

機関番号：24303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791634

研究課題 (和文) 聴覚受容に重要な働きをもつ感覚系構成分子の代謝動態に関する研究

研究課題名 (英文) Research in the metabolic dynamics of the molecular component of the tip link, essential structure for hearing reception

研究代表者

坂口 博史 (SAKAGUCHI HIROFUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00515223

研究成果の概要 (和文)：内耳有毛細胞の機械電気変換に中心的な役割を果たす tip link 構造の障害からの再生過程を検証し、ほ乳類においても鳥類と同様に tip link が自然に再生する可能性を示した。また、この再生能は内毛細胞と外毛細胞とで差があることを示した。さらに tip link が成熟する時期に一致して外毛細胞の頂側面形態が特徴的な変化を生じることを示した。

研究成果の概要 (英文)：In the current study, we observed regeneration process of tip link, a key player for the mechanotransduction in inner ear hair cells, and showed its possible spontaneous regeneration in mammal, as same as previously shown in avian. Our data also suggested the difference in the regeneration potential between inner and outer hair cells. Moreover, we demonstrated that the morphology of the apical surface in outer hair cells achieves its specific shape during the period of the tip link maturation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：聴覚、内耳、蝸牛、有毛細胞、tip link、カドヘリン、cadherin 23、protocadherin 15、再生医療、機械電気変換、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

難聴は最も頻度の高い疾患の 1 つであり、

65 歳以上の 25-40%、75 歳以上の 40-66% が中等度以上の難聴であると推測

され、その多くは感音難聴である。また、中等度以上の先天性難聴は人口1000人あたり1人、うち半数が遺伝性感音難聴である。感音難聴はこのように頻度の高い疾患でありながら、有効な治療はごく限られており、その克服が可能となれば社会に大きな福音をもたらすことになる。

感音難聴の主要な原因の一つとして、内耳感覚細胞である有毛細胞の障害が挙げられる。近年、有毛細胞障害を克服する戦略として、幹細胞移植や遺伝子導入による細胞再生治療が注目されているが、これらの方法では非生理的な細胞を用いるため、腫瘍化や副次的機能獲得などのリスクが伴う。一方の治療戦略として、細胞の自律的な機能再生能を利用する方法が考えられる。例えば、有毛細胞頂側に存在する不動毛は機械電気変換(MET)の主要な場として機能しているが、その細胞骨格を形成するアクチンフィラメントは恒常的に代謝新生して不動毛の形態と機能を維持していることが知られている。このような細胞内分子の動的代謝は細胞の機能障害からの自然回復に寄与しているものと考えられ、そのメカニズムの解明は感音難聴に対する新たな治療の開発に結びつく可能性を秘めている。本研究は、特に聴覚受容の中枢を担う構造である感覚糸(tip link)に着目し、その動的代謝機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

tip link は不動毛同士を結合するフィラメントであり、不動毛の偏位により発生する張力を伝達して MET チャンネルを開口する、いわば聴覚受容の中枢を担う構造である。その分子組成は cadherin 23(CDH23)、protocadherin15(PCDH15)という二つのカドヘリンファミリーに属する細胞接着分子の非対称結合で形成されている。tip link の

破綻は遺伝性難聴のみならず、騒音性難聴や老人性難聴の発症に関わると推測されている。鳥類では tip link が破綻した後に再生することが報告されているが、ほ乳類では検証されておらず、同様の再生機構が確認されれば感音難聴克服への大きな手がかりとなる。

本研究の目的は、1) まず、ほ乳類における tip link 障害後の再生の可能性を検証することを目的とした。2) さらに、CDH23 と PCDH15 は生後発生期の幼弱な不動毛に広く分布し、developmental link と呼ばれる、いわば幼弱な tip link に相当する多数のフィラメント構造を形成している。tip link の構造的・機能的成熟が有毛細胞に与える影響を解明するために、tip link の成熟過程で細胞頂側面にいかなる変化が生じるかについても検討した。

3. 研究の方法

1) ラット蝸牛感覚上皮(コルチ器)を培養、Ca²⁺キレーター(BAPTA)で tip link を切断した後に、再度 Ca²⁺を含む培養液中で培養し、走査型電子顕微鏡(SEM)で観察して tip link 構造の再生を検証した。

(手法) 生後早期のラット(P4)蝸牛骨包から、実体顕微鏡下にコルチ器を摘出して、ポリフェノール蛋白でコーティングしたディッシュ上に DMEM 溶液中で 24 時間培養した。培養したコルチ器を 5mM BAPTA 溶液で 15 分間処理し、tip link を切断した後に、再度 Ca²⁺を含む DMEM 中で 48 時間培養した。組織を 2.5%グルタルアルデヒドで固定し、OTOTO 法によるコーティングを施した後に SEM で観察した。

2) developmental link は生後1週間で成熟した tip link へと変化することが知られている。tip link の成熟過程に相当する時期のマウスから蝸牛感覚上皮を摘出し、細胞間結合のマーカー

一であるZO-1で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて外有毛細胞頂側面形態の経時的变化を観察した。

(手法) 発生期のマウス(胎生(E)16〜生後

(P) 7日)の蝸牛骨包を4%パラフォルムアルデヒドで固定した後にコルチ器を摘出した。摘出組織をZO-1抗体ならびにAlexa488結合二次抗体で標識、Alexa568結合ファロイジンでアクチンの対比染色を行った後に、共焦点レーザー顕微鏡で外有毛細胞頂側面の形態を観察した。さらに、手法1)で用いたのと同様の培養系を用いて、5mM BAPTA溶液で15分間処理し、tip linkを障害した組織における外有毛細胞の頂側面の形態変化を観察し、tip linkの障害により細胞頂側面の形態に変化が生じるかどうかを調べた。

4. 研究成果

1) Ca²⁺キレーターでtip linkを切断した組織においては、tip linkと考えられるフィラメント構造は確認されず、tip linkを切断していない有毛細胞に比べて、不動毛先端は丸い形状を示した。次いで、Ca²⁺キレーターにより、いったんTip linkを切断した後に、再度Ca²⁺を添加して48時間回復させたコルチ器を観察した。外有毛細胞では不動毛先端のフィラメント構造は認められず、不動毛の先端は切断直後と同様に丸い形状を保っており、tip link構造は消失していると考えられた。これに対し、内有毛細胞では、一部で不動毛先端にフィラメント様構造が認められるようになり、さらに2列目以下の不動毛先端は鋭角をなす、いわゆるtenting構造を示していた。tenting構造はtip linkが発生する張力により2列目以下の不動毛先端の細胞膜が牽引されていることを示すと考えられていることから、内有毛細胞ではtip linkが再生している可能性が示された。

本研究の結果から、ほ乳類有毛細胞においてもtip linkが再生している可能性が初めて示された。tip link障害による感音難聴に対して、このようなtip link再生能を利用した治療が開発される可能性を示しており、意義の高い結果であると言える。また、今回の結果から、内有毛細胞と外有毛細胞ではtip linkの再生能に差がある可能性が示唆された。tip link障害が関与すると考えられる感音難聴において、内有毛細胞に比べて外有毛細胞の細胞死が多く認められることは良く知られており、tip linkの再生能の差異が関与している可能性が示唆される。さらにこの結果は、内有毛細胞と外有毛細胞におけるtip link関連分子の違いを解明することでtip link再生を促進する因子を同定できる可能性があることを示しており、tip link再生を利用した新たな治療法の開発に手がかりを与えるという点で意義深い。

2) tip linkの再生を考える上で、その機能的な成熟過程を把握することも必要である。そこでまず、tip linkの成熟過程において、細胞にどのような形態的变化が生じるかについて観察した。特に外有毛細胞の形態は他の上皮細胞に見られない特異なハート形の形態であり、不動毛の配置と関係が深い。さらに、その平面極性は、不動毛頂部に存在するtip linkの配置と一致していることが知られている。その形態形成とtip linkの成熟ならびに障害との関連を調べた。

E16〜E18のコルチ器では、外有毛細胞頂側面は一般の上皮細胞と同様の多角形を呈した。一方で、生後早期(P1〜P4)のコルチ器では外有毛細胞の頂側面は円形から楕円形を呈した。この形態変化は蝸牛基底回転で最初に認められ、経時的に頂回転方向に進むことが解明された。P5では蝸牛基底回転の

外有毛細胞で蝸牛軸側に陥凹する形態を示した(notch 形成)。その後、notch 形成は蝸牛長軸方向に沿って基底側から頂側に向かって観察されるようになり、P7 では蝸牛長軸の全長で notch 形成が認められた。画像解析による notch 形成の定量的評価を行ったところ、notch 形成部の細胞輪郭は P6 を境に、細胞外側に向かって凸面を形成する状態から凹面へと変化していることが判明した。この結果から、外有毛細胞の特徴的な形態は、P4~P7 の期間に蝸牛基底回転から頂回転へむけて段階的に成熟し、特に tip link 構造を含めた微細構造および細胞機能が成熟するとされる P6 で特徴的な形態を獲得することが判明した。同時期は developmental link が消失し、代わって成熟した tip link が形成される時期に相当することから、tip link の成熟が細胞頂側面の形態変化に関与する可能性が考えられた。

