

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04042

研究課題名(和文) 遺伝性感音難聴を来たすDIA1変異体による新たな病態(血球系異常)の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism clarification of new symptoms in DFNA1 causing from constitutively active DAI1 mutants

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：1. 作製したDIA1変異体発現マウスに音響暴露を行うと、有毛細胞内のリボンシナプスが有意に減少した。つまり、DFNA1患者での進行性難聴が、後天性負荷によることが解かった。
2. DIA1変異体発現では、DIA1変異体が頂側結合に局在することを明らかにした。透過電顕微観察では、変異体発現マウスの有毛細胞頂側結合に形態異常が存在した。つまり、DFNA1の主要病変部位が有毛細胞頂側結合であることを解明した。
3. DIA1変異体発現マウスの経時的血球解析を行った。加齢により、血小板径にバラツキが顕在化してくる傾向が捉えられた。異常が出現する時期や機序については、現在、詳細を解明している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性感音難聴の一病型であるDFNA1の進行性難聴の発症機序を解明した。1. 主要病変部位は、変異体が局在する蝸牛有毛細胞の頂側結合である、2. 騒音により有毛細胞内のリボンシナプス数が減少する。これらは、DFNA1の治療戦略上、大きな成果である。現在、引き続きDFNA1の治療薬開発を進めているが、本研究の継続・成功により、有効な治療薬のない感音難聴の治療法開発の扉を開けることが出来ると確信している。

研究成果の概要(英文)：1. Noise exposure induced significantly decreased number of the ribbon synapse in hair cells in mice expressing a DIA1 mutant (p.R1213X) compared with control mice, suggesting that noise is one of factors leading to progressive hearing loss in DFNA1 patients.
2. In mice expressing the DIA1 mutant, the mutant was localized at the apical junctional complex (AJC) of hair cells, where showed morphological abnormalities by TEM. Thus, AJC is likely the main lesion in DFNA1.
3. In aged mice expressing the DIA1 mutant, size of the platelets was spread over a wider range, compared with control mice. Detailed studies analyzing the mechanism manifesting the phenotype are going on.

研究分野：医化学、神経科学、薬理学

キーワード：感音難聴 DFNA1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感音難聴（内耳有毛細胞以降の障害による難聴で、遺伝性難聴、老人性難聴、騒音性難聴、薬剤性難聴などに分類）は、感覚障害中で最多の疾患・障害であるが、根本治療法のない、克服しなければならない難病である。遺伝性感音難聴は、1人/1000出産であり、同じく新生児スクリーニングが導入されている先天性甲状腺機能低下症の1人/3000~5000出産と比べても高頻度で、現在まで約120の原因遺伝子が同定されている。また、老人性難聴患者は、国内で約1500万人（65歳以上の25~40%）と驚く程多いにも拘らず、研究の困難さも加わり、治療法開発が進んでいない。我々は、常染色体優性遺伝性感音難聴1 (DFNA1) の新規遺伝子変異及び患者を発見し、マウスモデルを作製、世界で初めてDFNA1の病態解明に成功した (EMBO Mol. Med. 2016)。更に、このマウスと患者が、血球系異常を呈する事を発見した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が作製した2種のDFNA1モデルマウス (Transgenic: TG and Knock-in: KI) を用いて、DFNA1に付随して起こる全身病態（血球異常や中枢神経異常）と難聴発症機序の詳細解明を行い、DFNA1、延いてはアクチン代謝異常が関わる感音難聴の治療薬開発の先駆けになろうというものである。

