

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。

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。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。

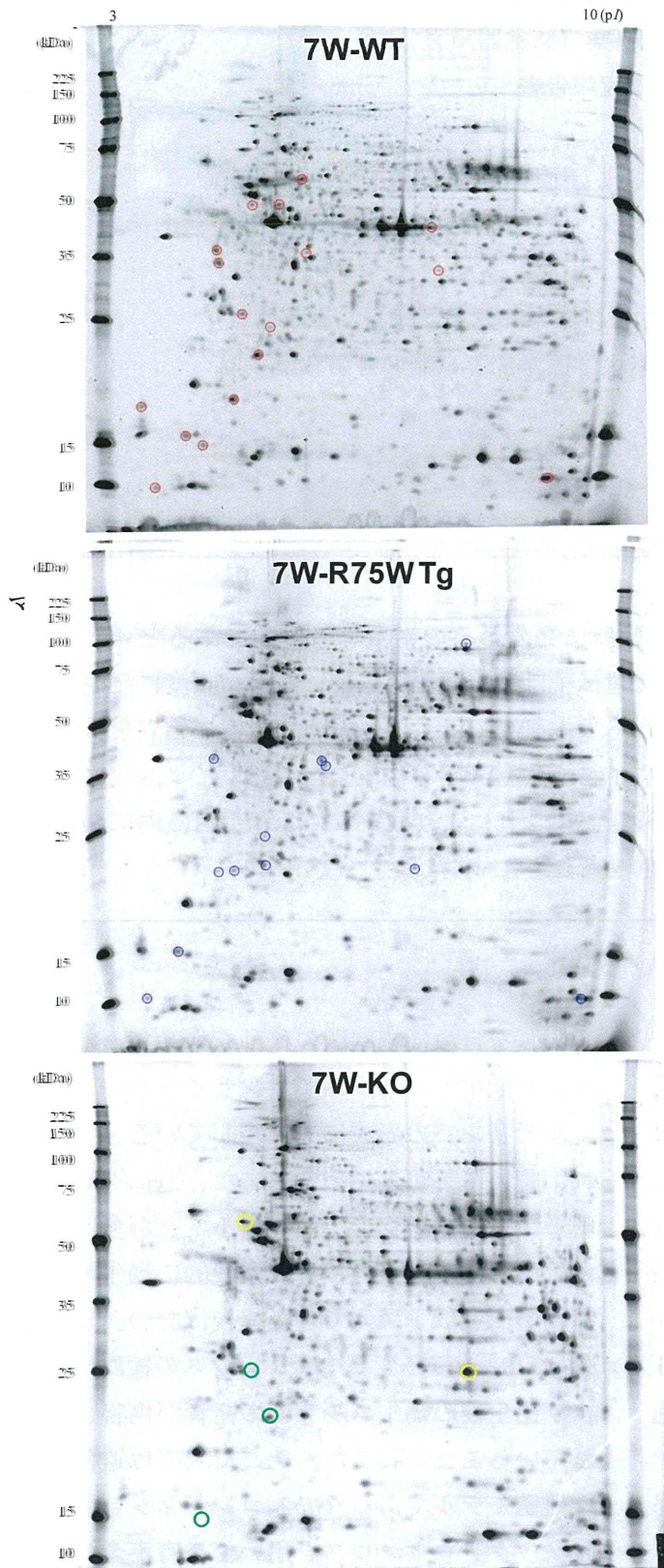
G. 研究発表

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
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）
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 4
Connexin26 欠損マウス蝸牛組織へのウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の検討

研究分担者 飯塚崇 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

先天性難聴は1000出生に一人と高頻度に発生しその半数は遺伝性であると考えられている。コネキシン26をコードするGjb2遺伝子は遺伝性難聴の中で最も高頻度に発生する遺伝性難聴原因遺伝子として知られている。本研究では遺伝性難聴の治療法確立を目的としGjb2遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（AAV）を作成した。同ウイルスベクターのGjb2ノックアウトマウスへの導入を検討し、これにより同マウスの蝸牛組織内にGjb2遺伝子がコードするコネキシン26を発現させることに成功した。

