

難聴に対する内耳細胞治療法の開発

Inner ear cell therapy for sensorineural hearing loss



神谷 和作

Kazusaku KAMIYA

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学教室

◎内耳は特殊なリンパ液で満たされた独特な構造をもち、血液-内耳関門とよばれる血管系を有するため、内耳有毛細胞やその周辺細胞への薬物的アプローチが難しい。しかし、移動能・多分化能を兼ね備えた幹細胞による内耳細胞治療の方法が確立すれば、難聴の根本的治療への有効なツールになると考えられる。近年の内耳再生医療に関する基礎研究分野は、*in vitro* での有毛細胞への分化誘導において年々進歩している。最近では培養シャーレ内で鳥類細胞から聴毛を有する有毛細胞への分化誘導も可能となっており¹⁾、細胞工学的分野では一定の成果が得られている。しかし、それらの細胞を移植により内耳組織へ生着させ、同時に機能的補足や組織修復によって聴力回復を誘導する細胞治療の試みは成功例が少なく、引用度の高い論文での報告も少ない。聴力回復を目的とした内耳細胞治療法を開発するためには移植細胞の生着と機能発現を同時に考慮し、内耳の解剖学的特徴および各細胞の生理学的特徴を十分に理解することが重要であると考えられる。著者らの報告では、実験的に蝸牛線維細胞のみに傷害を与えたラットへ半規管外リンパ液を経由した細胞液灌流法を用いることにより、損傷部の修復と聴力回復率を高めることに成功した²⁾。現在は、ヒト疾患に近い遺伝性難聴モデル動物への各種の幹細胞移植に取り組んでいる。蝸牛線維細胞のような、修復が困難ではないが聴力維持に不可欠な細胞を標的に検討を積み重ねることにより、将来的には有毛細胞も標的とした多様な難聴に対する聴力回復も不可能ではないと考えられる。本稿では、とくに各種幹細胞や遺伝子改変動物を用いた内耳への細胞治療に関する知見について報告する。

Key word : 内耳, 蝸牛, 有毛細胞, 蝸牛線維細胞, 骨髄間葉系幹細胞

背景

難聴の原因は多岐にわたるが、近年の遺伝子改変動物開発技術の向上や多種のモデル動物の開発により、多くの病態メカニズムが解明に近づいている。すべての先天性疾患のなかでも頻度の高い遺伝性難聴においては、難聴家系や突然変異難聴マウスの遺伝子解析によって多くの遺伝性難聴原因遺伝子が同定されている。初期に発見された遺伝性難聴の原因の多くは内耳有毛細胞の変性または機能的・形態的異常であったため、多くの研究者が有毛細胞を中心に難聴の病態メカニズム解明に取り組んできた。哺乳類の有毛細胞は再生能力をもたないため遺伝子導入などによる有毛細胞再生の誘導も盛んに研究されてきた^{3,4)}。その一方で、内耳への細胞移植による有毛細胞の修復の試みも

行われているが、特殊なリンパ液で満たされた内耳の構造的特徴から、聴力を保持しつつ標的部位に移植細胞を到達させ分化させることは容易ではない。そのため有毛細胞の修復にはモデル動物を用いた多くの検討実験が必要と考えられる。近年、有毛細胞以外にも蝸牛線維細胞などの機能異常が単独で難聴病態の引き金となることも明らかとなっており、多様な治療戦略が求められている。幹細胞の損傷部への移動能力や組織環境(ニッチ, niche)による分化誘導を十分に検討すれば、細胞治療は未だ根本的治療法の存在しない内耳組織変性に対する治療にきわめて有効であると考えられる。

