

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ーコネキシン 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ー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。

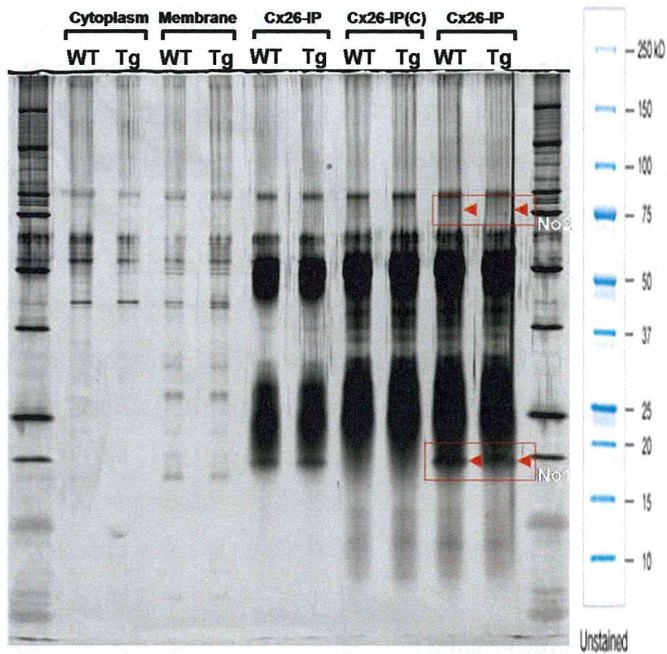
D. 考察

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ーコネキシン 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

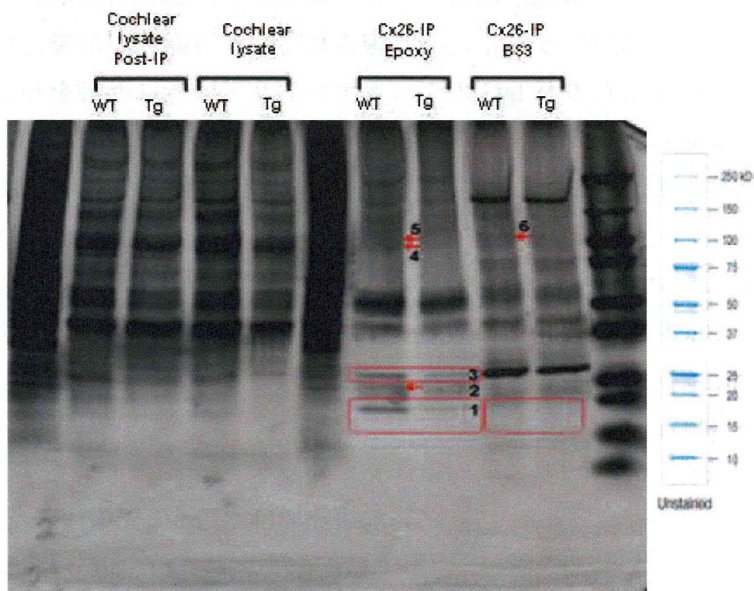
が、本来コネキシン 26 は 26kDa であるので、非特異的に結合したのか、もしくはコネキシン 26 の一部が切断された状態で存在している可能性が考えられる。この点に関してはこれまで報告がないため、より詳細な研究が必要である。また、Dynabeads®ProteinGーコネキシン 26 抗体と免疫沈降によるプロテオーム解析結果から 75kDa 付近に Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) が同定された。Mitofilin はミトコンドリアに局在する膜貫通型のタンパク質で、様々なタンパク質と結合し多量体を形成し、ミトコンドリアで行われ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ー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。



Cx26 免疫沈降反応によって得られた Gap Junction Plaque 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。



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

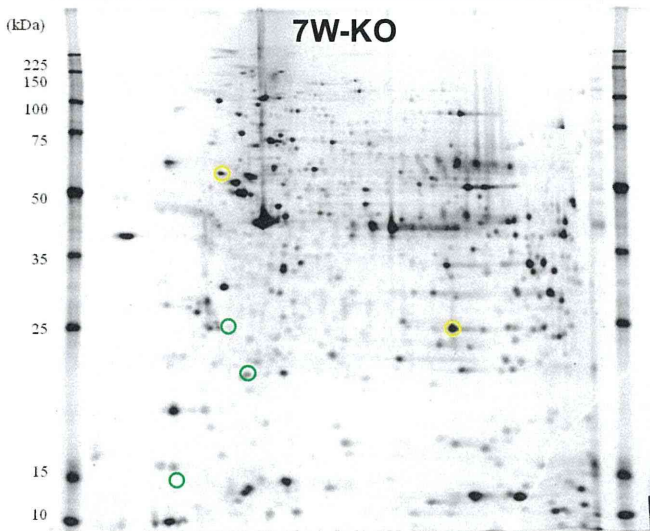
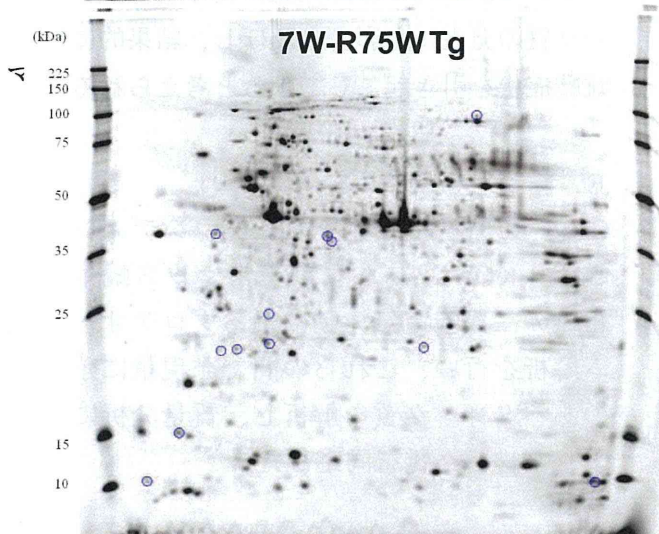
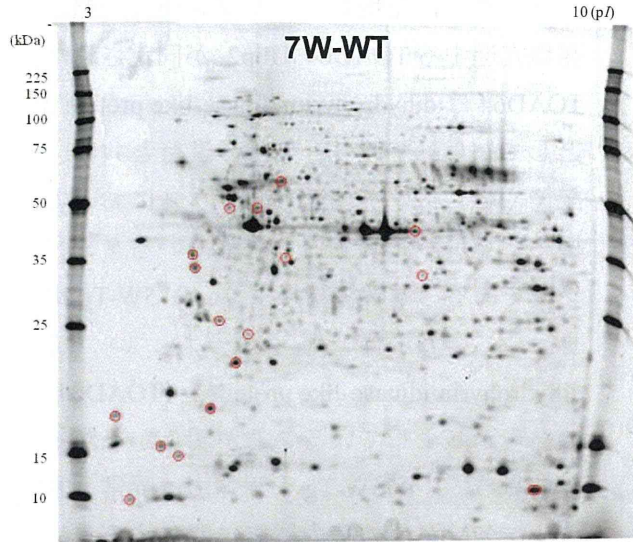
生能に影響を与え、周囲の細胞内機能が減衰している可能性が考えられる。また、海馬ニューロンに発現し、アクソン伸長の際に発現亢進する TOAD64, Ulip2 が同定された。TOAD64 は dihydropyrimidinase-like protein 2 として知られており、老化の進行と共に、記憶や聴力障害が加速したマウスにおいて極めて発現が減少するとされているタンパク質である。本解析結果より、R75W-Tg マウスの蝸牛において dihydropyrimidinase-like protein 2 (TOAD64) の発現が減少していることが明らかとなった。従って、R75W-Tg マウス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。