3. 研究の方法

既に作製・所有していたTGマウスに加えて、ヒト病態を正確に反映するため、新たにKIマウスを作製した。

- A. 4週齢の新規DIA1変異体発現TGマウスに音響暴露負荷を行い、4週間後（8週齢で）マウスを固定し、内毛細胞のリボンシナプスをCtBP2染色により可視化し、コントロールマウスと比較する。
- B. 新規DIA1変異体発現TGマウスとKIマウスから、経時的（生後5、7、14日）に蝸牛を採取し、DIA1染色により、内在性のDIA1と変異体DIA1の蝸牛における発現細胞と細胞内局在を明らかにする。野生型及び変異体を一過性、更には、安定的に発現するMDCK細胞を作製し、それぞれの細胞内局在を明らかにする。変異体DIA1が局在する部位での異常を形態学的に明らかにする。2種の疾患マウスモデルを用いて、聴性脳幹反応（ABR）で異常が認められる月齢（5か月）で、マウスから蝸牛を採取し、変異体DIA1が局在する細胞内部位での形態学的異常を、透過電子顕微鏡を用いて観察する。
- C. 新規DIA1変異体発現TGマウスとKIマウスの血液を経時的（1か月~12か月齢）に採血し、血液解析に供することにより、異常を呈する血球、及びその発現時期を明らかにする。更に、異常が認められた血球の形態学的異常を、電子顕微鏡を用いて明らかにする。加えて、異常出現機序を解明するため、初代培養系とインキュベーター顕微鏡を用いて、血球分化過程における異常発現時期を明らかにする。

4. 研究成果

- A. 新規DIA1変異体発現TGマウス（4週齢）に音響暴露負荷を行った。音響暴露4週

後、TG マウスでは野生型マウスに比し、高音域を司る有毛細胞内のリボンシナプス数が有意に低下することを明らかにした。このことは、DFNA1 患者での進行性の難聴が、騒音などの後天性負荷により影響を受けることを示唆した。

B. 上記 TG マウスに加え、新規 DIA1 変異体を発現する KI マウスを作製して、新規 DIA1 変異体の発現細胞と細胞内局在を解明することで、DFNA1 の病態機序を明らかにした。即ち、新規 DIA1 変異体は、蝸牛らせん神経節細胞、支持細胞、有毛細胞に存在し、有毛細胞では頂側結合 (apical junctional complex: AJC) に局在した。培養細胞を用いた実験で、新規 DIA1 変異体は、頂側結合 (ZO1 染色) を波打ち状に変化させた。透過電子顕微鏡で、5 か月齢 TG マウスの有毛細胞の頂側結合を観察すると、種々の形態異常が存在した。このことより、DFNA1 の進行性難聴を引き起こす主要病変部位は、有毛細胞の頂側結合であることが示唆された。

