

平成21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18791199

研究課題名（和文） 細胞外マトリックス異常による難聴に関する研究

研究課題名（英文） Mechanisms of hearing loss caused by the extra-cellular matrix.

研究代表者

浅村 賢二 (ASAMURA KENJI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：40377627

研究成果の概要：

従来、難聴の原因としては、内耳の有毛細胞の細胞死、血管条・ラセン靭帯などのイオンサイクルの破綻などが注目されてきたが、近年、細胞外マトリックス（蓋膜構成因子ネットワーク）の破綻による難聴が知られるようになってきた。本研究では、内耳における細胞外マトリックス（特に蓋膜構成因子）に注目し、蓋膜構成因子の細胞内局在を明らかにするとともに、蓋膜構成成分の遺伝子変異による難聴の探索を行ない、新規遺伝子変異を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴，遺伝子，内耳，細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は出生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性障害のひとつである。近年の分子遺伝学的手法の発達に伴い、数多くの原因遺伝子変異が同定され、報告されるようになってきた。

研究代表者である浅村らは、細胞外マトリックスのひとつである IX 型コラーゲンの遺伝子解析を行い、難聴の原因遺伝子変異を同定し報告してきた (Asamura et al., 2005)。また、IX 型コラーゲンのノックアウトマウス

では、進行性の難聴を呈するとともに、基底回転の蓋膜の構造が光学顕微鏡レベルで変性していることを見出し報告してきた (Suzuki et al., 2005)

従来より、有毛細胞やイオンサイクルに関連した遺伝子の原因は多数報告されてきたが、細胞外マトリックスの異常による難聴がどのようなメカニズムで引き起こされるのかは未だ不明である。

細胞外マトリックス異常による難聴の詳細を検討するためには、細胞外マトリックス構成

タンパク遺伝子を網羅的に検索し難聴との関連性について明らかにする必要がある。

本研究によりそれぞれの細胞外マトリックスの内耳における局在を明らかにし、その構造や機能について検討することで、難聴の原因究明や治療への足がかりに大きく寄与することが期待される。

2. 研究の目的

先天性難聴は出生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性障害のひとつである。従来、難聴の原因は不明である場合が殆どであったが、近年の分子遺伝学的手法の発達に伴い、数多くの原因遺伝子変異が同定され、報告されるようになってきた。

難聴の原因としては、内耳の有毛細胞の細胞死、血管条・ラセン靭帯などのイオンサイクルの破綻などが注目されてきたが、近年、細胞外マトリックス（蓋膜構成因子ネットワーク）の破綻による難聴が知られるようになってきた。また、我々の研究室では、蓋膜構成因子の遺伝子変異の解析を精力的に行っており、*COL9A1*、*COL9A3*、*TECTA* といった蓋膜構成因子の遺伝子変異に伴う難聴を見出し報告してきた（Asamura et al., 2005、Suzuki et al., 2005、Iwasaki et al., 2002）。しかしながら、蓋膜構成因子の遺伝子変異により難聴と成るメカニズムは不明でありより詳細な解析が必要な状況であった。

本研究では、内耳における細胞外マトリックス（特に蓋膜構成因子）に注目し、蓋膜構成因子の細胞内局在を明らかにするとともに、蓋膜構成成分の遺伝子変異による難聴の探索を行ない新規遺伝子変異の探索を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 日本人難聴患者を対象に、細胞外マトリックス構成因子の遺伝子解析を行い、新規遺伝子変異の探索を行なうとともに、(2) 培養細胞系を用いた、難聴原因遺伝子変異の機能解析を行った。また、(3) マウスを用いて内耳における細胞外マトリックス構成因子の発現部位の詳細な検討を行った。

(1) 日本人難聴患者に認められる細胞外マトリックス構成因子の新規原因遺伝子変異の探索

当研究室が保有する難聴遺伝子バンクより、常染色体優性遺伝形式をとる 84 家系を

選出し、*TECTA* 遺伝子の全エクソンおよびスプライシング領域を PCR 法で増幅した。増幅された PCR 産物を電気泳動で確認後、ABI PRISM model 3100 genetic analyser を用いて、直接シーケンス法により配列を決定した。

(2) 細胞外マトリックス構成遺伝子変異による難聴のメカニズムの解析

細胞外マトリックス構成因子の遺伝子変異により難聴となるメカニズムを推定するため、従来より報告があり、ドメイン構造がはっきりしている *TECTA* 遺伝子の機能解析を行った。*TECTA* 遺伝子のうち、難聴の原因として多くの変異が報告されている ZP ドメインを含む C 末端領域を Human fetal brain cDNA (Biochain) より、クローニングした。クローニングした *TECTA* 遺伝子 ZP ドメインに、従来報告のあった 3 種類の変異（スペイン家系：C1837G、オーストリア家系：Y1870C、日本人家系 R2021H）を、変異導入プライマーを用いた部位特異的変異導入法により導入した。変異を導入した *TECTA* 遺伝子 ZP ドメインを、pEGFP-C2 ベクター (Clontech) に導入し、GFP との融合タンパクを発現するプラスミドを構築した。構築した GFP 融合型 *TECTA* プラスミドをリポフェクトアミン LX (invitrogen) を用いたリポフェクション法により COS7 細胞に導入して、細胞内の局在をレーザー励起傾向顕微鏡下で確認した。

(3) マウス内耳における蓋膜構成因子の局在の解析

マウスおよびラットを用い、パラホルムアルデヒドで還流固定後、蝸牛および前庭器を取り出し凍結切片を作成する。ABC 法により、難聴原因遺伝子の産生する蛋白に対する特異抗体と特異細胞に対する抗体の蛍光 2 重染色を行い、蛋白の局在を明らかにする。また、アクリル樹脂包埋により超薄切片を作成し、電子顕微鏡を用いたイムノゴールド法を用いて細胞内での局在も解析した。また、パラホルムアルデヒド固定を行わずに、内耳を摘出し、蝸牛より Total RNA を抽出しコラーゲンなどの細胞外マトリックス遺伝子の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR を用いて調べた。

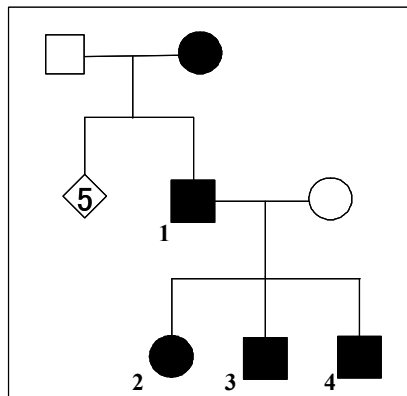
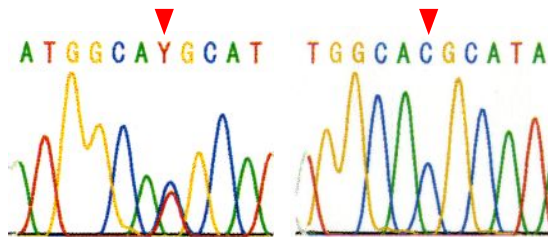
4. 研究成果

(1) 日本人難聴患者に認められる細胞外マトリックス構成因子の新規原因遺伝子変異の探索

優性遺伝形式をとる遺伝性難聴患者 84 家系を対象に、細胞外マトリックス構成遺伝子について変異の検索を行なうとともに、臨床

情報との比較検討を行い、遺伝子変異と難聴との関連性について詳細に検討した。その結果、内耳に発現する細胞外マトリックスの構成成分のひとつである *TECTA* 遺伝子の新規変異を 2 家系より見出した。2 家系はいずれも ZP ドメイン領域の変異であり、臨床的には進行性の中音域の難聴になることが明らかとなった (Moteki et al., 投稿準備中)。

図 1 新たに日本人家系から見出された *TECTA* 遺伝子変異 (5597C>T) と家系図



(Moteki et al., 投稿準備中)

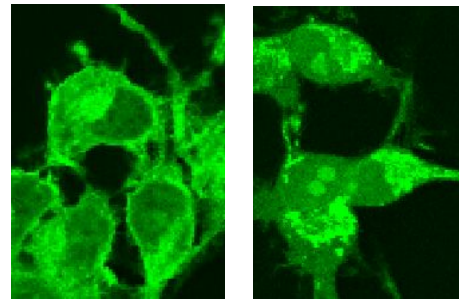
(2) 細胞外マトリックス構成遺伝子変異による難聴のメカニズムの解析

従来報告のあった 3 種類の変異 (スペイン家系: C1837G、オーストリア家系: Y1870C、日本人家系 R2021H) の機能解析を目的として、オワンクラゲ緑色蛍光タンパク (GFP) との融合タンパクを作成し、COS7 培養細胞に導入し細胞内の局在の解析を行った。

その結果、野生型の *TECTA* 遺伝子は細胞質に局在するのに対して、難聴患者より見出された変異では、細胞質に凝集した状態で局在し、細胞膜に移行しないことが明らかとなった (Moteki et al., 投稿準備中)。従って、細胞外に分泌されないことにより、蓋膜の構成成分中の *TECTA* 遺伝子が現象し、蓋膜の細胞外マトリックスネットワークが上手く構築できないことにより難聴となることが示唆された。

図 2 GFP 融合型 *TECTA* 遺伝子の細胞局在の変化 (左が野生型、右が変異型を示す) 野生型では、細胞膜で GFP の蛍光が認めら

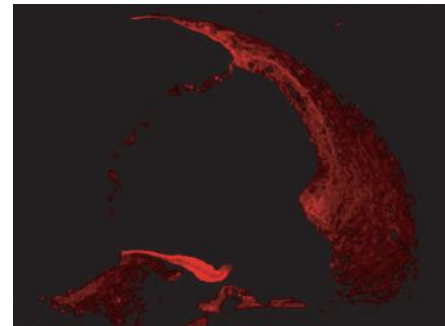
れるのに対して、変異型では細胞質内で凝集を形成しているように見える。



(Moteki et al., 投稿準備中)

(3) マウス内耳における蓋膜構成因子の局在の解析

また、蓋膜を構成する細胞外マトリックス構成蛋白質の局在を調べるために、各種のコラーゲンについて、内耳での発現をリアルタイム PCR で調べるとともに、いくつかについては組織免疫染色法を用いて内耳における局在を検討した。



(Usami et al., 2008)

また、難聴モデルマウスとして、IX 型コラーゲンノックアウトマウスを用い、*TECTA* など他の蓋膜を構成する細胞外マトリックス構成タンパク質に対する特異抗体を用いた蛍光染色を行った。(投稿準備中)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

① 茂木英明、塚田景大、橋本繁成、浅村賢二、工藤、宇佐美真一 日本人難聴患者に見出された *TECTA* 遺伝子変異についての検討 第 18 回日本耳科学会総会 2008 年 10 月 17 日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅村 賢二 (ASAMURA KENJI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：40377627

(2) 研究協力者

宇佐美 真一 (USAMI SHIN-ICHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：10184996

橋本 繁成 (HASHIMOTO SHIGENARI)

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：90359729

茂木 英明 (MOTEKI HIDEAKI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：60422698