A. 研究目的

出生1000人に1人の割合で生まれてくる高度難聴児のうち少なくとも半数は遺伝子の関与によると推測されている。この中でもGJB2変異による遺伝性難聴が最も頻度が高いことが知られているが、現在根本的な治療はない。GJB2遺伝子はギャップジャンクション蛋白であるConnexin 26（Cx26）をコードする遺伝子である。細胞間の結合様式の1つであるギャップジャンクションは内耳蝸牛では主に支持細胞に局在しており、水やカリウムイオンなど低分

子物質を自由に細胞間の移動をさせて、内リンパ液中のカリウムイオンサイクルや、コルチリンパの形成にも関与しているとされ、聴力に不可欠である。また、遺伝性難聴モデルにはマウスが使われることが多いが、成熟したマウスでは非侵襲的に蝸牛支持細胞に遺伝子導入できた報告はない。一方、GJB2遺伝子変異モデルマウスの検討により出生後の蝸牛コルチ器の発育が傷害されていることが判った。そこで我々は遺伝性難聴モデルであるGjb2コンディショナルノックアウトマウスを用いて発育不全の

コルチ器を遺伝子治療で回復させるのを目標にマウス蝸牛支持細胞へのウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。

B. 研究方法

内耳への遺伝子導入の方法として蝸牛壁に小孔を開けての投与、正円窓からの投与、半規管からの投与があるが、半規管からの投与は導入効率が低いため今回は検討しなかった。ウイルスベクターはアデノウイルスベクター (AdV) とアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた。また、投与前後に聴性脳幹反応を行い、聴力を比較した。

C. 研究結果

過去に当研究室で所有する *Gjb2* ノックアウトマウスを用いた我々の結果では、過去の報告と同様に外リンパ腔への導入ではコルチ器や内リンパ腔への発現はみられず、内リンパ腔への投与では高度難聴を認めた。

我々はマウス *Gjb2* 遺伝子を組み込んだ AAV を作成し、*Gjb2* ノックアウトマウスの蝸牛に導入した。凍結切片を作成し免疫染色にて検討したところらせん板縁とらせん靭帯に Cx26 の発現を認めた。比較としてベクターを導入していない *Gjb2* ノックアウトマウスを用いたものは発現を認めなかった。

D. 考察

我々は正円窓経路で AAV を出生直後のマウスに投与することにより聴力の損失なく蝸牛支持細胞に遺伝子を導入することを

報告した (T. iizuka et al. 2008)。今後この導入方法で *Gjb2* ノックアウトマウスに *Gjb2* 遺伝子を組み込んだ AAV の導入を行っていく予定である。

E. 結論

本研究では遺伝性難聴の治療法確立を目的とし *Gjb2* 遺伝子を組み込んだ AAV を作成した。同ウイルスベクターを *Gjb2* ノックアウトマウスへの導入を検討し、これにより同マウスの蝸牛組織内に *Gjb2* 遺伝子がコードするコネクシン26を発現させることに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Noninvasive In Vivo Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea. Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K. Human Gene Therapy 19(4):384-90. 2008.

2. 学会発表

Intracochlear Injection of Adeno-Associate Virus. Vector to a Mouse Model Created by a Conditional. Knockout of *Gjb2* Gene. Takashi Iizuka et al. ARO midwinter meeting 2010

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
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）
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 5
Connexin26 欠損マウス蝸牛組織へのウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の検討

研究協力者 岡田弘子 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室
研究分担者 飯塚崇 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

先天性高度難聴児は幼少児期に末梢平衡器官にも障害を伴う頻度が極めて高いことが知られている。近年、内耳への遺伝子導入に関して多くの報告が有る。我々は現在まで難聴の治療を目的として内耳への遺伝子導入に関する研究を行ってきており、この経験を基にマウス前庭組織へのウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。

