

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462551

研究課題名(和文) アミノグリコシド系抗菌薬の内耳有毛細胞への侵入経路の解明に基づく内耳保護の試み

研究課題名(英文) Systemic Fluorescent Gentamicin Enters Neonatal Mouse Hair Cells Predominantly Through Mechanoelectrical Transduction Channels

研究代表者

川島 慶之 (KAWASHIMA, Yoshiyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10376759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：全身投与されたアミノグリコシド系抗菌薬(AG)は内耳有毛細胞に取り込まれ難聴を引き起こすが、生体内におけるAGの有毛細胞への進入経路の詳細は解明されていない。Texas-Red 標識ゲンタマイシン(GTTR)を全身投与した際に、MET欠損マウスであるTmc1;Tmc2 ダブルノックアウトマウスの有毛細胞へのGTTRの取り込みは、野生型に比較し有意に少なく、またダブルノックアウトマウスをバックグラウンドにTMC1をモザイク状に発現させた感覚上皮では、モザイク状の取り込みを認めたことから、全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬の有毛細胞への主な進入経路は MET チャンネルであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Systemically administered aminoglycoside antibiotics enter the inner ear hair cells and trigger apoptosis. However, the in vivo mechanisms by which aminoglycoside antibiotics enter hair cells remain controversial. Transmembrane channel-like 1 (TMC1) and TMC2 are essential for MET and are components of the stereocilia MET channel complex. The present study aimed to clarify that systemic fluorescent gentamicin enters mouse hair cells through MET channels. Gentamicin-conjugated Texas Red (GTTR) or PBS was subcutaneously injected into Tmc1^{-/-};Tmc2^{-/-} mice and wild-type mice at postnatal day 0 (P0), P2, P4, or P6. In Tmc1^{-/-};Tmc2^{-/-} mice, the intensity was mostly stable from P0 through P6. In wild-type mice, the GTTR fluorescent intensity gradually increased with the development of hair cells. The increase in the GTTR intensity in wild-type mice coincided with the spatiotemporal onset of MET. These results provide evidence that AGs enter hair cells predominantly through MET channels.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳 有毛細胞 アミノグリコシド系抗菌薬 TMC1 TMC2

1. 研究開始当初の背景

(1) アミノグリコシド系抗菌薬 (以下、AG) は副作用として用量依存性の内耳毒性を示し、不可逆性の内耳障害を引き起こす。内耳障害の発症機序として、有毛細胞内に取り込まれた AG によりフリーラジカルが発生し有毛細胞にアポトーシスが引き起こされることが分かっている。しかし、AG の有毛細胞内への侵入経路に関しては、*in vitro* の実験において、エンドサイトーシスにより有毛細胞内に取り込まれるとする報告 [1] と、主に機械電気変換イオンチャンネル (Mechanoelectrical transduction channel、以下 MET チャンネル) から侵入するとする報告 [2] があり、未だ議論が分かれる。さらに、*in vivo* での AG の有毛細胞への侵入経路は不明である。

(2) 研究代表者 (川島) らは、ヒトの非症候群性遺伝性難聴の原因遺伝子である *TMC1*、およびそのパラログ遺伝子である *TMC2* のノックアウトマウスを作製し、ダブルノックアウトマウス (*Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-}) の有毛細胞は正常な形態の感覚毛を持つにも関わらず完全に MET 電流を欠くこと [3]、さらに *Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-} から外植した有毛細胞に外因性の *TMC1*、*TMC2*、または点突然変異 *TMC1*^{Bth} を発現させると、それぞれ異なるカルシウム透過性、MET 電流が計測されることを基に、*TMC1* および *TMC2* は MET チャンネルの構成要素であることを明らかにした [4]。さらに *Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-} から外植した有毛細胞は AG を取り込まず、AG に暴露後も感覚毛は保たれ AG による内耳毒性に対し耐性を持つことを報告した [3]。また、外植した野生型の内耳感覚上皮に FM1-43 を投与すると一瞬にして有毛細胞内で蛍光が観察されるが、*Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-} の有毛細胞は、BAPTA で tip link を切断した野生型の有毛細胞と同様に FM1-43 では蛍光が観察されないことを報告した [3]。また、外植した野生型の内耳感覚

上皮に FM1-43 を投与すると一瞬にして有毛細胞内で蛍光が観察されるが、*Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-} の有毛細胞は、BAPTA で tip link を切断した野生型の有毛細胞と同様に FM1-43 では蛍光が観察されないことを報告した [3]。

