

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861542

研究課題名(和文)内耳におけるグルタミントランスポータの解明と遺伝性難聴に関する研究

研究課題名(英文)Systematic analysis of the glutamine-glutamate cycle in the mice inner ear

研究代表者

小口 智啓 (OGUCHI, Tomohiro)

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号：10377640

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)：蝸牛感覚細胞と求心系第一次ニューロンの神経伝達物質であるグルタミン酸は、細胞毒性を持つため、その代謝が内耳機能に非常に重要と考えられている。本研究では、マウスの内耳におけるグルタミン-グルタミン酸サイクルに関与する遺伝子を同定するとともに、日本人難聴患者にこれら遺伝子が関与することを目的に検討をおこなった。その結果、System N transporterの関与を明らかにした。また、日本人難聴患者の解析より非常に稀な原因であるSLC17A8遺伝子変異による難聴患者を見出した。

研究成果の概要(英文)：Glutamate has been implicated in signal transmission between inner hair cells and afferent fibers of the organ of Corti. The inner hair cells are enriched in glutamate and the postsynaptic membranes express AMPA glutamate receptors. However, it is not known whether inner hair cells contain a mechanism for glutamate replenishment. Such a mechanism must be in place to sustain glutamate neurotransmission. We performed RT-PCR and immunofluorescence analysis of system N transporter. We also performed genetic analysis of Japanese sensorineural hearing loss patients and find one family with SLC17A8 mutation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子 グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

蝸牛感覚細胞と求心系第一次ニューロンの神経伝達物質であるグルタミン酸は、細胞毒性を持つため、その代謝が内耳機能に非常に重要と考えられている。実際、代謝経路のトランスポーター (VGLUT3) をコードする遺伝子変異が難聴の原因遺伝子として同定され、遺伝性難聴の原因遺伝子の1つとして注目されている。また動物実験レベルではあるが、グルタミン酸代謝関連遺伝子の変異を、遺伝子導入技術を用いて治療できる可能性が報告されており、難聴の原因としてだけでなく、その治療に関しても注目を集めている。

我々の研究室では従来より内耳におけるグルタミン酸代謝について解析をすすめており、中枢神経系のグルタミン酸代謝に類似した代謝機構を持つことを明らかにしてきた。また、申請者は世界で初めてグルタミントランスポーター (SAT1) が内耳に局在していることを見出し報告した (Oguchi et al., 2012)。

このように、内耳におけるグルタミン酸代謝経路が徐々に明らかとなってきたが、内耳では未だ System N transporters: SNs が同定されていない状況であった (図1)。

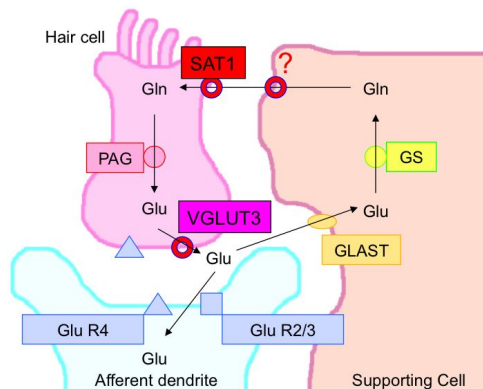


図1 内耳におけるグルタミン-グルタミン酸代謝経路

2. 研究の目的

過去の報告では、中枢神経系におけるグルタミン酸-グルタミン回路と、内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の間に類似が認められ、上記図1に示すように、それぞれ対応する酵素や受容体などに相同性が確認されている。

神経系におけるグルタミン酸-グルタミン回路との比較より、現時点で、内耳で解明されていない部分は supporting cell からグルタミンを放出するグルタミントランスポーターである。放出系グルタミントランスポーターの候補として System N transporter が関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では、種々の放出系グルタミントラン

スポータをターゲットに分子生物学的手法、免疫学的、分子細胞形態学的手法を用いて内耳での局在を解析し、内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の解明を行う。

本研究では、内耳におけるグルタミン酸代謝回路である「グルタミン酸-グルタミン回路」の全容解明をマウス蝸牛ですすめるとともに、同定された分子を対象に、日本人難聴患者の遺伝子解析を行い、新規難聴原因遺伝子を同定するとともに、内耳における機能を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の解明

神経系におけるグルタミン酸-グルタミン回路との比較より、現時点で、内耳で解明されていない部分は supporting cell からグルタミンを放出するグルタミントランスポーターである。放出系グルタミントランスポーターの候補として System N transporter が関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では、種々の放出系グルタミントランスポータをターゲットに分子生物学的手法、免疫学的、分子細胞形態学的手法を用いて内耳での局在を解析し、内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の解明を行った。具体的にはマウスを深麻酔下にて、側頭骨を摘出し、直ちに RNA later solution に移して RNA を安定化させる。Total RNA を抽出後に逆転写を行い cDNA を得て、候補遺伝子の RT-PCR を行うことにより、内耳での発現の有無を確認した。

また、共同研究施設であるオスロ大学が保有しているデータベースを基に、RT-PCR で同定された分子に対する特異的な抗体を作成 (既存の抗体については購入・提供を受ける) し、マウス内耳より抽出した蛋白を用いて該当蛋白の存在を確認する。また、内耳切片を作成して抗体を用いた共焦点レーザー顕微鏡による解析を行い詳細な局在解析を行った。

(2) 日本人難聴患者を対象にしたグルタミン酸代謝経路関連遺伝子の探索

蝸牛感覚細胞と求心系第一次ニューロンの神経伝達物質であるグルタミン酸は、細胞毒性を持つため、その代謝が内耳機能に非常に重要であり、グルタミン酸-グルタミン回路は聴覚・前庭機能に必要不可欠であると考えられる。また、VGLUT3 が難聴の原因遺伝子として報告されるなど、遺伝性難聴と密接な関連が考えられている。

