

移植幹細胞の生体イメージングに成功

遠赤色蛍光HcRedにより可能となった内耳のIn vivo イメージング

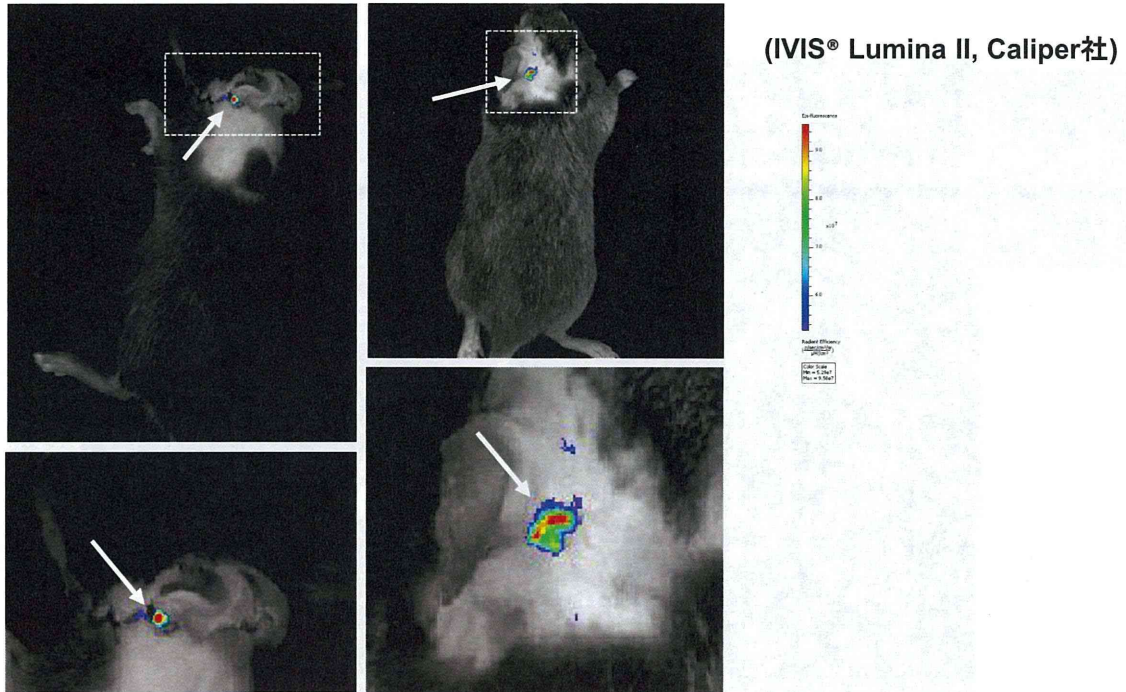


図 18. HcRed 標識—骨髄間葉系幹細胞により内耳移植幹細胞の生体内での可視化が可能となった。移植 4 日後、細胞治療を行った左内耳付近のみに HcRed の強いシグナルが観察された (矢印)

