

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18319

研究課題名(和文) FOXO3/TGF- β シグナルを介した難聴の新規病態メカニズム解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of new pathological mechanism of hearing loss mediated by FOXO3/TGF-beta signaling pathway

研究代表者

角木 拓也 (Kakuki, Takuya)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70706548

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)：内耳有毛細胞は自己再生能がなく、その障害は不可逆的であるため、内耳性難聴における再生医療が待ち望まれている。最近、細胞極性、代謝に関するフォークヘッド型転写因子のFOXO3の内耳性難聴への関与が注目されている。今回我々は、FOXO3が関係するTGF- β シグナル伝達経路の細胞極性、繊毛形成への関与の解析を行った。結果、FOXO3の内耳有毛細胞における繊毛形成、平面内細胞極性への関与において、TGF- β シグナル伝達経路の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳性難聴に対し有効性を示す薬剤の報告も散見されているが、新規治療薬の開発には至っていない現状である。本研究成果は内耳有毛細胞の細胞極性、繊毛形成におけるメカニズム解明の基礎的データになると考えられた。さらに、本培養細胞では繊毛形成の変化などが解析可能であり、薬剤使用によるその変化が認められたことから難聴のメカニズム解明のほか、新規治療薬の開発のためのin vitroモデルとして有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inner ear hair cells are incapable of self-renewal and their damage are irreversible. Therefore, regenerative medicine for sensorineural hearing loss may be expected. Recently, attention has been focused on the involvement of transcription factor FOXO3 that is involved in cell polarity and metabolism in sensorineural hearing loss. Here we analyze the involvement of FOXO3 in TGF- β signaling pathway in cell polarity and ciliogenesis. As a result, it was suggested that FOXO3/TGF- β signaling pathway plays a role in ciliogenesis and planar cell polarity in inner ear hair cells.

研究分野：耳鼻咽喉科学、分子細胞生物学

キーワード：内耳有毛細胞 平面内細胞極性 繊毛形成 Foxo3 TGF-

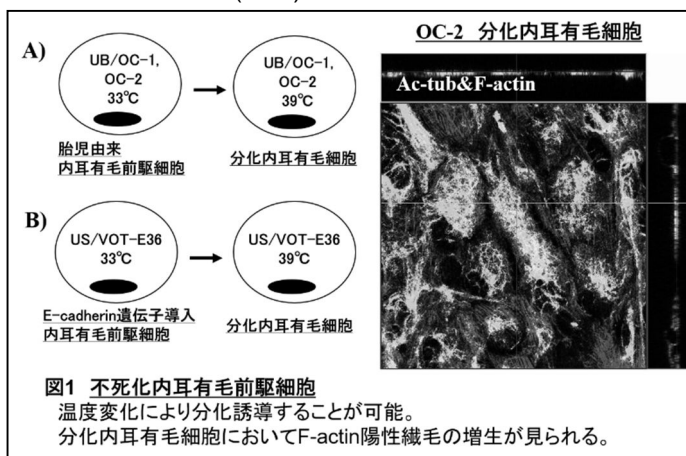
1. 研究開始当初の背景

聴覚器は空気の疎密波などの機械的振動をとらえる器官であり、ヒトはこの振動を音として感じ取っている。その振動をとらえる役割を担っているのがコルチ器に存在する内耳有毛細胞である。内耳有毛細胞は自己再生能を持たず、有毛細胞のダメージによる難聴は不可逆的である。そのため、内耳性難聴にはかねてから再生医療が待ち望まれている。これまで多くの研究者により内耳性難聴時の内耳有毛細胞の変性について研究され、内耳性難聴に対する有効性を示す薬剤の報告も散見される。

また、内耳有毛細胞において正常な機能には整然とした繊毛配列が必要であり、その配列には細胞極性が重要となる。我々は、温度感受性 SV40-largeT antigen 遺伝子導入マウスの胎児より分離培養し不死化させた不死化内耳有毛前駆細胞を有しており、これら細胞は、培養温度の変化によりそれぞれ有毛細胞へ分化させることが可能である(図1)。

以前に我々は、この不死化内耳有毛前駆細胞を用いて、三細胞間タイト結合分子および一次線毛(primary cilia)の形成動態に関して研究を行っており、三細胞間タイト結合分子の変化とそれによる細胞死への影響についてや一次線毛の伸長、細胞周期依存性の増殖能、遊走能の変化について報告した。

一方、最近細胞分裂、代謝、アポトーシスに関与するとされるフォークヘッド型転写因子である Foxo3 の内耳性難聴への関与が注目されており、Foxo3 欠損マウスにおいて騒音暴露による有毛細胞変性が促進することが報告されている。



2. 研究の目的

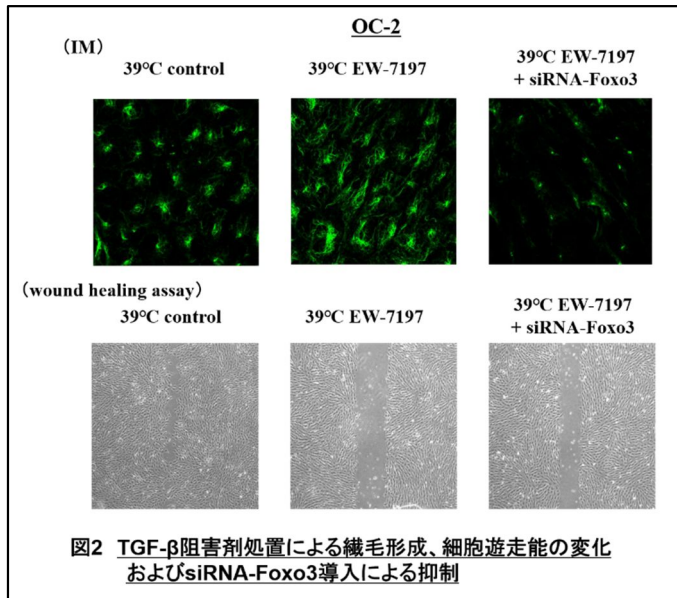
上記背景より本研究では我々の有する不死化内耳有毛前駆細胞を用い、この Foxo3 が関係する TGF-シグナル伝達経路の細胞極性、繊毛形成への関係を見るとともにそのメカニズムの解析を行うこととした。Foxo3 は細胞極性にも関与しているとされており、我々の研究に親和性が高く、そのメカニズムを解析することで難聴の新規病態メカニズムの解明および治療法開発の基礎的なデータとすることを目的とした。

3. 研究の方法

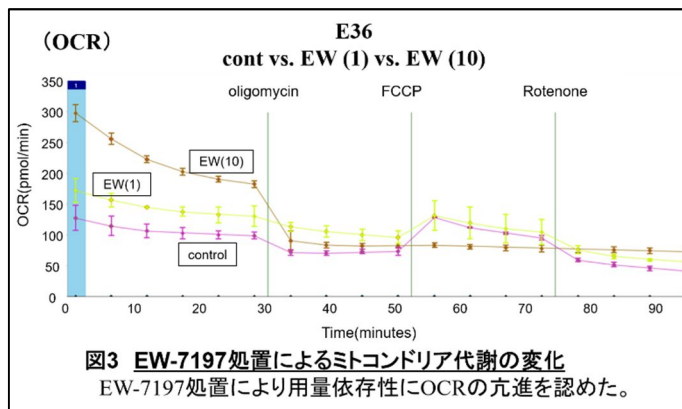
- (1) Foxo3 が関連する TGF-シグナル伝達経路による細胞極性への影響を検討するため、まずは細胞極性制御因子の局在変化を TGF-阻害剤である EW-7197 処置後の内耳有毛細胞を用いて免疫染色で比較検討した。
- (2) 細胞極性への影響による結果としての繊毛形成の変化を解析することとし、分化前後の内耳有毛細胞および EW-7197 処置後の内耳有毛細胞を用いて免疫染色、走査電子顕微鏡(SEM)、透過電子顕微鏡(TEM)で検討した。
- (3) TGF-阻害剤処置により繊毛形成の亢進、配列の整列化が見られたことから、安定した内耳有毛細胞の分化への影響を検討するため、ミトコンドリア代謝、酸化ストレスの変化を解析することとした。ミトコンドリア代謝に関しては細胞外フラックスアナライザーを用いて解析した。
- (4) TGF-阻害剤の内耳有毛細胞の分化、細胞極性への影響を検討するため、細胞遊走能の変化を wound healing assay により解析した。
- (5) 上記(1)から(4)の研究において変化を認めた TGF-伝達経路による繊毛形成、細胞遊走能の変化への Foxo3 の関与を検討するため、siRNA による Foxo3 の抑制を加え、免疫染色および SEM で繊毛形成の変化を解析し、wound healing assay により細胞遊走能の変化を解析した。
- (6) さらに、EGFR 阻害剤である AG-1478 処置による繊毛形成、細胞遊走能の変化を免疫染色、wound healing assay により解析し、siRNA-Foxo3 を用いてその変化が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

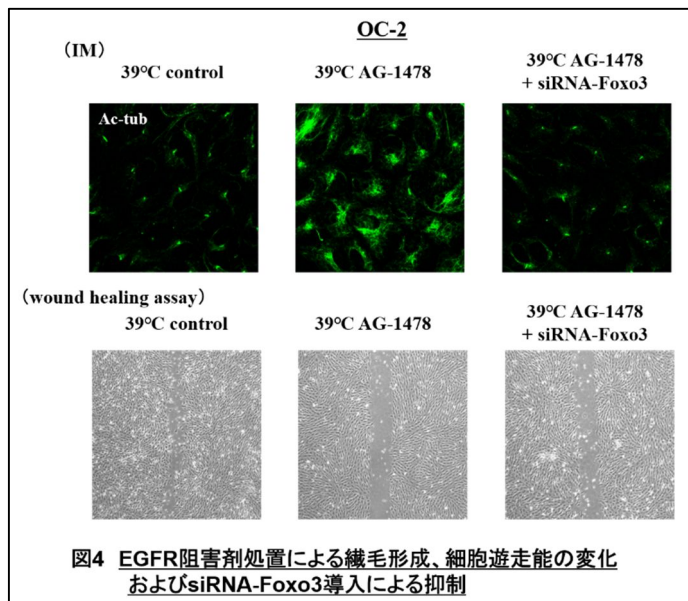
TGF- β 阻害剤である EW-7197 処置により細胞極性制御因子である PAR-3 の細胞膜への移行を認めた。また免疫染色、SEM の解析にて、EW-7197 処置による繊毛形成の亢進を認めた。さらに wound healing assay では EW-7197 処置による細胞遊走能の低下を認めた。これら繊毛形成の亢進、細胞遊走能の変化は siRNA-Foxo3 を同時に処置することで抑制された (図 2)。



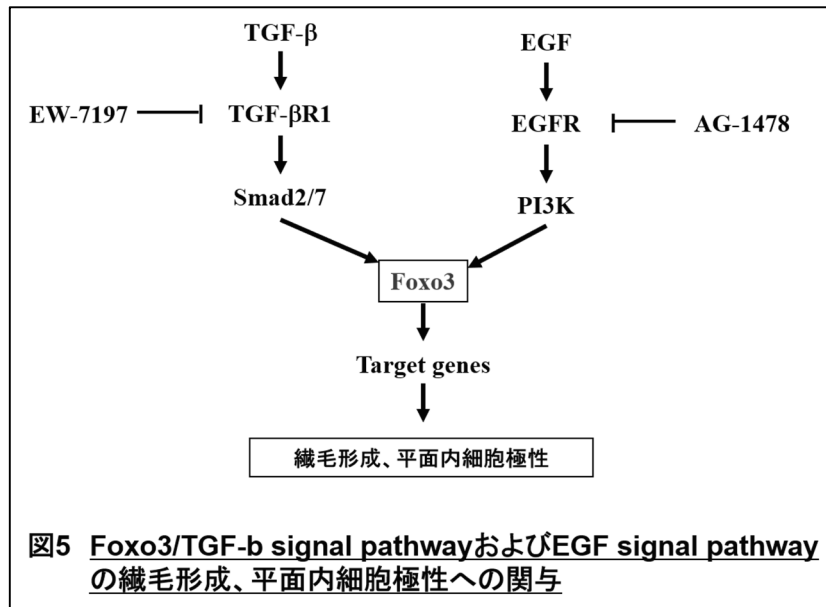
また、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア代謝の変化の解析では EW-7197 処置により細胞代謝の亢進が示唆された (図 3)。



同様に EGFR 阻害剤である AG-1478 処置により繊毛形成の亢進、細胞遊走能の低下を認め、これらの変化は siRNA-Foxo3 を同時に処置することで抑制された。



以上のことより、Foxo3 の内耳有毛細胞における繊毛形成、平面内細胞極性への関与において、TGF- β シグナル伝達経路および EGF シグナル伝達経路の関与が示唆された (図 5)。そして、本培養細胞は難聴のメカニズム解析および治療法の開発のための in vitro モデルとして有用であると考えられた。



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 0件）

1. 著者名 Kakuki Takuya, Kohno Takayuki, Nishida Soshi, Konno Takumi, Kikuchi Shin, Ohwada Kizuku, Nakano Masaya, Tezuka Mitsuki, Takano Kenichi, Kojima Takashi	4. 巻 157
2. 論文標題 FOXO3/TGF- signal-dependent ciliogenesis and cell functions during differentiation of temperature-sensitive mouse cochlear precursor hair cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-02068-8	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角木 拓也
2. 発表標題 TGF- シグナルを介した難聴の新規病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角木 拓也
2. 発表標題 内耳性難聴におけるFoxo3/TGF- シグナルを介した新規病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角木 拓也
2. 発表標題 Foxo3/TGF- シグナルを介した内耳性難聴における新規病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角木 拓也
2. 発表標題 内耳有毛前駆細胞におけるFoxo3および増殖因子シグナルを介した繊毛形成の亢進
3. 学会等名 第38回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角木 拓也
2. 発表標題 内耳有毛前駆細胞 (UB/OC-2) における増殖因子シグナルを介した繊毛形成の亢進
3. 学会等名 第31回日本耳科学会学術講演会
4. 発表年 2021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