

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09375

研究課題名(和文) 蝸牛の恒常性・形態形成におけるプロサポシンの機能的意義の解明

研究課題名(英文) Functional significance of prosaposin in the cochlea.

研究代表者

齋藤 正一郎 (Saito, Shouichiro)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60325371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プロサポシンは約520アミノ酸残基からなる蛋白質であり、聴覚系において、プロサポシンの先天性異常は蝸牛の形態異常を伴う著しい難聴を引き起こす。近年、プロサポシンの受容体としてG蛋白質共役型受容体(GPR)37およびGPR37L1が同定された。本研究では、マウス蝸牛におけるプロサポシン、GPR37およびGPR37L1の発現性について検討した。結果、GPR37およびGPR37L1は内毛細胞のみならず外指節細胞にも発現していることが明らかとなり、プロサポシンの作用経路の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロサポシンは中枢神経系において神経栄養因子として機能しており、プロサポシンの投与により、虚血による神経細胞の遅発性細胞死の抑制効果や、神経細胞再生の促進効果が報告されている。本研究により、蝸牛の恒常性に関わるプロサポシンの機能的意義の一端が明らかになり、またその受容体の発現性が明らかになったことから、外傷性聴覚障害治療へのプロサポシンの応用を考える上での基礎的貢献を果たすことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Prosaposin is a glycoprotein composed of approximately 520 amino acid residues. In the vestibuloauditory system, lack of prosaposin results in the deafness accompanying a severe morphological abnormality of the hair cell. Recently, G protein-coupled receptor (GPR) 37 and GPR37L1 are identified as candidates for prosaposin receptors. In this study, the expression patterns of prosaposin, GPR37 and GPR37L1 were examined in mouse cochlea. By reverse transcript-polymerase chain reaction, prosaposin, GPR37 and GPR37L1 mRNA were found in mouse cochlea cDNA. By immunofluorescence, both GPR37 and GPR37L1 immunoreactivity were observed in the inner hair cell and the outer phalangeal cell. These results indicate prosaposin may affect not only to the inner hair cell but also to the outer phalangeal cell.

研究分野：神経組織学

キーワード：プロサポシン GPR37 GPR37L1 蝸牛 神経栄養因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コルチ器の有毛細胞や支持細胞周囲には毛細血管が少ない(血管の拍動による振動を避けるためと考えられている)ため、細胞の生存因子の供給は内リンパ液を産生する血管条や、コルチ器各種細胞による自己分泌・傍分泌によるところが多く、それがコルチ器の脆弱性にも繋がっている。蝸牛のコルチ器は、強大音への暴露のみならず、低酸素、血行障害および抗生物質等に対して非常に鋭敏に反応し、容易に変成して、難聴や聾を引き起こす。成体哺乳類では幹細胞となる基底細胞も存在しないため、一度重篤な変成に陥れば回復は難しく、また加齢性変化への対応も脆弱なものとなっている。そのため、障害時に既存の細胞を如何に生存させるかが重要な要素となる。

プロサポシンは、リソソーム内のスフィンゴ脂質水解酵素群の反応を促進する4種類のタンパク質、サポシンA, B, C, Dをドメインとして持つ、これらの前駆体タンパク質である。リソソームを持つ細胞はすべてサポシンを有することから、プロサポシンはハウスキーピング遺伝子の側面を持ち、強い異化作用を有す脾臓、肝臓、腎臓などでは特に豊富に存在する。一方、神経細胞ならびに脳脊髄液といった細胞外液中にはサポシンへと分解されていないプロサポシンが豊富に存在し、神経栄養因子として機能している。聴覚系では、虚血モデル動物へのプロサポシンの投与により、有毛細胞の細胞死ならびに聴覚機能低下の“抑制”効果が認められる。蝸牛においてプロサポシンを豊富に含有する細胞は同定されている一方、プロサポシンを受容できる細胞(レセプター発現細胞)、プロサポシンを分泌する細胞の同定はなされていない。プロサポシンKOマウスでは、生後20日における著しい形態異常と聴覚障害の発生が報告されているが、生後30日で全数が死に至る本マウスでは、リソソーム病末期としての蝸牛変成の側面も強く、神経栄養因子としてのプロサポシンと、蝸牛の恒常性維持や形態形成との関係性は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、聴覚障害治療におけるプロサポシンの応用への貢献を目的とする基礎的研究であり、蝸牛におけるプロサポシンレセプターの発現性を明らかにし、蝸牛の恒常性・形態形成におけるプロサポシンの機能的意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス蝸牛におけるプロサポシン、GPR37 および GPR37L1 mRNA の発現性について