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。

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

我々は正円窓経由で 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キシン26を発現させることに成功した。

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、膨大部および卵形囊において、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。

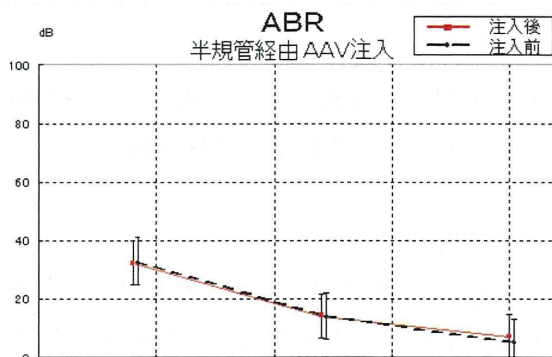
D. 考察

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。

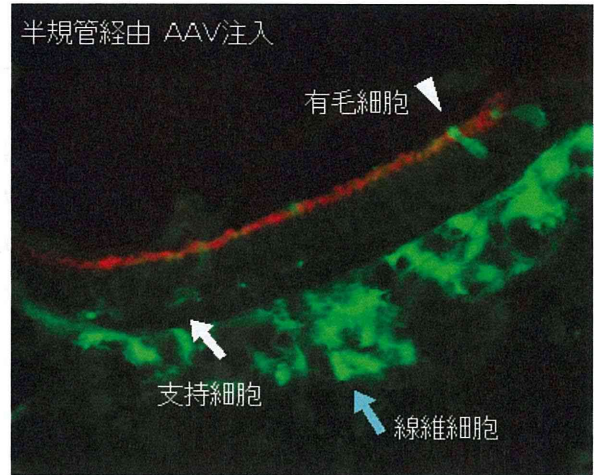
E. 結論

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。



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, 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.	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

Minekawa A, Abe T, Inoshita A, Iizuka T, Kakehata S, Narui Y, Koike T, Kamiya K, Okamura H.-O, 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	164	1312-9	2009
Kamiya K	Cell therapy targeting cochlear fibrocytes	Otology Japan	19(3)	214-218	2009
Inoshita A, Iizuka T, Okamura H.-O, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K	Postnatal development of the organ of corti in dominant-negative GJB2 transgenic mice	Neuroscience	156(4)	1039-1047	2008
Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K	Noninvasive <i>In Vivo</i> Delivery of Transgene via Adeno-Associated Virus into Supporting Cells of the Neonatal Mouse Cochlea	Human Gene Therapy	19(4)	384-390	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	171(1)	214-226	2007



Research article

Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires connexin 26

Kazusaku Kamiya,¹ Sabrina W. Yum,^{2,3} Nagomi Kurebayashi,⁴ Miho Muraki,¹ Kana Ogawa,¹ Keiko Karasawa,¹ Asuka Miwa,¹ Xueshui Guo,² Satoru Gotoh,⁵ Yoshinobu Sugitani,⁵ Hitomi Yamanaka,⁵ Shioko Ito-Kawashima,⁵ Takashi Iizuka,¹ Takashi Sakurai,⁴ Tetsuo Noda,^{5,6} Osamu Minowa,^{5,6} and Katsuhisa Ikeda¹

¹Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University Faculty of Medicine, Tokyo, Japan. ²Division of Neurology, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, USA. ³Department of Neurology, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA. ⁴Department of Cellular and Molecular Pharmacology, Juntendo University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan.

⁵Department of Cell Biology, Japanese Foundation for Cancer Research, Cancer Institute, Tokyo, Japan.

⁶Team for Advanced Development and Evaluation of Human Disease Models, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan.

Hereditary deafness affects approximately 1 in 2,000 children. Mutations in the gene encoding the cochlear gap junction protein connexin 26 (CX26) cause prelingual, nonsyndromic deafness and are responsible for as many as 50% of hereditary deafness cases in certain populations. Connexin-associated deafness is thought to be the result of defective development of auditory sensory epithelium due to connexin dysfunction. Surprisingly, CX26 deficiency is not compensated for by the closely related connexin CX30, which is abundantly expressed in the same cochlear cells. Here, using two mouse models of CX26-associated deafness, we demonstrate that disruption of the CX26-dependent gap junction plaque (GJP) is the earliest observable change during embryonic development of mice with connexin-associated deafness. Loss of CX26 resulted in a drastic reduction in the GJP area and protein level and was associated with excessive endocytosis with increased expression of caveolin 1 and caveolin 2. Furthermore, expression of deafness-associated CX26 and CX30 in cell culture resulted in visible disruption of GJPs and loss of function. Our results demonstrate that deafness-associated mutations in CX26 induce the macromolecular degradation of large gap junction complexes accompanied by an increase in caveolar structures.

