

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 22日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791873

研究課題名（和文） 内耳障害における有毛細胞間リン酸化シグナル伝達異常の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the variance of intercellular phosphorylation signaling in hair cells during inner ear disorder

## 研究代表者

村田 考啓（MURATA TAKAAKI）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：10569875

研究成果の概要（和文）：内耳組織に存在する各種タンパク質のリン酸化状態を評価するため、正常マウスの内耳組織破碎溶液を用い pervanadate 刺激下でのチロシンリン酸化状態を Western blotting で解析したところ、cochlin を含むと思われる数個の band でリン酸化の増加が生じていた。特に内耳に特異性の高い分泌タンパクである cochlin のリン酸化状態について免疫沈降法を用いて評価すると、cochlin のチロシンリン酸化が pervanadate 刺激で増加することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To evaluate phosphorylation state of proteins present in the inner ear organ, we used inner ear organ homogenate from wild mice. Immunoblot analysis indicated that several proteins including cochlin undergo tyrosine phosphorylation with pervanadate stimulation. We investigated the phosphorylation state about full length form of cochlin in pervanadate stimulation with immunoprecipitation method, and the immunoprecipitated cochlin protein was indeed tyrosine phosphorylated.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：神経科学、内耳障害、チロシンリン酸化、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

めまいの約70%は耳石器・半規管など末梢前庭器の障害により生じる。末梢前庭器の中樞は有毛細胞であり、有毛細胞の障害を来たす因子として虚血や内耳毒性薬剤、内リンパ水腫などが挙げられる。これにより惹起される有毛細胞障害の分子機構については、長期間の内耳毒性薬剤暴露による有毛細胞の消失所見などから、アポトーシスによる細胞死が中心として論じられているが、その他のメカニズムについては未だ十分明らかではない。

不可逆的な有毛細胞死に伴う一側の末梢

前庭機能の低下は、中枢前庭系の可塑性に基づく機能代償により補われるとされる。急性期の前庭代償の発現は、主に健側前庭神経核ニューロンの自発発火の変調により左右の神経活動性の不均衡が是正され成されるが、動物実験上めまいの存在を示す自発眼振は末梢前庭機能障害後1日経過しても残存する（Hirate et al., Neurosci Lett., 2000）。一方、申請者が耳鼻咽喉科の臨床現場において経験した多数の急性期めまい症例の中には、発症後数時間で自発眼振が消失する例も多く存在している。この現象の解離に対して、細胞死以外の有毛細胞の機能障害が関与す

る可能性が考えられ、これを解明することはめまい疾患の病態解明や新たな治療法の発展に有用である。

細胞の機能維持・分化に重要な細胞内シグナル伝達機構の1つにタンパク質のチロシンリン酸化がある。細胞膜上に存在する受容体型膜タンパク質の一部は、細胞間の接着部分で互いが結合し相互作用することでチロシンリン酸化を受け、その機能が制御される機構が存在する。

同様の機構が感覚器のひとつである有毛細胞間においても重要な役割を果たしている可能性は十分に考えられる。例として、前庭ではないが、蝸牛有毛細胞の不動毛に存在する膜タンパク質カドヘリン 23 は不動毛間で相互結合しているが、これの遺伝子異常により先天性難聴が生じることが報告されており (Di Palma et. al., Nat. Genet., 2001)、カドヘリンの作用には様々なリン酸化シグナル伝達に関わっている。

そこで、虚血等による内耳の障害が有毛細胞での細胞内リン酸化シグナル伝達の異常を来し、めまいや聴覚障害の発症に関与している可能性を考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、次の知見を明らかにすることを目標としている。内耳の障害により有毛細胞内の各タンパク質に生じたリン酸化状態の変化を解析し、有毛細胞障害における重要なリン酸化シグナル分子を見出す。これにより内耳障害の病態生理に関する新しいメカニズムの解明・提唱が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス内耳組織の適切な剖出・組織採取・短期間組織培養技術の確立

