

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791651

研究課題名（和文）新しい外リンパ瘻診断マーカー C T P の時空間的発現の検討

研究課題名（英文）Spatiotemporal expression of CTP, a novel biomarker of perilymphatic fistula, in the perilymph of rats.

研究代表者

新藤 晋（SHINDO SUSUMU）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00350067

研究成果の概要（和文）：

CTP(cochlin tomoprotein)は外リンパに豊富に存在する一方、内耳以外の組織から検出されないことから、外リンパ瘻の診断マーカーとして臨床応用が期待されている注目のタンパク質である。しかしその機能についてはほとんど解明されていない。我々は C T P の機能解明を目的として、ラット内耳発達過程における外リンパ中の C T P の発現パターンを時空間的に解析を行った。その結果、C T P は特徴的な発現パターンを示すタンパク質であることが解明された。

研究成果の概要（英文）：

The COCH gene mutated in DFNA9, an autosomal dominant hereditary sensorineural hearing loss and vestibular disorder, encodes Cochlin. Previously, we reported three bovine Cochlin isoforms, p63s, p44s, and p40s, which exhibit significant molecular heterogeneity in vivo. We have characterized Cochlin isoforms by generating four isoform-specific anti-Cochlin antibodies. The same three Cochlin isoforms, p63s, p44s, and p40s, were detected in human and cow inner ear tissue; however, p44s and p40s were not detected in perilymph. We identified a novel short 16kDa isoform in human perilymph and a 18-23kDa isoform in cow perilymph, named Cochlin-tomoprotein (CTP), corresponding to the N-terminus of full-length Cochlin (p63s) and the LCCL domain. Notably, CTP contains all of the known mutation sites associated with DFNA9.

In this study, we investigated the expression of cochlin isoforms in the inner ear tissues and perilymph during postnatal development of rats. By western blotting, no expression of CTP was detected in the inner ear tissues, and was increased in the perilymph during postnatal development. The expression of p63s was increased in the inner tissues, although expression of p63s was decreased in the perilymph during postnatal development. These results may suggest an important clue of The pathogenesis of DFNA9 is not fully clarified as yet, and this novel perilymph-associated CTP isoform might provide mechanistic clues to how mutations in the COCH gene damage the inner ear function.

交付決定額

(金額単位：円)

交付決定額	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：内耳基礎研究

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：perilymphatic fistula, CTP, inner ear

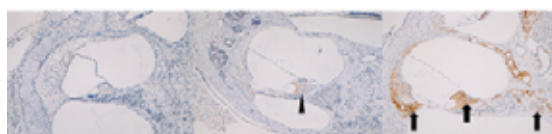
1. 研究開始当初の背景

我々は、非症候性遺伝性難聴の一つである DFNA9 の病因蛋白である Cochlin について先進的に研究を行ない、今までに )Cochlin が分子量の異なる 4 つのアイソフォーム ( p63s, p44s, p40s, CTP ) を持つこと。 ) Cochlin が内耳特異的タンパクであること。

) cochlin のアイソフォームの一つ CTP ( cochlin-tomoprotein ) が、外リンパに特異的に発現しており、陽性コントロール ( アブミ骨手術におけるアブミ骨底板開窓時の外リンパ ) の感度、特異度は、共に 100% 近い値を示すことから、外リンパ瘻の診断マーカーとして臨床応用が期待されている注目の蛋白であること。 ) cochlin が内耳の発達過程において、内耳の成熟とともに発現が増強すること、および発現部位特異性があること ( 図 1 - 3 ) などを報告してきた。しかしながら、CTP の基礎的研究はほとんど行なわれておらず、CTP が実際どのように存在し、どのような機能を持った蛋白など、詳細は不明である。さらに言えば、外リンパはヒトにおいても 150ul とごく微量しか存在しないことから、外リンパに存在するどの蛋白についてもほとんど研究されていない。

しかし、外リンパ瘻やライスネル膜の破綻などにより難聴、めまいを引き起こすことから、外リンパが内耳の恒常性を維持するために重要な役割は担っていることは以前から知られている。そこで我々は、外リンパに存在する CTP について詳細に調べることにより、cochlin アイソフォーム産生メカニズム、さらには外リンパの機能を明らかにする一助になるのではないかと考え研究をスタートさせた。

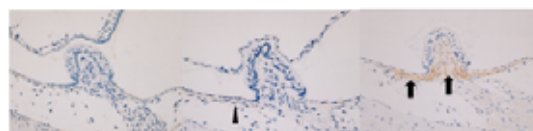
図1



生後6日目 生後16日目 成獣

図1:免疫染色(蝸牛)  
生後6日目ではほとんど染色されず、生後16日目になると、ラゼン板線やラゼン板帯に僅かに染色を認めるようになる(矢頭)。成獣では、ラゼン板線、ラゼン板帯だけでなく、蝸牛軸の神経線維の周囲も強く染色されるようになる(矢印)。

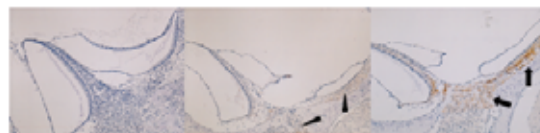
図2



生後6日目 生後16日目 成獣

図2:免疫染色(半規管膨大部)  
生後6日目では染色は認めない。生後16日目になると、暗細胞下の結合織に僅かに染色を認めるようになる(矢頭)。成獣では Stroma および暗細胞下の結合織とも強く染色されるようになる(矢印)。