Introduction

Hearing loss is the most common congenital sensory deficit (1, 2). Approximately 1 child in 1,000 is affected at birth or during early childhood by severe hearing loss, which is defined as prelingual deafness (3, 4), with about half of the cases attributable to genetic causes (5). Among the more than 100 known forms of nonsyndromic deafness with identified genetic loci, by far the most common and best characterized is the one associated with *GJB2* (OMIM 121011), the gene encoding the connexin 26 (CX26) protein (6). This gap junction protein, which assembles to form channels between cells in the cochlear supporting cells, allows the rapid removal of K⁺ away from the base of hair cells, resulting in the recycling of this ion back to the endolymph to maintain cochlear homeostasis (7). CX26 and CX30 are the two most abundantly expressed gap junction proteins in the cochlea (8) and form heteromeric and heterotypic channels in most of the cochlear gap junction plaques (GJPs) (9) as well as in *in vitro* experiments (10). In addition to their effects on K⁺, gap junction proteins mediate the movement of Ca²⁺ and anions via inositol 1,4,5-trisphosphate, as well as the cell-signaling, nutrient, and energy molecules ATP and cAMP (11).

Connexins are assembled into hexameric connexons in the endoplasmic reticulum and are trafficked to the plasma membrane. Hemichannels dock head to head with partner hexameric channels positioned on neighboring cells (12). The resulting GJP may vary from 100 nm to several micrometers in diameter and can contain up to 10,000 connexons. Newly synthesized gap junctions always merge into the outside of existing GJPs, and the older gap junctions in the central area of

the plaques are internalized in approximately 1 to 5 hours (13). Different types of connexin channels segregate into the different plaques forming both hetero- and homoconnexons (14). This dynamic process regulates gap junction assembly and disassembly in living cells.

In this study, we demonstrate that a mutation in CX26 induces the macromolecular degradation of large gap junction complexes accompanied by an increase in caveolar structures and that the assembly of this macromolecular complex requires CX26.

Results

In this study, we performed a detailed compositional analysis of cochlear GJPs using models of two major types of CX26-related hearing loss. The first model consists of a mouse that expresses human CX26 with the R75W dominant-negative mutation (CX26^{R75W+}; refs. 15–17 and Supplemental Figure 1, A and B; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI167621DS1). The other is a newly developed conditional *Cx26*-deficient mouse (*Cx26*^{f/f} *P0-Cre*) with localized gene deletion in the inner ear under the control of the protein 0 (*P0*) promoter (ref. 18 and Supplemental Figure 1C). To confirm the expression pattern of *P0* in the inner ear lineage, *P0-Cre* mice were crossed with R26R^{GFP} reporter mice, which contain GFP knocked into the *ROSA26* locus, allowing for the activation of GFP using Cre recombinase, and GFP signals were observed at the otocyst (Supplemental Figure 2). *Cx26*^{f/f} *P0-Cre* mice had severe sensorineural hearing loss (Supplemental Figure 1D), although no abnormalities were observed in other organs (data not shown). Furthermore, these mice displayed an impaired ability to propagate Ca²⁺ oscillations from cell to cell at P5 (Supplemental Figure 3), which is probably related to an impaired function of gap junctions (19, 20) and

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest.* 2014;124(4):1598–1607. doi:10.1172/JCI167621.

