

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07188

研究課題名(和文) 蝸牛有毛細胞におけるカベオリン分子の動態解析

研究課題名(英文) Exploration of the role of caveolin in the organ of Corti

研究代表者

安齋 崇 (ANZAI, TAKASHI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20624852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：外有毛細胞が二次的な脱落を示し不可逆的な難聴をきたすコネクシン26(Cx26)欠損モデルマウスとコントロールを使用して、外有毛細胞の脱落のメカニズムについて詳細な病態解明を行った。形態学的特徴を検討するため透過型電子顕微鏡を用いて外有毛細胞の観察を行った。Cx26欠損マウスではコントロールと比較して、外有毛細胞の外側壁周囲のカベオラ構造が増加しており、エンドサイトーシスが亢進している像が認められることが明らかになった。現在、崩壊前の外有毛細胞に集簇しているカベオリンの有毛細胞内での働きを検討するため、メチル シクロデキストリンによるカベオリンの除去を行い、有毛細胞の保護作用の検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：Mutations in GJB2, which encodes connexin 26 (Cx26), a cochlear gap junction protein, represent a major cause of pre-lingual, non-syndromic deafness. The degeneration of the organ of Corti observed in Cx26 mutant-associated deafness is thought to be a secondary pathology of hearing loss. The mechanism underlying secondary outer hair cell (OHC) degeneration remains unknown. We analyzed transmission electron micrographs of OHCs. Ultrastructure of the plasma membrane of OHCs shows a significantly large number of caveolae or caveolar vesicles were associated with OHCs lateral wall in Cx26 deficient mice as compared with those in the control mice. This may indicate that excessive endocytosis occurs in the presence of this Cx26 mutation, leading to OHC degeneration.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：カベオリン 難聴 有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は1000出生に1人発生するとされており、先天性疾患の中でも最も高頻度にかかる疾患の一つである。そのうち約70%が遺伝性疾患であり、人種間を問わずコネキシン26(Cx26)変異は遺伝性難聴の原因遺伝子として変位検出頻度が最も高いものである。当講座の池田・神谷らはこれまでにCx26遺伝子の優性阻害変異型トランスジェニック(Tg)マウス(Cx26Tg)とCx26の内耳特異的欠損マウス(Cx26KO)を新規開発し、病態解析を進めてきた。Cx26、Cx30は蝸牛繊維細胞や支持細胞に分布しており、コネキシンは隣接する細胞との間にギャップ結合を構成することが知られている。当講座で行ったこれらモデル動物の病態解析からは、Cx26変異・欠損によってCx30も減少しギャップ結合複合体(GJP)の崩壊・減少をきたし、内耳のイオン輸送障害となる新たな分子病態を報告した。(Kamiya et al. J Clin Invest. 2014) また、Cx26変異があると発生初期のコルチ器でのアポトーシス遅延や形態異常が生じ(Inoshita et al. BMCgenetics 2014, Neuroscience 2008)外有毛細胞に膜構造の変化が生じ、さらに病態が進行すると外有毛細胞が脱落に至る事がヒトや種々のCx26変異モデルにおいて報告されている。(Kudo et al. Hum Mol Genet, 2003)[図1]。

哺乳類の外有毛細胞は再生能を有しておらず、外有毛細胞が脱落は不可逆的な難聴の原因になるが、外有毛細胞の脱落に対する根本的な治療法・予防法は確立されていない。研究代表者の安齋崇は外有毛細胞の変性と

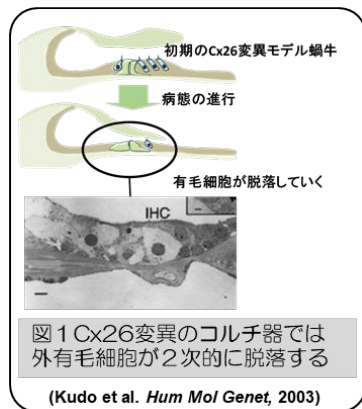
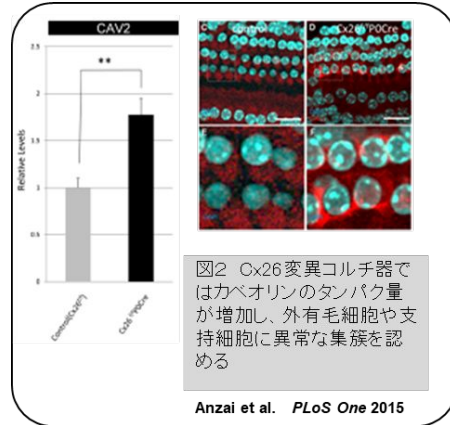


