

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26460340
 研究課題名(和文) 聴・平衡覚の確立・維持における低分子量G蛋白質の役割-聴毛と耳石に注目して-

 研究課題名(英文) Roles of Rho-family small GTPases in establishment and maintenance for hearing and balancing

 研究代表者
 上山 健彦 (Ueyama, Takehiko)

 神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

 研究者番号：80346254
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)内耳有毛細胞特異的Cdc42-KOマウスを作製し、「KOマウスが正常聴覚獲得後に聴毛形態異常による進行性感音難聴を呈する」、「Cdc42は聴毛の維持期に機能する」、「Cdc42は聴毛膜に局在し、活性化は聴毛上半部に強い」事を発見した。
 (2)更に「Cdc42-KO/KDによるRhoAシグナリング亢進」を見出した。RhoAの下流にはアクチン重合分子DIA1が存在する。そこで、原因不明難聴1120患者のエキソーム解析を行い、新規DIA1点変異をもつ遺伝性感音難聴の2家系(本邦)を発見した。加えて、この変異体発現マウスが、患者病態を再現し、高音域から始まる進行性感音難聴を呈する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) We generated inner ear hair cell (HC)-specific KO mice to analyze the role of Cdc42 in HCs. HCs of Cdc42-KO mice developed normally but progressively degenerated after maturation, resulting in progressive hearing loss particularly at high frequencies. Adenovirus-encoded GFP-Cdc42 expression in HCs and fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging of HCs from transgenic mice expressing Cdc42-FRET biosensor indicated Cdc42 presence/activation at stereociliary membranes in cochlear HCs.
 (2) We found that the amount of active RhoA (GTP-form) is increased in Cdc42-KD cells. DIA1 is a downstream molecule of RhoA signaling pathways, and nucleates and elongates unbranched/straight actin. We discovered a novel patient-derived DIAPH1 mutation (c.3610C>T) in two unrelated Japanese families. Mice expressing the DIA1(R1204X) mutant experienced progressive deafness beginning at high frequencies and HC loss with various morphological abnormalities in stereocilia at the basal turn.

研究分野：神経科学

キーワード：聴覚 平衡覚 低分子量G蛋白質 聴毛 耳石 DIA1 DFNA1 感音難聴

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rho family GTPase の聴・平衡覚における役割については、有毛細胞内での局在に関する報告が 2000 年 JBC (Cdc42, Rac1, RhoA) になされた後、暫く途絶えていた。申請者は、生命維持に必須である Rho family GTPase のような分子の内耳における機能を解明する手段として、内耳特異的に遺伝子操作を行えるマウスが存在しない事が、現状を打破できない原因の 1 つと考え、内耳有毛細胞特異的に Cre recombinase (Cre) を発現する 2 種類のプロモーターマウスを確立した。

2. 研究の目的

老人性難聴やメニエル病等、原因不明の聴・平衡覚障害で苦しむ人々は、国内で約 2000 万人と驚く程多いにも拘らず、内耳が微細構造 (聴・平衡毛や耳石) で感受した機械刺激を電気シグナルに変える (MET) 巧妙な感覚器であり、生体外での研究の困難さ (高度な極性器官) も加わり、治療法開発が進んでいない。本研究は、申請者が確立した内耳有毛細胞特異的に Cre を発現するプロモーターマウスと conditional (floxed) を用いて、内耳での Cdc42、Rac を含む Rho family GTPase の局在・機能・シグナルを解明し、聴・平衡覚障害の新規治療法開発に繋げるというものである。

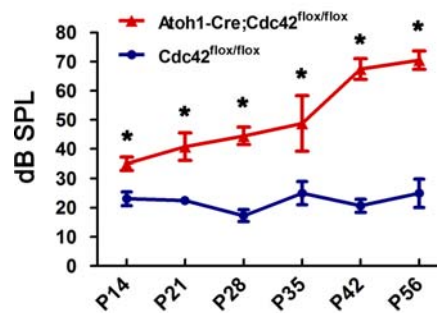
3. 研究の方法

(1) 申請者が確立した聴・平衡覚有毛細胞特異的に機能するプロモーターマウスを用いて作製した Cdc42 KO 及び Rac1 KO マウスの表現型解析と Cdc42 の細胞内局在・機能のイメージング解析

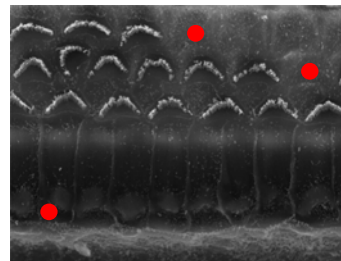
(2) RhoA 及びその下流分子である DIA1 に注目して、それらの異常が聴覚に及ぼす影響の細胞レベルと個体レベル (遺伝子改変マウス) での解析

