

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462568

研究課題名(和文) 蝸牛において予想されるTRPM4チャンネルの特異的機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of the functional roles of TRPM4 in the mammalian cochlea

研究代表者

村田 潤子 (Murata, Junko)

大阪大学・医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：80332740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は抗TRPM4ラビットIgG抗体を使用してTRPM4がアダルトマウスにおいて内毛細胞側底部、血管条辺縁細胞頂側部に特異的に発現していること、およびそれぞれの部位で聴覚確立期においてTRPM4 mRNAの発現が著しく上昇していることを解明した。さらにTRPM4ノックアウトマウスの聴覚を聴性脳幹反応(ABR)によって評価し、17週齢以降における野生型と比較しての閾値上昇を認めた。以上の結果よりTRPM4は内毛細胞の再分極と辺縁細胞頂側における内リンパ腔へのK<sup>+</sup>の移送への部分的な寄与が予想され、TRPM4遺伝子のヒトにおける進行性感音難聴との関連性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We showed that in the cochleae of adult mice, the specific TRPM4-immuoreactivity was observed in the basolateral side of inner hair cells and in the apical side of marginal cells of stria vascularis by using the rabbit anti-TRPM4 polyclonal antibody. Additionally, the mRNA of TRPM4 was up-regulated both in the organ of Corti and in the stria vascularis at the stage when the auditory sense of mice is established. The examination using the auditory brain stem response (ABR) revealed that the hearing threshold was elevated in the TRPM4 knock-out mice compared to the wild type especially at the stage older than 17 weeks old. The spatial-temporal expression pattern of TRPM4 implicated that TRPM4, at least partially, may contribute the repolarization of inner hair cells and the transfer of potassium ion through the marginal cells to the endolymphatic space. The results of ABR suggest the TRPM4 gene may be related to the progressive hearing loss of the human.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：TRPM4 内耳発生 内毛細胞 血管条辺縁細胞 聴性脳幹反応

### 1. 研究開始当初の背景

TRPM4 は transient receptor potential channel のひとつであり、脳、心臓などの興奮性細胞で活動電位形成に機能し、非興奮性細胞では主に上皮細胞に発現していることなどが報告されていた。蝸牛においては  $K^+$  イオン濃度が著しく高い内リンパ液の存在が感覚器としての機能を支えているためこれを形成する  $K^+$  イオンの還流は特に重要である (図 1)。しかし内耳における TRPM4 の発現及び機能に関してはこれまで詳細な検討がなされてこなかった (図 2)。

### 2. 研究の目的

我々はマウス内耳発生の各段階における TRPM4 の発現について TRPM4 に対する特異的抗体を用いて免疫染色法により検討した。その後半定量的 RT-PCR による mRNA レベルでの発現量解析を併用して論文として報告した (Sakuraba M et al., 2014)。

次に TRPM4 KO マウスをハイデルベルグ大学より導入し聴性脳幹反応 (ABR) による聴力評価も開始した。以上を解析し哺乳類内耳における TRPM4 の役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

免疫染色に関しては胎生 15.5 日齢 (E15.5)、E17.5、生後 0 日齢 (P0)、P7、2 週齢 (2W)、4W の野生型 (WT) マウスを対象とし、側頭骨凍結切片を作製し、抗 TRPM4 ラビット IgG 抗体 (Teruyama R et al., 2011) を用いて蛍光抗体法で免疫染色を行った。同じ発生段階で蝸牛上皮を基底板上のコルチ器を含む部分と血管条を含む側壁とに分けて解剖した後 mRNA を抽出し、TRPM4 の発現を半定量的 RT-PCR 法にて測定した。

TRPM4 KO マウスはハイデルベルグ大学より分与を受けて継代を開始し、WT、ヘテロ、KO マウス (各 N=3) の ABR 測定を生後 4W、8W、12W、17W、24W、36W において施行した。

### 4. 研究成果

TRPM4 の特異的免疫反応が 4W マウスにおいて内毛細胞側底部、血管条辺縁細胞頂側部、および一部の蝸牛神経節細胞と神経軸索で観察された (図 3、4)。血管条辺縁細胞と同様に、暗細胞の頂側には KCNQ1/KCNE1 が発現し前庭内リンパ腔へ  $K^+$  を移送していることが確認されている (Wangemann et al., 1996)。

