

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20274

研究課題名(和文) Hippo経路が及ぼす内耳有毛細胞の聴覚機能および微細構造への影響の解析

研究課題名(英文) Regulation of hair cell microstructure and auditory function by Hippo pathway

研究代表者

西山 崇経 (Takanori, Nishiyama)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90627168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路は細胞周期調節経路であり、細胞の硬さなどを規定し、発癌との関連も注目されている。その経路を構成するキナーゼのLATS1とLATS2のうち、LATS1のみが内耳有毛細胞に発現していた。LATS1の欠損マウスでは、内耳有毛細胞の配列不整や聴毛の脱落・不整を認め、それに伴う内耳性難聴を呈した。その表現系は新生時期から認められ、kinociliumの乱れも伴っていることから、LATS1が内耳の成熟過程に関与す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

今までにHippo経路の構成蛋白の欠損による影響としては、組織の悪性腫瘍化や個体の体格の縮小など、細胞周期調節の異常に伴う変化として説明可能な変化であった。しかし、本研究で得られた表現型においては、先天性かつ持続的な内耳有毛細胞の異常であり、Hippo経路が発生段階に与える影響としての新たな側面が疑われる。また、LATS1が適切な細胞配列と関わる可能性があり、適正な内耳有毛細胞配列を規定する要因を明らかにすることは、内耳の再生や再現といった面でも重要と思われる。

研究成果の概要(英文)：Hippo pathway regulates organ size, self-renewal of stem cells, and cell differentiation. LATS1 and LATS2 participate in Hippo signaling pathway. We examined expression pattern of LATS1 and LATS2 in the mouse cochlea, particularly in the organ of Corti. Because we only found LATS1 expression in the organ of Corti, we next investigated Lats1 deficiency mice. We found LATS1 deficiency caused congenital hearing loss with abnormal polarity and stereocilia bundles in both inner and outer hair cells. Those phenotypes indicate the possibility of LATS1 relating to the inner ear development.

研究分野：耳科・聴覚

キーワード：LATS1 Hippo経路 難聴 有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

Hippo 経路は、細胞周期を調節し、組織の大きさや形態、硬さや脆弱性などを規定する細胞内シグナル伝達経路である。同経路の破綻は癌化に関わり腫瘍領域において盛んに研究が行われているが、内耳での研究はまだない。また、同様の細胞周期調節経路として cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) の破綻は進行性内耳有毛細胞障害を起こすことが知られている。そこで Hippo 経路の中でも重要な役割を果たしている YAP/TAZ の上流因子である LATS1 と LATS2 に着目し、Hippo 経路の破綻が内耳に与える影響について研究を行った。

2. 研究の目的

我々の予備実験において、LATS1 は蝸牛内の有毛細胞に局在するのに対し、LATS2 は蝸牛に発現していなかった。そこで、LATS1 の欠損が内耳に与える影響を調べるために、内耳有毛細胞の微細構造の解析およびマウス聴覚機能の解析を、*Lats1* 遺伝子改変マウスを用いて解析した。

3. 研究の方法

Lats1 ノックアウト (KO) マウス群および同腹の対照群について以下の項目を比較検討した。

(1) 聴覚電気生理学的検査

4 から 6 週齢のマウスを全身麻酔下に聴性脳幹反応 (Auditory Brainstem Response; ABR) と歪成分耳音響放射 (Distortion Product Otoacoustic Emission; DPOAE) を測定した。

(2) 内耳有毛細胞の微細構造の解析

胎生期から成獣までのマウス側頭骨を全身麻酔下に摘出。内耳蝸牛の surface preparation を用いた免疫染色および、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 聴覚電気生理学的検査

ABR と DPOAE において、KO マウスは対照群に比して、8000, 16000, 24000, 32000Hz の全周波数において閾値の上昇を認め、内耳性難聴の像を呈していた (図 1)。

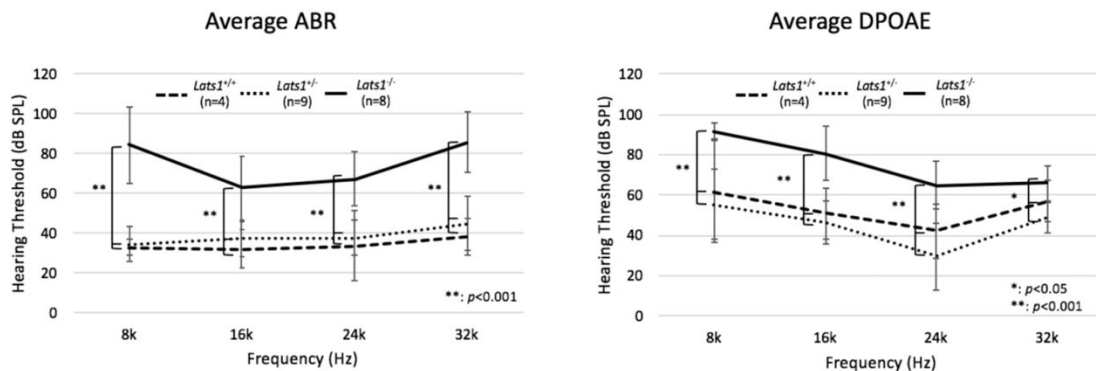


図 1 各 genotype における ABR, DPOAE の結果。ABR, DPOAE 共に *Lats1*^{-/-} 群は他の群に比し、全周波数で有意な閾値上昇を示した。*Lats1*^{+/-} 群と *Lats1*^{-/-} 群では有意な差を認めなかった。