図1 Cx26変異のコルチ器では外有毛細胞が2次的に脱落する (Kudo et al. Hum Mol Genet, 2003)

脱落を促進する候補たんぱく質としてカベオリンを同定し、有毛細胞における異常集簇を発見した。

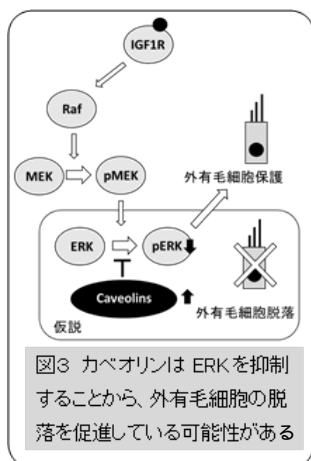
(Anzai et al. PLoS One 2015) [図2]



Anzai et al. PLoS One 2015

これまで、研究協力者の神谷らによる難聴の病態進行にカベオリンを介したエンドサイトーシスが関与する報告 (Kamiya et al. J Clin Invest. 2014) や、難聴・眩暈を伴う内耳障害の一つであるメニエール病においてはカベオリンの遺伝子多型が発病のリスクになることが報告されており、(Teranishi et al. Free Radical research 2013) 内耳におけるカベオリンの役割が注目されつつある。カベオリンはカベオラ構造を形成し様々なシグナルタンパク質の調節を担い、主として抑制的な作用をもたらす脂質ラフトの成分の一つである。代表的なシグナル調節としてはカベオリンがERKのリン酸化を抑制することで細胞増殖・細胞維持関与することが知られている。カベオリンの増加は角膜上皮の創傷治癒遅延をもたらすことが既に報告されており (Rhim JH et al. Mol Med 2010)、難聴の病態進行においても重要な役割を担っている可能性が示唆された。また外有毛細胞の脱落にはERKを介したシグナルが重要である事が明らかになってきており、ERKが外有毛細胞保護的に働いている事や、IGF-1が下流シグナルであるERKを活性化することで外有毛細胞

胞の脱落を軽減できることが報告されている。(Kurioka et al. Scientific Reports 2015)(Yamamoto et al. Frontiers in pharmacology 2014)[図 3]



2. 研究の目的

本研究では遺伝性難聴、加齢性難聴、騒音性難聴、酸化ストレス、ウイルス感染等の様々な因子に共通する現象である外有毛細胞の脱落を、カベオリンが ERK を制御することに着目し、下流のシグナル伝達の解析を行うことで、外有毛細胞脱落のメカニズムを明らかにし、感音性難聴の予防法開発を目指す。

3. 研究の方法

研究の第一段階として、Cx26 欠損モデルマウスとコントロールを用いて蝸牛内のカベオリン分子種のタンパク量を週齢ごとに計測し経時的な変化を測定し病態の進行との関連性を明らかにする。同時にカベオリンの下流にあるシグナルの経路を解明する。研究の第二段階として、有毛細胞の脱落という共通した現象を起こす音響外傷モデル・加齢性難聴モデルを利用し、カベオリンを介したシグナルの調節の変化を解析する。音響外傷モデルマウスや老齢マウスの、蝸牛内カベオリンのタンパク質の変化、局在の変化、蝸牛内のシグナル経路を明らかにする。研究の第三段階として、経正円窓経由で

caveolin-1 siRNA を投与しカベオリンをノックダウン、もしくは M₁ CD を投与しカベオリンを除去する。ストレスに対する反応を外有毛細胞の脱落数の変化、聴力変化、下流シグナルの変化をコントロールと比較し、カベオリンの内耳における働きを検証し明らかにする。カベオリンを阻害することで外有毛細胞保護が可能であることを証明する。