A. 研究目的

近年、内耳の遺伝子治療を目的として実験動物内耳への遺伝子導入法の検討は以前よりも多く報告されているが、前庭障害を標的とした内耳遺伝子治療法の検討は非常に少ない。我々はこれまで難聴の治療を目的として内耳への遺伝子導入に関する研究を行ってきており、主に蝸牛への遺伝子導入に焦点を当ててきた、本研究ではこの基礎データを基にマウス前庭組織へのウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。

B. 研究方法

前庭への遺伝子導入を目的として、アデノウイルスベクター（AdV）とアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を、微細ガラス管を用い、正円窓と半規管を通じて生後 2

週の野生型マウス内耳に注入した。AdV および AAV は緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を組み込まれたものを使用した。聴覚機能と平衡機能への侵襲を評価するため、聴性脳幹反応（ABR）とバランステストを術前および術後 2 週間で行った。その後内耳を摘出し、凍結切片を作成し、免疫染色を施行して導入遺伝子の発現を観察した。

C. 研究結果

いずれの群においても、膨大部および卵形嚢において、有毛細胞および前庭支持細胞への GFP の発現が認められた。また、AAV 注入群においては、線維細胞にも GFP の発現が多数みられたが、AdV 注入群においてはみられなかった。ABR 測定の結果では、正円窓経由に AdV を注入した群で軽度の聴

力閾値上昇がみられたが、半規管経由に AAV を注入した群では聴力閾値の変化が見られなかった。術後 2 週間のバランステストにおいて、いずれの群でも異常はみられなかった。

D. 考察

今回の実験では半規管経由で AAV を注入する方法が、安全かつ有用であることが示唆された。遺伝子導入を最適化するため、各手法・各ベクターによる導入効率を評価する必要があると考えられる。この低侵襲の前庭への遺伝子導入法は、今後ヒトの平衡異常の治療の開発に繋がる可能性がある。

E. 結論

半規管経由で AAV の投与方法により、聴力の低下を伴わずに前庭の有毛細胞、支持細胞、線維細胞への遺伝子導入に成功し、安全かつ効率的な前庭遺伝子治療法が開発された。

G. 研究発表

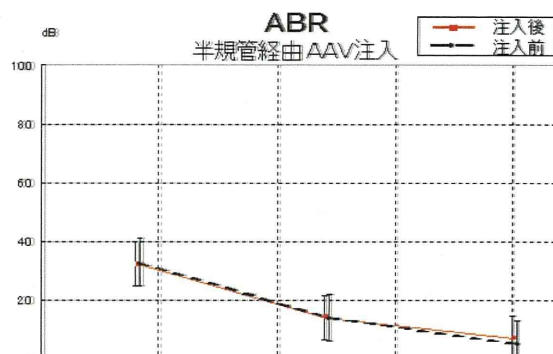
1. 論文発表

Hiroko Okada, Takashi Iizuka, Hideki Mochizuki, Tomoko Nihira, Kazusaku Kamiya, Ayako Inoshita, Hiromi Kasagi, Misato Kasai, Katsuhisa Ikeda, Gene transfer targeting mouse vestibule using adenovirus and adeno-associated virus vectors
Otology & Neurotology, 2012 33:655-659.
 学会発表

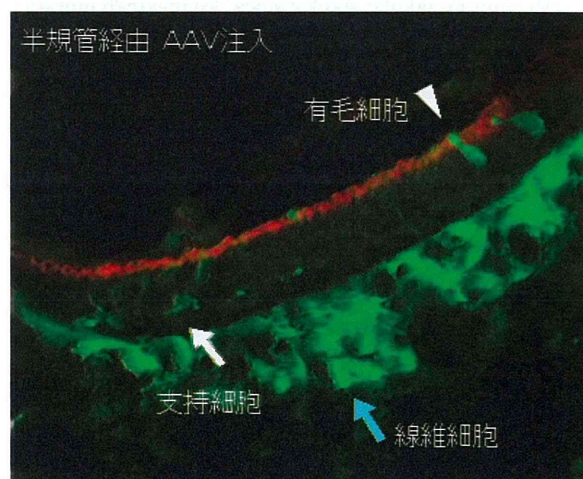
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



