

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09319
研究課題名(和文)内耳有毛細胞ときこえを守る支持細胞の働き

研究課題名(英文)Role of Supporting cells in cochlear

研究代表者

勝沼 紗矢香 (Katsunuma, Sayaka)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80457043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：感覚上皮は、機能の異なる感覚細胞と支持細胞の2種類が、特徴的な細胞配列を形成するも、その配列機序と役割はわかっていない。申請者らは、聴覚上皮の有毛細胞(感覚細胞)同士の異常な接着がみられるネクチンノックアウト(KO)マウスを報告し、感覚細胞と支持細胞の配列機序を明らかにした(Katsunuma, et al. 2016. Togashi, et al. 2011)。申請者らは、ネクチンKOマウスが難聴を示し、接した有毛細胞のみは生後すぐは機能を有するも、成長と共にアポトーシスにより失われることを明らかにし(未発表)、有毛細胞同士の異常な接着自体がアポトーシスの契機となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感覚上皮は、感覚細胞と支持細胞の2種類の細胞から構成され、感覚細胞は支持細胞に囲まれて互いに接することなく並ぶ。この特徴的な細胞配列は、視機能を担う網膜、聴覚を担う聴覚上皮、嗅覚を担う嗅上皮などの感覚上皮に共通であり、さらには種を超えて保存されている配列である。聴覚上皮細胞配列において、有毛細胞の維持ときこえにおける支持細胞の役割を明らかにすることは、感覚器共通の感覚受容機構を解明に繋がる。また、感覚上皮において、感覚細胞の生存およびその機能を守るための支持細胞の働きはこれまで明らかにされておらず、本研究により、感覚障害治療に対する新しい治療戦略を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In sensory epithelium, sensory cells and supporting cells are arranged in a characteristic mosaic pattern. The sensory cells are always separated from adjacent sensory cells by supporting cells. How the mosaic patterns are developed and maintained has not been well understood. We have reported sensory cells abnormally attached each other in nectin knockout (KO) mice, and have revealed how the mosaic patterns in sensory epithelium are arranged (Katsunuma, et al. 2016. Togashi, et al. 2011). We have proved that nectin KO mice have hearing impairment (unpublished). The attached hair cells in KO mice, which are alive and functioning right after birth, are gradually lost (unpublished). These results indicate that abnormal adhesion in neighboring hair cells induce apoptosis in themselves.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：聴覚上皮 感覚上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感覚上皮は、機能の異なる感覚細胞と支持細胞の2種類の細胞から構成され、感覚細胞は支持細胞に囲まれて互いに接することなく並んでいる。この特徴的な配列は、視機能を担う網膜、きこえを担う聴覚上皮、においを担う嗅上皮など、感覚上皮に共通であり、また種を超えて進化上保存されていることから重要と考えられる。しかし、感覚上皮において機能の異なる細胞が規則正しく配列することの機能的な意義のみならず、細胞が規則正しく並ぶためのメカニズムすらほとんど明らかにされていなかった。これまで、マウス内耳の聴覚上皮の細胞配列には接着分子ネクチンの働きが必須であることが明らかにされていた (Togashi, et al. 2011)。そこで申請者は、嗅上皮においても内耳と同様のメカニズムが働いていると想定して研究をすすめた。マウス嗅上皮において、嗅細胞と支持細胞が発生過程において自ら再配列運動することで規則的な細胞パターンを形成すること、嗅細胞(感覚細胞)と支持細胞が異なるサブタイプの接着分子ネクチンとカドヘリンを特徴的なパターンで発現することがわかり、さらに接着分子ネクチンをノックアウト(KO)したマウスや、カドヘリンの細胞内領域に結合する分子である N-カテニンを KO したマウスの嗅上皮では、本来接することのない嗅細胞が接したままで分離できないという細胞パターンの異常が観察された。マウス嗅上皮における接着分子発現の観察、嗅細胞と支持細胞を模した培養細胞の接着力と細胞配列形成、数理モデルを用いた2細胞の接着力と細胞配列形成を観察した結果、ネクチンとカドヘリンが協調することにより細胞間接着力が変化し、細胞境界が収縮または伸長することによって、細胞インターカレーションが生じ、特徴的な細胞配列が形成されることを明らかにした (Katsunuma, et al. 2016)。以上のように、申請者らは、感覚上皮の細胞が規則正しく並ぶためのメカニズムを明らかにしてきたが、その機能的意義はいまだ不明であった。

2. 研究の目的

感覚上皮は、機能の異なる感覚細胞と支持細胞の2種類の細胞から構成され、感覚細胞は支持細胞に囲まれて互いに接することなく並んでいる。申請者らは、感覚上皮におけるこれら細胞の配列機序を報告したが (Katsunuma, et al. 2016. Togashi, et al. 2011.) この配列が機能に果たす役割はわかっていない。申請者らはきこえを担う聴覚上皮で、異常に接した有毛細胞(感覚細胞)がみられるマウスを報告しており、これらマウスにおいて有毛細胞が次第に失われ難聴になることがわかってきた(未発表)。ここから申請者は、支持細胞が有毛細胞を取り囲む特徴的な細胞配列が、有毛細胞の生存に関与している可能性を考えた。本研究では、聴覚上皮の特徴的な細胞配列が、支持細胞の働きを通してどのように有毛細胞の維持および聞こえに結びついているかを明らかにすることを目的とした。これにより、聴覚受容機構の解明と、有毛細胞保護の新戦略を開発する。

