

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07756

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを用いた遠位尿細管アシドーシスに伴う難聴発症のメカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of hearing loss associated with distal tubular acidosis

研究代表者

池内 真代（Ikeuchi, Mayo）

大分大学・医学部・医員

研究者番号：80865668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、遺伝性遠位尿細管性アシドーシスの原因遺伝子の一つである、ATP6V1B1バリエーションによるdRTAに伴う感音難聴の病態解析を行った。Ortholog遺伝子であるatp6v1ba欠損ゼブラフィッシュの内耳有毛細胞では、繊毛の脆弱化やオートファゴソームの形成が見られ、オートファゴソーム形成のマーカーであるLC3Bが強染色された。正常な酸性リソソームの標識に用いられる蛍光色素を用いたリソソーム染色では、リソソーム内部のpH調節の異常が確認され、リソソーム内のpH不均衡によるオートファジー不全と有毛細胞変性との関連を示し、この病態の理解と治療に新たな示唆を与えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼブラフィッシュモデルは、その透明性により内耳が直接可視化可能であり、創薬のin vivoスクリーニングにも十分な実績を持つことから、本疾患モデルは将来の新たな治療法開発にも貢献する可能性がある。本研究において作製したatp6v1ba欠損ゼブラフィッシュモデルやpHluorin2トランスジェニックモデルは、アシドーシスに関連した聴覚障害の疾患メカニズムや潜在的治療法をさらに研究するための貴重なツールとなりうる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the pathogenesis of sensorineural hearing loss associated with dRTA caused by the atp6v1b1 variant, one of the genes responsible for hereditary distal tubular acidosis. Ortholog gene, atp6v1ba-deficient zebrafish inner ear hair cells showed brittle cilia and autophagosome formation. LC3B, a marker of autophagosome formation, was strongly stained in hair cells. Lysosomal staining using the fluorescent dyes indicated a link between autophagy failure and hair cell degeneration due to pH imbalance inside lysosomes. Our research provided new insights into the understanding of this pathology and its treatment.

研究分野：小児科学

キーワード：遠位尿細管性アシドーシス 難聴 ゼブラフィッシュ リソソーム pH

1. 研究開始当初の背景

遠位尿細管性アシドーシス(distal renal tubular acidosis : dRTA)の原因遺伝子である *ATP6V1B1* 遺伝子は、ATP を加水分解して H⁺ を能動輸送する V-ATPase を構成する分子の一つである B1 サブユニットをコードする。V-ATPase は、腎の集合管に存在し、体液の酸塩基調整を行なう。このイオンポンプは内耳の内リンパ囊にも存在し、内リンパ囊の酸塩基平衡の調節に寄与していると考えられている。

dRTA で感音性難聴を発症する患児の多くは、前庭水管拡大症を合併する。その機序については不明であるが、dRTA 遺伝子の原因遺伝子である *ATP6V1B1* 遺伝子は内耳にも発現するため、内耳の酸塩基平衡に異常が生じている可能性を考える。dRTA の患者の難聴は不可逆性かつ進行性であり、有効な治療法は現在のところ確立されていない。平衡感覚の異常を来すこともあり、内耳機能の異常は、dRTA 患者の QOL を低下させる大きな要因となっている。

2. 研究の目的

研究代表者は、dRTA では *ATP6V1B1* バリエントにより V-ATPase の機能異常を生じ、内耳の内リンパの酸塩基平衡が保てず、前庭水管拡大症や難聴を来すと仮説を立てた。

内リンパの pH は主として H⁺ と HCO₃⁻ のイオン輸送により調節されており、pH の恒常性は聴覚の維持に重要な因子である。dRTA の前庭水管拡大症および難聴の発症に内リンパ液の pH 恒常性の異常が関与していることが解明できれば、イオン輸送の働きを補う創薬の開発へとつながる可能性がある。

そこで本研究では、*ATP6V1B1* 遺伝子バリエントによる生じる、内耳の内リンパ囊における pH 恒常性の異常と難聴発症のメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では *ATP6V1B1* 遺伝子変異による内耳の pH 調整機構への影響と、pH 異常による内耳の形態や機能への影響についてゼブラフィッシュを用いて検討する

(1) *atp6v1ba* ノックダウンゼブラフィッシュの解析

ヒト *ATP6V1B1* 遺伝子と相同性のあるゼブラフィッシュ *atp6v1ba* 遺伝子を解析対象とした。モルフォリノオリゴにより *atp6v1ba* 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュによる表現型の解析を行う。

(2) *atp6v1ba* 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製

DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる CRISPR/Cas9 システムを用いて *atp6v1ba* 遺伝子をゲノム編集する。これにより *atp6v1ba* 遺伝子欠損ゼブラフィッシュ (*atp6v1ba*^{-/-}) を作製し、内耳の構造変化を観察する。

(3) *atp6v1ba* 遺伝子改変ゼブラフィッシュの表現型確認

atp6v1ba 遺伝子改変ゼブラフィッシュにおける内耳構造や内耳の pH、内耳機能との関連を解析する。内耳構造の確認は、Leica microsystems の実体顕微鏡や走査電子顕微鏡により経時的に観察するほか、有毛細胞の免疫染色により有毛細胞の形態を観察する。

atp6v1ba 遺伝子改変ゼブラフィッシュの pH は、pH 感受性 GFP である pHluorin2 を発現させた pH センサーフィッシュ (Tg[ubi-pHluorin2]) の蛍光強度を測定し、ゼブラフィッシュの pH を評価する。

4. 研究成果

(1) *atp6v1ba* ノックダウンゼブラフィッシュの解析

モルフォリノオリゴによる *atp6v1ba* 遺伝子の発現を一時的に大きく低下させた *atp6v1ba* ノックダウンモデルでは、コントロールモルフォリノを micro injection した稚魚と比較して体長が短く、耳石が小さいことがわかった (図 1)。

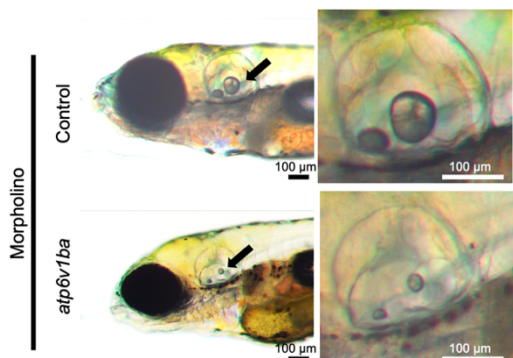


図1

(2) *atp6v1ba* 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製

Crispr/Cas9 システムを用いて、*atp6v1ba* 遺伝子欠損モデル (*atp6v1ba*^{-/-}) を作製し、シーケンス解析により 7 塩基欠失を確認した。

(3) *atp6v1ba* 遺伝子改変ゼブラフィッシュの表現型確認

受精後 5 日目の野生型と *atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) のゼブラフィッシュの稚魚を比較した。上の写真が野生型 (*atp6v1ba*^{+/+}) で、下の写真が *atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) である。

野生型に比べて *atp6v1ba* 欠損型は有意に体調が短く、耳石が小さいことが分かった (図 2A)。pH 感受性 GFP である pHluorin2 を全身に発現させた pH センサーフィッシュ (Tg[ubi-pHluorin2]) を用いて、野生型 (*atp6v1ba*^{+/+}) と *atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) の pH を比較すると、野生型 (*atp6v1ba*^{+/+}) よりも *atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) の pH が低かった (図 2B)。

野生型 (*atp6v1ba*^{+/+}) と *atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) 幼虫の pH の違いを 405/488 蛍光比を用いて定量化した。四角い領域は、卵黄嚢と同じ幅に位置する背側にあり、同部の 405/488 蛍光比は *atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) で低く、*atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) での pH 低下が確認された (図 2C)。

走査型電子顕微鏡による解析において、*atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) の有毛細胞層は野生型 (*atp6v1ba*^{+/+}) に比べ薄く、さらにはオートファゴソムの形成が見られた (図 2D)。

オートファゴソム形成のマーカである LC3B を免疫染色したところ、*atp6v1ba* 欠損型 (*atp6v1ba*^{-/-}) で強く染色され、オートファジー不全と有毛細胞変性が示唆された (図 2E, F)。

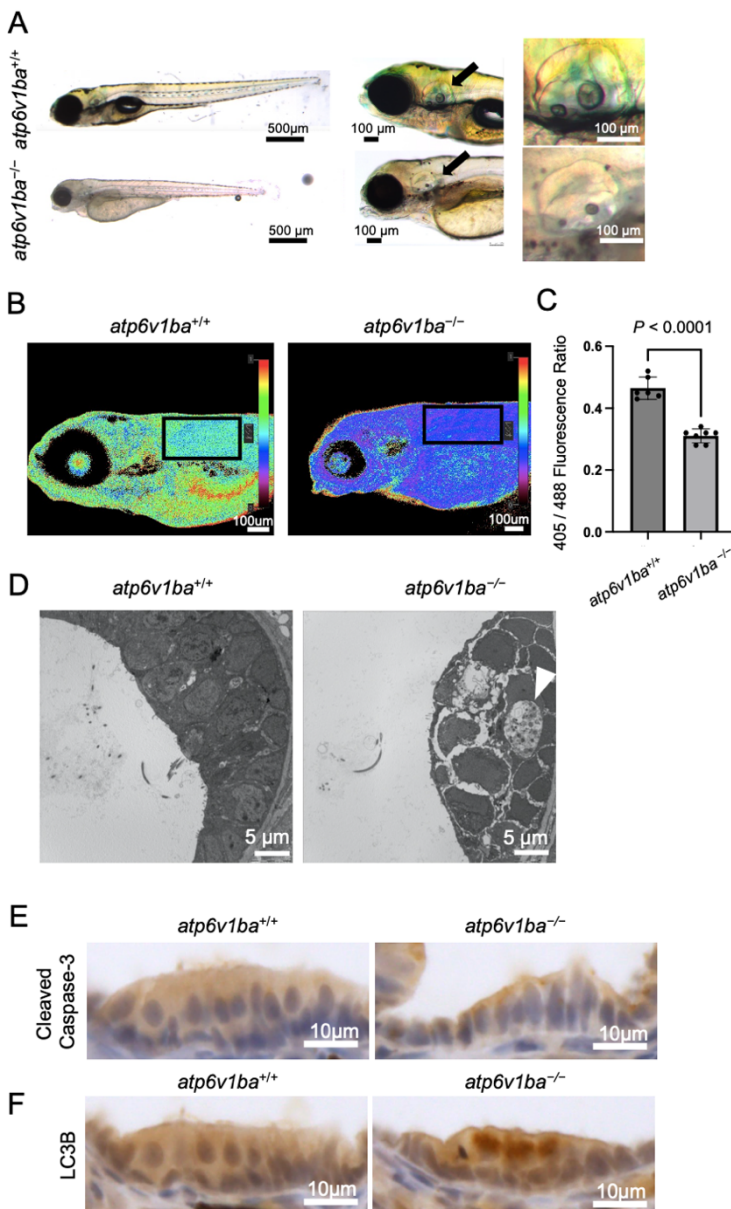


図2

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 Ikeuchi Mayo, Inoue Masanori, Miyahara Hiroaki, Sebastian Wulan Apridita, Miyazaki Shuya, Takeno Takashi, Kiyota Kyoko, Yano Shinji, Shiraishi Hiroshi, Shimizu Nobuyuki, Hanada Reiko, Yoshimura Akihiko, Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 699
2. 論文標題 A pH imbalance is linked to autophagic dysregulation of inner ear hair cells in Atp6v1ba-deficient zebrafish	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149551 ~ 149551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149551	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池内 真代
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of hearing loss associated with distal tubular acidosis
3. 学会等名 Asian Conference on Fish Models for Diseases2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池内 真代
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた遠位尿細管性アシドーシスの難聴発症メカニズム解明
3. 学会等名 日本生化学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池内 真代
2. 発表標題 遠位尿細管性アシドーシスに伴う難聴発症のメカニズム解明
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	井上 真紀 (inoue masanori) (20726913)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究 分担者	清田 今日子 (kiyota kyoko) (30774492)	大分大学・医学部・医員 (17501)	

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1件

国際研究集会 Asian Conference on Fish Models for Diseases2023	開催年 2023年～2023年
--	--------------------

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
---------	---------