

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791242
 研究課題名 (和文) 内耳発達過程における Cochlin の発現 —Spatiotemporal な検討—
 研究課題名 (英文) spatiotemporal expression of cochlin in the inner ear of rats
 研究代表者
 新藤 晋 (SHINDO SUSUMU)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00350067

研究成果の概要：

Cochlin は内耳可溶性蛋白の中で最も多く存在する蛋白であるが、その機能について詳しくはわかっていない。我々は cochlin の機能解明を目的として、ラットを用いた内耳発達過程における Cochlin の発現パターンの解析 (Spatiotemporal な検討) を行なった。その結果、cochlin は時間的にも空間的にも特徴的な発現パターンを示す蛋白質であることが解明された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：cochlin, rat, 内耳, spatiotemporal

1. 研究開始当初の背景

我々是非症候性遺伝性難聴 DFNA9 の病因である Cochlin について先進的に研究を行ない、今までに i) Cochlin が分子量の異なる 3 種類のアイソフォームを持つこと。ii) Cochlin が内耳特異的蛋白であること、iii) Cochlin の一部が切断されて作られたと考えられている Cochlin-tomo-protein (CTP) が、今まで困難とされてきた外リンパ瘻の診断マーカーとして有用であること (現在特許出

願中) などを報告してきた。しかし一方でその詳しい機能は判明していない。そのため、cochlin の機能解明は世界的にも大きな研究テーマとなっている。

我々は Cochlin について独自に抗体を作成し、ヒト、マウス、ラットの内耳について免疫組織学検討を行なったところ、コルチ器、血管条には発現せず、ラセン靭帯やラセン板縁に強く発現していることを明らかにした。さらに発現パターンについて電子顕微鏡を

用いた詳細な検討により、線維細胞や細胞外マトリックス (ECM) に主に発現していることを突き止めた。この結果は今までほとんど分かっていなかった **Cochlin** の機能解析を進める上で極めて示唆に富んだ所見であった。

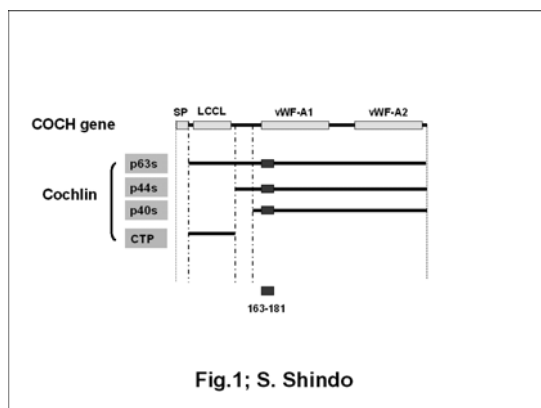
今回我々はさらなる **Cochlin** の機能解析を進めるにあたり、免疫組織学的検討で強い染色性を認めたラセン靭帯、ラセン板縁について着目した。特にラセン靭帯はカリウムイオンのリサイクル以外にも、水分子の移動、炎症反応、グルタミン酸代謝機構など極めて多彩な機能を有している部位であると考えられており、近年ではラセン靭帯の機能解析が内耳研究のひとつの大きなテーマとなっている。

2. 研究の目的

ある蛋白が発生学上、どの時期にどの部位に発現するのかを知ることは、その蛋白の性質や機能を知る上で非常に重要な鍵となり得る。我々は **cochlin** の機能解析を進める目的で、**cochlin** の時空間的発現パターンを解析する研究を行うことにした。

3. 研究の方法

実験動物としてwister系ラットを使用し、抗体は我々のグループが独自に作成した抗vWF-A1抗体を使用して実験を行った。(Fig. 1)



〈1〉：免疫組織学的検討

Cochlinの発現パターンを、生後3日目、6日目、10日目、13日目、17日目、20日目、24

日目の内耳に加え、陽性コントロールとして成獣の内耳の連続切片を作成し、我々の作成した抗**Cochlin**抗体を用いて**免疫組織化学的**に検討する。そして生後どの時期から**Cochlin**が発現し、染色性が増強していくのかを**定性的に**検討する。

〈2〉：ウェスタンブロッティング

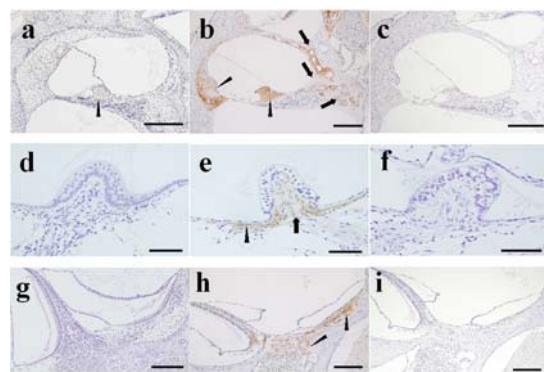
次に①と同様のタイムポイントで内耳組織を採取し、**ウェスタンブロット**による検討を行なう。その際**GAPDH**を内部標準とすることで経時的な発現性の変化を**定量的に**分析する。

4. 研究成果

〈1〉 実験結果

① 免疫染色(Fig.2)