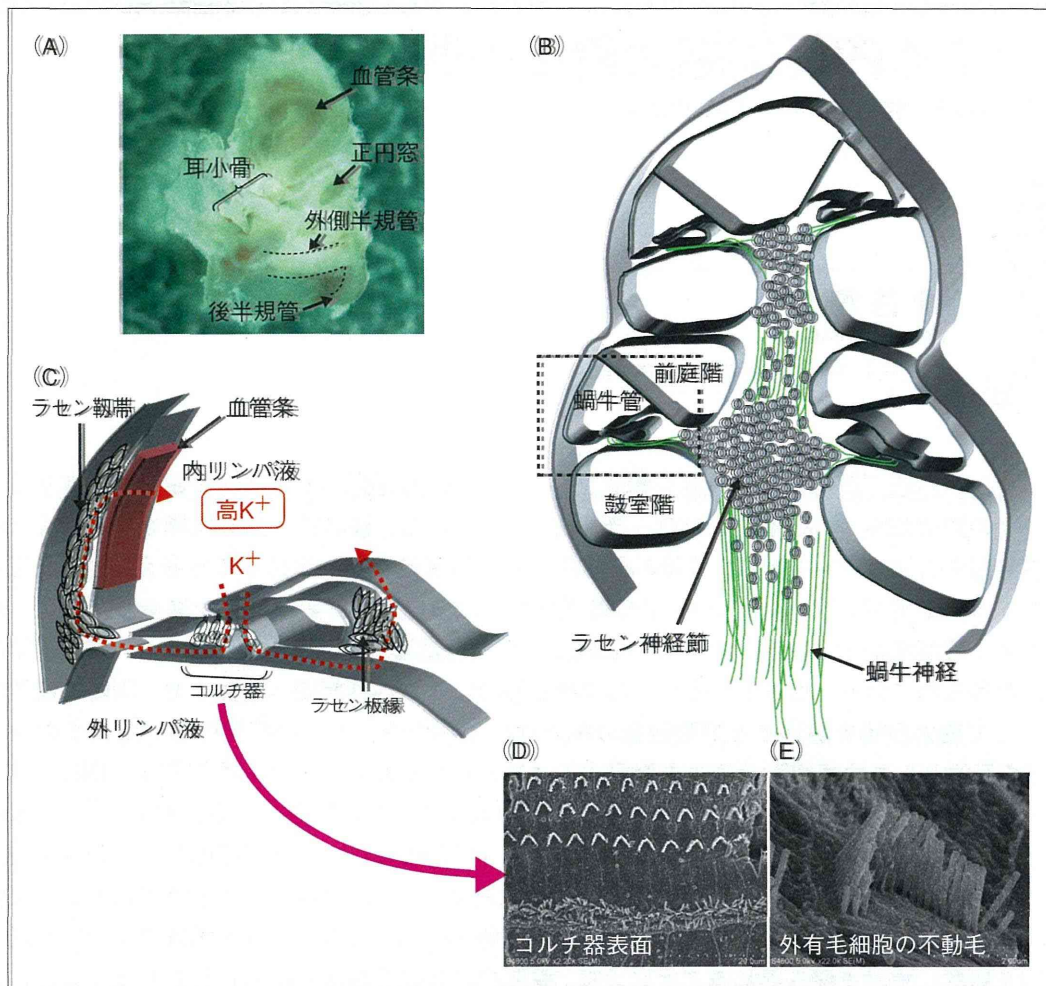


図 1 内耳の構造および K^+ リサイクリングシステム

A: 成熟マウス内耳。上部の血管条とともに螺旋構造を示す部位が蝸牛。B: 蝸牛の断面。C: K^+ リサイクリングシステム。ラセン靭帯、ラセン板縁の蝸牛線維細胞および血管条細胞による内リンパ液高 K^+ 濃度を維持するためのイオン輸送システム。これにより蝸牛内リンパ電位 (EP) が恒常的に維持される。D: 有毛細胞を含むマウスコルチ器の表面構造 (走査電子顕微鏡)。上部 3 列の外有毛細胞、下部 1 列の内有毛細胞が整然と並ぶ。E: 成熟マウス外有毛細胞の不動毛 (走査電子顕微鏡)。V 字型に配置した 3 列の長さの異なる不動毛で構成され、基底膜を介した外リンパ液の振動に起因するこれらの傾きにより K^+ が細胞内へ流入し、聴覚シグナルが生まれる。

● 内耳の形態的特徴と K^+ リサイクリングシステム

哺乳類の内耳は蝸牛と前庭器で構成され、骨で覆われた内部には鼓室階と前庭階を満たす外リンパ液と、蝸牛管を満たす内リンパ液が存在する (図 1)。内リンパ液ではつねに高 K^+ 濃度 (150 mM) が維持されており、これにより生じる電位を蝸牛内リンパ電位 (endocochlear potential: EP) とよぶ。内リンパ液に面している有毛細胞は、この EP という電位が存在するために、音の振動から聴毛に存在する機械電気変換 (mechano-electrical transduction: MET) チャネルの開口に併って脱分

極を起こすことができる。EP を維持するために重要な役割を担っているのが蝸牛線維細胞と血管条であり、これらはコネクシンで構成されるギャップジャンクション、 Na^+ 、 K^+ -ATPase、 Na^+ 、 K^+ 、 $2Cl^-$ 共輸送体などによってイオン輸送を行い、内リンパ液の高 K^+ 状態を維持している (図 1)。このイオン輸送システムは K^+ リサイクリングシステムとよばれ、これが正常に機能しなければ EP は低下し、たとえ有毛細胞機能が正常であっても脱分極は起こらず、その後の聴覚系神経の活動電位は発生しない。

● 内耳細胞治療での標的細胞

多くの研究者が内耳再生の分野でもっとも力を入れているのは有毛細胞の再生であるが、これは有毛細胞が再生能をもたない細胞であるからである。同細胞は、臨床のみならず科学的にも分化や機能的メカニズムに対する興味が集中している。しかし、有毛細胞は高度に分化した細胞であり、特殊化した巨大な繊毛の形成や極性の保たれた蛋白質局在を必要とするため、内耳で細胞を生着させ、正常に分化および機能発現させるための最初のターゲットとしては困難が予想される。蝸牛内には有毛細胞以外にも正常聴力の維持に必須な細胞(ラセン神経節細胞, コルチ器支持細胞, 血管条細胞, 蝸牛線維細胞)が存在し、これらをターゲットとした細胞治療の検討も重要であると考えられる。著者らの研究では、比較的機能がシンプルではあるにもかかわらず蝸牛の機能としては重要な働きを担う蝸牛線維細胞に着目し、同細胞を内耳細胞治療の第1のターゲットとして研究に着手した。

● 蝸牛線維細胞を標的とした骨髄間葉系幹細胞移植

蝸牛ラセン鞏帯およびラセン板縁を構成する蝸牛線維細胞は、ナトリウムポンプとギャップジャンクションによる蝸牛内イオンの能動輸送および受動輸送という単純な機能を担っている。しかし、蝸牛線維細胞の傷害は複数の先天性および後天性難聴の主要因となることが示され、その重要性が近年示唆されている。とくにヒト非症候性難聴 DFN3 の原因因子 *Birn4* の遺伝子欠損マウス⁵⁾や *otospiralin* 欠損マウス⁶⁾では蝸牛線維細胞の変性を主要因とした聴力低下が実証され、有毛細胞を含むコルチ器と同様に正常聴力を維持するうえで重要性の高い細胞群であることが明確に示された。また、複数の加齢性難聴モデル動物においても、蝸牛線維細胞の変性が他の細胞に先立ち開始することが報告されている⁷⁻⁹⁾。また、蝸牛線維細胞は単一細胞としての機能が単純であるにもかかわらず内耳機能における重要性が高いという点から、高度に分化した有毛細胞に比べて細胞治療が成功する可能性が格段に高いと考えられる。これ

らのことから蝸牛線維細胞は、多種の感音性難聴に対する新規治療法確立への重要な標的となりうると考えられる。著者らは、薬剤局所投与により蝸牛線維細胞の二点にのみ限局的なアポトーシスを起こすモデルラットを開発し^{10,11)}、半規管からの骨髄間葉系幹細胞の外リンパ液還流投与を行った。その結果、移植 11 日後の高音域(40kHz)の聴力回復が有意に促進され、外側壁の蝸牛線維細胞損傷部に多数の移植細胞が観察された。組織内には、腫瘍化を示す移植細胞は観察されなかった。移植細胞は蝸牛外側壁の頂回転側、外リンパ液に面している部分で多くみられ、この部位を中心に蝸牛組織に侵入し損傷部まで移動したと考えられる。損傷部ではコネクシンの発現とともに隣接細胞と接合する移植細胞が観察され、イオン輸送経路の回復による内リンパ液 K^+ 濃度の正常化が聴力回復に寄与したと推測される²⁾(図 2)。

● 内耳細胞治療に用いる幹細胞

ここ数年いくつかの内耳細胞移植研究に用いられてきたのが ES 細胞(embryonic stem cell, 胚性幹細胞)であり、同細胞は有毛細胞への分化も大いに期待できる。しかし他臓器同様、移植後に奇形腫(teratoma)様の形態がみられるなど、不安定性も示唆されている¹²⁾。また、成体細胞から作成することができる人口多能性幹細胞、iPS 細胞(induced pluripotent stem cells)も ES 細胞同様、有毛細胞への分化の可能性をもつことで期待できるが、いまだ移植実験の報告はない。同細胞も ES 細胞同様、分化の不安定性を考慮する必要がある。著者らが内耳移植実験に用いた骨髄間葉系幹細胞は ES 細胞、iPS 細胞ほどの多分化能はもたないが、分化が安定しており、著者らの移植実験でも奇形腫など腫瘍化に関連した形態はみられなかった。