有毛細胞の頂側面はクチクラ板と呼ばれる厚いアクチンの板状構造で構成されており、細胞膜の輪郭の変化に伴ってクチクラ板もハート形へと形状が変化する。このようなクチクラ板のハート形は、外有毛細胞の V 字型の不動毛の並び方に類似していることから、link 構造の変化が不動毛内のシグナルを介して細胞頂側面に伝達され、アクチン骨格の再構築を促す可能性が示唆される。この可能性を検証するため、BAPTA を用いて tip link を障害した外有毛細胞の細胞頂側面を観察したところ、細胞間の接着は保たれていたにも関わらず、一部で notch の形状が失われていた。これは tip link を介して細胞骨格の制御が動的に行われている可能性を示す結果である。

細胞形態を変化させる他の因子として、アクトミオシン系、細胞間接着因子、チューブリンを初めとする他の細胞骨格系の変化が

考えられる。そこで、これらのシステムが有毛細胞成熟期にどのような変化を示すか、免疫染色を用いて評価した。その結果、アクトミオシン系の主体となる II 型ミオシンは細胞頂側直下に局在するが、notch 形成の部分に特に多く集積することはない、アクトミオシン系の収縮力が notch 形成に関わる可能性は否定的であった。蝸牛感覚上皮に局在することが知られる主要な細胞接着因子である E-cadherin は、胎生期から生後早期にかけては外有毛細胞-支持細胞間および支持細胞-支持細胞間の結合に広範に局在していたが、細胞の成熟とともに有毛細胞-支持細胞間からは欠失するようになり、完全に成熟した蝸牛上皮では支持細胞-支持細胞間にのみ局在することが判明した。しかしながら、notch 形成部での特異的な局在の変化は見られず、ハート形の頂側面形態への関与は否定的であった。チューブリンは支持細胞内に高発現し、有毛細胞では動毛に強く局在するが、やはり notch 形成部には特徴的な局在を認めず、関与は否定的であった。

以上の結果から、不動毛の配置ならびに tip link の方向性に従って、細胞頂側面の形態と平面極性が規定される可能性が示唆された。tip link には複数種の有毛細胞特異的ミオシンが結合していることが知られており、これらのミオシン複合体が発生する収縮力が不動毛の位置関係を制御し、さらに tip link の成熟が細胞内シグナルを介して不動毛の位置情報を頂側面に伝達し、その形態制御を行う可能性が考えられる。今回の結果は、tip link の新たな機能的側面を示すという点で意義深く、今後、我々が用いた蝸牛感覚上皮の器官培養システムを応用することで developmental link および tip link が細胞形態形成に与える影響の詳細が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1) Sakaguchi H, Tokita J, Müller U, Kachar B. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 17 388-393, 2009

2) Grillet N, Kazmierczak P, Xiong W, Shwander M, Reynolds A, Sakaguchi H, Tokita J, Kachar B, Müller U. The Mechanotransduction machinery of hair cells. *Sci Signal* 2 pt5, 2009

3) 藤田朋己、瀧正勝、坂口博史、鈴木敏弘、米村重信、久育男. 発生期コルチ器における頂側結合の経時的変化. *Otology Japan*. 20(4) 539, 2010

4) 坂口博史. 有毛細胞感覚糸(Tip Link)の再生と細胞頂側面形態形成への関与について. 上原記念生命化学財団研究報告集. 24.155, 2010

[学会発表] (計2件)

1) Fujita T, Sakaguchi H, Suzuki T, Hisa Y, Yonemura S. Morphological Development of the Reticular Lamina in the Perinatal and Postnatal Mouse. 33rd MidWinter Research Meeting of Association for Research in Otolaryngology, 2010 Feb 8, Anaheim, CA, USA

2) 藤田朋己、瀧正勝、坂口博史、鈴木敏弘、米村重信、久育男. 発生期コルチ器における頂

側結合の経時的変化. 日本耳科学会学術講演会. 平成22年10月8日. 松山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 博史 (Sakaguchi Hirofumi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：00515223

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし