

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Epiphygan is specifically expressed in cochlear supporting cells and is necessary for normal hearing |
| Author(s)    | 花田, 有紀子  |
| Citation     |  |
| Issue Date   |  |
| Text Version | none   |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/69447">http://hdl.handle.net/11094/69447</a>                    |
| DOI          |  |
| rights       |  |
| Note         |  |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|   |     |        |       |
|---|-----|--------|-------|
| (申請者氏名)   |     | 花田 有紀子 |       |
| 論文審査担当者   | (職) | 氏名     |       |
|   | 主査  | 大阪大学教授 | 猪俣 勇典 |
|   | 副査  | 大阪大学教授 | 原田 彰宏 |
|   | 副査  | 大阪大学教授 | 四島 晴彦 |
| <p><b>論文 審査の結果の要旨</b></p> <p>様々な研究が行われているなか、いまだ原因の分からない遺伝性難聴症例は多く、さらなる解明が必要である。申請者はcDNAライブラリをもとに内耳に多く発現する遺伝子の一つであるEpiphycan (Epyc) に着目し、その局在や機能について研究を行った。まずreal-time PCRによりEpycが他組織に比べ蝸牛に豊富に発現していることを明らかにし、またIn situ hybridizationを行いEpyc mRNAが内耳蝸牛のコルチ器支持細胞に強く発現していることを見出した。さらに申請者はCRISPR/Cas9システムを用いてEpycノックアウトマウスを作成し、聴性脳幹反応検査でEpycノックアウトマウスでは16kHz~32kHzの音域で野生型マウスに比べ聴覚閾値の有意な上昇を認めることを明らかにした。今回の研究結果は遺伝性難聴の病態の解明に有用であると考えられ、学位の授与に値する。</p> |     |        |       |

## 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

|  |  |
|--|--|
| 氏名<br>Name   | 花田 有紀子   |
| 論文題名<br>Title  | Epiphycan is specifically expressed in cochlear supporting cells and is necessary for normal hearing<br>(蝸牛のコルチ器支持細胞に局在するEpiphycanは聴覚機能に必須である) |
| 論文内容の要旨  |  |
| 〔目的(Purpose)〕  |  |
| <p>近年難聴遺伝子の研究により様々な遺伝子が同定されているが、いまだ原因遺伝子がわからない先天性難聴の症例は多い。最近になりcDNAライブラリの解析によって新たな難聴遺伝子が同定されている。今回我々は内耳に豊富かつ特異的に発現する遺伝子が聴覚機能に関連しているのではないかと考えた。そこで我々は、cDNAライブラリを活用して新たな難聴遺伝子をピックアップし、さらに聴覚機能への関与について検討を行うことで、新たな難聴遺伝子の同定を試みた。</p>   |  |
| 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕  |  |
| <p>我々は、内耳のcDNAライブラリのExpressed sequence tag (EST) データベースから内耳に豊富かつ特異的に発現しているが現在まで聴覚との関連が報告されていない遺伝子を複数ピックアップした。そのなかのEpiphycan (Epyc) について、さらに詳細に検討を行った。</p> <p>まずRT-PCRを行い、EpycのmRNAが内耳に発現しており、前庭神経節よりも蝸牛に特に豊富に発現していることを示した。次に、マウスの様々な組織から作成したcDNAを用いてquantitative RT-PCRを行い、Epyc mRNAが特に蝸牛において豊富に発現しており、前庭神経節にはほとんど発現していないことを明らかにした。マウス内耳組織切片を用いた<i>in situ</i> hybridizationでは、コルチ器支持細胞・内/外ラセン溝細胞・root cells・spiral prominenceなどにmRNAの発現を認め、有毛細胞・ラセン神経節・血管条などには発現を認めなかった。</p> <p>さらにEpycの内耳における機能を明らかにするため、発生工学研究会の協力のもとCRISPR/Cas9法を用いてEpycノックアウト(KO)マウスを作成した。Epycは8つのExonから構成されるが、そのうちExon4をターゲットとしguide RNAを設定した。得られた遺伝子変異マウスのうち、2塩基が欠損しているマウスを選んで繁殖させ、ノックアウトマウスを確立した。ノックアウトの確認のためにWestern blottingを行い、KOマウスにおいてEpycタンパクが合成されていないことを確認した。また、guide RNAの配列類似部位のsequence解析によりOff target変異のないことも確認した。</p> <p>KOマウスの内耳形態の観察を様々な方法で行った。内耳Paraffin切片のH-E染色ではKOマウス蝸牛には明らかな形態異常は認められなかった。また、難聴モデルマウスにおいてはらせん神経節細胞密度の低下がみられることが多いが、Epyc KOマウスにおいてはらせん神経節細胞密度の低下は認められなかった。難聴モデルマウスにおいては有毛細胞の脱落がみられることがあるため、Whole mount処理を行った蝸牛の有毛細胞の観察も行ったが、野生型・KOともに明らかな有毛細胞の脱落は認めなかった。Epycの属するSmall leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) に含まれる遺伝子が発達段階で神経伸長に影響を与えるという報告があるため、KOマウスの蝸牛神経をNeurofilament染色により観察したが、明らかな相違は認められなかった。</p> <p>KOマウスの聴覚機能をABR (聴性脳幹反応検査) を用いて計測した。その結果、16kHz~32kHzの中~高音域でKOマウスの聴覚閾値が野生型マウスに比べ有意に上昇していた。この結果は、Epycが正常聴覚に必要であることを示唆する。</p> |  |
| 〔総括(Conclusion)〕   |  |
| <p>今回の研究では、cDNAライブラリを活用して内耳に豊富かつ特異的に発現する遺伝子であるEpiphycanを選択し、そのmRNAの局在や聴覚機能に与える影響について明らかにした。Epycは内耳蝸牛のコルチ器支持細胞に局在しており、ノックアウトにより中~高音域の聴覚閾値上昇を示す。この結果から、Epycが正常聴覚に必要であると考えられる。</p>  |  |