3. 研究の方法

(1) ネクチン KO マウスのきこえと有毛細胞の機能の判定。

ネクチン KO マウスのきこえを判定するために、聴性脳幹反応 (ABR: Auditory Brainstem Response) 測定、耳音響反射 (DPOAE: Distortion Product Oto Acoustic Emission) 測定を行う。ABR は聴覚路の神経活動を脳波として測定するものである。一方、DPOAE は聴覚上皮の外有毛細胞の働きをみるものであるため、マウス聴覚上皮の外有毛細胞の状態とあわせてその機能が評価できる。また、これらの生理学的検査は生後すぐのマウスでは評価できない。そのため、生後すぐのマウス聴覚上皮を摘出・培養し、FM-dye を加えて有毛細胞への取り込みを観察し、有毛細胞の機能を評価する。

(2) ネクチン KO マウス有毛細胞が成長とともに失われる機序の解明。

ネクチン KO マウス聴覚上皮を生後すぐから成長過程を追って摘出し、蛍光免疫染色の手法にて観察し、有毛細胞が失われる時期、その割合を明らかにする。また、有毛細胞の異常な接着による細胞死を仮定し、成長各段階におけるネクチン KO マウス聴覚上皮の接着分子の発現と濃縮を、蛍光免疫染色の手法にて観察する。さらに TUNNEL 染色を用いて、有毛細胞の細胞死がアポトーシスであるか判定する。アポトーシスにより有毛細胞が失われていた場合は、アポトーシスを惹起する経路を、蛍光免疫染色および蛋白発現解析にて同定し、同経路と接着分子の因果関係を同定する。

(3) 有毛細胞のアポトーシス抑制方法の探索。

聴覚上皮にトリプシン処理を行い、細胞同士の接着を解消し、支持細胞との接着が関与しない状況で、KO マウス有毛細胞の細胞死が抑制されるか観察する。また、マウス聴覚上皮の培養手法を確立し、アポトーシスを抑制する物質や環境を模索、同定する。

4. 研究成果

(1)・ネクチン K0 マウスは成長とともに難聴を呈する：ネクチン K0 マウスの聴覚生理学的検査の結果、同マウスは中等度の難聴を示すことが分かった。また、生後 1-3 日のマウス聴覚上皮を摘出、培養し、FM-dye を加えて有毛細胞への取り込みを観察したところ、ネクチン K0 マウス有毛細胞は、対照マウスと比較し、FM-dye の取り込みは同程度であった。これは、生後すぐのネクチン K0 マウス聴覚上皮の有毛細胞は異常に接していたとしても、その機能を有するといえる。以上より、ネクチン K0 マウスは成長とともに難聴を呈することが明らかになった。

(2)・ネクチン K0 マウスの有毛細胞の消失の程度は、中等度難聴であることと矛盾しない：ネクチン K0 マウス聴覚上皮を生後すぐから成長過程を追って摘出し、内有毛細胞はそのほとんどが観察された一方で、異常に接着した外有毛細胞は成長とともに失われていた。この有毛細胞の状態は、中等度難聴を呈することと矛盾しないと考えられる。

・聴覚上皮の細胞配列自体が有毛細胞の生存に重要であることが示唆される：聴覚上皮細胞間における接着分子およびその構成分子の集積を、成長を追って観察したところ、野生型ではこれら分子の細胞間濃縮が変化するのに対し、ネクチン K0 マウスでは有毛細胞と支持細胞間における濃縮に変化がみられなかった。また、ネクチン K0 マウスの異常に接した有毛細胞間では、成長とともに、タイトジャンクション分子の濃縮がみられなくなっていくことがわかった。野生型でこれら接着分子およびその構成分子の細胞間濃縮が変化する時期と、ノックアウトマウスにおける有毛細胞がアポトーシスを生じる時期は、同じころであり、有毛細胞同士の接着がアポトーシスを惹起していると考えられ、聴覚上皮の細胞配列自体が有毛細胞の生存に重要である可能性が考えられる。

・ネクチン K0 マウス聴覚上皮の異常に接した有毛細胞はアポトーシスにより失われる：ネクチン K0 マウス聴覚上皮を摘出し、TUNNEL 染色を行ったところ陽性であった。これにより、同マウスの異常に接した有毛細胞はアポトーシスにより失われることが明らかになった。現在、アポトーシスを惹起する経路を同定するために、ネクチン K0 マウス聴覚上皮を摘出し、そこから mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて探索しており、アポトーシス経路が同定できたのちは、蛍光免疫染色の手法を用いて、聴覚上皮における同経路の分子の発現を観察する。

(3)・有毛細胞のアポトーシス抑制方法の探索：聴覚上皮にトリプシン処理を行い、細胞同士の接着を解消して培養するも、現時点では十分な細胞の生存期間が得られていないため、手技を検討している。また、聴覚上皮の培養方法を確立した。先の FM-Dye の取り込みを行う実験も成功している。アポトーシス経路が同定されたのちは、経路を阻害する薬剤を培養液に添加してアポトーシスを抑制できるかを判定する。

聴覚上皮細胞配列における、支持細胞の働きをとおした有毛細胞の維持と聞こえの仕組みを解明することは、感覚器共通の感覚受容機構を解明するとともに、聴覚障害治療に対する新しい治療戦略を提供できる可能性があり、本研究をすすめていく意義があると考えられる。

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
---------	---------