(2) 内耳有毛細胞の微細構造の解析

surface preparation において、KO マウスは新生期～成獣に到るまで内耳有毛細胞 (IHC), 外耳有毛細胞 (OHC) の配列の乱れと聴毛の不整や脱落を共通して認めた。また同様の所見を SEM においても確認できた。このことから、LATS1 KO マウスは先天性の内耳有毛細胞障害を来すことがわかった (図 2)。

次に胎生期から新生期にかけての kinocilium の移動を調べたところ、KO マウスでは対象マウスと比して kinocilium の移動異常を呈していた。このことは、内耳有毛細胞の配列を決める Planar Cell Polarity (PCP) の異常を表しており、LATS1 が PCP に影響を与えていることが示唆された。

今までに Hippo 経路の構成蛋白の欠損による影響としては、組織の悪性腫瘍化や個体の体格の縮小など、細胞周期調節の異常に伴う変化として説明可能な変化であった。しかし、本研究で得られた表現型においては、先天性かつ持続的な内耳有毛細胞の発生異常であり、Hippo 経路が発生段階に与える影響としての新たな側面が疑われる。また、LATS1 欠損による影響が疑われる PCP については、コルチ器の発生において盛んに研究が行われているものの、LATS1 との関連は報告がなく、LATS1 は PCP に影響を与える新たな構成因子である可能性がある。昨今では、内耳領域においても再生医療への注目は大きく、適正な内耳有毛細胞配列を規定する要因を明らかにすることは、内耳の再生や再現といった面でも重要と思われる。さらに Hippo 経路自体においても、構成因子による影響は不明確な点も多く、LATS1 が担う機能を明らかにすることは経路の理解を深めるだけでなく、将来的に抗腫瘍薬の開発ターゲットを検討する場合などでも重要な知見になり得ると考える。つまり、LATS1 の欠損が有毛細胞脆弱性を伴う場合には、治療として Hippo 経路の調節を行った際に聴覚機能への影響を疑わせる知見となり得る。

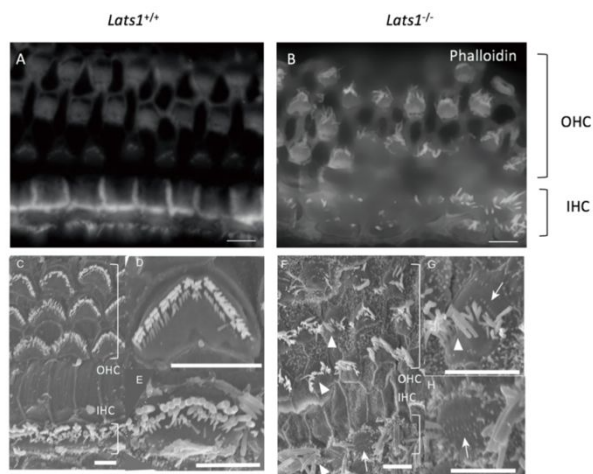


図 2 LATS1 KO による内耳有毛細胞構造への影響
 A. 野生群の内外有毛細胞、B. KO 群の内外有毛細胞。配列の不整・脱落を認める。C-E. 野生群の内外有毛細胞 SEM 像、F-H. KO 群の SEM 像。聴毛の不整 (矢頭)・脱落 (矢印) を認める。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Takanori Nishiyama, LATS1 configuration kinase of Hippo pathway deficiency cause congenital hearing loss, Inner Ear Biology 2018 年
2. 西山 崇経 Hippo 経路構成因子の LATS1 キナーゼ欠損がマウス内耳に与える影響の解析, 第 28 回日本耳科学会 2018 年
3. 西山 崇経, 細胞周期調節経路の破綻に伴う内耳への影響～LATS1 欠損マウスの解析、第 62 回聴覚医学会、2017 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：
 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：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室研究紹介 www.ent.med.keio.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：藤岡 正人

ローマ字氏名：FUJIOKA, Masato

研究協力者氏名：大石 直樹

ローマ字氏名：OISHI, Naoki

研究協力者氏名：佐谷 秀行

ローマ字氏名：SAYA, Hideyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。