iPS由来細胞・間葉系幹細胞・Cx26搭載アデノ随伴ウイルスによる複合治療

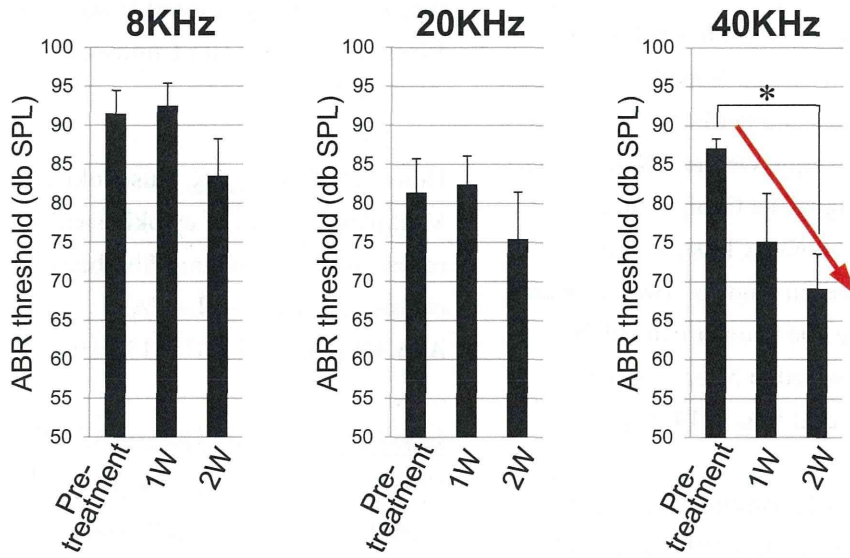


図 19. iPS 由来細胞・間葉系幹細胞・Cx26 搭載アデノ随伴ウイルスによる複合治療
処置後 2 週間の高音域 (40KHz) において有意に聴力が改善した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kazusaku Kamiya, Vincent Michel, Fabrice Giraudet, Brigitte Riederer, Isabelle Foucher, Samantha Papal, Isabelle Perfettini, Sebastien Le Gal, Elisabeth Verpy, Weiliang Xia, Ursula Seidler, Maria-Magdalena Georgescu, Paul Avan, Aziz El-Amraouia, Christine Petit
An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to outer hair cell hair bundle defects unveiled in Nherfl^{-/-} mice
Proc Natl Acad Sci U S A. 2014, in press

Kazusaku Kamiya (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
2014;124(4):1598–1607.
(日経産業新聞、時事通信、ウォールストリートジャーナル他、2014年3月4日)

Ayako Inoshita, Keiko Karasawa, Megumi Funakubo, Asuka Miwa, Katsuhisa Ikeda,
Kazusaku Kamiya (corresponding author)
Dominant negative connexin26 mutation R75W causing severe hearing loss influences normal programmed cell death in postnatal organ of Corti
BMC genetics 2014, 15(1):1-8

Nomura N, **Kamiya K**, 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.
2013;441(3):544-9

Homma H, **Kamiya K**, Kusunoki T, Ikeda K.
Multiplex analyses of cytokine and chemokine release from the cultured fibroblast of nasal polyps: the effect of IL-17A.
Acta Otolaryngol. 2013, 133(10):1065-72.

神谷和作 遺伝性難聴への内耳細胞治療法開発: 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
日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) (2013)
141(4):191-4

Gianluca Esposito, Sachine Yoshida, Ryuko Ohnishi, Yousuke Tsuneoka, Maria del Carmen Rostagno, Susumu Yokota, Shota Okabe,
Kazusaku Kamiya, Mikio Hoshino, Masaki Shimizu, Paola Venuti, Takefumi Kikusui, Tadafumi Kato, Kumi O. Kuroda
Infant Calming Responses During Maternal Carrying In Humans and Mice
Current Biology (2013)23(9):739-45

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(4):655-9

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 2011
69(12):2215-2219

Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kamiya K,
Kawano A, Suzuki M, Hattori N, Ikeda K.

Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2011
Feb;75(2):211-4.

Prevalence of GJB2 causing recessive profound
non-syndromic deafness in Japanese children.

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. 2011 Feb;92(1):66-71.

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(2010)補 126:1-5

Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutari 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. 2010 56(3):487-94.

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 130(9):990-5

Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T,
Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K,
Okamura HO, Shinkawa H, Ikeda K,

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;164(3):1312-9

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 2010 補 126, 1-5

神谷和作 難聴に対する細胞治療法の開
発

医学のあゆみ 特集号・細胞治療 Update,
2009 Vol229, No.9, 863-867

Kazusaku KAMIYA, Cell therapy targeting
cochlear fibrocytes,

Otology Japan 2009, 19(3):214-218

Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M,
Kusunoki T, Koike T, Ikeda K, Development
of distortion product otoacoustic emissions in
C57BL/6J mice.

Int J Audiol. 2009;48(8):576-81.

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.

oninvasive 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.

Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, Okamoto Y, Kouike H, Komatsuzaki R, Kusano R, Nakagawa S, Satoh H, Fujii M, Matsunaga T. Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes. *American Journal of Pathology* 2007, 171(1):214-26

2. 学会発表

招待講演

第 22 回日本耳科学会シンポジウム 2012 年 10 月 5 日 名古屋

遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞治療法の開発

神谷和作 美野輪治 池田勝久

第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会シンポジウム 2012 年 7 月 6 日 東京

遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞治療法の開発

神谷和作 池田勝久

第 85 回日本薬理学会 シンポジウム講演 2012 年 3 月 16 日 京都

Cell therapy for hereditary hearing loss with stem cell homing factors

Kazusaku Kamiya, Miho Muraki, Kana Ogawa, Katsuhisa Ikeda

国際学会

Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Osamu Minowa, Megumi Funakubo¹, Katsuhisa Ikeda

The activation of stem cell homing factors highly induce the cochlear invasion of bone marrow mesenchymal stem cells. **Association for Research in Otolaryngology (ARO), 37th MidWinter Meeting**, 2014 年 2 月・サンディエゴ、米国

Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Takashi Anzai, Kana Harada, Kazuma Kobayashi, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda

Cell therapy for hereditary deafness with bone marrow mesenchymal stem cell and the activation of stem cell homing.

国際幹細胞学会 (ISSCR) 2013 年 9 月・フィレンツェ、イタリア

Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Takashi Anzai, Kana Harada, Kazuma Kobayashi, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda

Cell therapy for hereditary deafness with bone marrow mesenchymal stem cell and the activation of stem cell homing.

50th Inner Ear Biology Workshop 2013 年 9 月・マドリッド、スペイン

Kamiya K, Karasawa K, Osamu Minowa, Ikeda K

Connexin26 mutations that cause hereditary deafness lead to macromolecular complex degradation of cochlear gap junction plaques

Association for Research in Otolaryngology (ARO), 36th MidWinter Meeting,

2013年2月 米国 ボルチモア

Kamiya K, Muraki M, Ogawa K, IKEDA K

Cochlear Gap Junction Plaque is Disrupted by connexin26 Mutation

48th Inner Ear Biology Workshop2011

2011年9月 ポルトガル リスボン

Kamiya K, Muraki M, Ogawa K, IKEDA K

Cochlear Gap Junction Plaque is

Disrupted by connexin26 Mutation

EMBO meeting2011 2011年9月 オーストリア ウイーン

Kazusaku KAMIYA, Katsuhisa IKEDA

Cochlear Gap-Junction plaque is disrupted by dominant-negative Connexin26 mutation.

EMBO meeting, 2010年9月 バルセロナ

国内学会

神谷和作 美野輪治 池田勝久

幹細胞ホーミング分子機構を応用した効率的内耳細胞治療法の開発

第23回 日本耳科学会学術集会 2013年11月・宮崎市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 1)。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 2.)、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+ 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+ のマウスは、高度難聴であった(図 3)。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 ABR I 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ると適用すれば、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と比較すると、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。