2007 年に Corwin らの研究チームはニワトリ内耳由来の増殖・継代・凍結保存可能な間葉系細胞から動毛、不動毛をもつ有毛細胞を作成した¹⁾。それまで *in vitro* においては有毛細胞特異的マーカーを発現させた報告はあったが、形態的にも有毛細胞と同様の聴毛を形成させた報告ははじめてである。次段階としては哺乳類細胞、とくにヒト

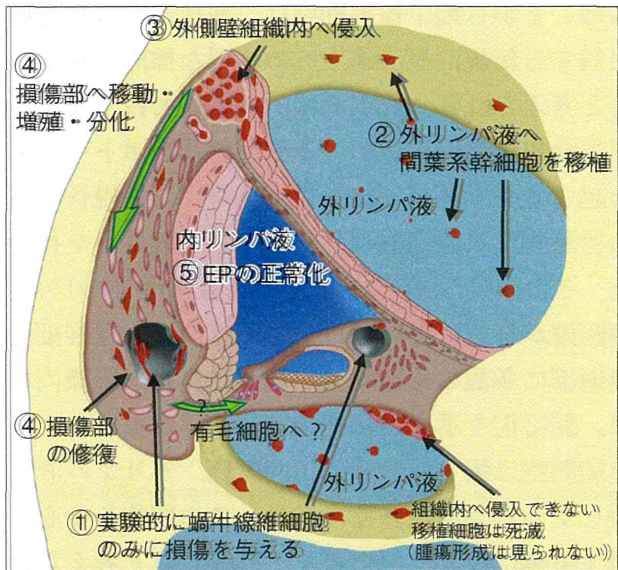


図 2 蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞移植²⁾

著者らの行った細胞治療法において観察された蝸牛線維細胞損傷部の修復および推測された移植細胞の移動経路。

由来細胞から有毛細胞を *in vitro* で作成する技術が期待できる。著者らも同方法によるマウス内耳間葉系細胞の調整を試みており、この方法で増殖させ調整した有毛細胞前駆細胞が移植に有効である可能性がある。同論文では有毛細胞が間葉系由来の細胞から分化誘導可能であることを証明しており、他の *in vitro* 研究においても骨髄間葉系幹細胞が有毛細胞への分化能をもつことが示唆されている¹³⁾。このことは、著者らの示した骨髄間葉系幹細胞の内耳移植が有毛細胞を標的とした治療にも有用である可能性を示唆している。

● 内耳細胞治療実験に適した難聴モデル動物

外傷、騒音、感染、薬物障害、血流障害に起因する聴覚障害動物モデルは多く開発されており、これらも細胞治療の対象とすることができる。著者らはミトコンドリア阻害薬を用いて蝸牛線維細胞のみに損傷を与えるモデルラットを開発し、この細胞移植実験に成功している。しかし、このような実験的に内耳損傷を誘導した動物モデルがヒトと同等な内耳組織傷害および機能的障害を忠実に再現しているかという点に関しては、実証することは困難である。これに対し原因蛋白質がすでに特定されている遺伝子改変動物または突然変異

動物は、ヒト遺伝性難聴と病態の多くが一致していると考えられる。細胞移植によりその蛋白質が担う機能を回復させることができれば、幹細胞が正常に分化し失われていた蛋白質機能を取り戻した結果として聴力が回復したことを実証しやすい。有毛細胞の変性が顕著にみられるモデル動物としては、アッシャー症候群原因遺伝子 (*Pcdh15*¹⁴⁾, *Cdh23*¹⁵⁾, *Sans*¹⁶⁾, *Harmonin*¹⁷⁾, *Myosin VIIa*¹⁸⁾ など)の突然変異動物あるいは遺伝子改変動物が、明白な表現型をもつため有毛細胞の研究に広く用いられている。これらの進行性の組織変性は重度であり、有毛細胞の変性から連鎖的にラセン神経節細胞の消失へとつながる場合が多い。そのため細胞治療による細胞の生着・分化の検討は可能であるが、聴力改善の検討は現段階で容易ではないと思われる。蝸牛線維細胞を標的とした場合、有毛細胞変性を伴わず蝸牛線維細胞のみに変性をもつ *Brn4* 欠損マウス⁵⁾, *Otospiralin* 欠損マウス⁶⁾ が有効であると考えられる。これらの聴力改善の可能性は、有毛細胞を標的とした細胞治療よりも格段に高いと思われる。ヒト遺伝性難聴でもっとも高頻度に出現するコネキシン 26 の遺伝子欠損マウスおよび優性阻害トランスジェニックマウス¹⁹⁾ は、同遺伝子が蝸牛線維細胞および支持細胞におもに発現するため著者らの行った骨髄間葉系幹細胞移植の応用も有効であると考えられる。

● 内耳への細胞投与方法

著者らの初期の移植実験では、蝸牛管付近より細胞液投与を試みた際はどの部位でも手術による永続的な聴力低下がみられ、蝸牛組織には線維化が認められた。蝸牛リンパ液は半規管リンパ液と直接交通しているため、著者らは Iguchi らの方法²⁰⁾を参考に、ラットの後半規管および外側半規管にそれぞれ小孔を開け(図 3)、片側から微小チューブを挿入し細胞液 (1×10^5 cells/20 μ l)での 10 分間の還流を行った。この方法では手術による聴力低下はほとんどみられず、大量の細胞を蝸牛内に導入することができるため、内耳細胞治療に適した投与方法であると思われる。また、新生児難聴スクリーニング直後の早期治療を想定した内耳への投与方法として、Iizuka らは生後 0 日齢の幼

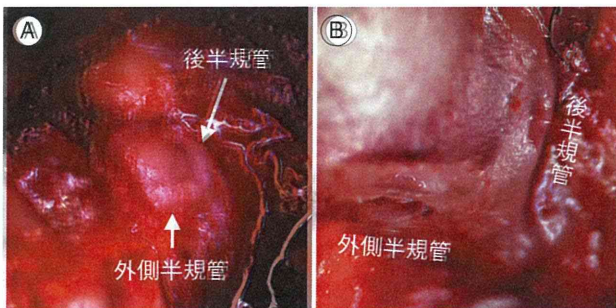


図3 半規管からの細胞投与法

A: 経半規管細胞移植時に露出された成熟マウス半規管. B: 後半規管および外側半規管に細胞液を灌流するための小孔を開け、一方に微小チューブを挿入し細胞液を注入、もう一方より外リンパ液を排出する.

