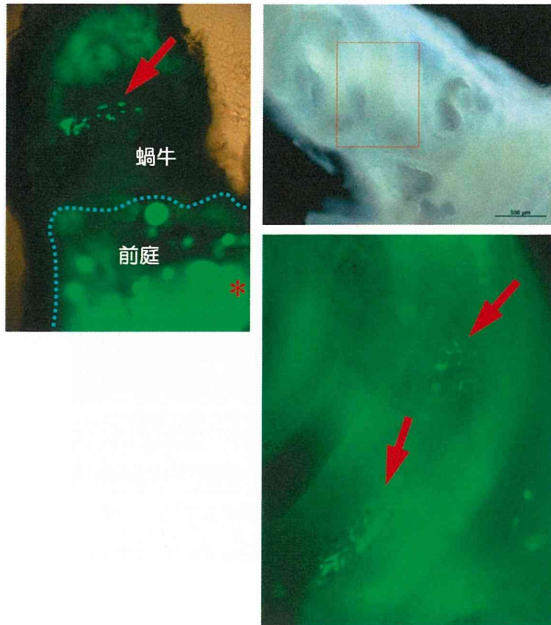


ホーミング分子の発現誘導によって  
蝸牛内へ誘導された間葉系幹細胞



蝸牛組織表面における間葉系幹細胞数 (MSC) の変化

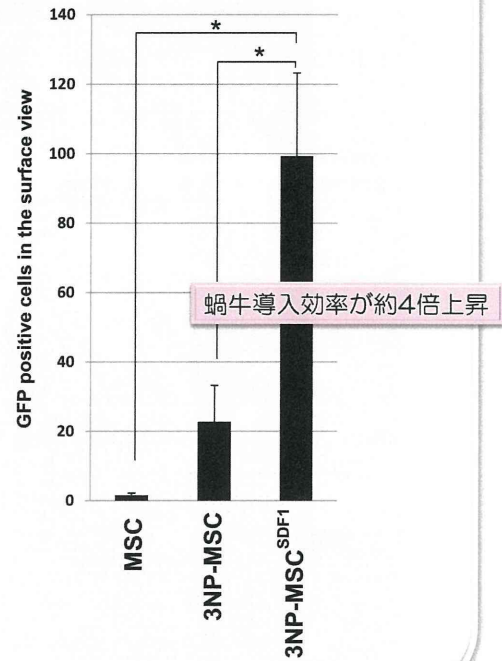


図 16 幹細胞ホーミング機構を応用した Cx26 欠損マウスへの骨髄間葉系幹細胞移植

Cx26 欠損マウスへの前述の 3NP 刺激および移植間葉系幹細胞への SDF1 前処置により経半規管外リンパ液還流による内耳幹細胞移植を施行し週間後に蝸牛へ侵入した間葉系幹細胞を解析した。

(左写真) 3NP 処置および SDF1 処置後の移植では多くの細胞が導入され、摘出した側頭骨の蛍光実態顕微鏡観察においても前庭領域から蝸牛へ侵入していることが確認できた (矢印)。(右グラフ) 蝸牛への侵入細胞数を計測した結果、間葉系幹細胞への SDF1 前処置により蝸牛導入効率が約 4 倍に上昇することが確認された。