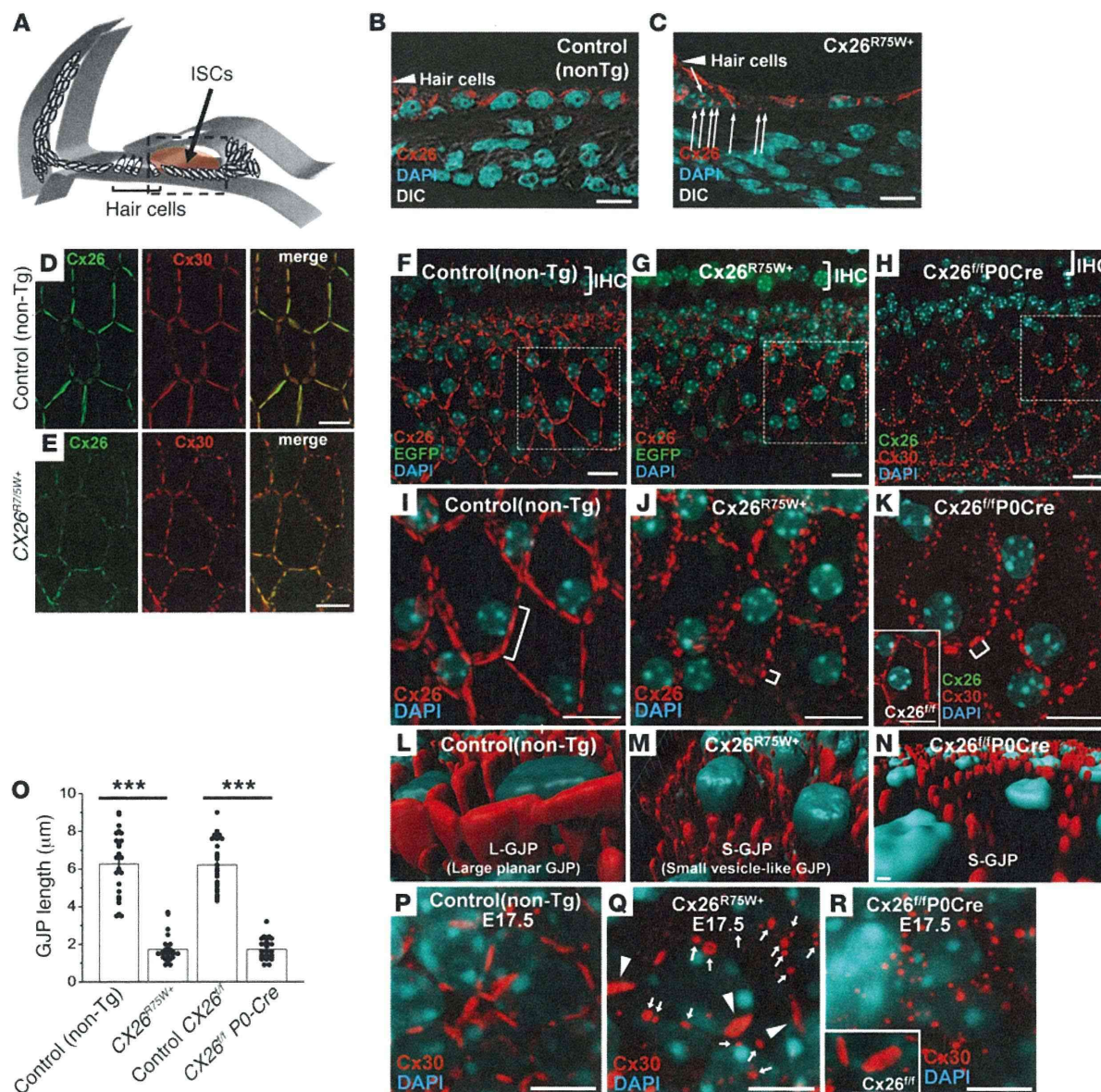


Figure 1

Drastic disruption of cochlear GJPs in two models of CX26-associated deafness. (A) Schematic illustration of cochlear ISCs. (B and C) CX26 distribution (in red) in ISCs (boxed region in A) in P12 cochlear cryosections from *CX26^{R75W+}* mice show fragmented GJPs (C, small arrows) in contrast to GJPs in control mice (B). (D and E) Double staining of CX26 and CX30 in whole-mount cochlear tissue at 3 weeks showing that these GJPs are composed of both connexins in control (D) and *CX26^{R75W+}* (E) mice. (F–H) GJP formation in 8-week-old adult cochleae from a *CX26^{R75W+}* mouse (G), a non-Tg littermate control (F), and a *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mouse (H). The partial EGFP signals in G indicate that it is a transgenic animal. (I–K) Image of each boxed region in F–H, respectively. Inset in K shows the GJPs in a *Cx26^{fl/fl}* littermate control mouse. (L–N) Three-dimensional images reconstructed from the images in I–K, respectively. (O) Lengths of the largest GJPs (brackets in I–K) along a single cell border (mean \pm SE, $n = 25$ for all four groups). $***P = 4.7 \times 10^{-14}$ and 1.2×10^{-16} for *CX26^{R75W+}* and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* cochleae, respectively, relative to controls (Student's *t* test). (P–R) At E17.5, *CX26^{R75W+}* ISCs showed a number of S-GJPs (Q, arrows), including some L-GJPs (Q, arrowheads), as observed in the non-Tg control ISCs (P). *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* ISCs (R) showed totally disrupted GJPs, although the control ISCs (*Cx26^{fl/fl}*, inset in R) showed L-GJPs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars: 10 μ m.

which occurs before the onset of hearing. We note that although the propagation range was affected, the frequency of the Ca^{2+} oscillations did not change significantly (Supplemental Figure 3 and Supplemental Videos 4–7).

In a detailed analysis with a three-dimensional graphic construction of the GJP structure in the inner sulcus cells (ISCs; Figure 1A),

WT adult mouse cochleae showed large, planar GJPs (L-GJPs; Figure 1I) at the cell border that formed orderly pentagonal or hexagonal outlines around normal ISCs (Figure 1, B, D, F, I, and L). In contrast, cochleae from *CX26^{R75W+}* (Figure 1, C, E, G, J, M, and Supplemental Video 1) and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* (Figure 1, H, K, and N) mice showed drastically fragmented, small vesicle-like GJPs (S-GJPs;



research article

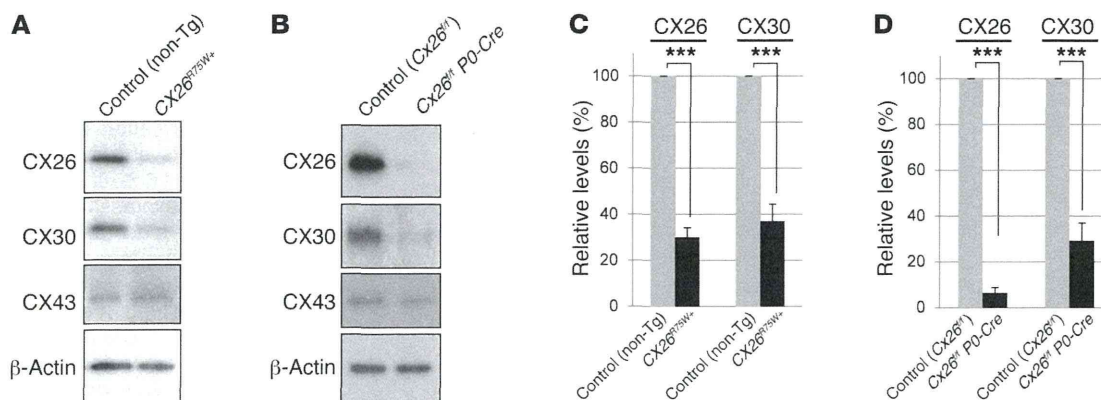


Figure 2

Changes in gap junction proteins in 8-week-old CX26-mutant mice. (A and B) Immunoblot analysis showed decreased protein expression not only for CX26, but also for CX30 in both *CX26^{R75W+}* (A) and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* (B) mice. CX43 expression in the different cochlear cells was analyzed as a control. (C and D) CX26 and CX30 protein levels were normalized to the corresponding β -actin levels and were expressed relative to the amount present in each littermate control. Values represent the mean \pm SEM (error bars; $n = 5$). $P = 7.0 \times 10^{-8}$ and 1.4×10^{-5} for CX26 and CX30, respectively, in *CX26^{R75W+}* mice; $P = 5.6 \times 10^{-11}$ and 8.7×10^{-6} for CX26 and CX30, respectively, in *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice. *** $P < 0.001$.