Cx26^{ff}P0Cre mouse

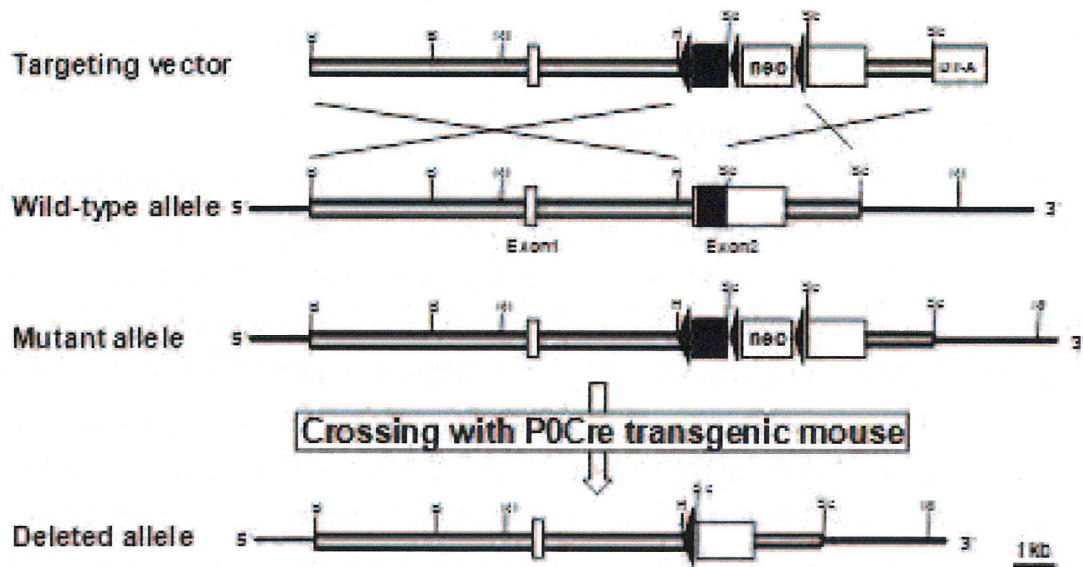


図 1. Connexin 26 遺伝子のコンディショナル・ジーンターゲティングベクター

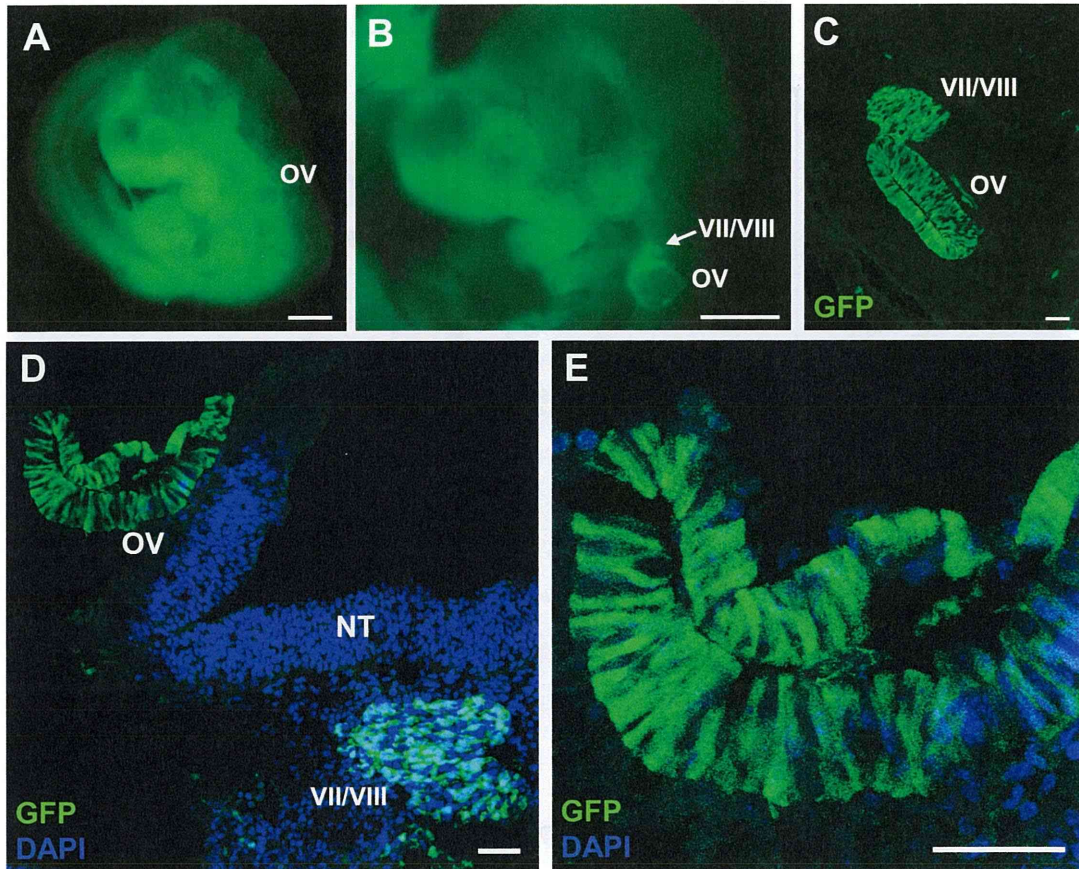


図 2 PO-Cre の耳胞での発現

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。

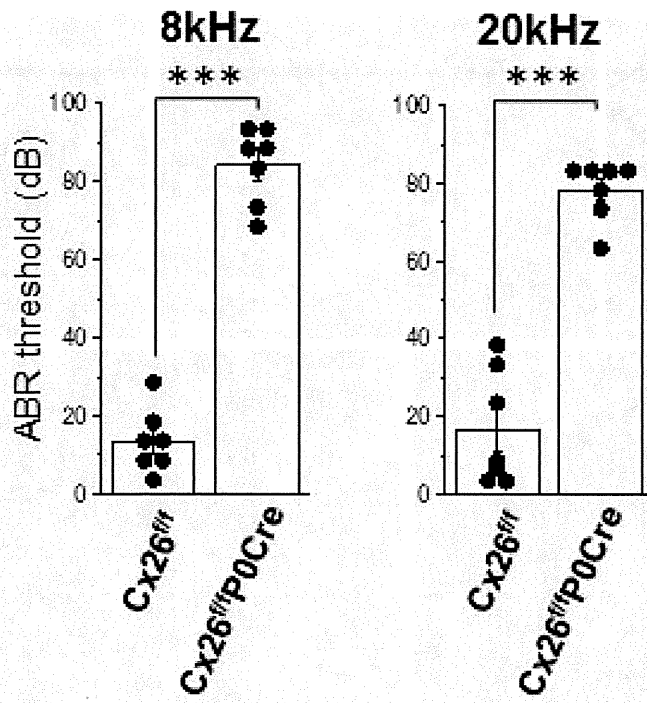


図 3. Cx26 コンディショナル・ノックアウトマウスにおける ABR 閾値

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。その中でもコネキシン 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 CO₂ チャンバーを装着し、5% CO₂、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