若マウスへ、微小ガラス管を用いて遺伝子治療用ウイルス液を非侵襲的に外リンパ液内へ注入することに成功している²¹⁾。同方法は、非侵襲性を必要とする幼若個体への細胞注入にも応用可能であると考えられる。この方法では外リンパ液の漏出がほとんどないため、少量であれば非侵襲的に細胞液を注入することができる。細胞移植用としては、ガラス管先端の直径をパッチクランプ用のプレーで微調整することで利用可能と考えられる。

血液内耳関門と移植細胞に対する拒絶

遺伝性難聴など遺伝子変異を原因とする聴覚障害に対する細胞治療としては、正常な遺伝子をもつ幹細胞による他家移植による細胞置換が考えられるが、そのなかで重要と考えられるのが移植の拒絶である。内耳の毛細血管には、脳と同様に過剰な免疫系から組織を保護する血液-内耳関門というシステムがあり、容易に移植細胞を拒絶することはないと考えられる。この特徴のため、免疫抑制剤なしに他家移植を行える可能性がある。著者らはF344系ラット由来の骨髄間葉系幹細胞をSD系ラットへの移植に用いたが、組織内に侵入した移植細胞のなかで拒絶を示す像はきわめて少なかった²⁾。このことは、他系統間であっても内耳細

胞移植が成立する可能性を示唆している。

おわりに

内耳は他臓器と比較して組織容量が小さく隔絶された組織であるため、実験後の移植細胞の動態が解析しやすいという利点がある。内耳への導入方法、移植に最適な細胞の選抜などが発展していけば、内耳の細胞変性を伴うあらゆるタイプの難聴において細胞治療が実現できると考えられる。

文献

- 1) Hu, Z. and Corwin, J. T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** : 16675-16680, 2007.
- 2) Kamiya, K. et al. : *Am. J. Pathol.*, **171** : 214-226, 2007.
- 3) Izumikawa, M. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 271-276, 2005.
- 4) Gubbels, S. P. et al. : *Nature*, **455** : 537-541, 2008.
- 5) Minowa, O. et al. : *Science*, **285** : 1408-1411, 1999.
- 6) Delprat, B. et al. : *Mol. Cell Biol.*, **25** : 847-853, 2005.
- 7) Hequembourg, S. and Liberman, M. C. : *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, **2** : 118-129, 2001.
- 8) Spicer, S. S. and Schulte, B. A. : *Hear Res.*, **172** : 172-185, 2002.
- 9) Wu, T. and Marcus, D. C. : *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, **4** : 353-362, 2003.
- 10) Hoya, N. et al. : *Neuroreport*, **15** : 1597-1600, 2004.
- 11) Okamoto, Y. et al. : *Audiol. Neurootol.*, **10** : 220-233, 2005.
- 12) Lang, H. et al. : *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, **9** : 225-240, 2008.
- 13) Jeon, S. J. et al. : *Mol. Cell Neurosci.*, **34** : 59-68, 2007.
- 14) Alagramam, K. N. et al. : *Nat. Genet.*, **27** : 99-102, 2001.
- 15) Di Palma, F. et al. : *Nat. Genet.*, **27** : 103-107, 2001.
- 16) Kikkawa, Y. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **12** : 453-461, 2003.
- 17) Johnson, K. R. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **12** : 3075-3086, 2003.
- 18) Gibson, F. et al. : *Nature*, **374** : 62-64, 1995.
- 19) Kudo, T. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **12** : 995-1004, 2003.
- 20) Iguchi, F. et al. : *Acta Otolaryngol. Suppl.*, (551) : 43-47, 2004.
- 21) Iizuka, T. et al. : *Hum. Gene Ther.*, **19** : 384-390, 2008.

* * *

Please cite this article in press as: Minekawa A, et al., Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission, *Neuroscience* (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.043

Neuroscience xx (2009) xxx

COCHLEAR OUTER HAIR CELLS IN A DOMINANT-NEGATIVE CONNEXIN26 MUTANT MOUSE PRESERVE NON-LINEAR CAPACITANCE IN SPITE OF IMPAIRED DISTORTION PRODUCT OTOACOUSTIC EMISSION

A. MINEKAWA,^a T. ABE,^b A. INOSHITA,^a T. IIZUKA,^a S. KAKEHATA,^b Y. NARUI,^a T. KOIKE,^c K. KAMIYA,^a HI.-O. OKAMURA,^c HI. SHINKAWA^b AND K. IKEDA^{a*}

^aDepartment of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

^bDepartment of Otorhinolaryngology, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan

^cDepartment of Mechanical Engineering and Intelligent Systems, The University of Electro-Communications, Tokyo, Japan

Abstract—Mutations in the connexin26 gene (*GJB2*) are the most common genetic cause of congenital bilateral non-syndromic sensorineural hearing loss. Transgenic mice were established carrying human *Cx26* with the R75W mutation that was identified in a deaf family with autosomal dominant negative inheritance [Kudo T et al. (2003) *Hum Mol Genet* 12:995–1004]. A dominant-negative *Gjb2* R75W transgenic mouse model shows incomplete development of the cochlear supporting cells, resulting in profound deafness from birth [Inoshita A et al. (2008) *Neuroscience* 156:1039–1047]. The *Cx26* defect in the *Gjb2* R75W transgenic mouse is restricted to the supporting cells; it is unclear why the auditory response is severely disturbed in spite of the presence of outer hair cells (OHCs). The present study was designed to evaluate developmental changes in the *in vivo* and *in vitro* function of the OHC, and the fine structure of the OHC and adjacent supporting cells in the R75W transgenic mouse. No detectable distortion product otoacoustic emissions were observed at any frequencies in R75W transgenic mice throughout development. A characteristic phenotype observed in these mice was the absence of the tunnel of Corti, Nuel's space, and spaces surrounding the OHC; the OHC were compressed and squeezed by the surrounding supporting cells. On the other hand, the OHC developed normally. Structural features of the lateral wall, such as the membrane-bound subsurface cisterna beneath the plasma membrane, were intact. Prestin, the voltage-dependent motor protein, was observed by immunohistochemistry in the OHC basolateral membranes of both transgenic and non-transgenic mice. No significant differences in electromotility of isolated OHCs during development was observed between transgenic and control mice. The present study indicates that normal development of the supporting cells is indispensable for proper cellular function of the OHC. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: hereditary deafness, connexin26, *Gjb2*, outer hair cell, prestin, electromotility.

*Corresponding author. Tel: +81-3-5802-1229; fax: +81-3-5840-7103. E-mail address: ike@juntendo.ac.jp (K. Ikeda).

Abbreviations: C_m , membrane capacitance; C_v , nonlinear capacitance; *Cx26*, connexin26; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DPOAE, distortion product otoacoustic emission; *GJB2*, connexin26 gene; OHC, outer hair cell; P, postnatal day; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde.

0306-4522/09/\$ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.043

The organ of Corti in mammals is a complex three-dimensional structure containing both sensory and supporting cells sitting on the basilar membrane. The supporting cells, including the pillar cells and Deiter's cells, form a rigid scaffold adjacent to and surrounding the outer hair cell (OHC) and confer essential mechanical properties for efficient transmission of stimulus-induced motion of the hair cells between the reticular lamina and the basilar membrane. Although development of pillar cells and the formation of a normal tunnel of Corti are required for normal hearing (Colvin et al., 1996), the physiological function of the supporting cells in postnatal development remains unclear.

Gap junction proteins in the cochlear supporting cells are believed to allow rapid removal of K^+ away from the base of hair cells, resulting in recycling back to the endolymph (Kikuchi et al., 1995). In addition to these effects on K^+ , gap junction proteins act to mediate Ca^{2+} and anions such as inositol 1,4,5-trisphosphate, ATP, and cAMP as cell-signaling, nutrient, and energy molecules (Beltramello et al., 2005; Zhao et al., 2005; Piazza et al., 2007; Gossman and Zhao, 2008). In the developing postnatal cochlea, Tritsch et al. (2007) further found that within a transient structure known as Kolliker's organ, ATP can bind to P2X receptors on the inner hair cells, thus causing depolarization and Ca^{2+} influx, while also mimicking the effect of sound.

In the organ of Corti, most gap junctions are assembled from connexin (Cx) protein subunits, predominantly connexin 26 (*Cx26*, *Gjb2* gene) and co-localized *Cx30* (Forge et al., 2003; Zhao and Yu, 2006). Mouse models have confirmed that *Cx26* encoded by *Gjb2* is essential for cochlear function (Cohen-Salmon et al., 2002; Kudo et al., 2003). A dominant-negative *Gjb2* R75W transgenic mouse model shows incomplete development of the cochlear supporting cells, resulting in profound deafness from birth (Inoshita et al., 2008). Characteristic ultrastructural changes observed in the developing supporting cells of the *Gjb2* R75W transgenic mouse model include (i) the absence of the tunnel of Corti, Nuel's space, or spaces surrounding the OHCs; and (ii) reduced numbers of microtubules in the pillar cells. On the other hand, the development of the OHCs, at least from postnatal day 5 (P5) to P12 was not affected. The *Cx26* defect in the *Gjb2* transgenic mouse is restricted to the supporting cells; it is thus difficult to explain why the auditory response is extensively disturbed despite the presence of the OHCs.

The present study was designed to evaluate developmental changes in the *in vivo* and *in vitro* function of the OHC together with the ultrastructure of the OHC and its adjacent

supporting cells in the R75W transgenic mouse, to provide a better understanding of the functional properties of the supporting cells, and to gain new insights into the molecular and physiological mechanisms of *Gjb2*-based deafness.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and anesthesia

All mice used for this study were obtained from a breeding colony of R75W transgenic mice (Kudo et al., 2003) and maintained at the Institute for Animal Reproduction (Ibaraki, Japan). R75W transgenic mice were maintained on a mixed C57BL/6 background and intercrossed to generate R75W transgenic animals. The animals were genotyped using DNA obtained from tail clips and amplified with the Tissue PCR Kit (Sigma, Saint Louis, MO, USA). The animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Ohara Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and xylazine (10 mg/kg) in all experiments. All experiment protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Juntendo University School of Medicine, and were conducted in accordance with the US National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Distortion product otoacoustic emission

All electrophysiology was performed within an acoustically and electrically insulated and grounded test room. Distortion product otoacoustic emission (DPOAE) responses at $2f_1-f_2$ were measured through the meatus using a measuring system (model ER-10B; Etymotic Research Inc., Elk Grove Village, IL, USA) with a probe developed for immature mice according to a previous paper (Narui et al., 2009). DPOAE stimuli were administered at two primary frequencies, f_1 and f_2 , such that $f_1 < f_2$. DPOAE input/output functions at $f_2 = 12, 30,$ and 45 kHz with $f_2/f_1 = 1.2$ were constructed. At each frequency pair, primary levels L1 (level of f_1 tone) and L2 (level of f_2 tone) were increased incrementally by 5 dB steps from 30 to 80 dB ($f_2 = 12$ kHz and 30 kHz), and 30 to 70 dB ($f_2 = 45$ kHz) with $L_1 = L_2$. The DPOAE threshold level was defined as the dB level at which the $2f_1-f_2$ distortion product was more than 10 dB above the noise level.

Non-linear capacitance

OHCs were obtained from acutely dissected organs of Corti from both transgenic and non-transgenic mice according to a previous report (Abe et al., 2007). Briefly, cochleae were dissected, and the organs of Corti were separated from the modiolus and stria vascularis. The organs were then digested with trypsin (1 mg/ml) in external solution (100 mM NaCl, 20 mM tetraethylammonium, 20 mM CsCl, 2 mM CoCl₂, 1.52 mM MgCl₂, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid and 5 mM dextrose (pH 7.2), 300 mosmol/L, in order to block ionic conductance) for 10–12 min at room temperature and transferred into 35 mm plastic dishes (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) with 2 ml external solution. OHCs were isolated by gentle trituration. The dish was mounted on an inverted microscope (IX71; Olympus, Tokyo, Japan).

The patch pipette solution contained 140 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM ethyleneglycoltetraacetic acid, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (pH 7.2), 300 mosmol/L (adjusted with dextrose).

The cells were whole-cell voltage-clamped with an Axon (Burlingame, CA, USA) 200 B amplifier using patch pipettes having initial resistances of 3–5 MΩ. Series resistances, which ranged 5–20 MΩ, remained uncompensated for membrane capacitance (C_m) measurements, though corrections for series resistance voltage errors were made offline.

Data acquisition and analysis were performed using the Windows-based patch-clamp program jClamp (SciSoft, New Haven, CT, USA).

