

った。(図 2)。Cx26 の正常タンパク質および Cx26-R75W 変異体の発現プラスミドが作成され、HEK293 に遺伝子導入したところ、Cx26-R75W 変異体も野生型同様に正常な GJP を形成した。これらを分子イメージ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、同一細胞に局在した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 Connexin26 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

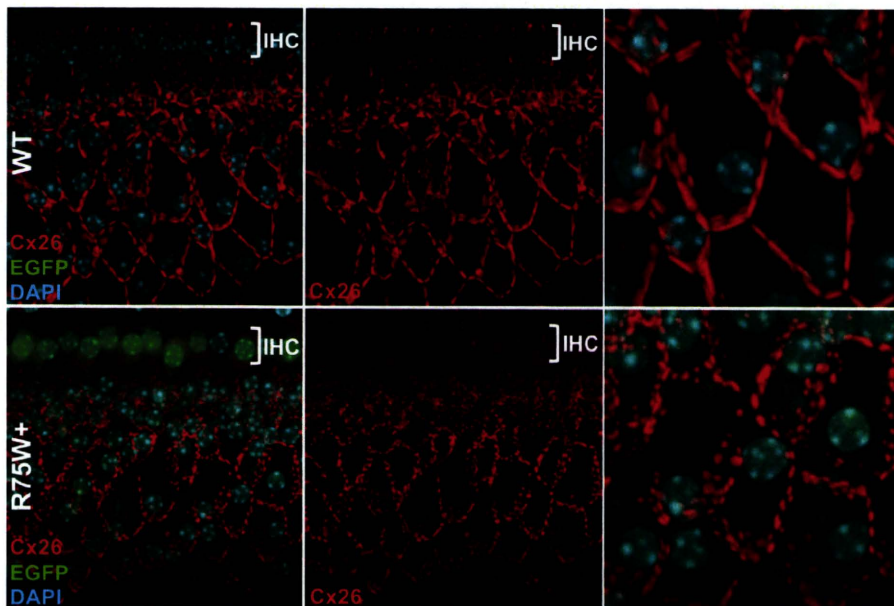


図 1. 遺伝性難聴の新たな分子病態として発見された Gap Junction Plaque の異常。野生型 (WT) において直線状に形成される Gap Junction Plaque は R75W 変異マウスの蝸牛内溝細胞では分裂し細かい円形の小プラークとして散在している。

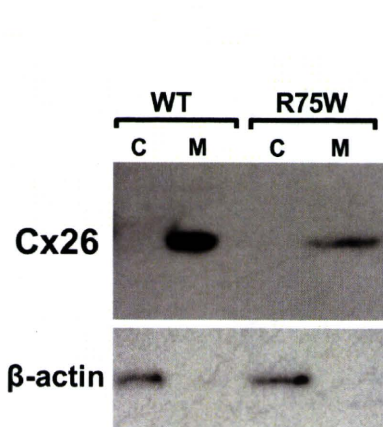


図 2. 各蝸牛組織における Cx26 の western blotting 像。両サンプルとも細胞質 (C) ではなく細胞膜 (M) に局在している。タンパク質の内在化は見られず Cx26 タンパク質は野生型と同じように細胞膜に組み込まれている。R75W で Cx26 のタンパク質量は減少していた。

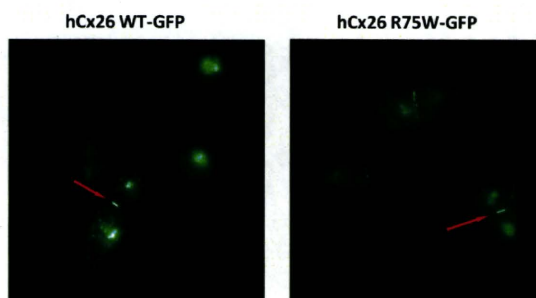
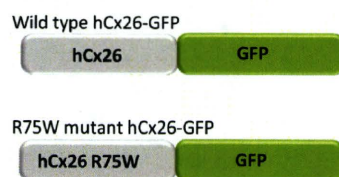


図 3. 上：構築したプラスミドにより発現される GFP 融合タンパク質。
下：HEK293 細胞に導入され、発現した Cx26 融合タンパク質。どちらも細胞間に gap junction plaque を構成することができる。

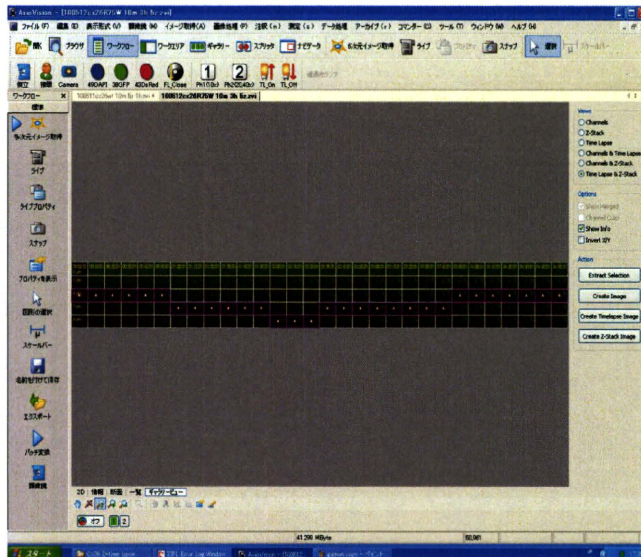


図4. イメージの選抜。標的とする gap junction plaque (GJP) を $1\ \mu\text{m}$ 間隔で5段階の焦点深度にて撮影。これを10分間隔で5時間撮影する。縦に自動制御したZ軸方向の画像を5枚、横軸を時間とし画像一覧を表示。この中から標的GJPの焦点が合ったZ面を選択し動画を再構築。

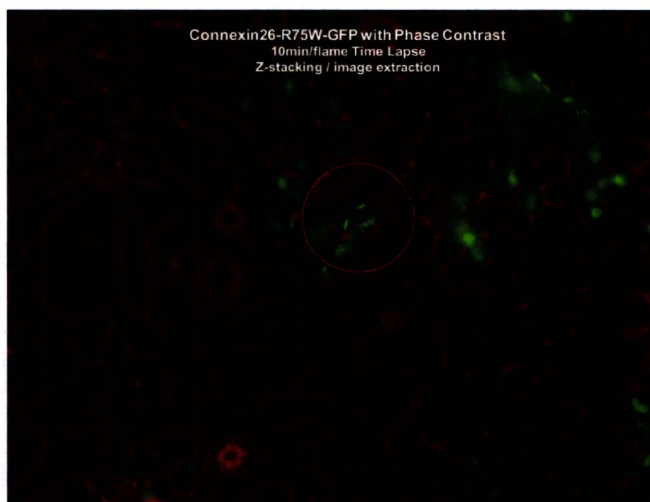


図5. イメージング動画の構築。図4で構築した動画例。赤丸の部分が標的の gap junction plaque。変異体 R75W では激しく移動しプラークの不安定性が示唆された。

5. 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

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。

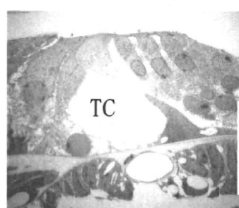
② コルチ器高の伸長不全

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。

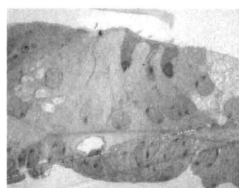
③ GER 内のアポトーシス出現の遅延

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

6. 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

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靱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。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