内耳は側頭骨に囲まれた小さな組織であり成体マウスにおいても体積は10立方mm未満と剖出には実体顕微鏡下において骨包内組織損傷を回避しながらの慎重な操作を要する。10週齢以上の成体マウスを数匹用いてトレーニングを施行し、適切な採取が行われているかを組織切片標本の作製や組織lysateを用い内耳組織に局在特異性の高いタンパク質の検出をimmunoblotで評価した。また剖出内耳組織への負荷実験を検討するに当たり、内耳組織の短期間組織培養を必要とするため、新生仔マウスからの内耳組織剖出や剖出後緩衝液に短期間浸出させた後での組織崩壊の有無につき組織切片を用いて検討した。

### (2) 内耳組織由来細胞における重要なリン酸化シグナル分子の探求

内耳障害により惹起されるリン酸化反応の検討を行い、新規標的因子を探る。

マウス由来内耳組織 lysate を用いて抗リン酸化チロシン抗体によるWestern blottingを施行し、定常状態におけるリン酸化タンパク質のプロファイルを検討した。また短期間組織培養下での低酸素刺激や内耳有毛細胞毒性物質刺激によるリン酸化状態の変化を非刺激時と比較評価した。得られた結果を基に、分子量等から変化のあるリン酸化タンパク質を絞り込み、標的とするタンパク質に対する抗体などによるWestern blottingを施行することで、重要なリン酸化シグナル分子の同定を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウスにおける内耳組織の適切な剖出・組織採取のトレーニングを行った。内耳は側頭骨に囲まれた小さな組織であり成体マウスにおいても体積は10立方mm未満と剖出には実体顕微鏡下において骨包内組織損傷を回避しながらの慎重な操作を要する。申請者は10週齢以上の成体マウスや新生仔マウスを数匹用いてトレーニングを施行し、内耳組織の剖出が可能な状態になった。次に、内耳組織が摘出されているかを確認するため、正常マウス(C57 BL/6)の内耳組織を冷温下に摘出、溶解破碎し、内耳組織に特異性の高い cochlin の検出をWestern blottingを用いてタンパク定量後行った。市販の抗Cochlin antibodyを用いたblottingでは、数本の非特異的 band も検出されるが、controlの海馬組織と比べ60kDaレベルに特異的なbandが認められ、sizeより cochlin isoform(full length type)であると考えられた(図1)。この組織溶液を用いて免疫沈降法により cochlin タンパクを濃縮させ blottingを行うと同部のbandが特異的に増加した。この結果から、内耳組織は適切に採取されており、細胞外マトリックスに多く存在する cochlin の検出が可能であることが確かめられた。

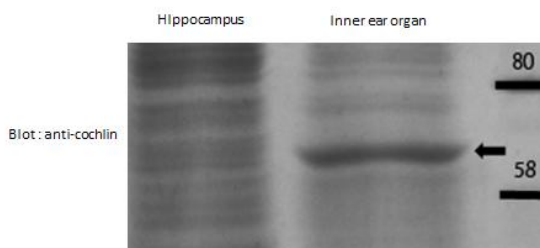


図1 内耳組織破碎溶液におけるcochlinの検出

(2) 内耳組織に存在する各種タンパク質のリン酸化状態を評価するため、正常新生仔マウスの内耳組織破碎溶液を用い pervanadate 刺激下でのチロシンリン酸化状態をWestern blottingで解析したところ、cochlinを含む

