

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11315

研究課題名(和文)メカノトランスダクション欠損マウスを用いたゲンタマイシンの耳毒性発生機序の解明

研究課題名(英文) Systemic Fluorescent Gentamicin Enters Neonatal Mouse Hair Cells Predominantly Through Sensory Mechanoelectrical Transduction Channels

研究代表者

川島 慶之 (Kawashima, Yoshiyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10376759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬は内耳有毛細胞に進入しアポトーシスを引き起こすが、その進入経路の全容は解明されていない。これまで、主にin vitroの研究によりマウスの有毛細胞へのAGの進入経路の候補として、エンドサイトーシス、機械電気変換(sensory mechanoelectrical transduction, MET)チャネルなどが挙げられてきた。本研究では、内耳有毛細胞のMETチャネル欠損マウスを用いて、全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬が新生児マウスの有毛細胞に進入する経路は、主にMETチャネルであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノグリコシド系抗菌薬はグラム陰性桿菌による重症感染症および結核の治療において必要不可欠な薬剤であるが、全身投与されると有毛細胞に取り込まれ、容量依存性に不可逆性の感音難聴を引き起こす。代替薬が無いため、副作用(薬剤性難聴)の予防手段の確立が望まれている。本研究の結果は、METチャネルに対する特異的なアンタゴニストや、METチャネルを通過しない設計の新規医薬品の開発を支持する根拠となる。また、METチャネル欠損マウスは、アミノグリコシド系抗菌薬以外にも、シスプラチンなどの内耳毒性を持つ薬剤の有毛細胞への進入経路の解明や、内耳障害の発症機序およびその予防法の解明に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Systemically administered aminoglycoside antibiotics can enter inner ear hair cells and trigger apoptosis. However, the in vivo route(s) by which aminoglycoside antibiotics enter hair cells remains controversial. Aminoglycosides can enter mouse hair cells by endocytosis or by permeation through transmembrane ion channels such as sensory mechanoelectrical transduction (MET) channels, transient receptor potential (TRP) channels, P2X channels, Piezo2-containing ion channels, or a combination of these routes. Transmembrane channel-like 1 (TMC1) and TMC2 are essential for sensory MET and appear to be the pore-forming components of sensory MET channels. The present study provided substantial novel evidence that systemic fluorescent gentamicin enters mouse hair cells predominantly through sensory MET channels using Tmc1; Tmc2 knockout mice.

研究分野：耳科学

キーワード：アミノグリコシド系抗菌薬 メカノトランスダクションチャネル 薬剤性難聴 Tmc1 Tmc2 有毛細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド系抗菌薬は、グラム陰性桿菌による重症感染症や結核の治療に必要不可欠な薬剤であるが、副作用として内耳毒性を持つ。全身投与されたアミノグリコシド系抗菌薬は、内耳有毛細胞進入しアポトーシスを誘発することにより感音難聴を引き起こすことが分かっているが、全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬の有毛細胞への進入経路の詳細は不明である。

全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬は血液迷路関門を通過後、内リンパ液を介して頂上膜から有毛細胞内へ進入する。アミノグリコシド系抗菌薬のような極性をもつ物質は脂質膜を通過できないため、エンドサイトーシスや膜貫通型イオンチャネルを介して有毛細胞に進入すると考えられる。*in vitro*の研究では、アミノグリコシド系抗菌薬の有毛細胞への進入経路は、主にメカノトランスダクションチャネルであるとする報告や、活性化された TRPA1 チャネルを介するとの報告がある。一方、数少ない *in vivo*の研究では、全身投与したカナマイシンがニワトリの有毛細胞の頂上膜直下の小胞内に観察されたことから、エンドサイトーシスによってアミノグリコシド系抗菌薬が有毛細胞に取り込まれたと報告されたが、直接的な証拠は示されていない。TMC1 と TMC2 はメカノトランスダクションチャネルの小孔を形成するタンパク質である。幼齢な *Tmc1;Tmc2* ノックアウトマウスの有毛細胞は、正常な形態の聴毛を持つが、メカノトランスダクション電流を欠く。