図3



生後6日目 生後16日目 成獣

図3:免疫染色(耳石器)  
生後6日目では染色は認めない。生後16日目になると感覚細胞下の結合織および神経線維の周囲組織とも僅かに染色を認めるようになる(矢頭)。成獣では Stroma および暗細胞下の結合織とも強く染色されるようになる(矢印)。

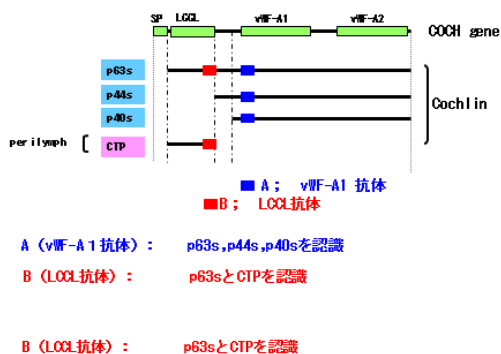
## 2. 研究の目的

内耳の成長に沿った CTP の発現パターンを解明することにより、CTP が内耳においてどのような役割を担っているか推測することを目的として研究を行なった。

## 3. 研究の方法

実験動物：生後 9 日齢、12 日齢、15 日齢、18 日齢、21 日齢、24 日齢、30 日齢、45 日齢、および成獣（70 日齢）の各日齢の wister rat を使用した。それぞれ深麻酔後に断頭し、その後速やかに内耳組織および外リンパを採取した。内耳組織は蛋白濃度の測定して蛋白濃度の均一化を図った後、すべての日齢の内耳組織および外リンパについて、p63s, p44s, p40s を認識する抗 vWF-A1 抗体と p63s と CTP を認識する抗 LCCL 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった（図 4）。

図 4



## 4. 研究成果

### (1) 実験結果 (図 5)

内耳組織における p63s, p44s は、従来の報告にもあるように、内耳が未成熟な生後 15 日目頃まではほとんど発現を認めないが、生後 18 日目頃から徐々に発現が増強していく所見が認められた。一方 CTP は、p63s, p44s が内耳において明らかに認められるようになる生後 18 日目頃から外リンパにおいて発現が認められることが明らかとなった。さらに興味深いことに、p63s は内耳組織において発現が明らかでない生後 9 日目には外リンパにおいて発現が強く認められ、内耳組織に発現が認められるようになる生後 18 日目以降は逆に発現が減少する傾向にあることが明らかになった。

図 5



### (2) 考察

内耳に特異的かつ多量に発現する cochlin は、内耳には欠かせないタンパクであることが推測されているが、その機能の詳細については未だに明らかになっていない。Cochlin は蝸牛において、ラセン靭帯やラセン板縁を始めとする内耳感覚細胞周囲の結合組織に発現を認めている。同部は、水やイオン輸送、グルタミン酸の代謝および炎症反応など多彩な役割を演じていることが分かってきていることに加え、イオン輸送などに重要な働きを担っている Na-K ATPase などの蛋白の発現が増強し、内耳機能が成熟に向かうラットの生後 20 日目頃に一致して cochlin の発現も増強していること、さらに cochlin は細胞外マトリックスとして type collagen に付着して存在していることから、cochlin は内耳の支持組織に発現し、内耳が成熟するために必要な蛋白であると推測されている。

今回新たに外リンパにおける cochlin アイソフォームの発現パターンを生後発達過程のラット外リンパを用いて実験を行なった。内耳組織をサンプルとした蛋白研究は盛んに行われているが、外リンパをサンプルとした蛋白研究はほとんど行われていない。今回の研究により、cochlin isoform の発現パターンが内耳組織と外リンパで大きく異なることが明らかとなった。cochlin はその構造に signal peptide を持つことから、前述した細胞外マトリックスだけでなく、分泌性蛋白の特徴を有していることを考えられていることから、産生された cochlin の一部もしくは全部が外リンパ（内リンパ）に放出される可能性、またその後はそのままの形でもしくは CTP と p44s, p40s に切断され、CTP は外リンパに、p44s, p40s は内耳感覚細胞周囲の結合組織に移動の後 type に沈着して機能を発揮する可能性が示唆された。今後さらに研究を進めることで cochlin の機能解明を進

めるとともに、今まであまり脚光をあびていない、外リンパの蛋白研究を行なうことで新たな知見が多く得られるものと考えられた。

#### 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)

[雑誌論文](計1件)

査読有 Shiiba S, Shindo S, Ikezono T, Sekine S, Matsumura M, Sekiguchi S, Yagi T, Okubo K: Cochlin expression in the rat perilymph during postnatal development. Acta Oto-Laryngologica. (in press)

[学会発表](計1件)

椎葉恭子・新藤 晋・池園哲郎・関根久遠・八木聡明. 生後ラット内耳における COCH 蛋白と遺伝子発現の比較 第 19 回日本耳科学会総会 2009 年 10 月 9 日 東京

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

新藤 晋 (Shindo Susumu)

埼玉医科大学・耳鼻咽喉科・講師

研究者番号: 00350067