The C_m functions were obtained 1 min after establishment of the whole-cell configuration. C_m was assessed using a continuous high-resolution (2.56 ms sampling) two-sine voltage stimulus protocol (10 mV peak at both 390.6 and 781.2 Hz) superimposed onto a voltage ramp (200 ms duration) from -150 to $+150$ mV (Santos-Sacchi et al., 1998; Santos-Sacchi, 2004). The capacitance data were fit to the first derivative of a two-state Boltzmann function (Santos-Sacchi, 1991).

$$C_m = Q_{\max} \frac{ze}{kT} \frac{b}{(1+b)^2} + C_{lin}$$

$$b = \exp\left(\frac{-ze(V_m - V_{pkcm})}{kT}\right)$$

where Q_{\max} is the maximum nonlinear charge moved, V_{pkcm} is voltage at peak capacitance or half-maximum charge transfer, V_m is membrane potential, z is valence, C_{lin} is linear membrane capacitance, e is electron charge, k is Boltzmann's constant, and T is absolute temperature. For analyses, we quantified C_v , peak, an estimate of maximum voltage-dependent, nonlinear capacitance, as the absolute peak capacitance minus linear capacitance.

Histology

The mice were perfused with 4.0% paraformaldehyde (PFA) and 2.0% glutaraldehyde (pH 7.4) in 0.1 M phosphate buffer (PB). The inner ears were dissected and immersed in fixative overnight at room temperature. Decalcification was completed by immersion in 0.12 M ethylenediaminetetraacetic acid with gentle stirring at room temperature for a day. The cochleae were flushed again with buffer prior to perfusion with a warm solution of 10% gelatin. They were chilled on ice, thus allowing the gelatin to solidify, and then cut in half under a dissecting microscope. The half cochleae were rinsed (four times for 1 min each) with warm PB (40 °C) to remove residual gelatin. The specimens were post-fixed 1.5 h in 2.0% OsO₄ in 0.1 M PB, then dehydrated through graded ethanols and embedded in Epon. Semithin sections (1 μm) were stained with Toluidine Blue for light microscopy. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by electron microscopy (HITACHI H7100, Japan).

Immunohistochemistry

The cochleae were removed after cardiac perfusion with 4% PFA (pH 7.4), placed in the same fixative at room temperature for 1 h, decalcified with 0.12 M ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.0) at 4 °C overnight. The specimens were dehydrated through graded concentrations of alcohol, embedded in paraffin blocks and sectioned into 5 μm thick slices. The sections were washed in several changes of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2), blocked with 2% bovine serum albumin in 0.01 M PBS for 30 min, and then were incubated for 1 h at room temperature with goat polyclonal antibodies to Prestin (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (Kitsunai et al., 2007) diluted in 0.01 M PBS + 1% bovine serum albumin. The following day, the tissues were rinsed with 0.01 M PBS, incubated for 1 h at room temperature with a Alexa-Fluor-594 conjugated donkey anti-goat (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), rinsed with 0.01 M PBS, and then mounted in Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Labeling was viewed using a confocal laser scanning microscope (LSM510 META, Carl Zeiss, Esslingen, Germany), and each image was analyzed and saved using the Zeiss LSM image Browser (Carl Zeiss).

Statistical analysis

Data were expressed as mean±SEM. Input/output function data of the amplitudes were analyzed via a non-repeated measures analysis of variance (ANOVA). The significance of DPOAE amplitudes was analyzed further by post hoc multiple comparison tests using the Bonferroni procedure. The statistical difference of DPOAE threshold was determined by a two-sided Mann-Whitney's *U*-test. *P*<0.05 was accepted as the level of significance.

RESULTS

Distortion product otoacoustic emission

DPOAE responses were examined during postnatal development. Non-transgenic mice started to show a measurable response of DPOAE from P12–14 followed by gradual increase of amplitude (Fig. 1A, B, C). Significant differ-