2. 研究の目的

全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬が、メカノトランスダクションチャネルを介して有毛細胞に進入することを明らかにする。

3. 研究の方法

野生型マウスとして C57BL/6J マウスを、メカノトランスダクションチャネル欠損マウスとして *Tmc1 ;Tmc2* マウスを用いた。さらに *Tmc1 ;Tmc2* マウスの X 染色体上に m-Cherry で標識した *Tmc1* を導入した *Tmc1::mCherry* マウスを用いた。この雌体では X 染色体の不活性化により TMC1::mCherry が有毛細胞ごとにモザイク状に発現する。

(実験 1) P4 の野生型と *Tmc1 ;Tmc2* マウスにゲンタマイシン (GM、300 mg/kg) またはテキサスレッド標識ゲンタマイシン (GTTR、2 mg/kg) を皮下投与した。対照群として野生型マウスにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を皮下投与した。3 または 24 時間後に耳包を摘出し、固定後に蝸牛感覚上皮を取り出した。GM 投与群および PBS 投与群は抗 GM 抗体と蛍光二次抗体を用いて免疫染色した。全サンプルを Myosin VI (有毛細胞に特異的なタンパク質) で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(実験 2) *Tmc1 ;Tmc2* マウスの有毛細胞におけるエンドサイトーシスの活性を確認するため、P2 の野生型と *Tmc1 ;Tmc2* マウスから蝸牛感覚上皮を摘出し培養した。カチオン化フェリチンを添加した培養液中で、4 (エンドサイトーシスの活性が抑制される) または 37 で 2 時間培養した。洗浄、固定の後、脱水、包埋、薄切、染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

(実験 3) P0、P2、P4、P6 の野生型と *Tmc1 ;Tmc2* マウスに GTTR (2 mg/kg) を皮下投与し、3 時間後に耳包を取り出し固定した。蝸牛感覚上皮を摘出し、Myosin VI を蛍光免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。各蝸牛の頂回転、中間回転、基底回転の有毛細胞を撮影し、Myosin VI で染色された有毛細胞の細胞体の範囲に含まれる GTTR の蛍光強度を定量した。

(実験 4) P4 の雌の *Tmc1::mCherry* マウスに GTTR (2 mg/kg) を皮下投与した。3 時間後に蝸牛感覚上皮を摘出し、一部は固定し、一部は底面がカバーガラスの培養皿に培養した。固定し

た感覚上皮は phalloidin (細胞骨格であるアクチンに結合する) と抗 Myosin VI 抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。培養した感覚上皮は、固定せずに培養皿上で GTTR の蛍光を観察し、位置は変えずに培養液を FM1-43 (5 μ M) に置き換え、FM1-43 の蛍光を 15 秒ごとに微速度撮影した。

4. 研究成果

【結果】

(実験 1) P4 の野生型マウスにおいて、GM の全身投与 3 時間後の時点では蝸牛の有毛細胞への GM の取込は明確には確認できなかったが、投与から 24 時間後には有毛細胞で GM の蛍光が観察された。GTTR を全身投与した野生型マウスでは、投与 3 時間後には有毛細胞内に明らかな GTTR の蛍光を認めた。24 時間後では細胞質に拡散した蛍光と斑点状の凝集した蛍光を認めた。GTTR と GM の細胞内分布パターンは同様であったことから GTTR が GM の代替となると判断した。全身投与した GTTR の有毛細胞への取り込みにおけるメカノトランスダクションチャンネルの役割を評価するため、P4 の野生型マウスと *Tmc1 ;Tmc2* マウスに GTTR を全身投与した。*Tmc1 ;Tmc2* の有毛細胞内で検出された GTTR の蛍光強度は、野生型の有毛細胞内で検出された GTTR の蛍光強度に比較し有意に低かった。

(実験 2) P2 の *Tmc1 ;Tmc2* と野生型マウスの蝸牛感覚上皮を、カチオン化フェリチンを添加した培養液で 4 または 37 で培養した。4 で培養した感覚上皮は *Tmc1 ;Tmc2* も野生型も有毛細胞内にフェリチンを含む小胞を認めなかったのに対し、37 で培養した感覚上皮では、*Tmc1 ;Tmc2* と野生型のどちらの有毛細胞内においてもフェリチンを含む小胞を認めた。この結果より、*Tmc1 ;Tmc2* の有毛細胞はエンドサイトーシスの機能を有すると考えた。