内耳が未熟な生後6日目には **cochlin** に対する染色性はほとんど認められなかった(a, d, g)が、生後70日目の内耳では、**cochlin** に対する染色性が明瞭に認められた(b, e, h)。次に発現部位についてみると、蝸牛ではラセン靭帯やラセン板縁、神経線維の周囲組織に、同じく前庭では感覚細胞下の結合組織に発現を認めた。一方で蝸牛のコルチ器や血管条、前庭の感覚細胞や暗細胞には経過を通じて **cochlin** の発現は認められなかった。また陰性コントロール (c, f, i) では染色性は認められなかった



② ウェスタンブロット(Fig.3, Fig. 4)

全体的にみると、生後13日目にはほとんど

ど cochlin の発現は認められなかったが、成長するにつれて cochlin の発現が増強した。内耳組織に存在する 3 種類の各アイソフォームの (p63s, p44s, p40s) 発現パターンを見ると、cochlin が発現し始める生後 17 日目から 24 日目にかけては p63s が最も優位なアイソフォームであったが、その後 p63s の発現は低下した。p40s は生後 17 日目には発現を僅かに認めるのみであったが、その後発現が徐々に増加し、成獣では p40s が最も優位となった。p44s は経過を通じて発現は僅かであった。

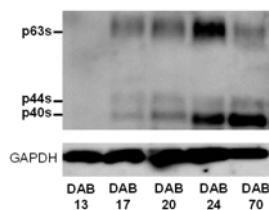


Fig.3; S. Shindo

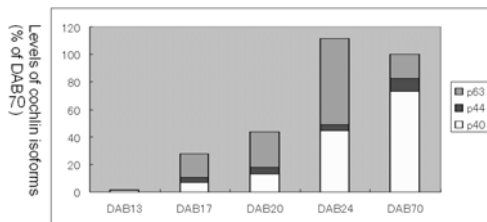


Fig.4; S. Shindo

(2) 考察

Cochlin は内耳可溶性蛋白の約 70% を占めるメジャー蛋白であるが、一方で臓器特異性が高い (内耳以外にほとんど発現していない) ために、その機能は未だに不明な点も多い。われわれは内耳の機能を推測する新たな手法として、時空間的検討を行なった。まず発現部位についてみると、cochlin は蝸

牛、前庭の感覚細胞周囲の結合組織に発現を認めた。ラセン靭帯を始めとする内耳感覚細胞周囲の結合組織は、水やイオン輸送、グルタミン酸の代謝および炎症反応など多彩な役割を演じていることが分かってきており、近年注目されている場所である。興味深いことに、cochlin は水やイオン輸送、グルタミン酸の代謝に関わる蛋白の発現が増強して、内耳が成熟に向かう生後 20 日目ごろに一致して発現が増強していた。遺伝子配列から機能を推測するモチーフ解析の結果より、cochlin は細胞外マトリックス蛋白であると考えられていることから、cochlin は内耳の支持組織に発現し内耳が成熟するために必要な細胞機能調節を行なっている蛋白である可能性が示唆された。

もうひとつの興味深い結果は、cochlin のアイソフォームの割合が内耳の成長につれて変化していることである。生後初期には全長 cochlin である p63s が優位であったものが成長するにつれて減少し、代わりに短いアイソフォームの p40s が優位となることが示された。この結果は cochlin のアイソフォーム形成メカニズムを解明する上で非常に興味深い。すなわちアイソフォームは、mRNA レベルでスプライシングを受けて作られる場合と、蛋白レベルで切られることによって作られる場合があるが、今回のデータは全長 cochlin である p63s が成長に伴い切断された結果、p63s の減少に一致して p40s が増加したように見える。つまり cochlin は蛋白レベルでの修飾によってアイソフォームが作成されると推測している。現在われわれはこの仮説を裏付けるべく、ラット生後発達過程における CTP の発現パターン解析や COCHmRNA のスプライシングバリエーションの検討を行ない、アイソフォームの形成メカニズムについて研究を進めている。

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 3 件)

- ① Shindo S, Ikezono T, Ishizaki M, Sekiguchi S, Mizuta K, Li L, Takumida M, Pawankar R, Yagi T. Spatiotemporal expression of cochlin in the inner ear of rats during postnatal development. *Neurosci Lett.* 24;444(2):148-52. 2008 査読有
- ② Mizuta K, Ikezono T, Iwasaki S, Arai M, Hashimoto Y, Pawankar R, Watanabe T, Shindo S, Mineta H. Ultrastructural co-localization of cochlin and type II collagen in the rat semicircular canal. *Neurosci Lett.* Mar 21;434(1):104-7. 2008 査読有
- ③ Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T. Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL*;67(5):252-8. 2005 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 新藤 晋・池園哲郎・関根 久遠・李 麗淑・登坂 亜希子・八木 聡明. 生後ラット内耳発達過程の外リンパにおける cochlin 発現の検討. 2008 年 10 月 神戸
- ② Susumu shindo・Tetsuo Ikezono・Toshiaki Yagi. Isoform-specific analysis of Cochlin in the developing rat. Washington D.C., Sep. 2007.

- ③ Susumu shindo・Tetsuo Ikezono・Masamichi Ishizaki・Lishu Li・Masaya Takumida・Ruby Pawakar・Akihiko Saito・Toshiaki Yagi. Developmental expression of cochlin in the inner ear of rats 24th Barany international congress. Sweden, Jun. 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新藤 晋 (Shindo Susumu)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00350067