・外有毛細胞脱落を来す種々の病態モデルの作成

a. 遺伝子改変難聴モデルマウス

以下の独自の遺伝性難聴モデル動物とストレスモデルマウスの作製を行う。

Cx26-KO マウス (Kamiya, J Clin Invest 2014) Cx26 は全身に遺伝子欠損させると胎生致死となるが、我々は P0-Promoter により制御される Cre recombinase 遺伝子を用いて内耳特異的に同遺伝子を欠損させる Cx26-KO マウスを新規開発した。同マウスが高度難聴を有することは確認済みである。理研・順天堂にて繁殖・維持。

Cx26-Tg マウス (Kudo, Hum Mol Genet 2003) Cx26 優性阻害変異を有する難聴モデルトランスジェニックマウス。理研・順天堂にて繁殖、維持

b. 音響外傷モデルマウス (C57BL/6J)

4 週齢の C57BL/6J 防音室内で覚醒下に 120dB 8.0-16.0kHz オクターブバンドノイズに 2 時間暴露する。

c. 加齢性難聴モデルマウス (C57BL/6J)

加齢性難聴を自然発症するモデルとして知られている C57BL/6J を用いる。

・各モデルにおけるカベオリンを中心としたストレス応答の病態の解析

a. 聴力モニタリング

マウスの聴力を全身麻酔下に聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分耳音響放射 (DPOAE) により測定。測定周波数は 8、12 kHz、1

6 kHz、20 kHz の 4 音域とする。

b.カベオリンとその下流シグナルのタンパク量の変化の解析

Caveolin-1 Caveolin-2,ERK,phospho-ERK、のタンパク量の変化を測定する。蝸牛軸を取り除いた外側壁とコルチ器からたんぱく質を抽出しウエスタンブロット法を用いてそれぞれのタンパク量を測定する。蛋白質の発現量の変化を Cx26 変異モデルマウス、加齢性難聴モデルでは週齢毎にストレス暴露モデルでは暴露後から時間を追ってタンパク量の変化を測定する。また発現部位を同定するため、ホールマウント標本および凍結切片での標本を作製し免疫染色を行い共焦点顕微鏡下に発現部位を観察する。

c.形態学的な変化の観察

形態学的な特徴を透過型電子顕微鏡を用いて観察する。カベオリンはカベオラ構造を構成しエンドサイトーシスに関与することが知られているが、内耳ストレス負荷や加齢、またはカベオリンをノックダウンによってすることで外有毛細胞の膜構造形態学的な変化やエンドサイトーシス像に変化が生じるか観察する。

.カベオリンのノックダウンと除去

a.siRNA を用いたカベオリンのノックダウン
4 週齢の C57BL/6J を全身麻酔下に耳後部切開により中耳骨胞を露出させ小開創を加え正円窓を明視下に置き。caveolin-1 siRNA (Santa Cruz) を投与、コントロール群には negative control siRNA を投与する。siRNA の投与方法は先行研究の方法に従う(Oishi N, Hearing Res. 2015)。投与 72 時間後に音響外傷を加える。

b.メチル シクロデキストリンによるカベオリンの除去

カベオリンを含む脂質除去薬であるメチルシクロデキストリン(M_βCD)を鼓室内に投

与する。4 週齢の C57BL/6J を全身麻酔下に耳後部切開により中耳骨胞を露出させ小開創を加え正円窓を明視下に置き鼓室内に 1 mM M_βCD(Sigma)をコントロール群には生理食塩水を投与する。投与 72 時間後に音響外傷を加える。

.カベオリンのノックダウン・除去による外有毛細胞保護作用を検証する

カベオリンノックダウン・除去とコントロール群で、聴力閾値の変化・外有毛細胞の残存率の変化やカベオリンの下流シグナルのタンパク量やリン酸化、局在に変化を生じるかを検討。

