では組織内に軽度の炎症を起こすことで走化性因子 MCP1 の誘導を促し、それに対応して組織内の MCP1 受容体、CCR2 の発現も高まり、修復反応が行われると考えられる。

この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。さらに MSC に MCP1 および CCR2 の発現プラスミド (次項にて作製) を導入し各遺伝子を強発現させることにより、生体内での自然な細胞誘導反応を増強させることにより、蝸牛内への MSC の導入効率が格段に向上することが期待できる。

E. 結論

新たな骨髄間葉系幹細胞誘導因子として MCP1 およびその受容体 CCR2 の発現上昇

