

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592538

研究課題名(和文) マウス蝸牛におけるAPC蛋白の発現の検討 - アクチン配列の制御と障害回復との関係 -

研究課題名(英文) Expression of Adenomatous Polyposis Coli protein in the mouse cochlea.

研究代表者

香取 幸夫 (Katori, Yukio)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20261620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蝸牛の構成細胞、すなわち支持細胞と感覚有毛細胞は剛性と細胞の極性を保つ働きを担っている細胞骨格蛋白アクチン蛋白の配列を制御するAPC蛋白(大腸腺ポリープ蛋白)の発現部位を免疫組織化学法より検討した。マウス蝸牛でのAPC蛋白の局在を免疫蛍光抗体法により観察し、蝸牛軸付近の歯間細胞と、音刺激で振動する基板外側に位置する型線維細胞に強く発現することを明らかにした。一方、感覚有毛細胞やその近傍の支持細胞である柱細胞には成体において発現を認めず、APC蛋白以外の分子がアクチン配列の修飾に関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Actin is one of the important cytoskeletal protein which manage the structural integrity and polarity of sensory hair cell and supporting cell in the cochlea. Adenomatous polyposis coli (APC) protein is known to modulate arrangement of actin molecule, thus the APC protein may act an important role for the cochlear function. The localization of the APC protein in adult mice cochlea have been investigated using an immunofluorescence histochemistry. The APC protein is expressed in the interdental cell near the cochlear modiolus and in the type two fibrocyte located near the outer ridge of basilar membrane. In these area, APC protein could organize the structural integrity of the cochlear epithelium and basilar membrane. On the other hands, the APC protein was not investigated in both sensory hair cells and nearby supporting cells. In those cells of adult mice, the other molecules could modulate the arrangement and the polarity of the actin molecule.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛 聴覚 アクチン APC蛋白 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

内耳有毛細胞は聴覚・平衡覚の振動受容器であり、細胞頂面に備わる不動毛束の変異により非選択的陽イオンチャンネルの開閉頻度が変化して電氣的に興奮することが知られている。この有毛細胞の機械電気変換 (MET) の機能に関し、近年の国外諸家の研究では、不動毛の骨格をなすアクチン線維に裏打ちされた細胞膜貫通蛋白 cadherin 23 からなる有毛細胞の不動毛間架橋構造 (Tip link) が細胞膜上の METchannel に連結し、不動毛の変位に伴い Tip link がばね状に働き MET を調節する説が有力になっている。

また、不動毛の基部となる細胞頂面付近の cuticular plate や外有毛細胞が興奮した際に長軸方向に伸縮して音受容の機械的刺激を調節する細胞側壁の cortical lattice といった音受容機構の維持に重要な構造も、不動毛の中のアクチン線維とは異なる配列をもったアクチン分子から構成されていることが明らかになっている。しかしながら、内耳有毛細胞において、これら精緻なアクチン分子の配列を制御、維持する機序に関しては未だに明らかになっていない。

一方、近年腸管上皮で同定されている Adenomatous polyposis coli (APC) 蛋白は、アクチンや微小管などの細胞骨格蛋白の形態や極性の維持に重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、内耳とりわけ器官形成後の蝸牛における APC 蛋白の発現は明らかにされていない。アクチン分子の配列を規定する APC が有毛細胞の機能障害の際にどのように発現するかを明らかにし、APC の有毛細胞の形態維持と修復への関与を検討することは、蝸牛レベルでの難聴の解明、さらには難聴の治療に役立つものと考えられる

2. 研究の目的

蝸牛を構成する感覚有毛細胞と支持細胞内のアクチン分子の配列や維持の調整を行っていることが推察される APC 蛋白の局在を免疫組織化学法により明らかにする。騒音不可や薬剤投与により様々な難聴モデル動物を作成することが可能なマウス成体を用い、APC 蛋白の局在を安定して同定できるようにした後に、発生時期の動物や難聴の障害モデル動物に対して実験を進めて、APC 蛋白が蝸牛のアクチン分子の配列や構成細胞の極性が形成ないし損傷が行われる際に、どのように発現が変化するかを明らかにする。

3. 研究の方法

動物実験倫理指針に従いマウスを深麻酔の後に 4%パラホルムアルデハイド溶液を用いて心血管還流固定する。蝸牛を含む側頭骨を採取し、0.12M EDTA 溶液により脱灰を行った後、パラフィン包埋ないし凍結処理を行い、それぞれパラフィン組織切片ないし凍結組織切片を作成する。また、脱灰以降の組織処理を行わず、マウス蝸牛の感覚上皮を直接検鏡する surface preparation method も行った。