前項までの検討により明らかとなった内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路を構成するグルタミントランスポータに関して、日本人難聴患者 200 名を対象に直接シー

クエンス法による遺伝子解析を行うことにより、遺伝性難聴の関連遺伝子を同定、病態解析を行う計画である。またグルタミントランスポーターだけでなく、グルタミン酸-グルタミン回路に關与する他の分子に關しても同様に解析を行った。

4. 研究成果

(1)内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の解明

神経系におけるグルタミン酸-グルタミン回路との比較より、現時点で、内耳で解明されていない部分は supporting cell からグルタミンを放出するグルタミントランスポーターであるため、NCBI BLAST により中枢神経系における放出系グルタミントランスポーターの配列をベイトに用いて BLAST 検索を実施し、候補として System N transporter の配列を抽出し、RT-PCR 用のプライマーを設計した。マウス蝸牛から得られた Total RNA を抽出後に逆転写を行い cDNA を得て、候補遺伝子の RT-PCR を行うことにより、内耳での発現の有無を確認した。その結果 System N transporter の発現を確認することができた。

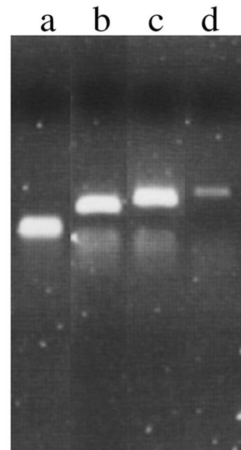


Fig. 1. RT-PCR of the cochlear tissues for SAT1 and three VGLUT isoforms. Specific transcripts for SAT1, VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 were detected in the cochlea. (a) SAT1 111 bp, (b) VGLUT1 190 bp, (c) VGLUT2 229 bp, (d) VGLUT3 230 bp. No products were detected when PCR was performed in the absence of RT (data not shown).

(2)日本人難聴患者を対象にしたグルタミン酸代謝経路関連遺伝子の探索

日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者 200 例を対象にグルタミン酸代謝経路に關連する遺伝子を直生シークエンス法により解析を実施した結果、3 例に候補と考えられる *SLC17A8* 遺伝子変異を見出した。家系解析の結果、このうちの 1 例に關しては家系内の整合性もあり、難聴の原因である可能性が高い。見出された遺伝子変異は海外での変異とは異なる変異であり、

日本人独特の変異スペクトラムがあることが示唆された。以上の結果より、内耳におけるグルタミン-グルタミン酸サイクルに關連する遺伝子が日本人難聴患者においても、難聴の原因遺伝子として關与していることが明らかとなった。今後、より多くの症例に關して検討を行うことにより、難聴の診断に寄与するとともに、聴覚維持のメカニズムに關する理解も深まることが期待される。

図 *SLC17A8* 遺伝子変異を認めた症例

過去の報告と同様に常染色体優性遺伝形式をとる家系であった。

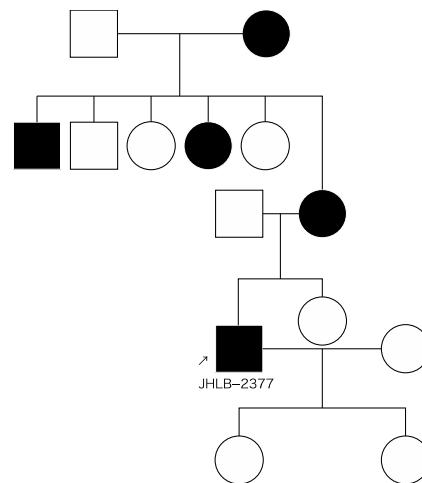
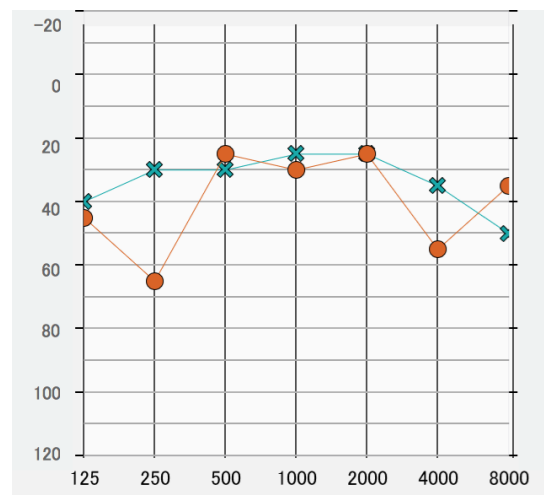


図 *SLC17A8* 遺伝子変異を認めた症例の聴力像水平型の中重度難聴を認める。



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)

[学会発表](計 2 件)

横田陽、宮川麻衣子、茂木英明、西尾信哉、小口智啓、宇佐美真一. 日本人難聴患者における *SLC17A8* 遺伝子の解析. 第 4 回 耳

鼻咽喉科フロンティアカンファレンス.
2015/9/5. グランドホテル大雪、旭川

岩佐陽一郎、吉村豪兼、塚田景大、小口智啓、宇佐美真一. Equitest を用いた平衡機能障害に対する評価に関する検討. 第 76 回耳鼻咽喉科臨床学会. 2014.6.26-27. 盛岡グランドホテル

6. 研究組織

(1)研究代表者

小口 智啓 (OGUCHI, Tomohiro)
信州大学医学部・委嘱講師
研究者番号：10377640

(4)研究協力者

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：10184996