(実験 3) マウス蝸牛有毛細胞のメカノトランスダクションチャンネルの機能は P0 の基底回転側から始まり、頂回転では P2-P3 で初めて検出される。メカノトランスダクション電流の最大振幅は基底回転では P0 から P2 の間、頂回転では P2 から P6 の間で上昇する。メカノトランスダクションチャンネルが GTTR の有毛細胞への主な進入経路であれば、チャンネルの機能開始時期に一致して GTTR が有毛細胞に進入するようになると考えた。GTTR を P0、P2、P4、P6 の *Tmc1 ;Tmc2* マウスと野生型マウスに全身投与し、3 時間後に蝸牛の有毛細胞内の GTTR の蛍光強度を測定した。野生型有毛細胞の細胞体における GTTR の蛍光強度は、P0 から P4 にかけて上昇する傾向を示したのに対し、*Tmc1 ;Tmc2* 有毛細胞の細胞体における GTTR の蛍光強度は、P0 から P6 までほぼ一定して低かった。

(実験 4) *Tmc1 ;Tmc2* マウスの有毛細胞に GTTR が取り込まれない理由として、メカノトランスダクションチャンネルの欠損ではなく、*Tmc1 ;Tmc2* マウスの内耳のホメオスタシスの異常に起因している可能性が考えられた。そこで雌の *Tmc1::mCherry* マウスに GTTR 全身投与し、3 時間後に蝸牛感覚上皮を観察した。どの有毛細胞も細胞体と感覚毛の形態は維持していたが、GTTR を取り込んだ細胞と取り込まない細胞とがモザイク状に観察された。続いて、GTTR 全身投与後に培養した蝸牛感覚上皮を FM1-43 に浸漬すると、GTTR を含んだ細胞のみ短時間で FM1-43 を取り込んだ。

【考察】

本研究では、エンドサイトーシスの活性は有するがメカノトランスダクションチャンネルを欠損する有毛細胞をもつ *Tmc1 ;Tmc2* 遺伝子改変マウスと野生型マウスを用いて、全身投与したアミノグリコシド系抗菌薬の有毛細胞への取込を比較検討した。以下の 3 つの結果から全身投

与したアミノグリコシド系抗菌薬は主にメカノトランスダクションチャンネルを介して有毛細胞に取り込まれると結論した。1) 野生型マウスにおいてメカノトランスダクションが機能している時期(P4)では、メカノトランスダクションチャンネル欠損有毛細胞への GTTR 取り込み量は、野生型と比べて有意に低かった。2) 野生型において、有毛細胞への GTTR の取り込み量は、メカノトランスダクションの発達に伴い有意に増加した。3) メカノトランスダクションチャンネルを発現する有毛細胞がモザイク状に存在するマウスでは、全身投与した GTTR は蝸牛感覚上皮において有毛細胞にモザイク状に取り込まれ、GTTR を取り込んだ細胞のみ生体外で急速に FM1-43 を取り込んだ。GTTR を全身投与した 3 時間後の有毛細胞内の GTTR の蛍光強度は、いずれの日齢でも、メカノトランスダクションチャンネル欠損マウスにおいては、野生型に比較して低かったが、PBS 投与群と比較すると高かった。この結果は、主な経路ではないものの、AG が有毛細胞内に進入する MET チャンネル以外の経路の存在を示唆する。

本研究の結果は、メカノトランスダクションチャンネルに対する特異的なアンタゴニストや、メカノトランスダクションチャンネルを通過しない設計の新規医薬品の開発を支持する証拠となる。また、メカノトランスダクションチャンネル欠損マウスが GM 以外のアミノグリコシド系抗菌薬やシスプラチンなどの内耳毒性を持つ薬剤の有毛細胞への進入経路の解明や、内耳障害の発症機序およびその予防法の解明に貢献できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------