得られた蝸牛の組織切片を用い、一次抗体として市販の抗 APC 蛋白抗体、二次抗体としては HRP および蛍光標識した抗体を用いて免疫組織化学法を行った。

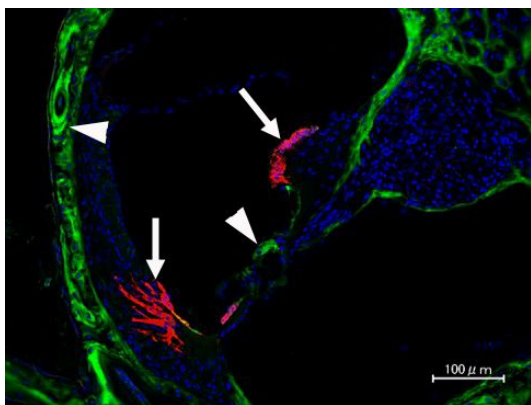
4. 研究成果

マウス蝸牛で安定した染色を示す市販抗体 (Santa Cruz, APC (C20): sc-896) と染色条件を同定した。図 1 に示すように、成体マウスでは蝸牛軸付近の歯間細胞と、音刺激で振動する基板外側に位置する型線維細胞に強く発現することを明らかにした。一方、マウス前庭耳石器の有毛細胞では APC 蛋白の陽性所見が認められる (図 2) にも関わらず、蝸牛の感覚有毛細胞やその近傍の支持細胞である柱細胞には成体において発現を認めず、APC 蛋白以外の分子が

アクチン配列の修飾に関与している可能性が考えられた。現在、音響暴露により酸化ストレスを加えたマウスならびに内耳器官形成期すなわち胎生後期から生後2週間までの個体での発現を検討しているが、まだ安定した所見は得られていない。

また、本研究の聴覚障害モデル動物を作成する準備過程で中耳腔に耳毒性を示す可能性のある薬剤投与実験を付随して行った。成体マウスの鼓室内に中耳～外耳の MRSA 感染症の際に用いられる daptomycin や、内視鏡を用いた手術や検査の際に内視鏡の先端に付ける曇り止め溶液である ultrastop solution など、耳鼻咽喉科疾患の臨床で用いる薬剤の投与を行い、聴力障害や蝸牛組織の損傷を検討した。これらの薬剤の投与後には聴性脳幹反応検査において高度難聴が認められ、組織学的観察では内耳蝸牛の感覚有毛細胞の脱落が認められた。これらの結果を次項に記す論文に発表している。

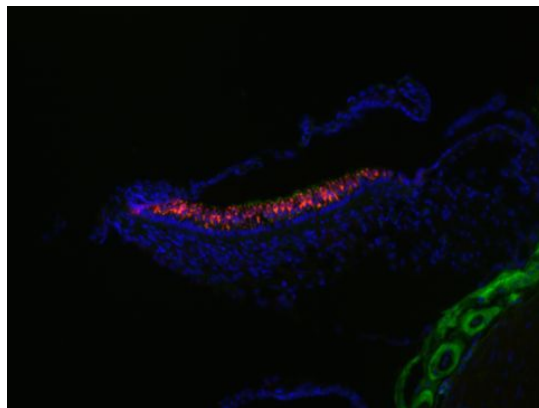
< 図 1 >



成体マウス蝸牛切片を用いた、抗 APC 蛋白抗体（2 次抗体で赤色に発色）ならびに本実験の陽性対照として用いた抗 myosin7a 抗体（2 次抗体で緑色に発色）による免疫組織染色像。APC 蛋白は蝸牛軸付近の歯間細胞（写真中央上方矢印）と基底版外側近くに位置する型線維細胞（写真左下方矢印）に陽性所見を呈した。一方、写真中央部の有毛細胞を含む蝸牛感覚上皮には APC 蛋白に対する陽性所見を認めない。

myosin7a では内有毛細胞（写真中央矢頭）と血管条の構成細胞（写真左上方矢頭）が過去の報告に合致して染色されている。

< 図 2 >



成体マウス前庭耳石器（球形嚢）の免疫染色像。APC 蛋白の陽性所見が感覚上皮の有毛細胞に一致して認められる（写真中央部）。

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2件)

Oshima H, Nomura K, Yamazaki M, Suzuki J, Kawase T, Kobayashi T, Katori Y. Ototoxic effect of daptomycin applied to the guinea pig middle ear. *Acta Otolaryngol.* 134(7):679-683, 2014. (査読有)

Nomura K, Oshima H, Yamauchi D, Hidaka H, Kawase T, Katori Y. Ototoxic effect of Ultrastop antifog solution applied to the guinea pig middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 151(5):840-844, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Nomura K, Oshima H, Yamauchi D, Hidaka H, Kawase T, Katori Y. Ototoxic effect of Ultrastop antifog solution applied to the guinea pig middle ear. AAO-HNS annual

meeting, Orland, USA. (2014 年 9 月 24
日、ポスター発表)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

香取 幸夫 (KATORI YUKIO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20261620

(2)研究分担者

川瀬 哲明 (KAWASE TETSUAKI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：50169728

工藤 貴之 (KUDO TAKAYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80451590