6匹の成体雄マウス(S1c:ddY, 36~37g)を使用した。動物は $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12:12時間の明暗サイクルで、餌と水は自由に摂取できる環境で、実験に使用するまで飼育した。ソムノペンチル(共立製薬株式会社, Tokyo, Japan)  $8\times 10^{-3}$  ml/g body weighを腹腔内注射し、深麻酔下で断頭し、内耳を剖出し、TRIzol (Invitrogen, CA, USA)を用いて定法に従いtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAからPrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Shiga, Japan)を用いて定法に従い内耳cDNAを作製した。GenBankに登録されているマウスプロサポシンDNA (NM\_011179), GPR37 DNA (NM\_010338) および GPR37L1 DNA (NM\_134438) の塩基配列を基に、各分子のプライマーを設計した。上記cDNAとプライマーからTakara Ex Taq (Takara)を用いて定法に従いPCRを行い、PCR産物を精製後、マルチキャピラリーDNAシーケンサーにて配列を解析した。

#### (2) マウス蝸牛におけるプロサポシン、GPR37 および GPR37L の組織局在について

6匹の成体雄マウス(S1c:ddY, 36~37g)を使用した。動物は $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12:12時間の明暗サイクルで、餌と水は自由に摂取できる環境で、実験に使用するまで飼育した。ソムノペンチルによる深麻酔下で開胸後、リングル液、続いて0.1Mリン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒド溶液(pH 7.4)により灌流固定を施した。灌流固定後断頭し、側頭骨を剖出し、0.1Mリン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒド溶液に一晩浸漬した。その後0.1Mリン酸緩衝250mM Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid溶液(pH 7.4)にて一週間浸漬して脱灰した。その後定法に従いパラフィンに包埋し、ミクロトームにより5  $\mu\text{m}$ 厚の連続切片を作製し、抗プロサポシン抗体(bs-1879R, Bioss Antibodies, MA, USA), 抗GPR37抗体(bs-13524R; Bioss Antibodies) および抗GPR37L1抗体(bs-15390R; Bioss Antibodies)を用いて定法に従い免疫組織化学的染色ならびに免疫蛍光染色を行った。

#### (3) マウス脾臓をモデルとした、GPR37 および GPR37L1 とプロサポシン、アデノシン $A_{2A}$ 受容体( $A_{2A}R$ )ならびにドパミンD2受容体(D2R)との相互作用に関する研究

6匹の成体雄マウス(S1c:ddY, 36~37g)を使用した。動物は $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12:12時間の明暗サイクルで、餌と水は自由に摂取できる環境で、実験に使用するまで飼育した。(2)に準拠した手技で脾臓を摘出し、OCT compoundに包埋して $-60^{\circ}\text{C}$ で凍結し、定法に従いクリオスタットにより20

$\mu$ m 厚の凍結切片を作製し、上記抗体ならびに抗 A<sub>2A</sub> 抗体 (A2A-GP-Af1000; Frontier Institute) および抗 D2R 抗体 (D2R-GP-Af500; Frontier Institute) を用いて定法に従い免疫組織化学的染色ならびに免疫蛍光染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス蝸牛におけるプロサポシン, GPR37 および GPR37L1 mRNA の発現性について

マウス蝸牛におけるプロサポシン, GPR37 および GPR37L1 mRNA の発現性を RT-PCR により解析した。結果、全ての分子が内耳に発現していることが明らかとなった (図 1)。配列解析により、内耳に発現しているプロサポシンは、数種類報告されているスプライシングバリエーションの内、9 塩基短い alternative splicing form が優勢に発現していることが明らかとなった (図 2)。中枢神経系では 9 塩基の挿入があるものとならないものの両タイプの発現が認められるため、蝸牛においては特定のタイプのプロサポシンが主に活用されている可能性が示唆された。