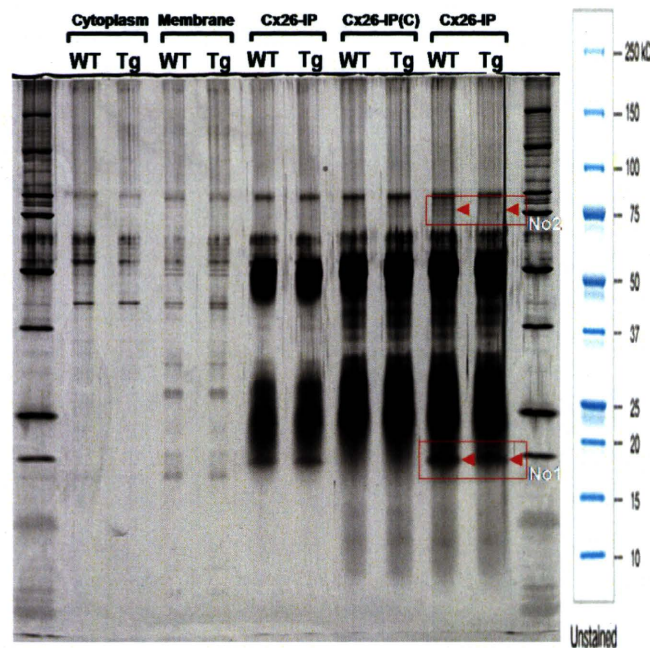
1. 論文発表

なし

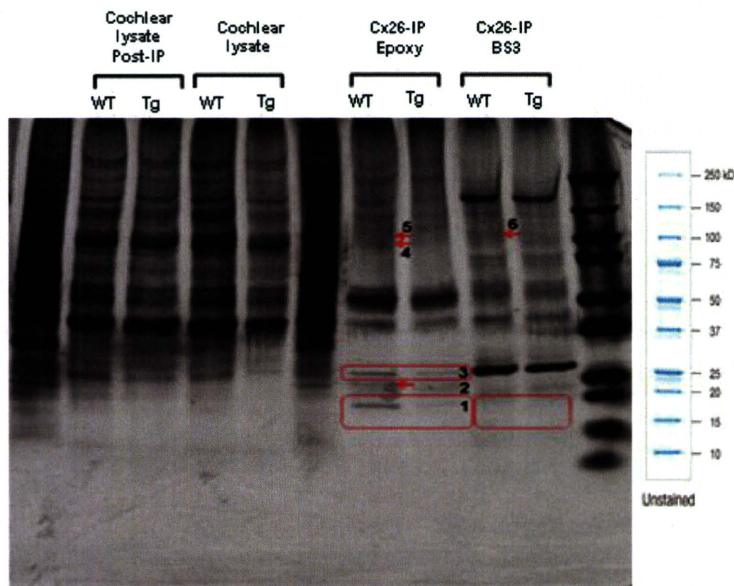
2. 学会発表

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 Plaques 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。



7. 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

A. 研究目的

遺伝性難聴は 2000 出生に一人と高頻度で発生し、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靱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、Myll 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 レベルの調節に参与する 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、異常コネキシン 26 が直接または間接的に細胞内のエネルギー産生能に影響を与え、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キシン 26 が他の聴力機能に参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

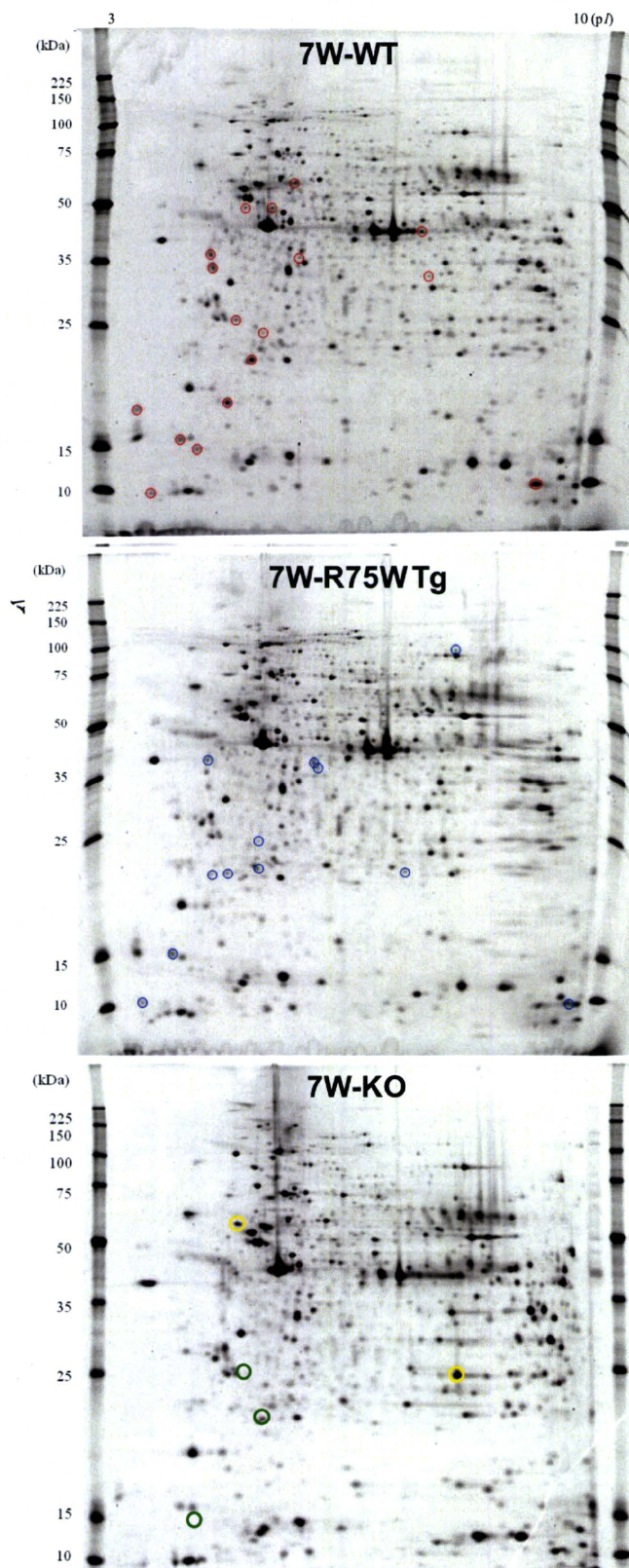
1. 論文発表

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。

8. 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

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。

9.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

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

```
caaatcaaaagyaatgggaagacaaataatgbbacccagttcabcacagggcatabctatc  
H E D N N H L P Q F I N G I L S  
aacatcctcattctctat//cattatcactcctgacaaatggataggtacttggctatggt  
T S H S L F I I L L T I D R Y L A I V  
tcatgctgcttggctttaaaacaggagacgttaccctttgggtgat aacaagtgat agt  
H A V F A L K A R T V T F G V I T S V V  
cacttgggtgggtggctgcttgcctctctaccaggaatcatatbactaaatccaaac  
T W U V A V F A S L P G I I F T K S K Q  
agatgatcaccatbaccactgctggcccttatttaccacaactgtggaagaatttccaaac  
D D H N Y T C G P Y F T Q L W K N F Q T  
aat aat gagaaat at cttgagc ct gat cct c t a c t t g t c a t g g t c a b c t g c t a c t c  
I H R N I L S L I L P L L U H V I C Y S  
aggaaatctccacaccttggcttggctgtagaaggaaatgagaagaagagcacagggctgtag  
G I L H T L F R C R N E K K R R A V R  
gctcactccttggccatcat//cactggggagc aagaggtctcgggtgggttggtaa  
L I F A I H T G E Q E V S U G L *
```

図1 走化性因子レセプターCCR2

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の発現上昇を発見した。この生体の組織修復反応を利用し過剰発現させることにより効率的な幹細胞の組織導入が可能となると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

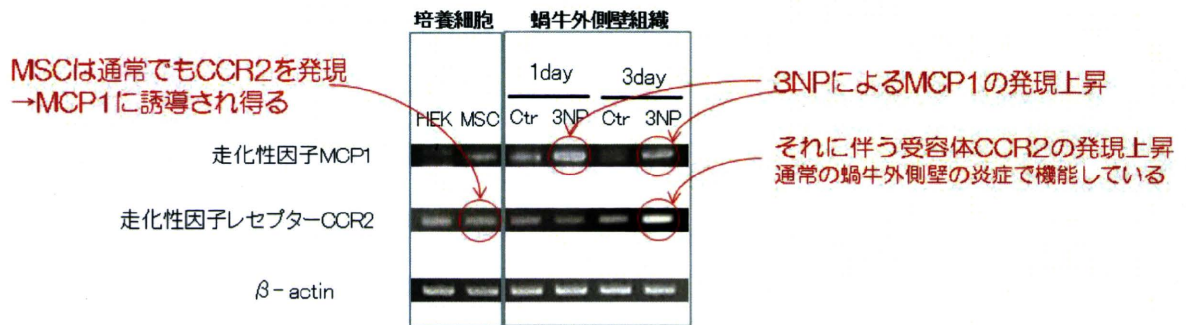
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

```
ggcagctctctcttccctccaccaccctgaggtccctgctatgcttctggcctgctgt  
H Q V P V M L L G L L F  
cacagtgcggctggagcatccacgtgttggctcagccaga tgcagtttaagcccact  
T V A G W S I H V L A Q P D A V N A P L  
cacctgctgctactcattcaccagcaagatgctcccaatgagtaggctggagagctacaa  
T C C Y S F T S K H I P M S R L E S Y K  
gaggatcaccagcagcaggtgtcccaagaagctgtagtttttgcaccaagctcaagag  
R I T S S R C P K E A V V F V T K L K R  
agaggtctgtgctgaccccaagaagyaatgggtccagacata catta aaaaacctggatcg  
E V C A D P K K E W V Q T Y I K N L D R  
gaaccaaatgagatcagaacctacaactttatttaaaactgcatctgcoctaaggtcttc  
N Q H R S E P T T L F K T A S A L R S S  
agcacctttgaaatgtaggtgacccgtaaactctgaaagctaa tgcacccactaccttttc  
A P L N V K L T R K S E A N A S T T F S  
cacaccacctcaagcactctctgtaggagtgaccagtgtagc agtgaactagtgtgactc  
T T T S S T S V G V T S V T V N *
```

図2 走化性因子MCP1

MCP1、CCR2のmRNA発現の変化



- MCP1: 3NP投与後、高発現状態を保っている。
- CCR2: 3NP投与後3日で高度に発現している。
- MSCはMCP1、CCR2を発現している

図 3. 蝸牛線維細胞および骨髄間葉系幹細胞における 3NP 投与後の MCP1 とその受容体 CCR2 の mRNA 発現の変化

10.内耳への幹細胞移植法および遺伝子導入法の開発 2

骨髄間葉系幹細胞および蝸牛線維細胞変性組織からの走化性因子MCP1および走化性因子レセプターCCR2の遺伝子クローニングおよび各種発現ベクターの開発

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、走化性因子MCP1とMCP1レセプターCCR2のクローニングを行い、テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、下図に示したように前庭階付近の組織で走化性因子MCP1とMCP1レセプターCCR2の条件付き発現が誘導可能な系の構築を目的とした。更には各種幹細胞へCCR2遺伝子を導入し同遺伝子の安定発現株を得るためのベクターとしてCCR2発現レンチウイルスを開発し、これによりCCR2安定発現間葉系幹細胞を作製した。

さらに移植細胞の染色体へ目的遺伝子を容易に組換え導入することが出来るFlpInシステムをつかった遺伝子導入法も使い、幹細胞の効率的な遺伝子導入システムを行った。

B. 研究方法

マウス内耳組織よりRNAを抽出し、逆転写により得たcDNAを鋳型に、PCRを用

いて走化性因子MCP1および走化性因子レセプターCCR2の遺伝子のクローニングを行った。

クローニングにはClontech社のTet-on Advanced Inducible Gene Expression Systemを利用したベクターを用いた(図1)。このシステムでは、DOXの添加により一過的、局所的に遺伝子を発現することが出来る。

走化性因子レセプターCCR2のクローニング

PCR反応に用いたプライマーは、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2のように設計した。(青色で示した配列にはコザック配列および、クローニングベクターへ挿入するための制限酵素サイトを付加した。)

最初にcDNAを鋳型として、赤色で示したプライマーセットを用いてPCR反応を行い、PCR産物を鋳型に青色で示したプライマーセットを用いてnested PCRを行った。PCR反応物を精製し、制限酵素処理を行った後、クローニングベクターの制限酵素部位に挿入し、大腸菌に導入しクローンを得た。得られたクローンの遺伝子配列は、シーケンサー反応により確認を行った。

走化性因子MCP1のクローニング

PCR反応に用いたプライマーは、マウスの走化性因子MCP1の遺伝子配列を基に、図3のように設計した。(青色で示した配列にはコザック配列および、クローニングベ