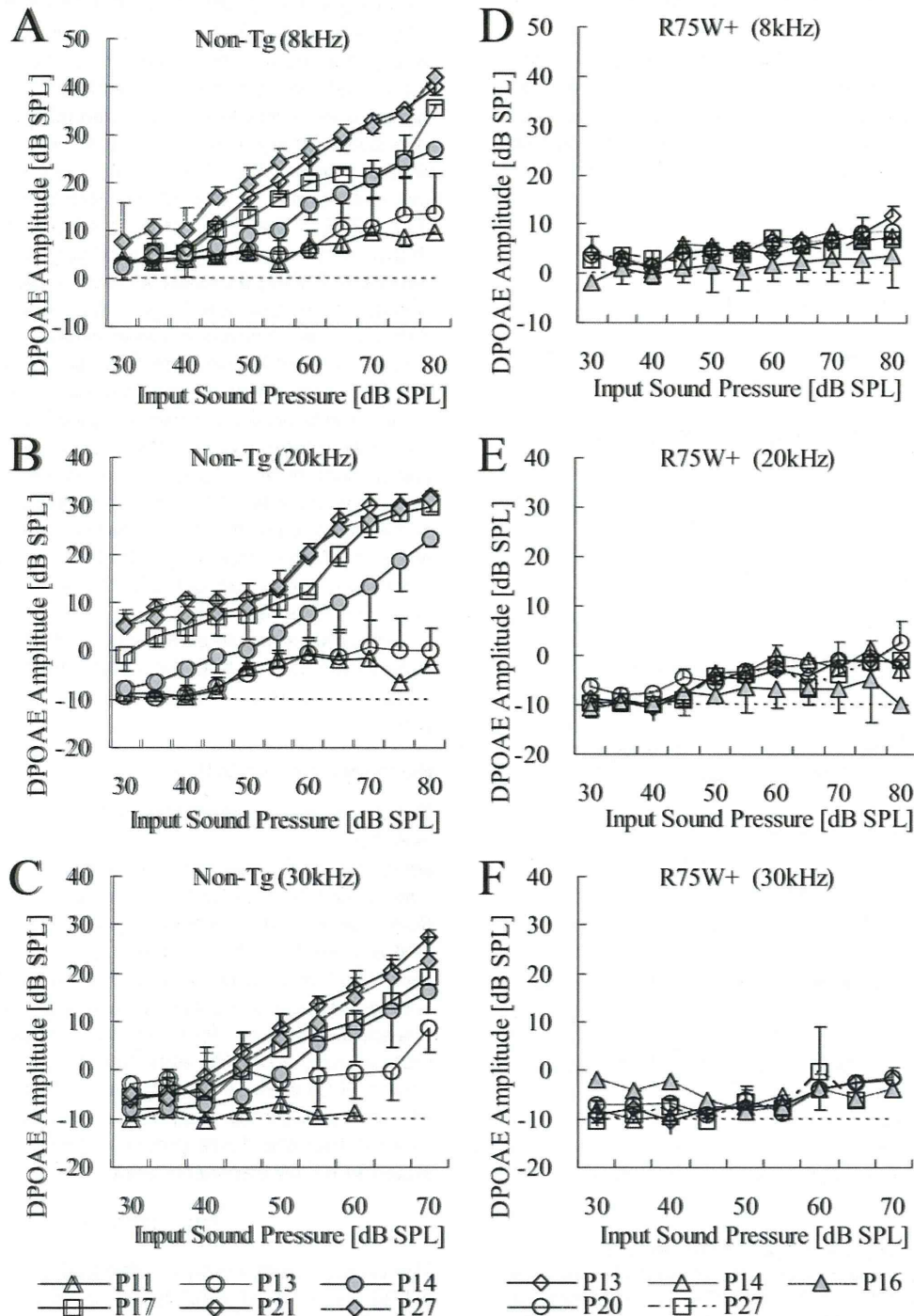


Fig. 1. Input/output function of the amplitudes of non-transgenic (A, B, C) and R75W transgenic (D, E, F) mice at 8 kHz, 20 kHz and 30 kHz frequencies (2f1–f2) from P11 to P27. DPOAE data were plotted as mean±SEM. The dotted line is the noise level. Non-Tg: non-transgenic mice, R75W+: R75W transgenic mice.

Please cite this article in press as: Minekawa A, et al., Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission, *Neuroscience* (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.043

ences of the DPOAE amplitudes of the non-transgenic mice in comparison to noise levels appeared at P12–14 for the different stimuli tested. In contrast, there were no statistically significant differences between noise level and DPOAE amplitudes at 8 kHz, 20 kHz, and 30 kHz throughout postnatal development in the R75W transgenic mice. Furthermore, no DPOAE was detected at any frequencies in R75W transgenic mice throughout postnatal development (Fig. 1D, E, F).

The mean DPOAE thresholds of non-transgenic mice were abruptly reduced around P13–P14 to reach the adult level by P16. In contrast, the mean DPOAE thresholds of R75W transgenic mice stayed at high level throughout postnatal development (Fig. 2).

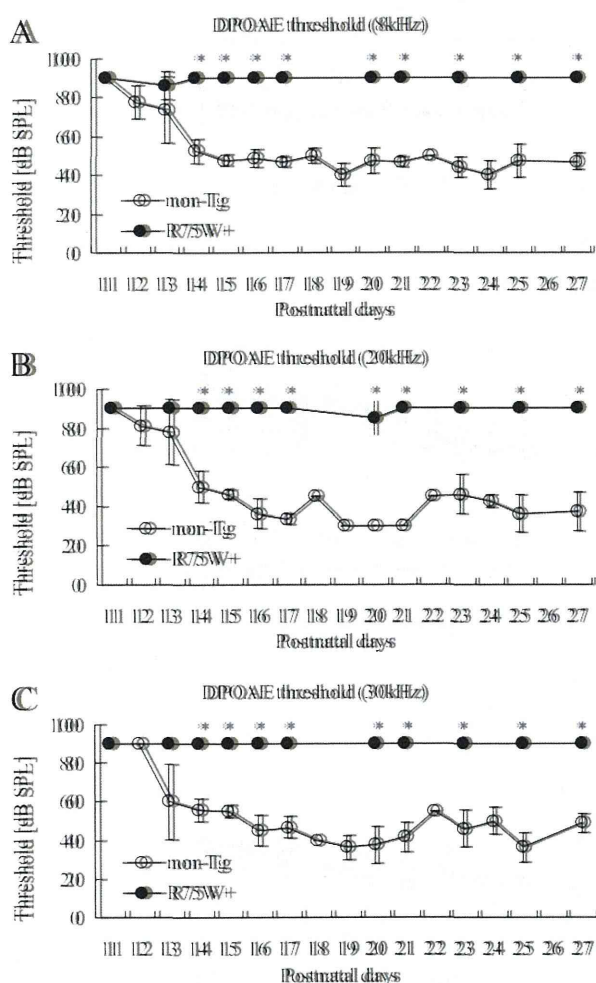


Fig. 2. DPOAE thresholds at 8 kHz (A), 20 kHz (B), and 30 kHz (C) frequencies of non-transgenic mice (open circle) and R75W transgenic mice (filled circle) from P11 to P27. The DPOAE threshold level was defined as the dB level at which the 2f1–f2 distortion product was more than 10 dB above the noise level. In the case of no DPOAE, the threshold level was defined as 90 dB. *: Significant difference between non-transgenic and transgenic mice ($P < 0.05$). Non-Tg: non-transgenic mice; R75W+: R75W transgenic mice.

Histology and immunohistochemistry

The cytoarchitecture of the organ of Corti of the R75W transgenic mouse was remarkably different from that of the non-transgenic mouse (Fig. 3A, B). Transverse sections of the organ of Corti in R75W transgenic mouse revealed compression and squeezing of the OHC by the surrounding supporting cells, and Nuel's space around each OHC was occupied by Deiter's cells (Fig. 3B). Structural changes in the OHCs and adjacent cells are likely to restrict the electrically-induced motility of the OHC. The mesothelial cells associated with the basilar membrane in the transgenic mouse were cuboidal and more densely packed in contrast to a flattened layer in the control mouse. However, the ultrastructure of the OHCs in the non-transgenic mouse was comparable to that of the R75W transgenic mouse (Fig. 3C, D). The OHC of both mice showed consistent characteristic features; (i) a relatively high proportion of cytoplasm having a basally located nucleus, (ii) a smooth plasma membrane lined by a thick layer of subsurface cisternae, (iii) numerous mitochondria along the lateral membrane, and (iv) no vacuole formation in the cytoplasm and no condensation of chromatin in the nucleus.

Immunofluorescence microscopy of cross-cochlear sections was used to examine the distribution of prestin in the apical turns of the cochlea of non-transgenic and R75W transgenic mice at P12. Prestin labeling was clearly visible on the whole OHC basolateral wall in both the control (Fig. 4A) and R75W+ mice (Fig. 4B) at P12. On the other hand, the nucleus and the cuticular plate of both mice were devoid of immunostaining.

These ultrastructural and immunohistochemical results support the notion that the OHC are equipped with the morphological and molecular bases to produce electromotility.

Electromotility of OHCs

The signature electrical response of an adult OHC is a bell-shaped, voltage-dependent capacitance, which represents the conformational fluctuations of the motor molecule. In wild-type of C57BL/6J mice, C_v increased rapidly during development, saturating at P18 (Abe et al., 2007). OHCs from both R75W transgenic and non-transgenic mice showed somatic shape change in response to the voltage change (data not shown) and showed a typical bell-shaped voltage dependence (Fig. 5A). C_v increased progressively from P9 and saturated at P24. The time course of C_v in R75W transgenic and non-transgenic mice showed no significant difference (Fig. 5B). These results indicate that the development of OHC motility is not affected in R75W transgenic mice.

DISCUSSION

The present study demonstrated that a dominant-negative R75W mutation of *Gjb2* failed to generate a detectable DPOAE from birth in spite of the presence of OHCs and apparently normal electromotility. The DPOAE depends on two factors, an intact OHC system (Long and Tubis, 1988; Brown et al., 1989) and a positive endocochlear potential

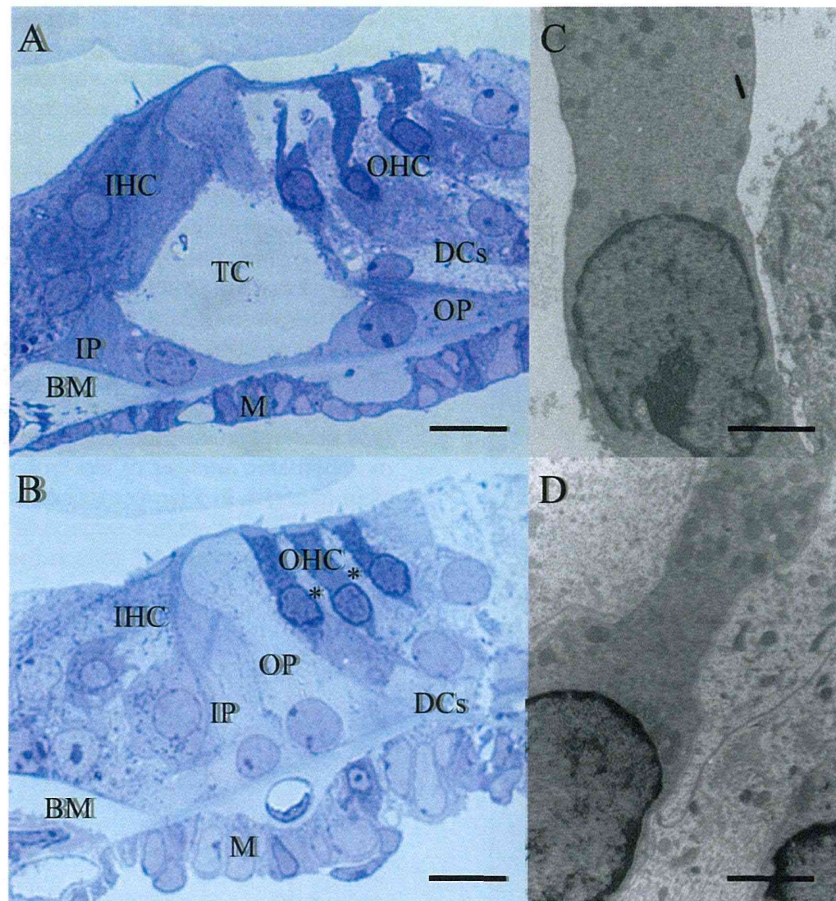


Fig. 33. Histology and transmission electron micrographs of non-transgenic (A, C) and R75W transgenic (B, D) mice. At P12, tunnel of Corti is detected in non-transgenic mice (A), but not (asterisk) in R75W transgenic mice (B). Nuell's space is formed in non-transgenic mice (A, C), but not in R75W transgenic mice (B, D). OHCs are detected in both non-transgenic (A) and R75W transgenic mice, but are squeezed by the surrounding Deiter's in R75W transgenic mice (B). The OHCs showed normal development, with preserved fine structure of the lateral wall, membrane-bound subsurface cisterna beneath the plasma membrane, and enriched mitochondria in both the non-transgenic (C) and R75W transgenic mice (D). Scale bars are 10 μm (A, B) and 2 μm (C, D). Abbreviations used: TC, tunnel of Corti; IP, inner pillar cell; OP, outer pillar cell; BM, basilar membrane; M, mesothelial cell.

(Brownell, 1990). The R75W transgenic mice have a normal endocochlear potential (Kudo et al., 2003). Furthermore, the OHC develops normally with apparently intact fine structure of the lateral wall, including normal membrane-bound subsurface cisterna beneath the plasma membrane. The characteristic phenotype observed in the R75W transgenic mice was the absence of the tunnel of Corti, Nuell's space, and spaces surrounding the OHC, related to abnormal development of the supporting cells.

The mammalian cochlea uses a unique mechanism for amplification of sound signals. Cochlear amplification is thought to originate from (1) somatic motility based on the cochlear motor prestin and (2) hair cell bundle motor related to mechano-electrical channel (Robles and Ruggero, 2002). Distortion and cochlear amplification are believed to stem from a common mechanism. A recent study (Verpy et al., 2008) postulated that the main source of cochlear waveform distortions is a deflection-dependent hair bundle stiffness derived from stereocilin associated with the horizontal top connectors. However, the relationship between stereocilin and prestin is still unclear.

Somatic electromotility of the OHC is a voltage-dependent rapid alteration of OHC length and stiffness. The electromotility of the OHC is thought to amplify the motion of the basilar membrane at low sound pressure levels and compress it at high levels (Patuzzi et al., 1989; Ruggero and Rich, 1991; Kossl and Russell, 1992). Prestin, which resides in the basolateral membrane of the cochlear OHC (Yu et al., 2006), acts as a voltage-dependent motor protein responsible for OHC electromotility (Belyantseva et al., 2000; Zheng et al., 2000; Liberman et al., 2002). The present study demonstrated that the voltage-dependent, nonlinear capacitance representing the conformational fluctuations of the motor molecule progressively increased from P10 to P18 in *Gjb2* R75W transgenic mice. The developmental changes in the OHC electromotility observed in the *Gjb2* R75W transgenic mice resemble those of both the C57BL/6J mouse in a previous study (Abe et al., 2007) and the littermate non-transgenic mice in the present study.

At least three factors that could explain the discrepancy between the DPOAE and the OHC electromotility