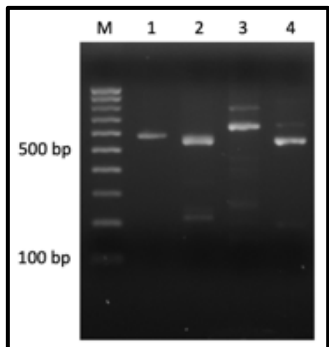


図 1. 内耳の RT-PCR 像。  
M: マーカー, 1:  $\beta$ -actin, 2: プロサポシン, 3: GPR37, 4: GPR37L1。

|       |  |
|-------|--|
| Sam   | -----CGAGATGAGCAACCCCTGGGGAAGTGTGCTGTGCCTCAACCTCTGCCAGTCCCTTCAGGAGTACTTGGCCGA    |
| Pro v | ATTAAGGGCGAGATGAGCAACCCCTGGGGAAGTGTGCTGTGCCTCAACCTCTGCCAGTCCCTTCAGGAGTACTTGGCCGA |
| Pro   | ATTAAGGGCGAGATGAGCAACCCCTGGGGAAGTGTGCTGTGCCTCAACCTCTGCCAGTCCCTTCAGGAGTACTTGGCCGA |
| ***** |  |
| Sam   | GCAAACCCAGAAACAGCTTGAGTCCAACAAGATCCCGGAGGTGGACATGGCCCGTGTGGTTGCCCCCTTCATGTCCAACA |
| Pro v | GCAAACCCAGAAACAGCTTGAGTCCAACAAGATCCCGGAGGTGGACATGGCCCGTGTGGTTGCCCCCTTCATGTCCAACA |
| Pro   | GCAAACCCAGAAACAGCTTGAGTCCAACAAGATCCCGGAGGTGGACATGGCCCGTGTGGTTGCCCCCTTCATGTCCAACA |
| ***** |  |
| Sam   | TCCCTCTCCTGCTGTACCCCTCAGGATCACCCCGCAGCCAGCCCAACCTAAGGCTAACGAGGAGCTCTGCCAGGACTGT  |
| Pro v | TCCCTCTCCTGCTGTACCCCTCAGGATCACCCCGCAGCCAGCCCAACCTAAGGCTAACGAGGAGCTCTGCCAGGACTGT  |
| Pro   | TCCCTCTCCTGCTGTACCCCTCAGGATCACCCCGCAGCCAGCCCAACCTAAGGCTAACGAGGAGCTCTGCCAGGACTGT  |
| ***** |  |
| Sam   | ATGAAGCTGGTGTCTGATGTCCAGACTGCTGTGAAGACCAACTCCAGCTTTATCCAGGGCTTCGTGGACCAGCTGAAGGA |
| Pro v | ATGAAGCTGGTGTCTGATGTCCAGACTGCTGTGAAGACCAACTCCAGCTTTATCCAGGGCTTCGTGGACCAGCTGAAGGA |
| Pro   | ATGAAGCTGGTGTCTGATGTCCAGACTGCTGTGAAGACCAACTCCAGCTTTATCCAGGGCTTCGTGGACCAGCTGAAGGA |
| ***** |  |
| Sam   | GGATTGTGACCCTTGGGGCCAGGCGTGTCTGACATATGCAAGAAGTACGTGGACCAGTATCCGAGGCTGTGTGCCAGA   |
| Pro v | GGATTGTGACCCTTGGGGCCAGGCGTGTCTGACATATGCAAGAAGTACGTGGACCAGTATCCGAGGCTGTGTGCCAGA   |
| Pro   | GGATTGTGACCCTTGGGGCCAGGCGTGTCTGACATATGCAAGAAGTACGTGGACCAGTATCCGAGGCTGTGTGCCAGA   |
| ***** |  |
| Sam   | TGTTGATGCACATGCA-----ACCCAAGGAAATCTGTGTGCTGGCTTCTGTAATGAGGTCAAGAGAGTGCCA         |
| Pro v | TGTTGATGCACATGCA-----ACCCAAGGAAATCTGTGTGCTGGCTTCTGTAATGAGGTCAAGAGAGTGCCA         |
| Pro   | TGTTGATGCACATGCAAGGATCAGCAACCCAAGGAAATCTGTGTGCTGGCTTCTGTAATGAGGTCAAGAGAGTGCCA    |
| ***** |  |
| Sam   | ATGAAGACTTGGTCCCTGCCACCGAGACC-----   |
| Pro v | ATGAAGACTTGGTCCCTGCCACCGAGACC-----   |
| Pro   | ATGAAGACTTGGTCCCTGCCACCGAGACC-----   |
| ***** |  |