半定量的 RT-PCR では、コルチ器・蝸牛外側壁の双方において聴覚の確立する P7 から 2W にかけて著しい発現上昇が認められた (図 5)。TRPM4 KO マウス ABR 測定結果については、まだ例数が少なく十分な検討ができていないが、主に 17W 以降において KO マウスでは WT に比べて閾値上昇が観察された (図 6)。免疫染色及び半定量的 RT-PCR の結果より、TRPM4 は内毛細胞においては脱分極後に  $K^+$

を細胞側底部から流出させて再分極へと導く機能を有し、辺縁細胞頂側では内リンパ腔への  $K^+$  の移送に KCNQ1/KCNE1 とともに寄与している可能性が考えられた。ABR 測定結果より TRPM4 遺伝子のヒトにおける進行性感音難聴との関連性も示唆された。

### 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)

Spatio-temporal expression of TRPM4 in the mouse cochlea

M Sakuraba, J Murata, R Teruyama, K Kamiya, J Yamaguchi<sup>3</sup>, H Okano<sup>4</sup>, Y Uchiyama, K Ikeda<sup>1</sup> J Neurosci Res. 2014 Oct; 92(10): 1409-18.

〔学会発表〕(計 4 件)

Expression of TRPM4 in the mouse cochlea and its putative roles in the potassium ion transport and the inner hair cell repolarization J Murata, M Sakuraba, R Teruyama, K Kamiya, J Yamaguchi, H Okano, Y Uchiyama, K Ikeda

(The 37th Annual Midwinter Meeting of the ARO, 22-26, 2014, Manchester Grand Hyatt, San Diego, CA, USA)

哺乳類内耳における TRPM4 の時空間的発現パターンが示唆するその機能について

村田 潤子、城所 淑信、松岡理奈、神谷 和作、池田 勝久

(第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2014 年 5 月 14 日～17 日、ヒルトン福岡シーホーク、福岡)

TRPM4 の内耳発生における発現とノックアウトマウスにみられた聴覚障害について

村田 潤子、藤岡 正人、神崎 晶、岡田 弘子、池田 勝久、

小川 郁<sup>2</sup>

(第 25 回日本耳科学会総会・学術講演会、2015 年 10 月 7 日～10 日、長崎ブリックホール、長崎)

〔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

村田 潤子 ( Murata, Junko )  
大阪大学・医学系研究科・招へい准教授  
研究者番号：80332740

### (2) 研究分担者

久恒 智博 ( Hisatsune Tomohiro )  
独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 発生神経生物研究チーム・研究員  
研究者番号：10321803

### (3) 連携研究者

岡田弘子 ( Okada, Hiroko )  
順天堂大学 医学部 耳鼻咽喉科学講座・助教  
研究者番号：2043774

### (4) 研究協力者

( )

図1 蝸牛における K<sup>+</sup>イオンの還流

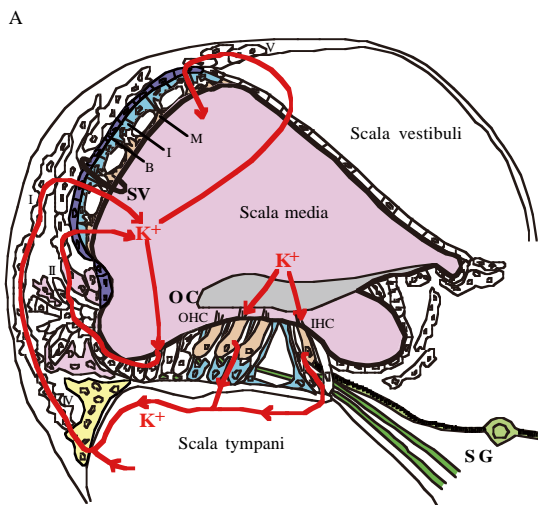


図2 これまでに報告されている蝸牛での TRP チャンネルの発現

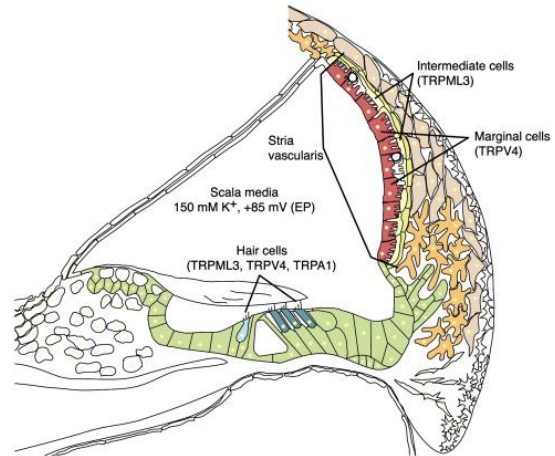


図3 4週齢野生型マウスにおける TRPM4 の発現：血管条、コルチ器、らせん神経節にウサギ抗 TRPM4 ポリクロナール抗体による特異的免疫陽性反応が観察された。

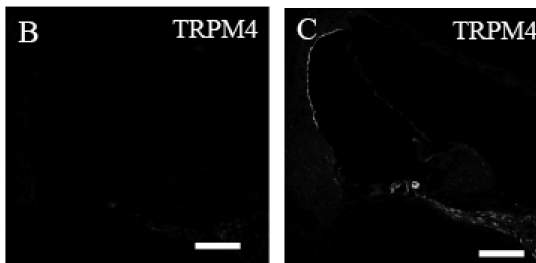
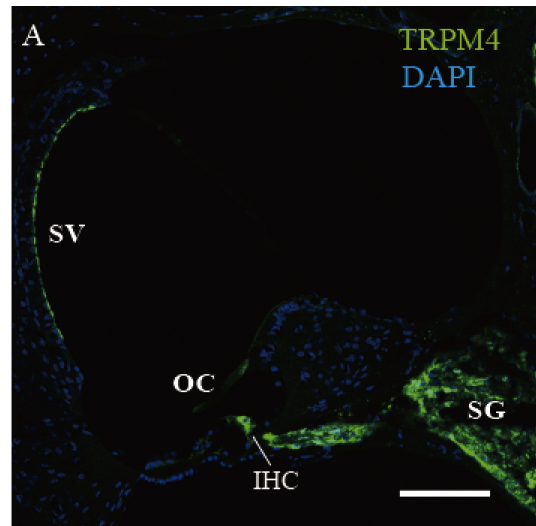


図4 野生型マウスにおける TRPM4 発現のさらに詳細な検討：4週齢野生型マウスにおいて内毛細胞側底部、血管条辺縁細胞頂側部、および一部の蝸牛神経節細胞と神経軸索で観察された

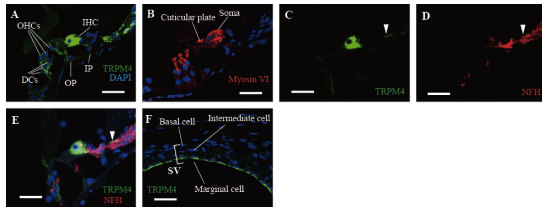


図5 免疫染色と判定量 RT-PCR による発生各段階での TRPM4 発現の推移

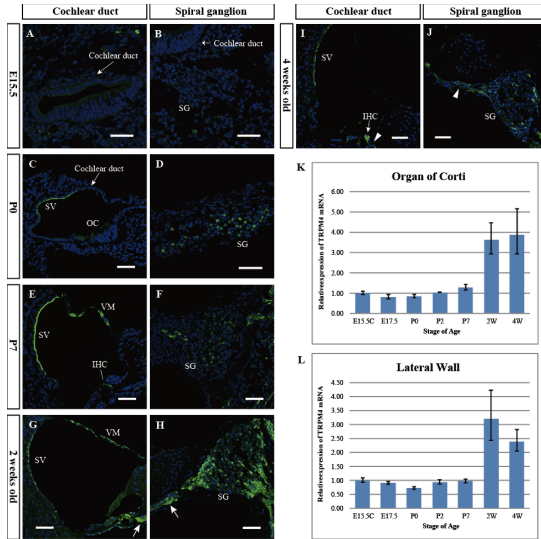


図6 野生型と TRPM4 KO マウスの発生各段階における聴覚