2. 研究の目的

MET チャンネルノックアウトマウスを用いて *in vivo* での AG の有毛細胞への侵入経路を解明する。

3. 研究の方法

(1) 使用した動物

胚性幹細胞の相同的遺伝子組換えにより作製された *Tmc1* ノックアウトマウス (*Tmc1*^{-/-})、*Tmc2* ノックアウトマウス (*Tmc2*^{-/-})、ダブルノックアウトマウス (*Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-})、および *Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-} の X 染色体上に mCherry で標識した *Tmc1* を導入した BAC トランスジェニックマウスである *Tmc1*-mCherry line3 マウス (*Tmc1*-mCherry) を NIDCD/NIH の Dr. Andrew Griffith より譲り受けた。遺伝子型は、尾の先端組織から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法にて判定した。コントロールとして日本クレア株式会社より購入した C57BL/6 の野生型マウスを用いた。0 日齢 (P0) から P6 までのマウスを使用し、野生型と *Tmc1*^{-/-};*Tmc2*^{-/-} の性別は問わず、*Tmc1*-mCherry は *Tmc1* がモザイク発現する雌のみを使用した。なお本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会より動物実験計画 (承認番号 0170300A)、同大学遺伝子組み換え生物等実験安全委員会より遺伝子組み換え生物等実験計画 (承認番号 2013-073C) の承認を受けたうえで行われた。

(2) 薬剤の投与と蝸牛の解剖

マウスにゲンタマイシン (GM) もしくは Texas-Red 標識ゲンタマイシン (GTTR) を全身投与し、3 時間後もしくは 24 時間後に安楽死させた。コントロールのマウスには PBS を投与

した。

マウスの蝸牛をPBS内で取り出し4%PFAで1時間浸漬固定してから感覚上皮を取り出した。P6のマウスは4% PFAで内耳灌流固定した後に同様に浸漬固定した。PBSで洗浄後、ライスネル膜、蓋膜を取り除いてから0.5%tritonX-100で20分間透過処理した。

*In vitro*でのFM1-43の有毛細胞への取込を評価する際には、安楽死させた後、直ちに Leibovitz's mediumの中で蝸牛を取り出し、骨壁、ラセン靭帯、血管条を取り除いた上で HBHSS-Ca (HBSS 50 ml + 1M HEPES 500 μ l + 2M CaCl_2 32.5 μ l)で調製した5 μ M FM1-43に10秒間浸漬した。HBHSS-Ca で洗浄した後、4% PFA で1時間固定してからPBS中で蝸牛軸から感覚上皮を取り外してライスネル膜、蓋膜を取り除いた。これをAlexa647 Phalloidin in 0.5% tritonX-100で20分間染色した。

(3) 免疫染色

染色の前に2% Albumin Bovine Serumで30分間ブロッキングした。1次抗体にはウサギポリクローナル抗Myosin 抗体、またはマウスモノクローナル抗GM 抗体を使用し、室温にて1時間浸漬した。二次抗体にはAlexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ抗体 (1:500)、Alexa Fluor 568標識ヒツジ抗マウス抗体 (1:500)、またはAlexa Fluor 405標識ヒツジ抗ウサギ抗体 (1:500) を用いて、室温にて30分間浸漬した。各染色の後にPBSで十分な洗浄を行った。

(4) 封入・顕鏡

染色した感覚上皮はProlongで封入した。全ての画像の撮影はLeica社の共焦点レーザー顕微鏡TCS SP8で行い、63倍の対物レンズを用いた。蝸牛の頂部から基底回転に向かって約180°、360°、540°の部位を頂回転、中間回転、基底回転と規定し、各部位より内有毛細胞および外有毛細胞を撮影した。この際、Myosin の染色像から有毛細胞の核の位置を確認し、核と頂上膜の間の細胞質を撮影した。

(5) GTTRの蛍光強度の測定とデータの解析
Photoshop CS6 と ImageJ を用いて有毛細胞内のGTTRの蛍光強度を解析した。初めにImageJのAuto Threshold 機能 (Huang) を用いてMyosin の染色像を二値化し、有毛細胞の範囲を規定し面積を求めた。次に、Myosin VIで規定された有毛細胞の範囲内のGTTRの蛍光強度を測定し、有毛細胞内の単位面積当たりのGTTRの蛍光強度を算出した。統計検定にはJMP 10を用い、有意水準を5%とした。ANOVAで有意差を認めただけにはTukey-kramerのHSD検定を行った。

4. 研究成果

(1) 全身投与したGMおよびGTTRの有毛細胞への取り込み

はじめに、全身投与したGMが生後早期のマウスの有毛細胞に取り込まれるか検討した。P4の野生型マウスにGM (300 mg/kg)を全身投与し、24時間後に安楽死させた。蝸牛の感覚上皮を取りだし、GMの免疫活性を調べた。GMを全身投与したマウスでは有毛細胞内にGMの免疫活性を認め、細胞全体が染まっているだけでなく斑点状に凝集しているような蛍光も見られた。一方、コントロールでは有毛細胞内にGMの免疫活性を認めなかった。

次に、全身投与したGTTRが生後早期のマウスの有毛細胞に取り込まれるか検討した。P4の野生型マウスにGTTR (2 mg/kg)を全身投与し、24時間後に安楽死させた。GTTRはGMと同様に有毛細胞内に取り込まれた。

(2) *Tmc1* ; *Tmc2* の有毛細胞へのGTTRの取り込み

P4の野生型マウスおよび*Tmc1* ; *Tmc2* マウスにGTTR (2 mg/kg)を全身投与し、3時間後に安楽死させた。野生型の有毛細胞にはGTTRの取り込みを認めたが、*Tmc1* ; *Tmc2* の有毛細胞には明らかなGTTRの取り込みを認めなかった。