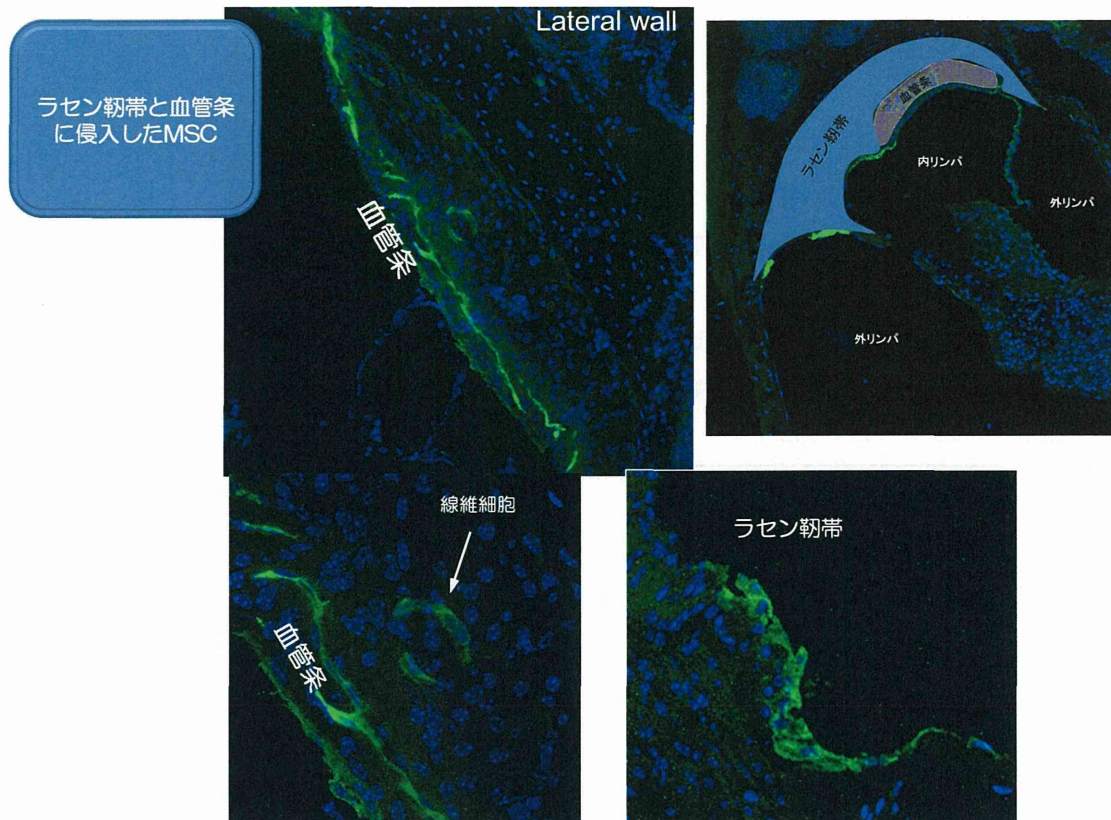


図 17 Cx26 欠損マウス蝸牛に侵入・生着した骨髄間葉系幹細胞  
Cx26 欠損マウスへの前述の 3NP 刺激および移植間葉系幹細胞への SDF1 前処置により経半規管外リンパ液還流による内耳幹細胞移植を施行し週間後に蝸牛へ侵入した間葉系幹細胞を解析した。  
(左上・左下) 血管条細胞および蝸牛線維細胞への移植間葉系幹細胞の侵入。(左上) 外リンパ液経由で導入された間葉系幹細胞は内リンパ腔領域への侵入によりらせん靭帯中央部に生着させることに成功した。

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

## 遺伝性難聴の遺伝子解析 1

先天性難聴での GJB2 の遺伝子変異解析：新たな COMMON MUTATION の確立

研究協力者 林千江里 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室助教

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

先天性高度難聴は 1000 出生に 1 人の頻度で発症し、その半数は遺伝性であるとされている。遺伝性難聴の中で最も高頻度に発生する遺伝子変異として知られている Gjb2 遺伝子はコネクシン 26 をコードし、蝸牛のギャップジャンクションを構成する重要な機能を担っている。本研究では当教室における非症候性難聴者を対象に GJB2 遺伝子変異検索を行った。解析した 138 名中 40 名に GJB2 遺伝子変異を認めた。変異の種類別では c.235delC が全変異アレル中 54.2% と最も頻度が高く過去の報告と一致するが、その他の変異比率は過去の日本人患者での報告との間に相違がみられた。

### A. 研究目的

先天性高度難聴は1000出生に1人の頻度で発症し、先天性の感覚器障害としては非常に高頻度の疾患である。先天性高度難聴者の約半数は遺伝的素因があると言われている。有毛細胞へのKイオンの供給と排出ルートになっていると考えられているギャップジャンクションは聴覚の形成に最も重要な分子である。それを構成するギャップジャンクション蛋白遺伝子である connexin26 遺伝子(GJB2)は先天性難聴の約10%に変異が認められるとされ、最も頻度の高い変異遺伝子として広く知られている。これまでの報告からGJB2遺伝子変異による難聴児は人工内耳による聴力・言語獲得

能力が良好な事や、遺伝子変異パターンから聴力レベルを推測し得ることも報告されており、ますます遺伝子診断による臨床への応用が期待されている。GJB2遺伝子変異は今日までに約100種類が世界中から報告されている。創始者効果により地域依存性が強く、c.35delGはアメリカ・ヨーロッパ人種に、c.235delCは日本人をはじめとするアジア人種に、c.167delTはヨーロッパユダヤ人種に、R143Wはアフリカ系人種にそれぞれ多くの報告がみられる。