C. TG と KI マウスを用いて、経時的に血球解析を行った (1 か月~12 か月齢)。加齢により、血小板径のバラツキが顕在化してくる傾向が捉えられた。現在、血小板異常が出現する時期や機序について、詳細を解明している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto I, Ueyama T, Hayashibe M, Nakamura T, Mohri H, Kiyonari H, Shigyo M, Tohda C, Saito N	4. 巻 302
2. 論文標題 Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 57-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Morioka S, Sakaguchi H, Yamaguchi T, Ninoyu Y, Mohri H, Nakamura T, Hisa Y, Ogita K, Saito N, Ueyama T	4. 巻 146
2. 論文標題 Hearing vulnerability after noise exposure in a mouse model of reactive oxygen species overproduction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 459-473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazono A, Adachi N, Takahashi H, Seki T, Hamada D, Ueyama T, Sakai N, Saito N	4. 巻 293
2. 論文標題 Pharmacological induction of heat shock proteins ameliorates toxicity of mutant PKC in spinocerebellar ataxia type 14	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 14758-14774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueyama T	4. 巻 8
2. 論文標題 Rho-family small GTPases: from highly polarized sensory neurons to cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8020092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Takashi, Ueyama Takehiko, Ninoyu Yuzuru, Sakaguchi Hirofumi, Choijookhuu Narantsog, Hishikawa Yoshitaka, Kiyonari Hiroshi, Kohta Masaaki, Sakahara Mizuho, de Curtis Ivan, Kohmura Eiji, Hisa Yasuo, Aiba Atsu, Saito Naoaki	4. 巻 144
2. 論文標題 Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1863 ~ 1875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1242/dev.147900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hanes Cheryl M., D' Amico Anna E., Ueyama Takehiko, Wong Alexander C., Zhang Xuexin, Hynes W. Frederick, Barroso Margarida M., Cady Nathaniel C., Trebak Mohamed, Saito Naoaki, Lennartz Michelle R.	4. 巻 199
2. 論文標題 Golgi-Associated Protein Kinase C- Is Delivered to Phagocytic Cups: Role of Phosphatidylinositol 4-Phosphate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 271 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.4049/jimmunol.1700243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shirafuji Toshihiko, Ueyama Takehiko, Tanaka Shigeru, Hide Izumi, Saito Naoaki, Sakai Norio	4. 巻 50
2. 論文標題 Validation of Anti-CSP , SNAP25, Tyrosine Hydroxylase, Ubiquitin, Cleaved Caspase 3, and pSer PK Motif Antibodies for Utilization in Western Blotting	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 177 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1267/ahc.17028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirafuji Toshihiko, Ueyama Takehiko, Adachi Naoko, Yoshino Ken-Ichi, Sotomaru Yusuke, Uwada Junsuke, Kaneoka Azumi, Ueda Taro, Tanaka Shigeru, Hide Izumi, Saito Naoaki, Sakai Norio	4. 巻 38
2. 論文標題 The Role of Cysteine String Protein Phosphorylation at Serine 10 and 34 by Protein Kinase C for Presynaptic Maintenance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 278 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1523/JNEUROSCI.1649-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Isao, Ueyama Takehiko, Hayashibe Masakazu, Nakamura Takashi, Mohri Hiroaki, Kiyonari Hiroshi, Shigyo Michiko, Tohda Chihiro, Saito Naoaki	4. 巻 302
2. 論文標題 Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueyama Takehiko, Sakuma Megumi, Nakatsuji Mio, Uebi Tatsuya, Hamada Takeshi, Aiba Atsu, Saito Naoaki	4. 巻 140
2. 論文標題 Rac-Dependent Signaling from Keratinocytes Promotes Differentiation of Intradermal White Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 84.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jid.2019.06.140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Bong Jik, Ueyama Takehiko, Miyoshi Takushi, Lee Seungmin, Han Jin Hee, Park Hye-Rim, Kim Ah Reum, Oh Jayoung, Kim Min Young, Kang Yong Seok, Oh Doo Yi, Yun Jiwon, Hwang Sang Mee, Kim Nayoung K D, Park Woong-Yang, Kitajiri Shin-ichiro, Choi Byung Yoon	4. 巻 56
2. 論文標題 Differential disruption of autoinhibition and defect in assembly of cytoskeleton during cell division decide the fate of human DIAPH1-related cytoskeletopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 818 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirafuji Toshihiko, Shimazaki Haruo, Miyagi Tatsuhiro, Ueyama Takehiko, Adachi Naoko, Tanaka Shigeru, Hide Izumi, Saito Naoaki, Sakai Norio	4. 巻 98
2. 論文標題 Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a nonsense mutation in the PRKCG gene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 46 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.mcn.2019.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 脳・脊髄損傷後修復時のアストロサイトにおける新規シグナリング
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 イメージング手法を駆使した聴・平衡覚機能障害治療法開発への挑戦
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 遺伝子改変マウスからの疾患病態解明と治療法開発戦略へのフィードバック
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会および第13回日中合同組織細胞化学セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 ヒト患者とマウスモデルから学ぶアクチン動態障害による遺伝性難聴の治療戦略
3. 学会等名 第88回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiko Ueyama
2. 発表標題 Hearing loss causing from impaired actin dynamics: clinical implications
3. 学会等名 International Congress of ORL-HNS 2018 in conjunction with 92nd Annual Congress of Korean Society of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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	坂口 博史 (Sakaguchi Hirofumi) (00515223)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	