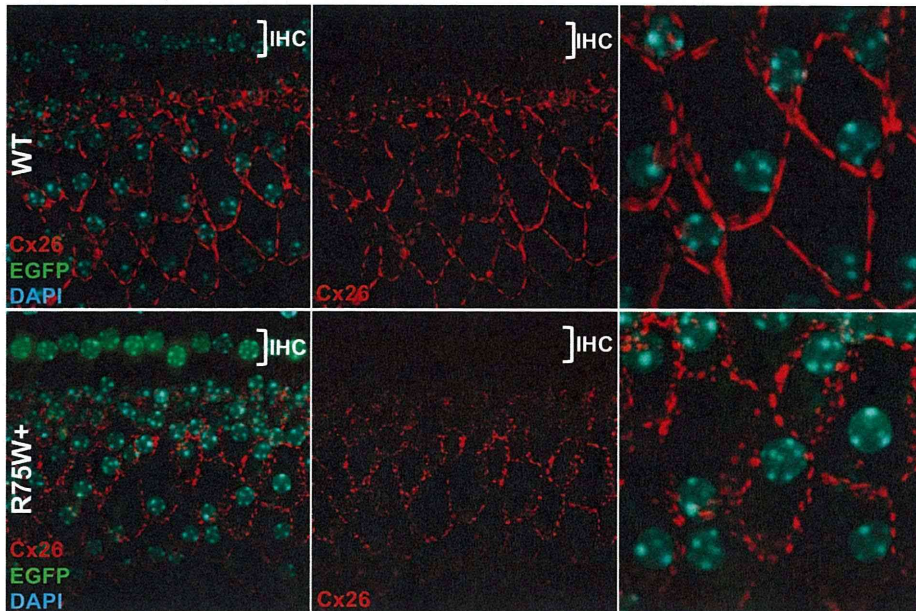


図 1. 遺伝性難聴の新たな分子病態として発見された Gap Junction Plaque の異常。野生型 (WT) において直線状に形成される Gap Junction Plaque は R75W 変異マウスの蝸牛内溝細胞では分裂し細かい円形の小プラークとして散在している。

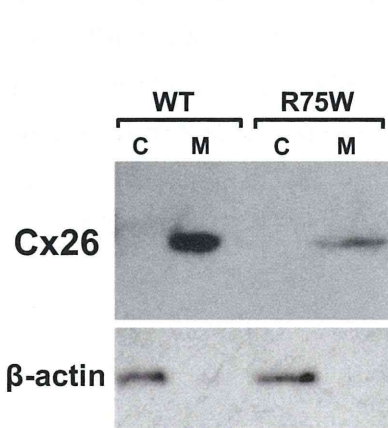


図 2. 各蝸牛組織における Cx26 の western blotting 像。両サンプルとも細胞質 (C) ではなく細胞膜 (M) に局在している。タンパク質の内在化は見られず Cx26 タンパク質は野生型と同じように細胞膜に組み込まれている。R75W で Cx26 のタンパク質量は減少していた。

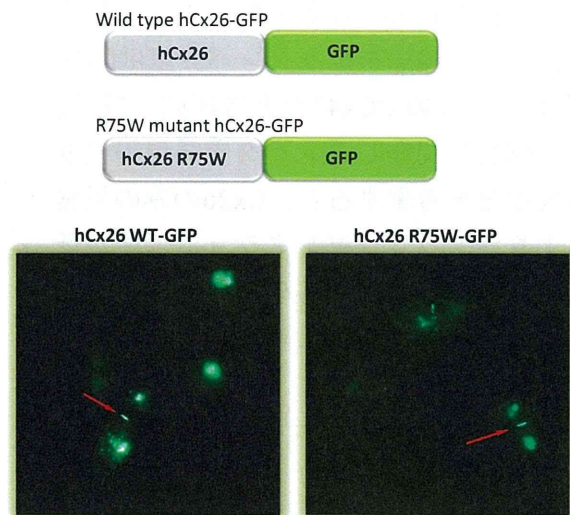


図 3. 上; 構築したプラスミドにより発現される GFP 融合タンパク質。下; HEK293 細胞に導入され、発現した Cx26 融合タンパク質。どちらも細胞間に gap junction plaque を構成することができる。

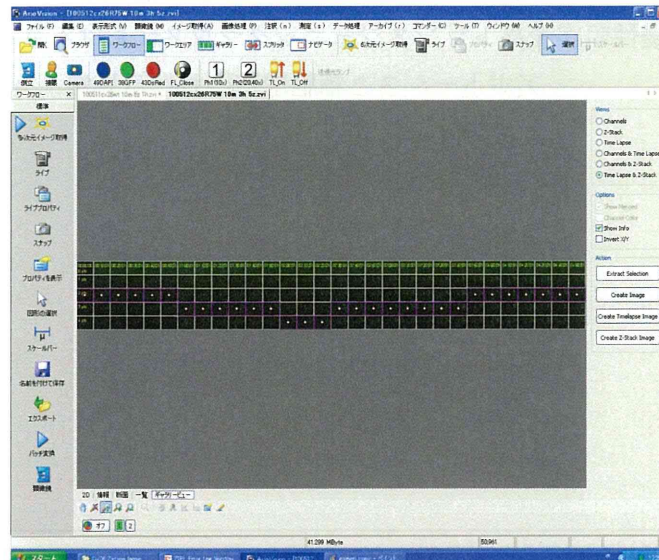


図 4. イメージの選抜。標的とする gap junction plaque (GJP) を $1\mu\text{m}$ 間隔で 5 段階の焦点深度にて撮影。これを 10 分間隔で 5 時間撮影する。縦に自動制御した Z 軸方向の画像を 5 枚、横軸を時間とし画像一覧を表示。この中から標的 GJP の焦点が合った Z 面を選択し動画を再構築。

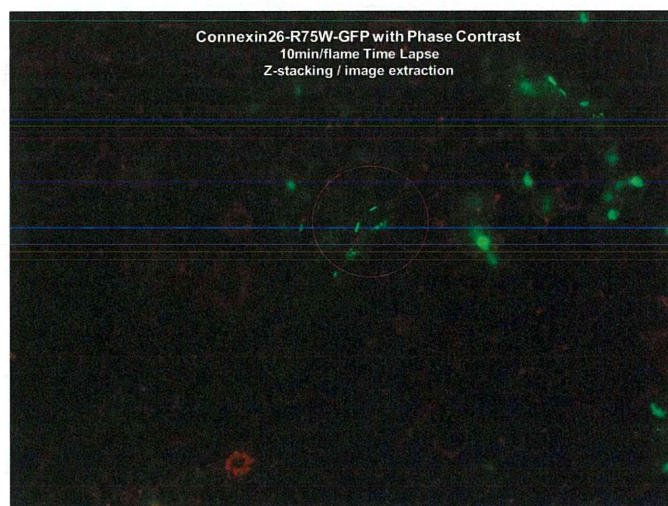


図 5. イメージング動画の構築。図 4 で構築した動画例。赤丸の部分が標的の gap junction plaque。変異体 R75W では激しく移動しブラックの不安定性が示唆された。

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。この結果は TUNEL 法を用いた生後 11 日齢のコルチ器の立体構造観察でも証明された (図 1)。

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。

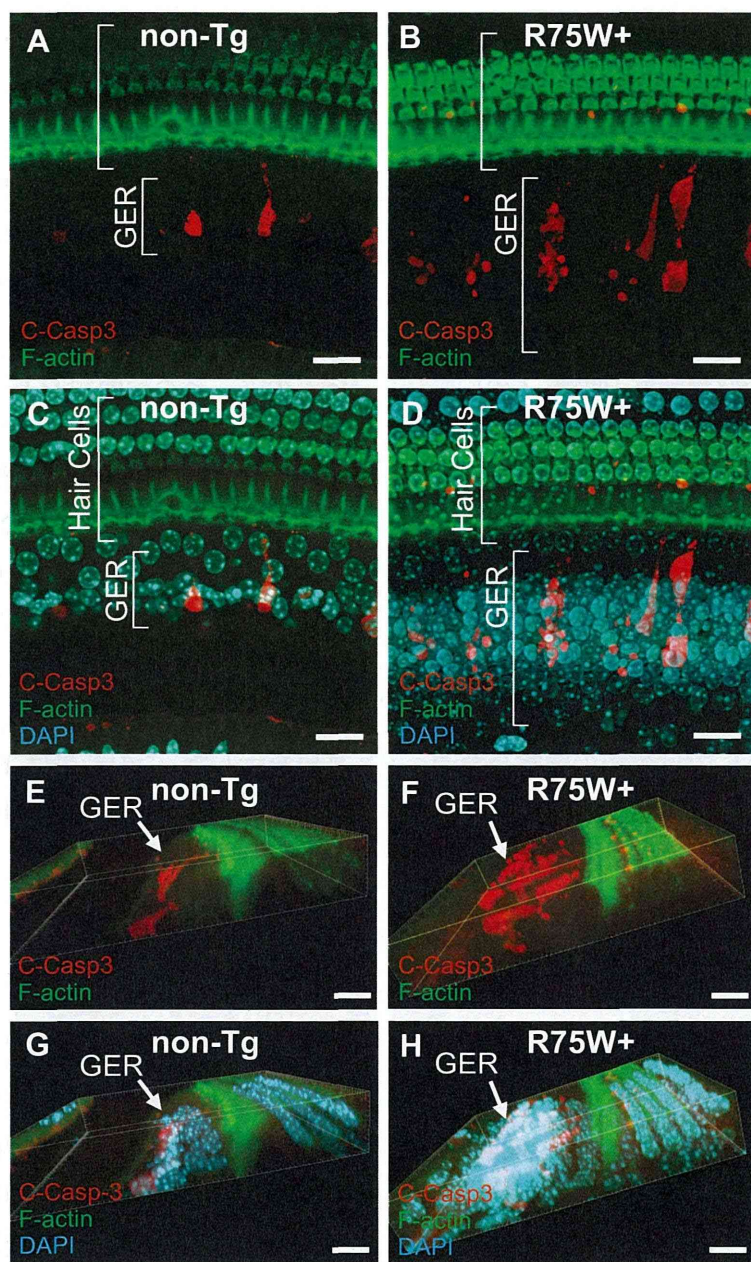


図 1. プログラム細胞死の遅延により未成熟状態を維持する Cx26 優性阻害変異 R75W+トランスジェニックマウス (R75W+) の蝸牛コルチ器 GER 領域 (生後 11 日齢)。TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出 (赤)、アクチン細胞骨格を示すファロイジン (緑)、核染色 DAPI (水色) により、non-Tg (野生型) ではすでにアポトーシスによるプログラム細胞死が終了し、成熟構造を完成させるのに対し R75W+では細胞死が遅延して起こることにより多くの残存細胞が GER 領域に残り、生後 11 日齢でも未成熟なコルチ器構造を維持している。

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