(3) 日齢と有毛細胞へのGTTRの取り込み量の推移

内耳メカノトランスダクションは、基底回転ではP0から頂回転ではP2から機能開始し、その後、最大メカノトランスダクション電流は数日に渡り上昇する。内耳メカノトランスダクションの発達と有毛細胞へのGMの取り込みの関連を調べるために、P0、P2、P4、P6の野生型と*Tmc1* ; *Tmc2* マウスにGTTR (2 mg/kg) またはPBSを全身投与し、3時間後に安楽死させた。感覚上皮を取り出し、有毛細胞内の単位面積当たりのGTTRの蛍光強度 (任意単位: AU) を測定した。

野生型、*Tmc1* ; *Tmc2* とともに、P0からP6までいずれに日齢においても、GTTR投与群はPBS投与群と比較してGTTRの蛍光強度が高かった。GTTRを投与した野生型では、P0からP4まで日齢が進むにつれ蛍光強度が上昇した。頂回転ではP6まで蛍光強度が上昇したが、中間回転、基底回転ではP4からP6にかけて低下した。一方、GTTRを投与した *Tmc1* ; *Tmc2* では、頂回転から基底回転までいずれの部位でもP0からP6まで蛍光強度の上昇する傾向は認められなかった。野生型と*Tmc1* ; *Tmc2* を比較すると、P0では基底回転を除き蛍光強度に有意差を認めなかったが、P2では頂回転を除き、P4以降はいずれの部位でも野生型で蛍光強度が有意に高かった。

(4) メカノトランスダクションモザイク発現マウスにおけるGTTRの有毛細胞への取り込み

Tmc1 ; *Tmc2* マウスの有毛細胞へのGTTRの取り込みが野生型と比較して有意に少なかった原因として、内耳迷路路のホメオスタシスの障害が関与している可能性が考えられた。そこで、個体内でメカノトランスダクションを発現する有毛細胞と発現しない有毛細胞が混在する *Tmc1*-mCherryマウスにおけるGTTRの取り込みを調べた。P4の*Tmc1*-mCherryマウスの雌にGTTR(2mg/kg)を全身投与した。3時間後に安楽死させて直ちに感覚上皮を取り出し、

FM1-43に10秒間浸漬させた。スチリル色素であるFM1-43は *in vitro* において、METチャンネルを通して短時間に大量に有毛細胞内に取り込まれ、細胞内で強い蛍光を発する¹¹。固定後、phalloidin-Alexa488および Myosin -Alexa405で染色を行い共焦点顕微鏡で観察を行った。

Phalloidin染色および MyosinVI染色では、いずれの有毛細胞も聴毛および細胞体に明らかな形態異常を認めなかったが、GTTRを取り込む細胞と取り込まない細胞が混在していた。GTTRを取り込んだ細胞とFM1-43を取り込んだ細胞は完全に一致していた。

今回我々は、MET チャンネルの構成分子をコードする *Tmc1* および *Tmc2* の遺伝子改変マウスを用いて検討を行い、*in vivo* においてAGは主にMETチャンネルを介して内耳有毛細胞に取り込まれていることを明らかにした。この根拠として以下の4つの実験結果を示した。(1) 野生型の有毛細胞と比較しMETが機能していない有毛細胞ではGTTRの取り込み量が大きく減少した。(2) METが機能していないP0の頂回転および中間回転ではMET欠損有毛細胞と野生型有毛細胞でGTTRの取り込みに差を認めなかった。(3) METを欠損したマウスではGTTRの取り込み量に日齢による変化がみられなかったのに対し、野生型のGTTRの取り込み量は最大METチャンネル電流の上昇時期に一致して増加した。(4) 一個体内においてもMET機能している細胞はGTTRを取り込むが、MET機能を失っている細胞にはGTTRの取り込みは認められなかった。

<引用文献>

- Hashino E, Shero M. Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res* 704:135-40, 1995.
- Marcotti W, et al. The aminoglycoside

antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J Physiol* 567:505-21, 2005.
Kawashima Y, et al.
Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J Clin Invest* 121:4796-809, 2011.
Pan B, Géléoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, Kawashima Y, et al. TMC1 and TMC2 Are Components of the Mechanotransduction Channel in Hair Cells of the Mammalian Inner Ear. *Neuron* 79:504-515, 2013.

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3件)

Makabe Ayane、Yoshiyuki Kawashima、他、Systemic fluorescent gentamicin enter neonatal mouse hair cells predominantly through mechano-electrical transduction channels、40th ARO midwinter meeting、2017年
真壁 彩音、川島 慶之 他、全身投与されたアミノグリコシド系抗菌薬の内耳有毛細胞への進入経路の解明、第27回日本耳科学会、2017年
川島 慶之、マウス有毛細胞のMETチャネルにおける Transmembrane channel-like(TMC)遺伝子の役割。第35回聴覚生理研究会共同セッション、2016年

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川島 慶之(KAWASHIMA, Yoshiyuki)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10376759

(2)研究分担者

野口 佳裕(NOGUCHI, Yoshihiro)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：50282752