今回当教室で非症候性難聴者を対象にGJB2 遺伝子変異検索を行った。過去の報告と比較検討を加えそれを報告する。

## B. 研究方法

常染色体劣性遺伝と思われる家族性発症 29 家系の 40 名（家族歴は 3 親等まで調査し、1 家系で 2 名以上の発症で家族性とした）を含む 138 名の非症候性難聴者を対象とした。うち 3 名は後天性中等度難聴者であとの 135 名は先天性高度難聴者であった。

検体は末梢血よりゲノム DNA を抽出し PCR direct sequence 法にて解析を行った。また、コントロール群として正常聴力者 150 名に同様の解析を行った。

## C. 研究結果

解析した138名中40名に*GJB2*遺伝子変異を認めた。変異の種類別ではc.235delCが全変異アレル中54.2%と最も頻度が高く、その内訳はホモ接合体変異が14名、複合ヘテロ接合体変異が10名、シングルヘテロ接合体変異が1名であった。次いでY136X/ G45Eが15.3%であった。Y136X/ G45Eをホモ接合体でもつ症例を2名認めたが、後天性の中等度難聴と先天性高度難聴と、それぞれ聴力レベルに大きく相違があった。過去の報告ではc.235delCに次いで多いとされているV37Iは（Ohtsuka et al. 2003）、今回2名のシングルヘテロ接合体変異を認めるのみでアレル頻度は2.8%であった。また、R143Wも13.9%と高頻度であった。欧米に多いとされるc.35delGは見られなかった。家族性発症29家系では10家系に*GJB2*遺伝子変異を認めた。また、新規変異としてR32S (c.94C>A)、P225L (c.674C>T) を認めた。これら2つの変異は正常コントロール群には見られなかった。

## D. 考察

今回の解析では *GJB2* 遺伝子変異を持つ症例数は全体の 28.9%で非症候性難聴の常染色体劣性遺伝症例中約 30%とされている過去の報告とほぼ同等であった。しかし、c.235delC のアレル頻度は全変異アレル中 54.2%と過去の報告より比較的高頻度に認められた。その一方で V37I が極端に少数であることが今症例の特徴と思われた。要因としては、今症例の殆どが人工内耳施行症例の先天性高度難聴者を対象としていることや、主に関東近郊出身者を対象としており地域依存性による偏りが生じた事などが考えられた。しかし、V37I は当院で施行された正常聴力者 150 名にも 2 名のキャリアーが存在し、アレル頻度は正常聴力者と差がなかった。先天性高度難聴者でこの変異を持つ患者は *GJB2* 以外の原因遺伝子によって発症している可能性が考えられた。また、R143W も過去の報告と比較すると明らかに高頻度であり、ミスセンス変異でありながら先天性高度難聴発症に重要な変異と思われた。

Y136X/ G45E をホモ接合体でもつ症例 2 名の表現型に大きな差異があったことから、この遺伝子変異以外に症状を調節する他の因子の存在が示唆された。この 2 つの変異がシスカトランスかで聴力レベルが異なるとの報告もあり、同変異における表現型発現機序に関しては更に検討する必要があると思われた。新たに見られた変異に関しては、32 番目のアミノ酸であるアルギニンは欧米にて R32C、R32L、R32H と 3 パターンもの変異の報告があり、遺伝子変異のホットスポットと考えられ、R32S は新規遺伝子変異である可能性が高い。

今回変異が検出されなかった患者やシン

グルヘテロ変異のみ検出された患者に関しては今後他の原因遺伝子を解析し、日本人における先天性高度難聴の遺伝子変異の分布および頻度を詳細に分析していく。本研究は順天堂大学老人性疾患病態・治療研究センターとの共同研究である。

E. 結論

非症候性難聴者を対象にGJB2遺伝子変異検索を行い解析した結果、138名中40名にGJB2遺伝子変異を認め、これを報告した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasai M, Hayashi C, Iizuka T, Inoshita A, Kamiya K, Okada H, Nakajima Y, Kaga K, Ikeda K Vestibular function of patients with profound deafness related to GJB2 mutation Acta Oto-Laryngologica 2010 Early Online, 1-6

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

検出された Gjb2 変異およびそのアレル頻度

Amino acid Change	Nucleotide change	Allele (%) n=276
—	c.235delC	39 (54.2)
Y136X/ G45E	c.408C>A/134G>A	11 (15.3)
R143W	c.427C>T	10 (13.9)
—	c.176-191del	5 (6.9)
V37I	c.62G>A	2 (2.8)
T86R	c.257C>G	2 (2.8)
—	c.299-300delAT	1 (1.4)
R32S	c.94C>A	1 (1.4)
P225L	c.674C>T	1 (1.4)
	Total mutation	72 (100)