図 2. プロサポシンの塩基配列アライメント。  
SAM: 内耳由来, Pro V: Prosaposin variant 6 (NM\_001146124.1),  
Pro: Prosaposin (NM\_011179.3)。

##### (2) マウス蝸牛におけるプロサポシン, GPR37 および GPR37L1 の組織局在について

マウス蝸牛におけるプロサポシン, GPR37 および GPR37L1 の組織局在を、免疫組織化学的染色ならびに免疫蛍光染色により検討した。結果、コルチ器では、プロサポシンの発現は多様な細胞において認められ、特に内毛細胞およびラセン神経節細胞に強度の染色性が認められた (図 3)。GPR37 および GPR37L1 の発現性は、内毛細胞の他にも、特定の細胞に認められた。内毛細胞と外指節細胞に特異的に発現しているカルレチニンとの 2 重免疫蛍光染色から、GPR37 および GPR37L1 を強度に発現しているのは内毛細胞と外指節細胞であることが明らかとなった (図 4)。

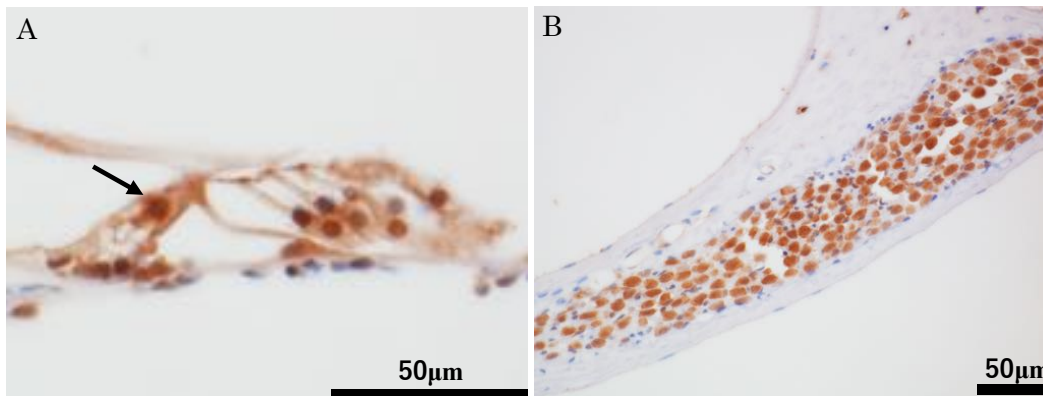


図 3. プロサポシンの免疫組織化学的染色像。  
A: コルチ器。内毛細胞 (矢印) に特に強い染色像が観察された。B: ラセン神経節細胞。