カベオリンを阻害することで蝸牛の機能が温存できるか検証する。

4 . 研究成果

電子顕微鏡での観察

本研究ではまず、外有毛細胞が二次的な脱落を示し、不可逆的な難聴をきたす、Cx26 欠損モデルマウスとコントロールを使用して詳細な病態解明を行った。

形態学的な特徴を検討するため透過型電子顕微鏡を用いて外有毛細胞の観察を行った。Cx26 欠損マウスではコントロールと比較して、外有毛細胞の外側壁周囲のカベオラ構造が増加しており、エンドサイトーシスが亢進している像が認められた。(図 4)

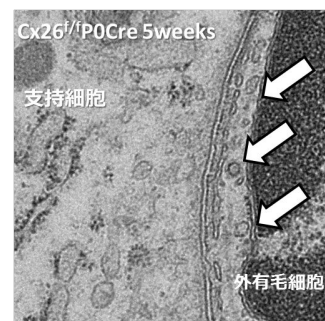


図 4 外有毛細胞の超微細構造を観察するとエンドサイトーシス像が観察することができる(矢印)

さらに、収束イオンビーム走査型顕微鏡を用いて外有毛細胞損傷におけるより詳細な初

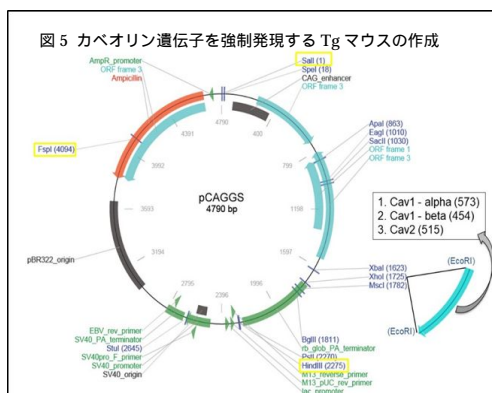
期構造変化を解明している。

内耳におけるカベオリンの除去

また、現在は崩壊前の外有毛細胞に集簇しているカベオリン2の有毛細胞内での働きを検討するため、メチル シクロデキストリンによるカベオリンの除去を行っているが、中耳内耳に損傷を加えない手術操作や投与経路、試薬の選定などの条件設定を進めている。

カベオリン遺伝子強発現トランスジェニック(Tg)マウスの開発

Cav1-alpha, Cav1-beta, Cav2の内耳細胞への影響を解析するため、これらの遺伝子を強制発現する Tg マウスの開発を行った。まず pCAGGS プラスミドベクターへ Cav1-alpha, Cav1-beta, Cav2 の cDNA を挿入、サブクローニングしたのちこれらが大腸菌にて増幅させた。プラスミド DNA を精製した後に制限酵素で切断し強発現用プロモーターとコーディング領域を含む断片を精製した。精製した DNA 断片を用いて受精卵へのマイクロインジェクションを行った。これにより Cav1-alpha, Cav1-beta, Cav2 の Tg マウスが得られた。[図5]得られた産仔は現在ジェノタイプングにより選抜交配しており、今後内耳を摘出して解析に用いる予定である。これらの実験は理研バイオリソースセンターおよび順天堂大学医学部動物施設の協力を得て行われた。



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)

コネキシン 26 変異蝸牛における 2 次的有害毛細胞の脱落に与える因子の探索 (紀要)
安齋 崇, 神谷 和作, 池田 勝久
耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 31 巻 Page33-34

[学会発表](計3件)

安齋 崇, 神谷 和作, 池田勝久
コネキシン 26 変異蝸牛における 2 次的有害毛細胞の脱落に与える因子の探索
耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
2016年8月26日
グランディア大阪(大阪市)

安齋 崇, 池田 勝久, 神谷 和作
コネキシン 26 欠損モデルマウスにおける外有毛細胞の変形とカベオリン2の集簇
日本耳鼻咽喉科学会総会
2016年5月21日
名古屋国際会議場(名古屋市)

神谷 和作, 飯塚 崇, 福永 一朗,
青木 徹, 安齋 崇, 池田 勝久
GJB2 変異遺伝性難聴の分子病態解析と新規治療法の開発
2016年5月19日
名古屋国際会議場(名古屋市)

[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

安齋 崇 (ANZAI, Takashi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20624852

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者