4. 研究成果

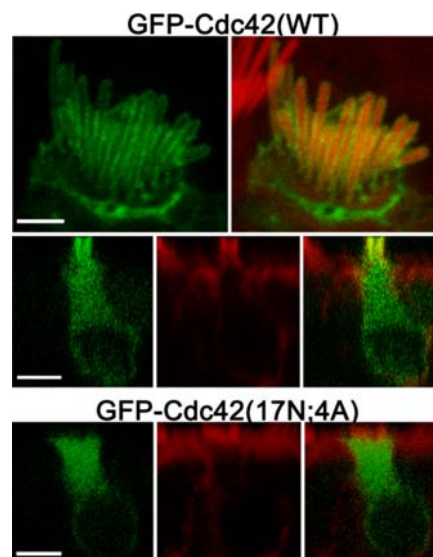
(1) アクチン骨格を制御する Rho-family GTPase のメンバーである Cdc42 に注目し、内耳有毛細胞特異的に Cdc42 が KO されるマウスを作製し、「Cdc42-KO マウスが正常聴覚獲得後に多彩な聴毛形態異常による進行性高度難聴を呈する」、「Cdc42 は聴毛の形成過程よりむしろ維持期に機能する」、「Cdc42 は聴毛膜に局在し、その活性化は聴毛の上半部に強い」等の 3 つの事実を解明し報告した。



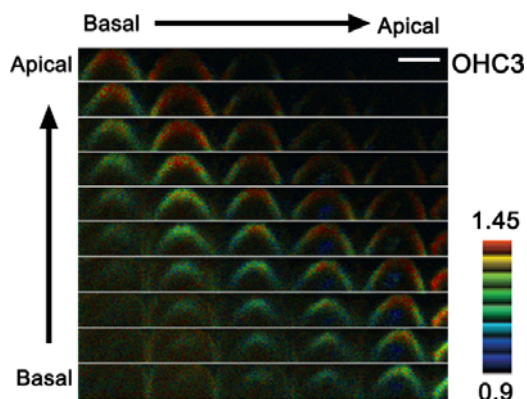
Cdc42-KO マウスは進行性の難聴を来す。



Cdc42-KO マウスは進行性の有毛細胞脱落を呈する (赤丸)。

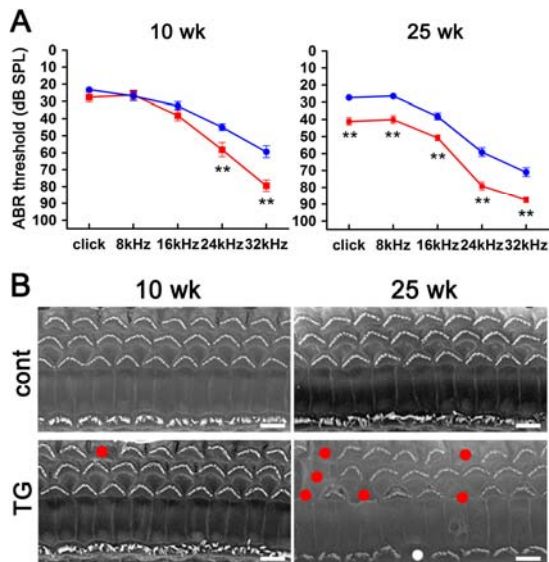


Cdc42 (WT) は聴毛膜及び頂側結合に局在。



Cdc42 は聴毛上半部で活性化している (Cdc42 FRET プローブ発現マウス蝸牛)。

(2) 上記研究の過程で、新たに「Cdc42 KO/KD により RhoA シグナリングが亢進し、これが Cdc42-KO による聴毛の形態異常の一因である」可能性を見出した。RhoA シグナルの下流には、直鎖状アクチン繊維の重合に関わる DIA1/DIAPH1 が存在し、その点変異により、常染色体優性遺伝性感音難聴である DFNA1 が発症することが 1997 年に報告されていた。この DIA1 変異による DFNA1 は、現在至るまで、コスタリカの 1 家系のみで報告に留まり、その病態も感音難聴でなく内リンパ水腫であるとの報告もあり、DFNA1 が感音難聴かの議論のみでなく、DFNA1 の存在自体にも疑問が呈されていた。そこで我々は、原因不明の難聴を呈する 1120 例の患者を対象に、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、新規の DIA1 点変異を本邦の 2 家系で発見した。加えて、一分子蛍光イメージングなどの手法を駆使して、発見した新規 DIA1 点変異により生じる変異体が、恒常的活性化型変異体であることを明らかにした。更に、新規 DIA1 変異体を発現するトランスジェニックマウス (TG) を作製し、TG マウスが、ヒト患者の病態を非常によく再現し、高音域から始まり全音域に及ぶ進行性感音難聴を呈することを明らかにした。