Figure 1, J, K, M, and N), resulting in an extremely diminished total plaque area as compared with that seen in control mice. In addition, the significant reduction in the protein levels of not only CX26 but also CX30 (Figure 2) suggested that the macromolecular complex had been degraded. The drastically dispersed plaques were observed from E17.5 (Figure 1, P–R). At the initial stage of cochlear GJP formation on E14.5, we observed that GJP disruption was already present. Two CX26-mutant mice did not show GJPs at many of the cell borders, although a part of the cells showed significantly shorter GJPs compared with the those of controls (Supplemental Figure 4). Since drastic GJP disruptions were observed even at E17.5 and the initial GJP formations were also abnormal at E14.5, which is the earliest histological change in this disease yet reported, we believe that this may be an initial phenotypic change that is followed by physiological disorder in the inner ear. As some undisrupted L-GJPs (Figure 1Q, arrowheads) were still present among the S-GJPs (Figure 1Q, arrows) in *CX26^{R75W+}* mice at E17.5, GJP disruption was thought to begin during embryonic development.

Since CX26 immunolabeling was rarely detected even in *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mouse cochlea, the numbers of CX26-positive ISCs in 5 mice were counted at the middle turn of the cochlea. Approximately 1.6% ($1.6 \pm 0.3\%$, $n = 5$) of ISCs in *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice showed CX26 expression (Figure 3A, arrows), in contrast to 100% ($100 \pm 0\%$, $n = 5$) in their littermate controls (*Cx26^{fl/fl}*, referred to herein as *Cx26^{fl/fl}*). These CX26-positive cells in *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice may have invaded the cochlea from other tissues such as bone marrow and thus did not undergo Cre recombinase regulation (21). This cellular mosaicism enabled us to analyze differences in the cochlear GJPs formed by adjacent cells with and without the expression of CX26 and, critically, revealed the CX26-dependent differences in the formation of the two GJP types (L-GJP and S-GJP). Cochlear GJPs with both CX26 and CX30 formed L-GJPs, as compared with the S-GJPs that formed without CX26 (Figure 3, A–E, Supplemental Figure 5, E and F, and Supplemental Videos 2 and 3). Even in a single cell, the GJP type at each junctional side varied depending on the connexin expression in the adjacent cells (Figure 3D, arrowheads). The cells were classified as either CX26-positive cells (CX26 in Figure 3, B and C), which expressed CX26 in at least one GJP at

the lateral cell junction site, or CX26-negative cells (KO in Figure 3, B and C). Based on this finding, we categorized the resulting GJPs as one of four types (Figure 3, F–I). It is notable that even though a cell expressed CX26, this protein was not able to assemble into a GJP when the adjacent cell did not also express CX26 (Figure 3H).

These GJP disruptions in the cochlea were also produced by human cDNA clones in HeLa cells (22, 23) that stably expressed mutant CX26 together with CX30 (Figure 4, A–E). Interestingly, these cell lines clearly showed functional differences in neurobiotin (NB) transfer analysis (Figure 4, I, J, O, and P) depending on the level of GJP disruption (Figure 4, F, G, L, and M), even when mutations at the same amino acid in CX26 were used (i.e., R75W and R75Q, which also cause hereditary deafness; ref. 24). The cells with smaller GJPs had less extensive NB dye transfer as compared with cells with larger GJPs (Figure 4, H–Q). To investigate whether supplementation with WT CX26 can rescue the GJP size in the two mutant mouse strains, we performed an overexpression experiment with adeno-associated virus (AAV) carrying WT CX26 tagged with FLAG in cochlear organ cultures from *CX26^{R75W+}* mice and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice (Supplemental Figure 6). In this context, CX26-FLAG formed mainly small ($0.93 \pm 0.14 \mu\text{m}$) vesicle-like GJPs in *CX26^{R75W+}* mouse cochleae, although it formed relatively large ($3.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$) GJPs in cochleae from *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice. Considering the original GJP size for the adult CX26-mutant mice shown in Figure 1O ($\sim 1 \mu\text{m}$ for both CX26-mutant mice and $\sim 6 \mu\text{m}$ for the control littermate), the GJP size of *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* ISCs may be rescued by supplementation with WT CX26, while some mutants such as *CX26^{R75W+}* may not be rescued due to their dominant-negative effects. These results corresponded with the functional changes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) or dye transfer analysis in HeLa cells in our previous reports (22, 23).

After extensive protein analysis with mutant cochleae (Supplemental Figure 7 and data not shown), we found that caveolin 1 (CAV1) and caveolin 2 (CAV2), components of the caveolae (which form during endocytosis), were molecules that were altered in the pathology. Interestingly, we observed a drastic isoform shift in CAV1 from CAV1 α to CAV1 β , which lacks the N-terminal

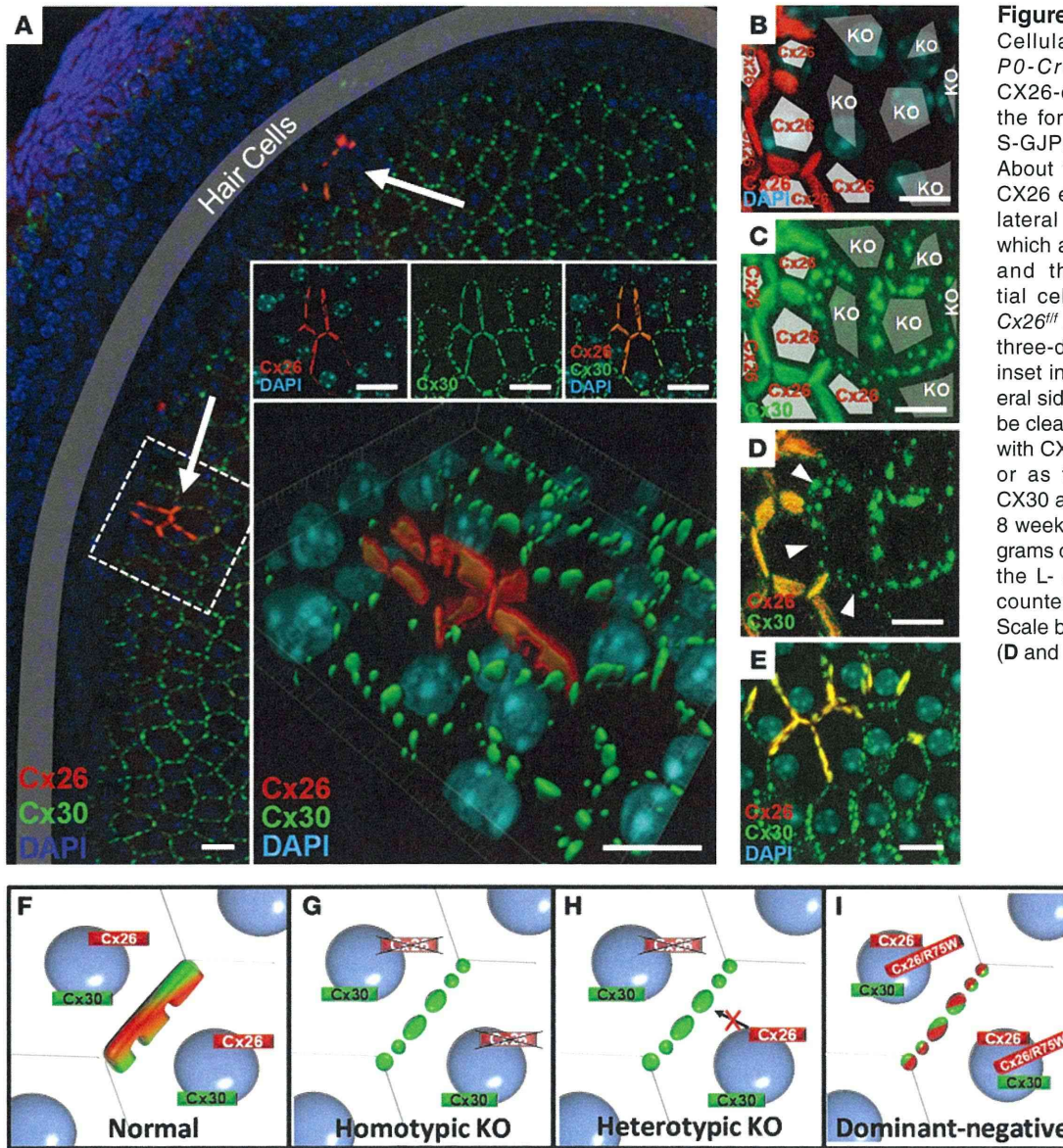


Figure 3
Cellular mosaicism in *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice revealed the CX26-dependent differences in the formation of L-GJPs versus S-GJPs shown in Figure 1. (A) About 1.6 % of the ISCs showed CX26 expression on at least one lateral side (arrows and insets, which are from the boxed region), and these cells showed partial cellular mosaicism in adult *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice. Confocal and three-dimensional images (large inset in A) revealed that each lateral side of the cell junctions could be clearly distinguished as L-GJPs with CX26 (red) and CX30 (green) or as fragmented S-GJPs with CX30 alone at 3 weeks (A–D) and 8 weeks (E). (F–I) Schematic diagrams of the rules used to organize the L- and S-GJPs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars: 5 μ m (A–C) and 10 μ m (D and E).

hydrophilic region of CAV1 α in *Cx26^{R75W+}* cochleae, and found significantly increased expression of CAV1 β and CAV2 in both *CX26^{R75W+}* and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* cochleae (Figure 5, A–D). CAV1 and CAV2 showed excessive accumulation (Figure 5, E–K) in 3-week-old *CX26^{R75W+}* cochleae. These cells that accumulated CAV1 or CAV2 were occasionally observed at the inter-GJP space or on the surface of the GJPs (Figure 5, G, H, J, and K) in 3-week-old *CX26^{R75W+}* cochleae, although no accumulated signals were observed in the control mice (Figure 5, E and I). We quantified the number of ISCs that had accumulated CAV1 and CAV2 in both CX26 mutants. There was no difference in their distribution pattern or in the number of positive cells ($P = 0.16$) with respect to CAV1 ($7.3 \pm 1.3\%$) and CAV2 ($5.6 \pm 0.9\%$) accumulation (Figure 5L). In the overexpression of CAV1 β with WT CX26, CX26R75W, and CX30 in HEK293 cells, we observed that numerous GJPs at the cell borders and the connexin vesicles were accompanied by accumulated CAV1 β , although WT CX26 with CAV1 β did not show such a distribution pattern (Supplemental Figure 8). We also observed

numerous CAV1- and CAV2-positive vesicles at the S-GJPs in the two mutant mice in the adult stage as compared with those seen at the L-GJPs in the control mice (Figure 5, M and N). These changes were associated with an increase in the caveolar structures (Figure 6, B and E–K) that are indicative of endocytosis, which leads to membrane retrieval and, perhaps, abnormal GJP formation.

Based on electron microscopic analysis of the ISCs, we observed that both *CX26^{R75W+}* and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice also formed gap junctions, although there were a number of discontinuous gap junctions (Figure 6, B, D, and K) with excessive endocytosis (Figure 6, B, E, F, and G–K) or abnormally condensed intermembrane layers (Figure 6, E and F) around the gap junctions in *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice. In contrast with their littermate controls (Figure 6, A and C), significantly larger numbers of caveolae and vesicles were detected at cell borders in both *CX26^{R75W+}* mice and *Cx26^{fl/fl} P0-Cre* mice (Figure 6L). The distributions and the number of caveolae were nearly identical between both types of mutant mice and were consistent with the immunolabeling for CAV1 and CAV2 around GJPs (Fig-



research article

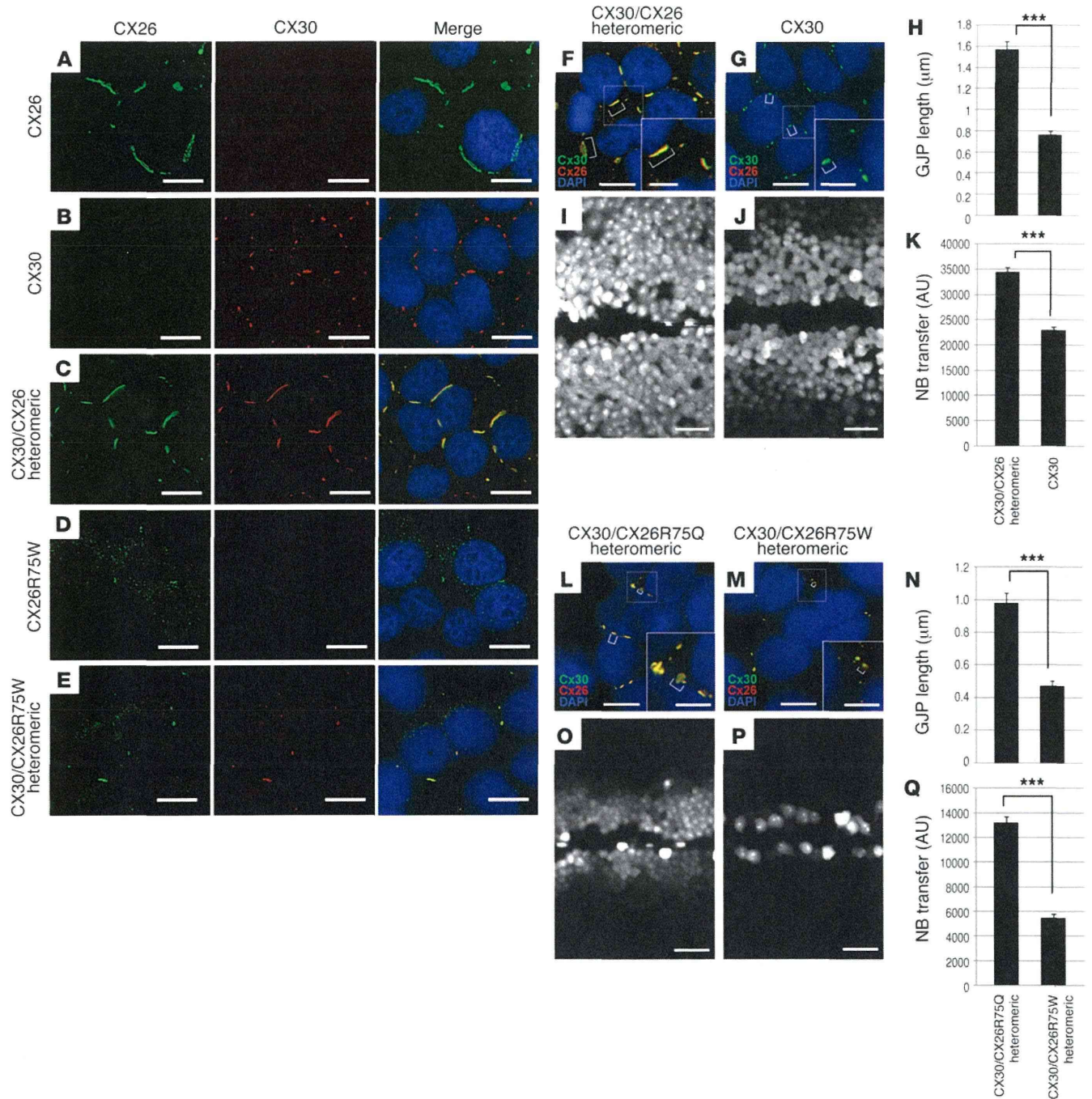


Figure 4 Disruption of cochlear GJPs is reproduced by human cDNA clones for CX30 and CX26, with or without mutations in HeLa cells, and leads to functional differences in dye transfer depending on the resultant GJP sizes. (A–E) Clear differences in GJP formation were observed in HeLa cells that expressed the indicated connexin(s), which made homomeric or heteromeric channels. Cells were colabeled with anti-CX26 (green) and anti-CX30 (red) antibodies and were counterstained with DAPI (blue). L-GJPs were observed only when normal CX26 was expressed alone (A) or was coexpressed with CX30 (C). The other combinations (B, D, and E) formed S-GJPs. (F–Q) In HeLa cells that expressed CX30 and CX26, cells with smaller GJPs demonstrated decreased NB transfer. (F, G, L, and M) Shown are HeLa cells that expressed WT CX30 alone (CX30) or coexpressed WT CX30 and WT CX26 (CX30/CX26), or the indicated CX26 mutants (CX30/Cx26R75Q or CX30/CX26R75W). CX26 and CX30 were colocalized, and the GJP size differed across cell lines. (H and N) Quantitative analysis of the GJP length (mean ± SEM). $***P = 3.3 \times 10^{-17}$ (H) or $P = 7.7 \times 10^{-12}$ (N). (I, J, O, and P) Digital fluorescence images of HeLa cells expressing the indicated connexin(s) after NB scrape-loading. (K and Q) Quantitative analysis of intercellular NB transfer after scrape-loading. Columns represent the mean distance (± SEM) of NB transfer from the scrape line. $***P = 9.6 \times 10^{-9}$ (K) or $P = 3.2 \times 10^{-11}$ (Q). Scale bars: 10 μm and 5 μm (insets).

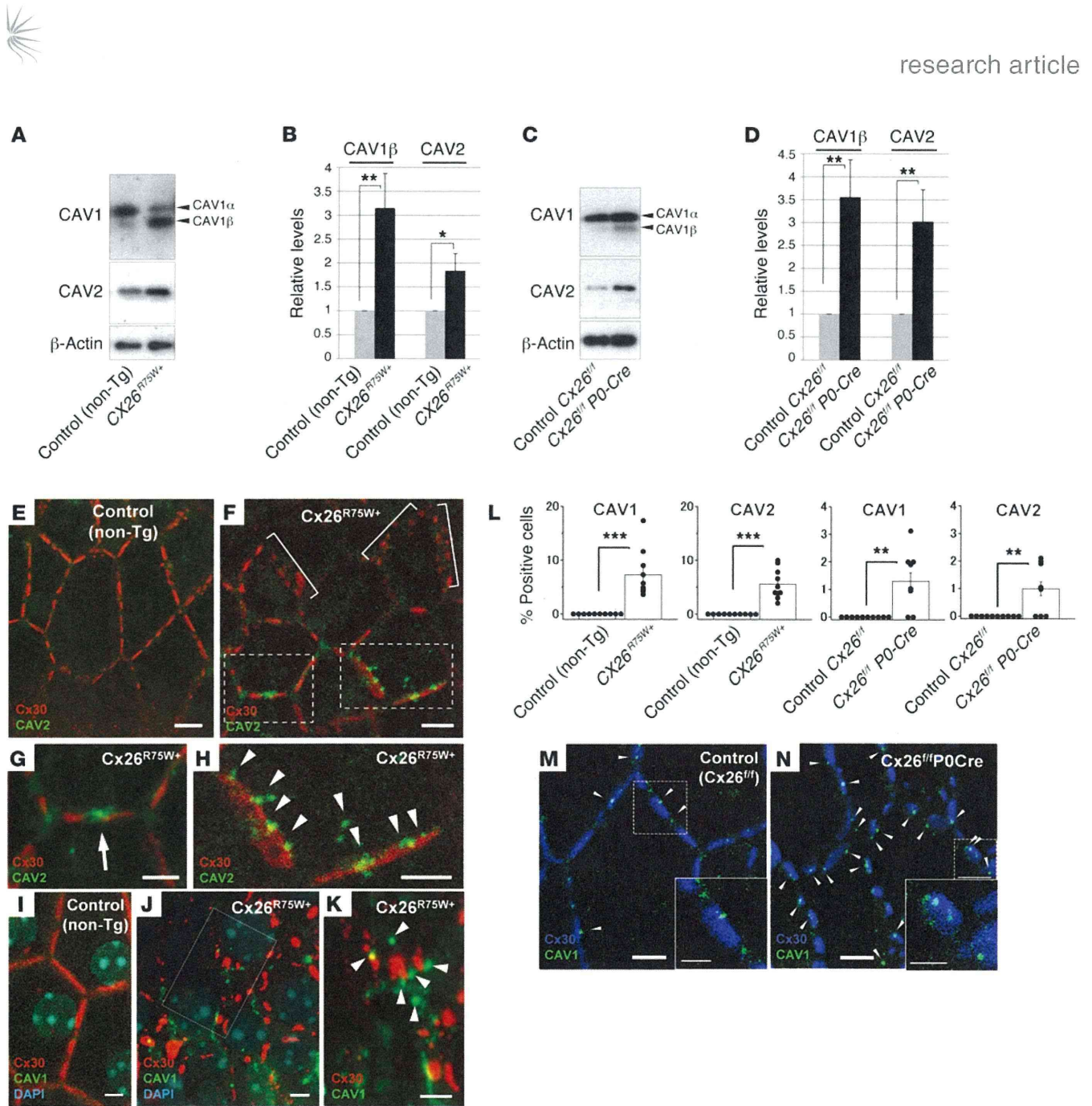


Figure 5

Changes in the endocytosis proteins CAV1 and CAV2 in CX26-mutant mouse cochlea. The CAV1 isoform preference shifted from α to β in $CX26^{R75W/+}$ cochlea (A). The CAV1 β and CAV2 increased in both mutant mice (A and C) at 8 weeks of age, as shown by Western blotting. Protein levels of CAV1 β (B) and CAV2 (D) are expressed relative to the amount present in each littermate control (mean \pm SEM, $n = 5$). $P = 0.009$ and 0.03 for CAV1 β and CAV2, respectively, in $CX26^{R75W/+}$ cochlea. $P = 0.007$ and 0.01 for CAV1 β and CAV2, respectively, in $Cx26^{fl/fl}$ P0-Cre cochlea. (E–K) Accumulation of CAV2 and CAV1 in 3-week-old non-Tg littermate controls (E and I) and $CX26^{R75W/+}$ mice (F–H, J, and K) with S-GJPs (brackets in F) was occasionally observed at the inter-GJP space (G, arrow) and on the surface of the GJPs (H, arrowheads), differing from that seen in littermate controls (I and E). The boxed regions in F and J are magnified in G, H, and K, respectively. (L) Numbers of cells with accumulated CAV1 or CAV2 were counted in five animals from each group (mean \pm SEM, $n = 10$; $P = 0.0003$, 6.1×10^{-5} , 0.001 and 0.002 , from left to right). (M–N) In adult mice, vesicles positive for CAV1 (arrowheads) were frequently detected on GJPs in $Cx26^{fl/fl}$ P0-Cre mice (K), but not in their littermate controls (J). Boxed regions are magnified in the bottom right corner. Scale bars: $10 \mu\text{m}$ and $5 \mu\text{m}$ (insets). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 5, M and N) and the upregulation of the caveolin proteins (Figure 5, A–D). This may be associated with the membrane retrieval (Figure 6K) caused by excessive endocytosis and the formation of abnormal GJPs. In the labeling with cholera toxin subunit B (CTxB), it was shown that GJPs with CX26 and CX30 did not colo-

calize with lipid rafts in control mice (Supplemental Figure 9, A, C, and E). In contrast, the lipid raft signals in $Cx26^{fl/fl}$ P0-Cre mice localized between S-GJPs with no regularity and with more diffuse labeling and less clarity as compared with those in control mice (Supplemental Figure 9, B, D, and F).