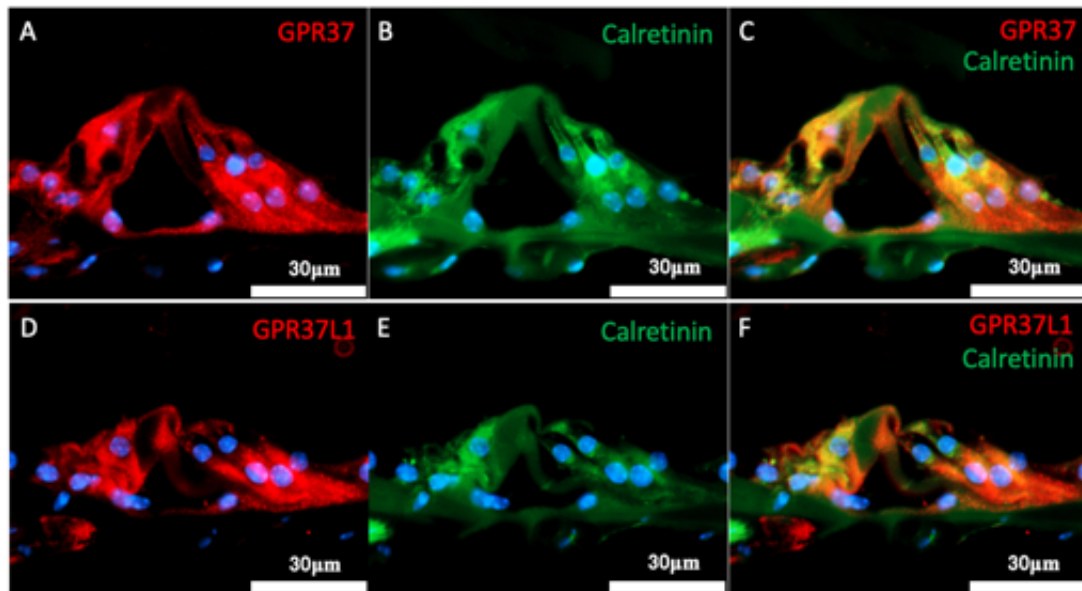


図 4. GPR37 および GPR37L1 の蛍光免疫染色像。  
GPR37, GPR37L1 とともに、マーカーの Calretinin と共存性から、内毛細胞と外指節細胞に発現していることが明らかとなった。

(3) マウス膵島をモデルとした、GPR37 および GPR37L1 とプロサポシン、アデノシン  $A_{2A}$  受容体 ( $A_{2A}R$ ) ならびにドパミン D2 受容体 (D2R) との相互作用に関する研究

GPR37 および GPR37L1 は、プロサポシンの受容体であるという報告の他に、 $A_{2A}R$  および D2R の発現調整に関わるとも考えられている。プロサポシンとの関係性を考えるために、膵島をモデルとしてプロサポシン、GPR37, GPR37L1,  $A_{2A}R$  および D2R の発現性について検討した。膵島においてプロサポシンは広く発現しており、GPR37 および GPR37L1 の発現性も膵島に広く観察された (図 5)。膵島における  $A_{2A}R$  の免疫染色像は非常に弱く、D2R の免疫染色像は GPR37 および GPR37L1 を強度に発現する細胞 (図 6) において認められることが明らかとなった。

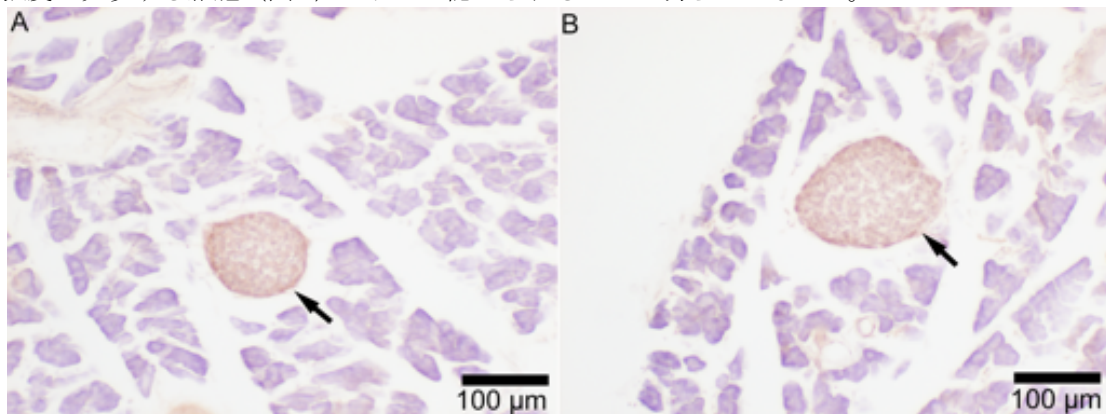


図 5. 膵島 (矢印) における GPR37 (A) および GPR37L1 (B) の免疫組織化学的染色像。

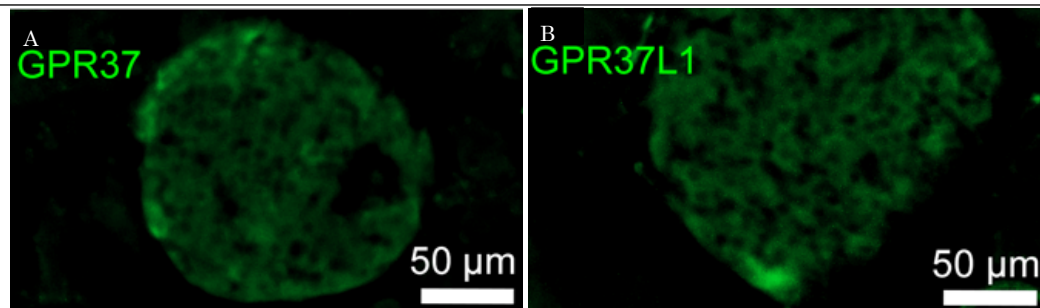


図 6. 膵島における GPR37 (A) および GPR37L1 (B) の蛍光免疫染色像。

以上より、内耳のプロサポシンは分泌型プロサポシンが優勢であること (9 塩基欠損型の特徴)、プロサポシンを感受できる細胞の存在 (受容体の発現性から)、そして細胞種によっては GPR37 および GPR37L1 は  $A_{2A}$  や D2R との発現性とは必ずしも一致しない、すなわちプロサポシンを受容するために働く可能性が高い (膵島における発現性から)、ことを鑑みると、プロサポシンは外傷性聴覚障害へ有用である可能性が高いことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>SARKAR Sonjoy, HOMMA Takeshi, ONOUCHI Sawa, SHIMIZU Yasutake, SHIINA Takahiko, NABEKA Hiroaki, MATSUDA Seiji, SAITO Shouichiro | 4. 巻<br>83        |
| 2. 論文標題<br>Expression of the G protein-coupled receptor (GPR) 37 and GPR37L1 in the mouse digestive system                               | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Veterinary Medical Science  | 6. 最初と最後の頁<br>1~8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1292/jvms.20-0603  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-         |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本間健志, Sonjoy Sarkar, 高木彩花, 尾之内佐和, 齋藤正一郎. |
| 2. 発表標題<br>消化器系におけるプロサボシン受容体GPR37およびGPR37L1の発現様式.   |
| 3. 学会等名<br>第125回日本解剖学会総会・全国学術集会                     |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sonjoy Sarkar, Sawa Onouchi, Takeshi Homma, Shouichiro Saito. |
| 2. 発表標題<br>The expression of GPR37 and GPR37L1 in the chicken inner ear. |
| 3. 学会等名<br>第162回日本獣医学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shouichiro Saito, Sonjoy Sarkar, Sawa Onouchi, Yasuro Atoji.   |
| 2. 発表標題<br>Expression patterns of vesicular glutamate transporters and nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 9 mRNAs in the chick inner ear. |
| 3. 学会等名<br>第124回日本解剖学会総会・全国学術集会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>齋藤 正一郎, 阿閉 泰郎.                         |
| 2. 発表標題<br>鳥類の聴覚受容器における小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性について. |
| 3. 学会等名<br>日本解剖学会第78回中部支部学術集会                     |
| 4. 発表年<br>2018年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小林 志織, 阿閉 泰郎, 尾之内 佐和, 齋藤 正一郎.                                       |
| 2. 発表標題<br>二ワトリ壺囊におけるニコチン性アセチルコリンレセプター 9サブユニットmRNA及び小胞性グルタミン酸トランスポーター3mRNAの局在. |
| 3. 学会等名<br>第161回日本獣医学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |