

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16851

研究課題名（和文）内耳におけるDIAPH1の生理的機能の解明およびDFNA1治療薬の開発

研究課題名（英文）Analysis of physiological function of DIAPH1 in cochlea and development of novel therapeutic drug for DFNA1

研究代表者

二之湯 弦（Ninoyu, Yuzuru）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：70814573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、DFNA1の新規変異（R1204X/R1213X）に対する2種類のモデルマウス（DIA-TGおよびDIA-KI）を用いて、DIA1の発現細胞種および細胞内局在を明らかにした。DIA1は蝸牛有毛細胞頂側結合に局在し、変異体発現マウスでは同部位に形態異常を呈することを明らかにした。また、DIA-TGに音響暴露を行うと、野生型マウスと比較して有意にリボンシナプスの減少と聴毛の形態異常が観察された。すなわち、DFNA1の主要病変部位は蝸牛有毛細胞頂側結合であり、それによる潜在的な蝸牛有毛細胞脆弱性亢進と進行性の有毛細胞脱落が、DFNA1の難聴発症メカニズム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

先天性難聴の6割は遺伝性難聴を言われ、その発生頻度は1000人に1人と高頻度にも関わらず、未だ根本的な治療法は開発されていない。本研究では遺伝性難聴の一つDFNA1の進行性難聴発症機序を、アクチン骨格制御機構の観点から解明し、蝸牛におけるその難聴責任部位を明らかにした。これは将来的なDFNA1の治療薬開発のみならず、加齢性難聴をはじめとした進行性感音難聴治療薬開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We established two types of DFNA1 mouse model (DIA1-TG, DIA1-KI) expressing novel DFNA1 mutant (R1204X/R1213X), which revealed the expression cell types and subcellular localization of DIA1 in the cochlea. The mutant was localized at the apical junctional complexes (AJC) of cochlear hair cells, where showed morphological abnormalities. Moreover, noise exposure induced significant decrement of the ribbon synapses and stereocilia abnormalities in cochlear hair cells in the mutant mice, suggesting subclinical vulnerability of cochlear hair cells. In conclusion, AJC is the main lesion of DFNA1 and subclinical vulnerability of cochlear hair cells is likely the cause of progressive hearing loss associated with DFNA1.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：感音難聴 DFNA1

1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴は先天性難聴の約 6 割を占めるとされ、1 人/1000 出産と高頻度に認められるが、未だ根本的な治療法開発は進んでいない。現在まで約 120 の原因遺伝子が同定されているが、その多くはアクチン制御に関わる分子とされる。DIA1 は、フォルミンファミリーに属するアクチン重合因子の一つであり、直鎖上アクチン伸長作用を介して様々な細胞応答に関与する。遺伝性難聴の一つ DFNA1 (deafness, non-syndromic autosomal dominant, the first type) は、この DIA1 遺伝変異により引き起こされることが知られていたが、長らくその難聴発症メカニズムはわかっていなかった。我々は日本人難聴者家系から DFNA1 新規変異体、p.R1213X/p.R1204X を報告し、そのモデルマウスの作製・解析により、機能獲得変異による恒常的活性型 DIA1 と進行性難聴との関連を明らかにした (Ueyama 2016)。しかしながら依然として、DIA1 の蝸牛における生理的機能や発現細胞種、および細胞内局在については明らかにされておらず、DFNA1 による難聴克服のためには、より詳細な難聴発症メカニズムの解明が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、DIA1 分子の発現細胞種ならびに細胞内局在を同定し、その生理的機能を理解することにより、より詳細な DFNA1 における難聴発症メカニズムの解明を試みる。これにより DFNA1、延いてはアクチン代謝異常に関わる感音難聴治療薬開発の基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

既に作製・所有していた疾患モデルマウス (DIA1-TG) に加え、より DIA1 変異体の発現細胞種、細胞内局在を明らかにするため、新たに AcGFP で蛍光標識した DIA1 変異体 (AcGFP-DIA1(R1213X)) を発現するノックインマウス (DIA1-KI) を作製した。これら 2 種類のモデルマウスと抗体 (mDia1 および DIAPH1) を用いて、経時的に蝸牛を採取し、DIA1 を発現する細胞種および細胞内局在を同定する。更には、同変異体を一過性および安定発現する MDCK 細胞株 (MDCK^{AcGFP-DIA1(R1213)}) を作製し、変異体が局在する部位での形態学的異状を明らかにする。また、聴性脳幹反応 (ABR) で異常が認められる 5 か月齢の DIA1-TG から蝸牛を採取し、透過型および走査型顕微鏡による蝸牛微細構造の評価を行う。

DFNA1 は進行性感音難聴を特徴とするため、騒音などによる後天的な障害を受けやすい可能性、すなわち蝸牛有毛細胞の脆弱性が存在するとの仮説を立てた。そこで 4 週齢の野生型および DIA1-TG を用いて、一過性聴力閾値上昇を引き起こす中等度の音響暴露負荷 (105dB、1 時間) を行い、8 週齢の時点での聴力、有毛細胞残存率、および内有毛細胞におけるリボンシナプス数についての比較検討と、走査型電子顕微鏡を用いた不動毛の形態評価を行う。

4. 研究成果

DIA1 変異体は、コルチ器およびラセン神経節のいずれにも存在し、蝸牛有毛細胞に於いては頂側結合複合体 (apical junctional complex: AJC) および不動毛先端部に局在した。MDCK 細胞を用いた実験では、細胞頂側面、および微絨毛への強い局在傾向を示す一方で、AJC への局在は不明瞭となり、AJC の形態異常を引き起こすことが解かった。さらに 5 か月齢の DIA1-TG マウスでは、AJC 周囲のアクチン帯の菲薄化と形態異常を呈する一方で、蝸牛神経には明らかな異常を認めなかった。すなわち、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。

音響露実験では、有毛細胞脱落数には有意差を認めなかったが、DIA1-TG マウスにおいてリボンシナプス数の減少が有意に亢進し、さらに不動毛の形態異常が観察された。これはモデルマウスに於いて音響暴露による障害性が亢進していると考えられ、潜在的な有毛細胞脆弱性が存在することが示唆された。このことから、DFNA1 患者での進行

性難聴は、騒音などの後天性負荷により増悪する可能性が示唆された。

以上より、DIA1 活性型変異体による潜在的な有毛細胞脆弱性と進行性の有毛細胞死が、DFNA1 における進行性難聴の本態と考えられた。このことは DIA 変異体の活性を抑える薬剤、または後天的負荷を軽減することにより、難聴の進行抑制が期待できることを示唆している。この研究をさらに発展させることにより、難聴克服に向けた新たな治療標的に成り得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ninoyu Yuzuru, Sakaguchi Hirofumi, Lin Chen, Suzuki Toshiaki, Hirano Shigeru, Hisa Yasuo, Saito Naoaki, Ueyama Takehiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The integrity of cochlear hair cells is established and maintained through the localization of Dia1 at apical junctional complexes and stereocilia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	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） 10.1038/s41419-020-02743-z	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 二之湯弦, 坂口博史, 陳林, 毛利宏明, 斎藤尚亮, 上山健彦
2. 発表標題 DFNA1疾患マウスモデルを用いたDIA1分子の局在と病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二之湯弦
2. 発表標題 DFNA1疾患マウスモデルを用いたDIA1分子の局在と病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ninoyu Y, Sakaguchi H, Chen L, Mohri H, Saito N, Ueyama T
2. 発表標題 Constitutive activation of Dia1 induces hair cell vulnerability via attenuated integrity of apical junctional complexes and stereocilia
3. 学会等名 43rd ARO Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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