と思われる数個の band でリン酸化の増加が生じていた。次に各々の band について候補となるタンパク質の絞り込みを行うことを検討した。最初に、リン酸化チロシン抗体結合ビーズを用いた免疫沈降法により、pervanadate 刺激後の内耳組織破碎溶液からチロシンリン酸化タンパク質群を濃縮し、その溶液を用いて、内耳障害に関与する可能性のあると思われるシグナル伝達基質について immunoblot 法により検出を試みた。増殖シグナルに関与する Src や TrkA、IRS 1、また内耳有毛細胞の tip link に存在する cadherin23 の C 末端にチロシンリン酸化モチーフが存在することから cadherin23 についても検討したが、band 自体の検出を認めない、もしくはリン酸化チロシン抗体による免疫沈降法での濃縮に見合う band の増加が認められない結果となった。この方法で網羅的に解析することは困難であると判断した。そこで今度は pervanadate 刺激組織破碎溶液のリン酸化チロシン抗体による immunoblot の結果得られた band から基質候補の検討を行うことにした。内耳に特異性の高い分泌タンパクである cochlin は、von Willebrand factor A-like domain を有することから内耳における細胞外基質の一つとして存在していると考えられているがその詳細な機能については未だわかっていない。Cochlin をコードする遺伝子 COCH の変異による遺伝性難聴家系が報告されており、常染色体優性遺伝形式をとるとされている。その聴力像は進行性難聴の形式をとるため、先天的な内耳機能障害というよりは機能の恒常性維持機構の障害により進行性に難聴を来すことが想定される。この恒常性維持機構の一つとして内耳障害時に何らかの機能を担っている可能性は十分考えられる。また、cochlin タンパクのアミノ酸配列上、典型的なチロシンリン酸化モチーフではないがチロシンリン酸化を受ける可能性のある配列が C 末端に存在しており、cochlin タンパク自体のチロシンリン酸化について検討した。その結果、pervanadate 刺激下内耳組織破碎溶液のチロシンリン酸化 band 上に cochlin (full isoform) と似た size の band が認められた。そこで cochlin のチロシンリン酸化状態について、抗 cochlin 抗体を用いた免疫沈降法を用いて評価すると、チロシンリン酸化を受けたと考えられる cochlin の増加が認められた (図 2)。このことから、cochlin のチロシンリン酸化が pervanadate 刺激で増加することが明らかになった。

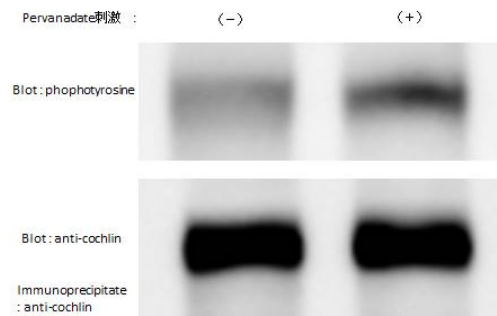


図2 pervanadate刺激有無によるcochlinチロシンリン酸化状態の変化

今後は、cochlin のチロシンリン酸化と内耳障害との関連について、内耳障害モデル（短期間組織培養下での低酸素刺激や内耳毒性薬剤暴露）を用いたチロシンリン酸化状態の変化について検討することが重要であり、同様に変動を認める場合、内耳組織における障害へのシグナル伝達応答に内耳特異的分泌タンパクである cochlin が何らかの機能を有している可能性が示唆され、その機構を解明することにより内耳障害時のシグナル伝達機構の理解や、現在既に様々なチロシンキナーゼに対する分子標的治療が臨床応用されていることを踏まえ、内耳障害への治療の端緒に繋がる可能性を秘めている。

## 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 2 件)

- ① Takaaki Murata, Yoshihito Yasuoka, Tetsuaki Shimada, Masato Shino, Hideki Iida, Katsumasa Takahashi, Nobuhiko Furuya: A new and less invasive procedure for arytenoid adduction surgery: Endoscopic-assisted Arytenoid Adduction Surgery, The laryngoscope. 121. 1274-1280 (2011) 査読有  
DOI : 10.1002/lary.21762

[学会発表] (計 7 件)

- ① 村田考啓、当科における難聴を合併した広汎性発達障害症例の検討、第 21 回日本耳科学会、2011. 11. 25、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

[図書] (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 考啓 (MURATA TAKAAKI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：10569875

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし