

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11174

研究課題名(和文) 外有毛細胞シナプスにおけるグルタミン酸受容体の局在の同定と難聴発症機序の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of delta receptors in outer hair cells

研究代表者

藤川 太郎 (FUJIKAWA, Taro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60401402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難聴との関連が報告されているデルタ型グルタミン酸受容体の内耳ではたらきについて解析をおこなった。マウスをつかった実験で、デルタ型受容体は聴覚にかかわる蝸牛とバランス・平衡にかかわる前庭の両者で恒常的に発現していた。デルタ1受容体の欠損マウスでは、生後5ヵ月より難聴は高音域から加齢とともに進行することが観察された。さらに同時期より蝸牛外有毛細胞遠心性シナプスが加齢とともに減少した。このことから、デルタ型受容体は有毛細胞シナプスの形成と維持にかかわり、聴覚機能に重要なはたらきがあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、デルタ型受容体が様々な神経変性疾患との関連が報告されている。本研究の成果は、デルタ型受容体が蝸牛有毛細胞のシナプスの形成と維持に重要なはたらきを有することを示す。デルタ型受容体の機能異常が難聴や平衡障害の新たな病態モデルとなる可能性がある。

またデルタ型受容体によるシナプス形成は成体においても可逆的でレスキューができるので、加齢性難聴や進行性平衡障害などに対する遺伝子治療や薬物治療のターゲットとしても有望であることから将来性があり、創造的であり画期的な研究成果になる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We used GluD1 knock-out mice to analyze the role of delta receptors in the inner ear. Delta receptors were highly expressed in cochlear and vestibular mice tissues. GluD1 knock-out mice showed progressive hearing loss that started in high frequencies at 5 months of age and spread to lower frequencies, which was associated with the decreased number of efferent synapses of outer hair cells. These results indicate that delta receptors play an important role in formation and maintenance of hair cells synapses in the cochlea.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：加齢性難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は最も主要な興奮性神経伝達物質であり、グルタミン酸受容体はイオン透過型と代謝型の2つの大きなファミリーから構成される。イオン透過型受容体はAMPA型、NMDA型、カイニン酸型の3つのクラスに分類され、グルタミン酸の結合によって陽イオンチャネルが開口し、速い興奮性入力を生じさせる。代謝型受容体はチャネル機能を有さないが、G蛋白質共役と下流のシグナル伝達カスケードを介して複雑な調節作用を示す。

またグルタミン酸はシナプス可塑性において重要な働きを担っている。シナプス可塑性を説明する長期増強(long-term potentiation: LTP)や長期抑制の現象と分子機序は小脳や海馬において詳細に研究されている。LTPは高頻度刺激によってシナプス伝達効率が持続的に増強する現象で、学習や記憶の根底にある主要な細胞学的メカニズムであると考えられているが、NMDA型受容体以外に、カイニン酸受容体と代謝型受容体を介したLTPは重要である。

蝸牛では、内有毛細胞が音刺激を電気信号に変換し、グルタミン酸の放出とラセン神経節細胞シナプスに発現するAMPA型受容体への結合によって音情報を中枢聴覚路へ入力する。外有毛細胞においてもグルタミン酸による神経伝達が予想されるも長く不明のままであったが、2009年にWeiszらによってグルタミン酸作動性の求心性シナプス伝達が証明され、外有毛細胞の高頻度刺激(時間的加重) = 過大な音響刺激があるときのみ伝達される特徴が明らかとなった。これを受けて、我々はイオン透過型のカイニン酸受容体GluK2/GluK5が求心性シナプス後部に局在することを世界に先駆けて明らかにしたほか、遠心性シナプスにもカイニン酸受容体と代謝型グルタミン酸受容体mGlu7が発現することを明らかにした。これは外有毛細胞が内有毛細胞とは大きく異なるシナプス機構をもち、シナプス可塑性による聴覚の維持・修飾のメカニズムが存在する可能性を強く示唆する。

興味深いことに、デルタ型グルタミン酸受容体GluD1の欠損マウスは16kHz以上の高音域で内耳性難聴を呈し、騒音負荷後の一過性閾値上昇が野生型よりも大きく、その蝸牛の脆弱性の原因として外有毛細胞の機能不全が示唆された。また欧州での大規模な全ゲノム関連研究で、代謝型グルタミン酸受容体mGlu7の遺伝的多型がヒトの加齢性難聴の危険因子であると報告された。これらの結果を踏まえ、我々はグルタミン酸受容体を介した外有毛細胞シナプスの可塑性の破綻に起因するグルタミン酸毒性が加齢性難聴や騒音性難聴の病態であると考えた。

## 2. 研究の目的

外有毛細胞シナプスにおけるカイニン酸受容体および代謝型グルタミン酸受容体の局在と機能を免疫電子顕微鏡法やパッチクランプ法を用いて調べ、聴覚におけるグルタミン酸受容体の役割と難聴の病態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

初年度は主に実験体制の立ち上げからLaser capture microdissectionによる内耳細胞の取得を目指す。大学院生に標本作製を含む基本手技の指導を行う。リアルタイムPCRによるcDNAライブラリーの作成と特異的プライマーによるグルタミン酸受容体の発現パターンを細胞レベルで明らかにする。次年度以降はグルタミン酸受容体の外有毛細胞シナプスにおける局在を、光学顕微鏡レベルで、続いて電子顕微鏡レベルで明らかにしていく。パッ

チクランプ法を用いて外有毛細胞シナプスにおける可塑性の機序を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

蝸牛と前庭において GluD1 だけでなく GluD2 も恒常的に発現していることを明らかにした。蝸牛では両者の発現量はほぼ等しく、前庭耳石器ではむしろ GluD2 が優位である。さらに、GluD1 KO の難聴は高音域から加齢とともに進行すること、GluD1 と GluD2 に共通のリガンドであると考えられている Cbln1 がコリン作動性の外有毛細胞遠心性シナプスに局在すること、有毛細胞の数は変化しないが外有毛細胞遠心性シナプスが加齢とともに減少することを示した (Takeda et al, 2019)。これらは、内耳において GluD2 と GluD1 の相補的な関係が存在していて、その破綻による外有毛細胞 synaptopathy が蝸牛の加齢性変化をもたらす可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takamori Takeda, Taro Fujikawa, Yuriko Sakamaki, Masato Fujioka, Yoshiyuki Kawashima, Taku Ito, Ayane Makabe, Takeshi Tsutsumi, Michisuke Yuzaki
2. 発表標題 GluD1 Deficiency Causes Progressive High-frequency Hearing Loss and Insufficient Efferent Synapse Formation on Outer Hair Cells
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology, 42nd Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川島 慶之  (Kawashima Yoshiyuki)  (10376759)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授    (12602)	