

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861527

研究課題名(和文) 蝸牛外有毛細胞シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Signal transduction mechanism in cochlea outer hair cell

研究代表者

木谷 令 (KITANI, Rei)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80436047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：まずはモルモット蝸牛から得られたコルチ器または急性単離したOHC(外有毛細胞)に作用させその形態変化をビデオ録画し経時的に解析するための準備としてのシステム構築が完了した。OHCにコレステロール除去薬を作用させるとOHC細胞長は短縮し細胞幅は大きくなる。ところが一方、コレステロールをOHCに作用させた場合は、細胞長が変化することはなかった。ROCK inhibitorであるY-27632などを投与しても細胞長自体に変化はなく、コレステロール除去による細胞長変化の度合いを変えることもなかった。このことは膜脂質の増減が細胞骨格に影響するがそのシグナル伝達経路は単一ではないことが推察される。

研究成果の概要(英文)：Outer hair cells (OHCs) were isolated from young albino guinea pig cochlea, observed with IX-73 microscope (OLYMPUS, Japan). Cell images were analyzed off-line using and further processed using Sigmaplot software (Systat Software, CA). Cholesterol depletion using methyl-beta-cyclodextrin shortened and widened OHC length, while cholesterol loading never changed in OHC length. Y-27632 as ROCK inhibitor changed neither in OHC length nor in shortening rate of OHC length induced by osmotic change and cholesterol depletion. This suggest that cholesterol and cell membrane lipid could affect the regulation of cytoskeleton, however, the pathway of signal transduction via lipid raft in OHC might be complex.

研究分野：聴覚

キーワード：外有毛細胞 コレステロール 脂質二重膜 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のコルチ器にある外有毛細胞 (Outer Hair Cell, OHC) は円筒状の特徴的な構造を有している。これはアクチンとスペクトリンによる網目構造を主体とした細胞骨格と、ピラーと呼ばれる膜と骨格をつなぐ微小構造に基づき形態維持される (図 1)。

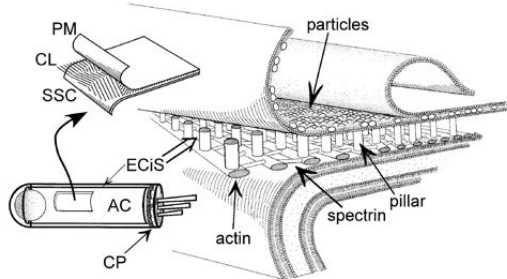


図 1 外有毛細胞膜表面の構造

この特殊かつ単純な形状は細胞形態を計測するのに適しており、近年の様々な画像解析ツールの進化とともに OHC の経時的形態学的評価は簡便に行われるようになってきている。

細胞内電位の変化により OHC はマイクロ秒からミリ秒のスケールで伸縮運動を繰り返し、聴覚における周波数弁別能を適宜コントロールしている (fast motility, electromotility) が、一方 OHC は浸透圧変化や細胞外カリウム濃度といった刺激に対しても、まるで外界の環境へ適応するかのように数秒単位で伸縮する (slow motility)。近年コレステロールが OHC に与える効果がパッチクランプ法を用いて電気生理学的に検討されるようになり、コレステロールの増減が OHC 側壁に存在するモータータンパク prestin の効力に影響を与え、fast motility を変化させることがわかっている。対してコレステロールが slow motility に与える効果については未だよくわかっていない。

本申請者らは Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) などのコレステロール除去薬により OHC 細胞長が短縮することを観察しており、これはすなわち細胞膜の変化が OHC 内シグナル伝達を介して細胞骨格を変化させ、slow motility のみならず、fast motility にも間接的に影響を与えうることを示唆している。

2. 研究の目的

コレステロールはすべての細胞に存在する脂質二重膜の重要な構成要素であるだけでなく、膜上に点在するマイクロドメインの主要成分でもある。このコレステロールの豊富なドメインは種々の細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っていることが示唆されており、細胞膜コレステロールの増減は聴覚、特に OHC が密接に関与する蝸牛増幅機構に変調を与える可能性についての報

告がパッチクランプ法を用いた研究にていくつか示されるようになり、OHC 膜コレステロールの増減が OHC の電氣的運動能に影響を与えることがわかってきた。本研究ではコレステロールを中心とした OHC 内シグナル伝達の役割を解析し、それらが聴覚に与える影響について模索する。

3. 研究の方法

まずコレステロールをはじめとした細胞膜重要構成成分や膜脂質除去薬を、モルモット蝸牛から得られたコルチ器または急性単離した OHC に作用させ、数秒にわたるその形態変化を直接ビデオ録画し、経時的に解析する。OHC 細胞内シグナル伝達の仕組みを解明するべく本研究では特に Rho ファミリー及び RhoA ROCK LIMK カスケードに着目しコレステロールとともに RhoA inhibitor や ROCK inhibitor などを加えることによりさらに形態学的・分子生物学的検討を重ねる。

4. 研究成果

まずはモルモット蝸牛から得られたコルチ器または急性単離した OHC (外有毛細胞) に薬剤など作用させその形態変化をビデオ録画し経時的に解析するための準備としてのシステム構築が初年度に完了した。OHC にコレステロール除去薬である Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) を作用させるとこれまでの報告どおり OHC 細胞長は短縮し細胞幅は大きくなる (図 2)。