DIA1 変異体を発現するマウスは 10 週齢から高音域に難聴を来し、進行性に増悪し 25 週齢では全音域難聴を呈する。同時に蝸牛有毛細胞の進行性の脱落を認める (赤丸及び白丸)。

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 6 件)

- 1) Ueyama T, Ninoyu Y, Nishio S, Miyoshi T, Torii H, Nishimura K, Sugahara K, Sakata H, Thumkeo D, Sakaguchi H, Watanabe N, Usami S, Saito N, Kitajiri S: Constitutive activation of DIA1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. *EMBO Mol Med*, 2016, 8, 1310-1324 doi: 10.15252/emmm.201606609 査読有
- 2) Ishii T, Ueyama T, Shigyo M, Kohta M, Kondoh T, Kuboyama T, Uebi T, Hamada T, Gutmann DH, Aiba A, Kohmura E, Tohda C, Saito N: A novel Rac1-GSPT1 signaling pathway controls astrogliosis following central nervous system injury. *J Biol Chem*, 2017, 292, 1240-1250 doi: 10.1074/jbc.M116.748871 査読有
- 3) Ueyama T, Sakuma M, Ninoyu Y, Hamada T, Dupuy C, Geiszt M, Leto TL, Saito N: The extracellular A-loop of dual oxidases affects the specificity of reactive oxygen species release. *J Biol Chem*, 2015, 290, 6495-6506 doi: 10.1074/jbc.M114.592717 査読有
- 4) Takahashi H, Adachi N, Shirafuji T, Danno S, Ueyama T, Vendruscolo M, Shuvaev AN, Sugimoto T, Seki T, Hamada D, Irie K, Hirai H, Sakai N, Saito N: Identification and characterization of PKCγ, a kinase associated with SCA14, as an amyloidogenic protein, *Hum Mol Genet*, 2015, 24, 525-539 doi: 10.1093/hmg/ddu472 査読有
- 5) Ueyama T, Sakaguchi H, Nakamura T, Goto A, Morioka S, Shimizu A, Nakao K, Hishikawa Y, Ninoyu Y, Kassai H, Suetsugu S, Koji T, Fritsch B, Yonemura S, Hisa Y, Matsuda M, Aiba A, Saito N: Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells. *J Cell Sci*, 2014, 127, 2040-2052 doi: 10.1242/jcs.143602 査読有
- 6) Shirafuji T, Ueyama T, Yoshino K, Takahashi H, Adachi N, Ago Y, Koda K, Nashida T, Hiramatsu N, Matsuda T, Toda T, Saito N: The role of PIX-β phosphorylation at serine 340 and 583 by PKCγ in the dopamine release, *J Neurosci*, 2014, 34, 9268-9280 doi: 10.1523/JNEUROSCI.4278-13.2014 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 上山健彦: 聴毛インテグリティ維持破壊により発症する難聴メカニズム解明,

第 88 回日本薬理学会年会シンポジウム
「感覚薬理学の新たなる展開: QOL を高
める内耳研究の最前線」, 2016, パシフィ
コ横浜 (神奈川県)

2) Ueyama T: Targeting and assembling
mechanisms of NADPH oxidases at
phagosomal and apical membranes. 第
120回日本解剖学会、第92回日本生理学会
合同大会シンポジウム (in English)
「Mechanism of host defense and
homeostatic maintenance by phagocytes」,
2015, 神戸国際会議場 (兵庫県)

3) 上山健彦: 内耳有毛細胞における Rho フ
ァミリー低分子量 G 蛋白質の役割, 第
55 回日本組織細胞化学会総会シンポジウ
ム「感覚器における機能分子の作用機構
～形態的なアプローチから～」, 2014, 松
本市中央公民館 (長野県)

〔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

上山 健彦 (UEYAMA, Takehiko)
神戸大学・バイオシグナル総合研究セン
ター・准教授
研究者番号 : 80346254

(2) 研究分担者

坂口 博史 (SAKAGUCHI, Hirofumi)
京都府立医科大学・耳鼻咽喉科・頭頸部
外科学教室・准教授

研究者番号 : 00515223

(3) 連携研究者

齋藤 尚亮 (SAITO, Naoaki)
神戸大学・バイオシグナル総合研究セン
ター・教授
研究者番号 : 60178499

(4) 研究協力者

()