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

## 遺伝性難聴モデルマウスの開発

P0-Cre マウスによる内耳特異的 Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作製

研究分担者 美野輪治 理化学研究所筑波研究所

研究代表者 神谷和作 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学講座

### 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)遺伝子は世界で最も高頻度に変異が検出される遺伝性難聴最大の原因遺伝子で、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。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、最近 *GJB2* 遺伝子に対する遺伝子欠損動物が作成されているが、全身にて遺伝子を欠損させると胎生致死となり、生後の聴力変化や分子病態を解析することが困難であった。本研究に置いて我々は P0-Promoter により制御される Cre recombinase 遺伝子を用いて内耳特異的に *Gjb2* 遺伝子を欠損させるマウスを新規開発し、このマウスの聴覚機能及び内耳病態変化を解析した。その結果、新規に開発された同マウスは聴力以外の機能は正常に発育し、*GJB2* 変異によるヒト遺伝性難聴とほぼ同様の聴力障害と、組織障害を持つことが確認された。

このことから同マウスはヒト難聴の分子病態解析、さらにはヒト遺伝性難聴の新規治療法を開発するために、これまでになかった最適なモデル動物となり得ると考えられる。

### A. 研究目的

標的遺伝子組み換え法により、Connexin26 遺伝子の Silent-Allele 即ち P フェージ由来の配列である loxP 配列を含み、Cre 酵素の非存在下では、正常な機能を保つ allele を持つマウスを作成した(図 2)。Connexin26 遺伝子欠損変異体は、胎生期に致死である事が知られており、Cre 酵素の存在下で初めて欠損する Conditional-Allele を持つ事が、生きた産子を得るためには不可欠である。交配により、この Silent-allele をホモに持つ

マウスを作製し、正常に発生発達することが確認された。

P0-promoter-Cre 遺伝子を transgene として持つ transgenic マウスを導入した。P0 蛋白は、マウス胚発生の中期から出生にかけて、耳胞、聴覚器に発現するので(図 1. )、聴覚器の細胞に広範に Cre 酵素を発現するマウスを得る事ができると考えられる。

### B. 研究方法

Connexin26 Silent allele のホモ接合体マ

ウス (Cx26-conditional-KO マウス) と、P0-Cre transgenic マウスをかけあわせ、ラセン靭帯 Fibrocyte での選択的或はは内耳蝸牛全体に Connexin26 欠損を誘導する事を試みた。Cx26-conditional-KO マウスと P0-Cre マウスの掛け合わせにより、実際に産子が得られ、それらについて聴性脳幹反応 (ABR) の測定を行った。

### C. 研究結果

聴性脳幹反応：Cx26-Silent-Allele:E/P0-Cre<sup>+</sup> のマウスは、ABR の測定により、正常聴力と判断されたのに対し、Cx26-Silent-Allele:O/P0-Cre<sup>+</sup> のマウスは、高度難聴であった (表 1.)。即ち、Cx26 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。このことは、内耳における Cx26 がヒトの場合と同様にマウス聴覚の成立に不可欠である事を示しており、Cx26-conditional-KO マウスがヒト DFNB1 のモデルとなる可能性を示唆している。更に、このマウスを用いて、形態学的、生理学的解析を組み合わせて適用すれば、EP 生成における Cx26 の役割を解明するための最適なシステムを構築できる事も期待できる。

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-Lox 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要な原因遺伝子である GJB2 遺伝子の異常による病態においては、言語習得前の高度難聴を呈する。今回作成したマウスは、これ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

Gjb2 遺伝子を内耳特異的に欠損させることにより、ヒト遺伝性難聴の新規治療法開発のために最適な遺伝子改変モデルマウスが開発された。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

G. 研究発表  
なし

対立遺伝子	記号	遺伝子型	P0-Cre	ABR 閾値
Lox-Cx26-Lox	→ S	S/W	-	34.6dB ± 7(n=6)
Cx26	→ W	S/W	+	35.0dB ± 2(n=9)
		S/S	-	37.5dB ± 5(n=3)
		S/S	+	100dB < (n=6) 97.1dB ± 5(n=6)

表1. Cx26 コンディショナル・ノックアウトマウスにおけるABR 閾値

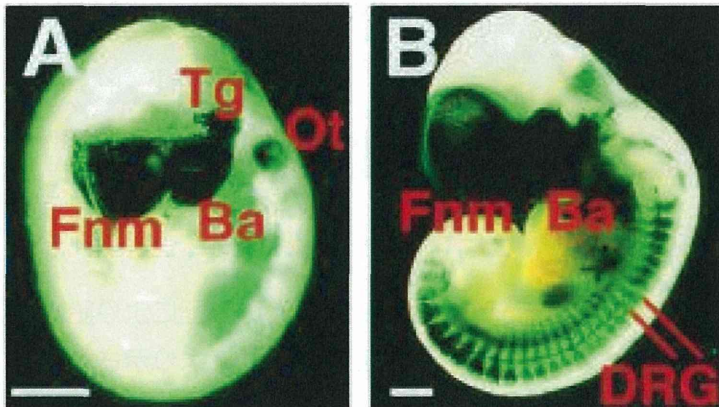


図1. P0-Cre の耳胞での発現 A: 9.5Ed, B: 11.5Ed bar は 0.5mm

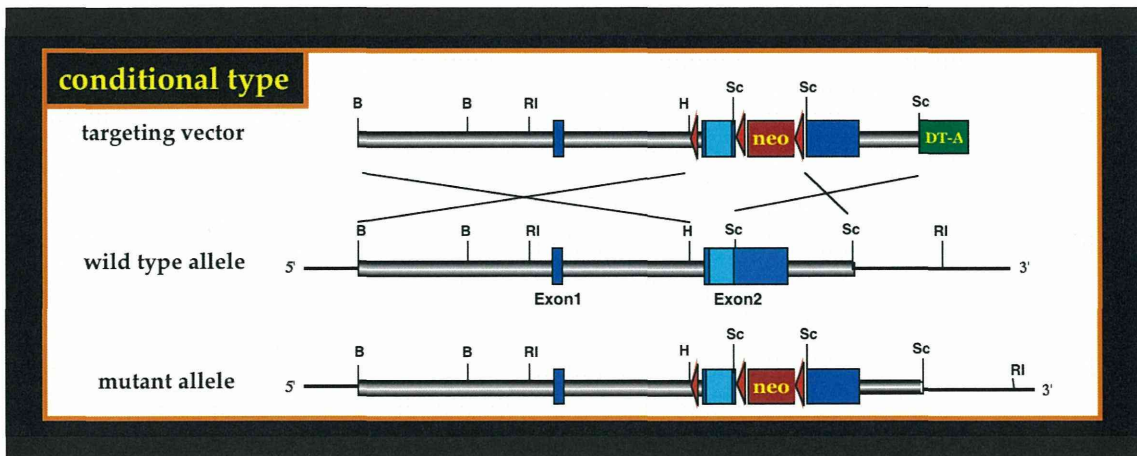


図2. Connexin 26 遺伝子のコンディショナル・ジーンターゲティング ベクター



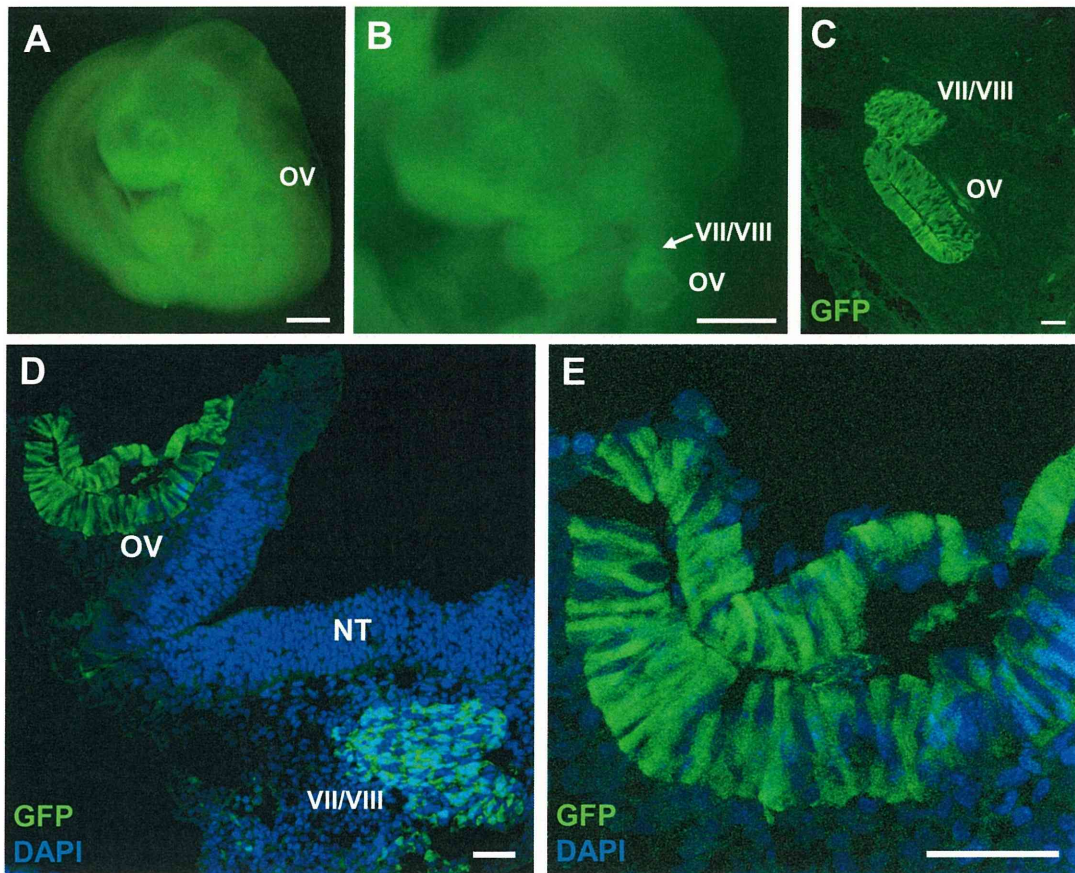


図3 PO-Cre の耳胞での発現

ROSA26-GFP レポーターマウスと PO プロモーターCre マウスとの交配により胎生 10.5 日齢における PO-Cre の発現が緑色蛍光遺伝子 (GFP、緑) により示された。

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 1

Connexin26 変異遺伝子の強制発現によるギャップ結合の分子イメージング

研究分担者 神谷和作 順天堂大学耳鼻咽喉科学教室

### 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い。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多数の円形小プラークに分散していることが示された。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ジャンクション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。本研究ではこの新たな病態の形成メカニズムを解明するため、Connexin26 の *in vitro* 発現系を用いたリアルタイム解析システムを構築した。まず GFP 標識したヒト Connexin26 およびその変異体 R75W を発現する発現プラスミドを構築し HEK293 細胞に遺伝子導入することにより、直線形のギャップ結合プラークを形成させた。このギャップ結合プラークの動態をリアルタイム解析する最適条件を検討し、Cx26-R75W 変異によるギャップ結合プラークの形成・維持過程の経時的変化の解析を行った。

## 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。中でもコネキシン 26 (Cx26) 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 Cx26 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 Cx26 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。最近新たな分子病態として R75W-Tg が蝸牛ギャップ結合プラーク形成に異常を持つことが新たに確認された (図 1)。この分子病態メカニズムを詳細に解析するため、細胞培養系での Cx26 分子イメージングにより、Cx26-R75W 変異によるギャップ結合プラークの形成・維持過程の経時的変化の解析法を検討し優性阻害変異による微細変化をリアルタイムに追跡することを目的とした。

## B. 研究方法

### 正常および変異 Connexin26 発現プラスミドの作成

Connexin26 遺伝子、Gjb2 は単一エクソン内に全長のコーディング領域を含むため、ゲノムからの発現クローンのクローニングが可能である。ヒト型 Connexin26 遺伝子のイメージング用 GFP 融合発現プラスミドを得るため、ヒト DNA および Cx26 R75W-Tg (ヒト Cx26 R75W がゲノム上に組み込まれている) を鋳型とし、kozak 配列の付加と終始

コドンの削除を行ったプライマーセットにて PCR 反応を行った。PCR Product を CT-GFP Fusion TOPO TA Expression Kit (Invitrogen) にて TA Cloning し、得られたクローンをシークエンスで確認、大量精製した。

### 培養細胞への遺伝子導入

精製したプラスミド DNA を FuGENE HD (Roche) によるリポフェクション法での遺伝子導入を行った。イメージング用の培養には Poly-D-Lysine Coverslip Bottom-Dish (BD BioCoat) を使用した。遺伝子導入効率は 70% 程度であった。

### ギャップジャンクション分子イメージング条件の検討

分子イメージングシステムは Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss) 蛍光顕微鏡解析システムに CO<sub>2</sub> チャンバーを装着し、5% CO<sub>2</sub>、37°C 条件下にて解析を行った。撮影間隔や焦点間隔の検討によりギャップジャンクションプラークを解析する最適条件を検討した。

## C. 研究結果

Cx26 優性阻害変異 R75W 変異を導入したトランスジェニックマウス (R75W-Tg) では正常型で直線形の gap junction plaque (GJP) が分断し円形の細かい小プラークが散在していた (図 1)。この異常はタンパク質の internalization (内在化) によるものではなかった (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

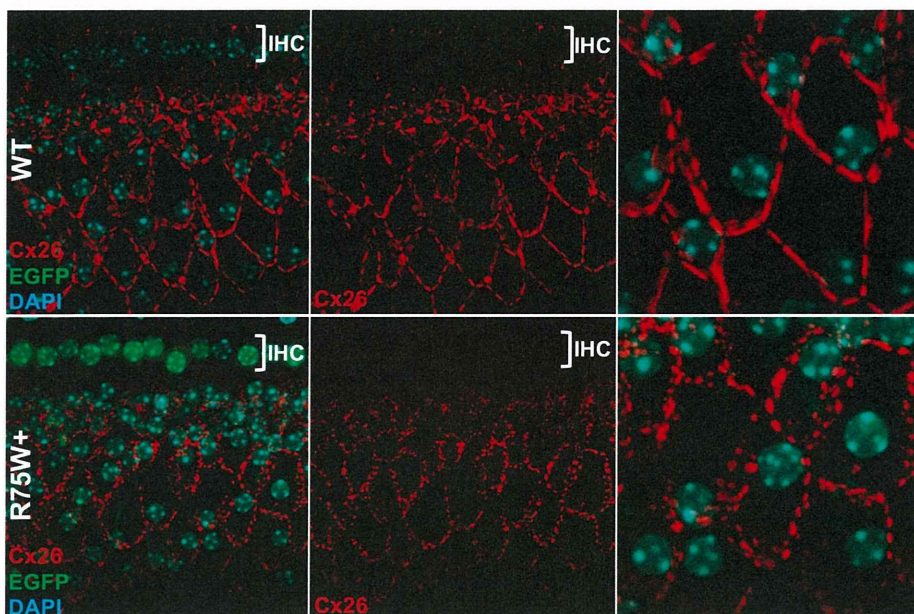


図 1. 遺伝性難聴の新たな分子病態として発見された Gap Junction Plaque の異常。野生型 (WT) において直線状に形成される Gap Junction Plaque は R75W 変異マウスの蝸牛内溝細胞では分裂し細かい円形の小プラークとして散在している。

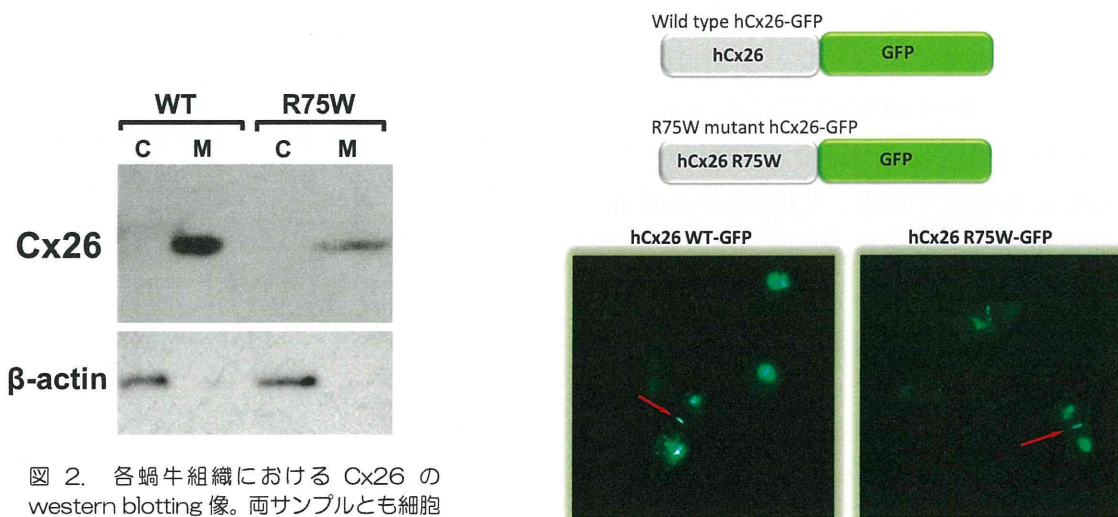


図 2. 各蝸牛組織における Cx26 の western blotting 像。両サンプルとも細胞質 (C) ではなく細胞膜 (M) に局在している。タンパク質の内在化は見られず Cx26 タンパク質は野生型と同じように細胞膜に組み込まれている。R75W で Cx26 のタンパク質量は減少していた。