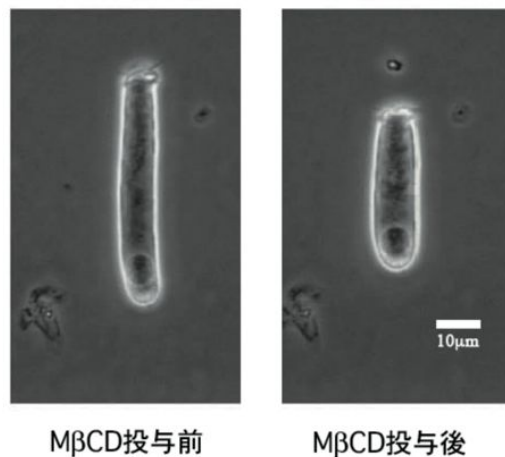


図 2 MβCD 投与による OHC の形態変化

また、この細胞長変化は MβCD 濃度依存性であった (図 3)。ほかの生体内の細胞と同様に OHC でも外界の浸透圧の変化によって形態は変化することが知られおり、この MβCD 投与による変化は細胞外浸透圧増加に伴う形態変化に酷似している。これまで報告されているパッチクランプ法を用いた検討では浸透圧変化に伴う Non linear capacitance の変化は形態変化に伴うもの、すなわち細胞内圧の変化によってもたらされることが知られている。

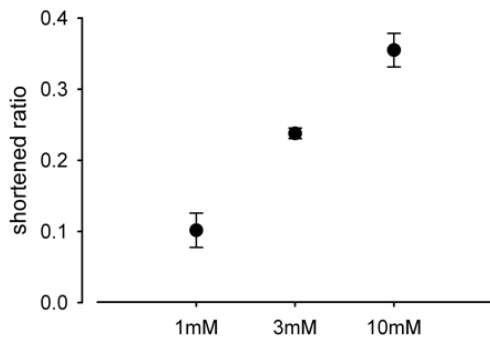


図3 M CD投与によるOHC細胞長変化

浸透圧変化に伴う slow motility と fast motility の変化は parallel であり、M CD 投与による細胞膜コレステロールによりもたらされる変化もそれと同じようなものかどうか検討した。コレステロール (cholesterol-water soluble) を OHC に作用させた場合は、OHC 細胞長は変化せず、M CD により短縮した細胞長が再び伸長することもなかった。このことは、膜脂質の増減により変化するモータータンパク prestin の効力は可逆的であるという諸家によるパッチクランプ法を用いた電気生理学的検討とは異なっている。つまり、膜脂質の増減による slow motility と fast motility の変化は別々のメカニズムによって制御されており、前者はおそらく actin を中心とした細胞骨格の変化により、後者は prestin の働きによるものである。

また膜脂質の減少による細胞形態変化を制御する経路として RhoA ROCK LIMK カスケードが注目されているが、ROCK inhibitor である Y-27632 など投与しても細胞長自体に変化はなく、コレステロール除去による細胞長変化の度合いを変えることもなかった。膜脂質の増減は細胞骨格に影響するがそのシグナル伝達経路は単一ではないことも推察される結果であった。

膜脂質の増減によるこれらの結果、すなわち slow motility, fast motility いずれもが非常に大きな変化であるにもかかわらず別々の経路により制御されているであろうことは独特な現象である。またそのように大きな変化が見られるにもかかわらず高脂血症と難聴の関係はいまだに解明されておらず、外リンパ液中の脂質の直接的な測定や高脂血症モデルを用いた動物実験などが今後必要になってくると思われる。

<引用文献>

Rei Kitani, Seiji Kakehata, Federico Kalinec
 Motile responses of cochlear outer hair cells stimulated with an alternating electrical field
 Hear Res (2011) Oct;280(1-2):209-18
 Rei Kitani, Channy Park, Federico

Kalinec
 Microdomains Shift and Rotate in the Lateral Wall of Cochlear Outer Hair Cells
 Biophys J. (2013) Jan 8;104(1):8-18.

Rei Kitani, Federico Kalinec
 Investigating outer hair cell motility with a combination of external alternating electrical field stimulation and high-speed image analysis
 J. Visualized Exp (2011) Jul 18;(53). pii: 2965. doi: 10.3791/2965.

Nozomu Matsumoto, Rei Kitani, Federico Kalinec
 Linking LIMK1 deficiency to hyperacusis and progressive hearing loss in individuals with Williams syndrome.
 Commun Integr Biol (2011) Mar; 4(2): 208-10.

Nozomu Matsumoto, Rei Kitani, Anastasiya Maricle, Melissa Mueller, Federico Kalinec
 Pivotal role of actin depolymerization in the regulation of cochlear outer hair cell motility
 Biophys J. (2010) Oct 6; 99(7): 2067-76.

Takahiko Nagaki, Seiji Kakehata, Rei Kitani, Takahisa Abe, Hideichi Shinkawa
 Effects of cholesterol alterations are mediated via G-protein-related pathways in outer hair cells
 Pflugers Arch. (2013) Jul;465(7):1041-9.

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

木谷 令 (KITANI,Rei)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80436047