経半規管 AAV 投与による遺伝子導入後の ABR 閾値の変化
 AAV 投与による聴力の低下は見られず、AAV の経半規管投与方法の安全性が確認された。



AAV による半規管経由遺伝子導入後の前庭組織
 多くの有毛細胞 (矢頭)、支持細胞 (白矢印)、および線維細胞への遺伝子導入に成功した。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

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 |
|---|--|--|--------|-----------|------|
| <u>Kazusaku Kamiya</u> (corresponding author), Sabrina W. Yum, Nagomi Kurebayashi, Miho Muraki, Kana Ogawa, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Xueshui Guo, Satoru Gotoh, Yoshinobu Sugitani, Hitomi Yamanaka, Shioko Ito-Kawashima, Takashi Iizuka, Takashi Sakurai, Tetsuo Noda, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda | Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires Connexin26 | Journal of Clinical Investigation | 124(4) | 1598-1607 | 2014 |
| Ayako Inoshita, Keiko Karasawa, Megumi Funakubo, Asuka Miwa, Katsuhisa Ikeda, <u>Kazusaku Kamiya</u> (corresponding author) | Dominant negative connexin26 mutation R75W causing severe hearing loss influences normal programmed cell death in postnatal organ of Corti | BMC genetics | 15(1) | 1-8 | 2014 |
| Nomura N, <u>Kamiya K</u> , Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sakaki S, Uchida S | Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type IV caused by mutated Bsnd in mice. | Biochem Biophys Res Commun | 441(3) | 544-9 | 2013 |
| 神谷和作 | 幹細胞ホーミング機構を応用した遺伝性難聴に対する内耳細胞治療法の開発 Cell therapy for hereditary hearing loss with stem cell homing factors | 日本薬理学雑誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 特集・革新的難聴治療の夜明け | 141(4) | 191-194 | 2013 |

| | | | | | |
|--|---|---|--------|-----------|------|
| Hiroko Okada, Takashi Iizuka, Hideki Mochizuki, Tomoko Nihira, Kazusaku Kamiya, Ayako Inoshita, Hiromi Kasagi, Misato Kasai, Katsuhisa Ikeda | Gene transfer targeting mouse vestibule using adenovirus and adeno-associated virus vectors | Otology & Neurotology, | 33 | 655-659 | 2012 |
| 神谷和作 池田勝久 | 多能性幹細胞を用いた 遺伝性難聴に対する内 耳細胞治療法の開発 Inner ear cell therapy for hereditary deafness with multipotent stem cells | 日本臨床 特集・幹細胞治療 | 69(12) | 2215-2219 | 2011 |
| Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kamiya K, Kawano A, Suzuki M, Hattori N, Ikeda K | Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children. | Int J Pediatr Otorhinolaryngol. | 75(2) | 211-4 | 2011 |
| Yan D, Kamiya K (Co-first), Ouyang XM, Liu XZ. | Analysis of subcellular localization of Myo7a, Pcdh15 and Sans in Ush1c knockout mice. | Int J Exp Pathol. | 92(1) | 66-71 | 2011 |
| Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutani K, Fujii M, Matsunaga T. | Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid. | Neurochem Int. | 56(3) | 487-94 | 2010 |
| 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 | 130(9) | 990-5 | 2010 |
| 神谷和作 池田勝久 | 実験動物を用いた内耳 細胞治療研究へのアプ ローチ | 耳鼻咽喉科臨床 Practica Oto- Rhino-Laryngologica | 補126 | 1-5 | 2010 |
| 神谷和作 | 難聴に対する内耳細胞 治療法の開発 | 医学のあゆみ 特集・細胞治療update | 229(9) | 863-867 | 2009 |