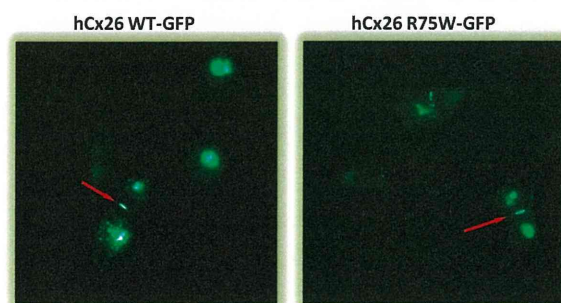


図 3. 上；構築したプラスミドにより発現される GFP 融合タンパク質。  
下；HEK293 細胞に導入され、発現した Cx26 融合タンパク質。どちらも細胞間に gap junction plaque を構成することができる。

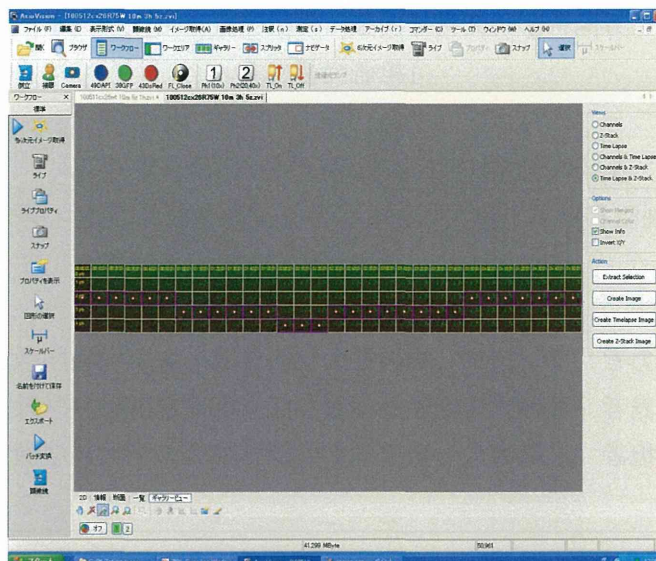


図 4. イメージの選択。標的とする gap junction plaque (GJP) を  $1\ \mu\text{m}$  間隔で 5 段階の焦点深度にて撮影。これを 10 分間隔で 5 時間撮影する。縦に自動制御した Z 軸方向の画像を 5 枚、横軸を時間とし画像一覧を表示。この中から標的 GJP の焦点が合った Z 面を選択し動画を再構築。

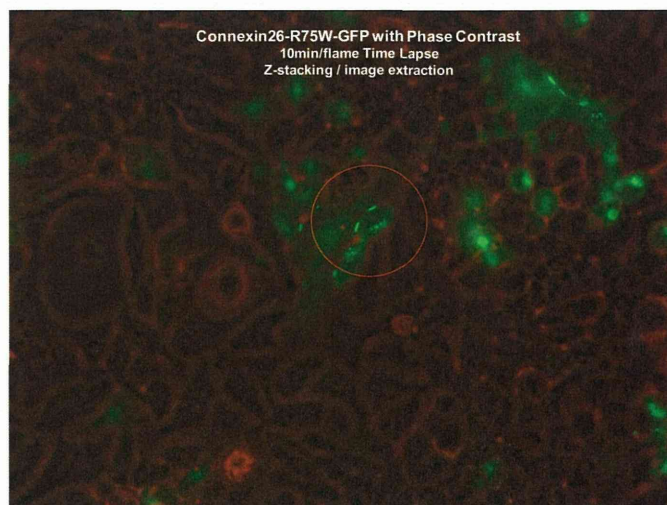


図 5. イメージング動画の構築。図 4 で構築した動画例。赤丸の部分が標的の gap junction plaque。変異体 R75W では激しく移動しブラークの不安定性が示唆された。

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

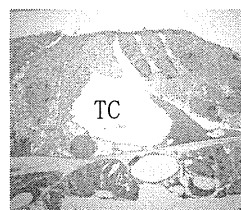
コルチトンネルは柱細胞の細胞骨格の発達により内・外柱細胞の細胞間の開大が生じ形成される。Tgマウスでは柱細胞内のmicrotubulesの形成不全を認めコルチトンネル形成不全の原因と考えられた。

#### 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, 7<sup>th</sup> 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。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。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 BS<sup>3</sup> 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 BS<sup>3</sup> 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 BS<sup>3</sup> 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、BS<sup>3</sup> 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