

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462563

研究課題名(和文) 蝸牛感覚上皮の組織構築とバリア機能 - 頂側結合の役割に関して -

研究課題名(英文) Role of apical junctions in barrier function and structural maintenance of the cochlear sensory epithelia

研究代表者

坂口 博史 (Sakaguchi, Hirofumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00515223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞同士を結合して細胞の上下のスペースを仕切るバリアとして働くトリセルリン分子が、内リンパのイオン組成に与える影響を調べた。トリセルリン遺伝子を持たない遺伝子改変マウス(トリセルリン欠失マウス)の内耳の機能を調べたところ、成長過程で有毛細胞と呼ばれる内耳の感覚細胞が細胞死を生じ、高度の感音難聴を生じた。この結果から、難聴遺伝子の一つであるトリセルリン遺伝子変異で難聴が発症するメカニズムが明らかとなった。今回の成果は、イオン組成が関係するその他の難聴のメカニズムの解明や、内耳のイオンバランスを保つ新しい難聴治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Tricellulin is a member of cell adhesion molecule forming tight junctions and contribute to maintain barrier function in the epithelial cells. We investigated the function of tricellulin in maintaining the ion homeostasis of endolymph, which is extracellular fluid with unique ion component and contained in our sound-sensory organ, inner ears. Genetically engineered tricellulin-deficient mice (Tric-KO mice) show severe hearing loss associated with progressive loss of sensory hair cells during postnatal development. These results revealed the mechanism underlying the onset of sensorineural hearing loss in previously known human hereditary deafness caused by mutations in the tricellulin gene. Moreover, our findings will contribute to elucidate mechanisms of other sensorineural hearing loss caused by compromised ion component and hopefully lead to the development of novel therapeutic approach against deafness by improving the ion homeostasis in the inner ears.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 蝸牛 聴覚 有毛細胞 タイト結合 内リンパ トリセルリン イオン

1. 研究開始当初の背景

本研究は、頂側結合を構成する細胞間接着分子の機能について、欠失モデルマウスを用いて *in vivo* で解析し、蝸牛上皮細胞の形態と機能を制御する分子機構の理解をさらに深めることを目的とした。蝸牛上皮細胞の頂側結合は、最も頂側のタイト結合と、その基底側にあるアドヘレンス結合からなる。タイト結合は上皮のバリア機能を維持するとともに、細胞頂側面を機能的ドメインとして分離することで細胞極性を規定している。聴覚の成立には、高度に特化された感覚上皮頂側面の特異な形態と内リンパを隔離するバリア機能が必須であるため、タイト結合は内耳において特に機能的意義が高い。

本研究を始める段階で、三細胞間の結合部位には三細胞間タイト結合 (tricellular tight junction : TTJ) とよばれる構造が見られ、細胞接着分子トリセルリンで構成されることが知られていた。また、トリセルリンをコードする *TRIC* 遺伝子は非症候群性遺伝性難聴 *DFNB49* の原因遺伝子であり、聴覚機能に重要な役割を担っていることも知られていた。一方で、内耳における TTJ の特性と機能は、二細胞間タイト結合に比べて十分に解明されておらず、これらを解明するため、我々は新規に樹立されたトリセルリン欠失マウス (*TRIC-KO* マウス) を用いて、蝸牛上皮細胞における TTJ の機能と分子構造の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 内耳機能における TTJ の役割

まず *TRIC-KO* マウスの聴覚を解析し、トリセルリン欠失が聴覚機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、ABR を用いて成体 *TRIC-KO* マウスの聴力を確認し、次いで ABR と DPOAE を用いて聴覚獲得期から経時的に評価し、聴覚に関するフェノタ

イプの全貌を把握することを目指した。さらに、TTJ が内耳以外の他臓器に対してどのような機能的および組織学的変化をもたらすかについても解析することとした。

(2) 蝸牛感覚上皮の形態と極性への関与

TTJ は上皮細胞の輪郭を規定する頂側結合ネットワークの一部であり、蝸牛上皮細胞の特異的な形態形成に関わると想定される。本研究では組織学的解析により蝸牛上皮細胞形態への TTJ 複合体の関与を明らかにすることを目指した。また、TTJ の障害により細胞の頂面と側底面の極性にどのような影響が出るかについて検証を試みた

(3) 内耳バリア機能に及ぼす影響

研究開始にあたって、*TRIC-KO* マウスでは TTJ の破綻により内耳のバリア機能が障害されると予測されたが、一方で、特定のタイト結合構成分子の欠失やトリセルリンの部分的変異では、傍細胞間透過性に顕著な変化はなく、内リンパ電位も変化しないことが知られていた。そこで、*TRIC-KO* マウス内耳へのトレーサー注入および内リンパ電位の測定により、トリセルリン欠失による内耳バリア機能への影響を確認することを目的とした。

(4) TTJ 微細構造の変化と機能的意義

透過型電子顕微鏡 (TEM) では、タイト結合はストランドと呼ばれる網目状の超微細構造として観察され、TTJ も同様のストランドを構築する。二細胞間タイト結合では構成分子クロードインの欠失でストランド異常が生じることが知られているが、TTJ での詳細は十分に解明されていない。*TRIC-KO* マウスの上皮組織における TTJ ストランドの変化を観察し、TTJ の障害機構を微細構造レベルで理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 聴覚および全身表現型の解析

TRIC-KO マウスに対して ABR および DPOAE を用いて各発達段階での聴覚を解析した。また、上皮間結合が重要な役割を果たす他の臓器（腸管、心臓、腎臓、甲状腺）において形態学的な以上が生じないかどうか光学顕微鏡を用いて調べた。

(2) 蝸牛上皮細胞の形態変化の解析

TRIC-KO マウスの蝸牛から感覚上皮を摘出、細胞頂側面と輪郭をファロイジンや抗 ZO-1 抗体を用いて蛍光標識し観察した。さらに、透過型電子顕微鏡 (SEM) によって有毛細胞形態の詳細を観察した。

(3) 内リンパ電位の測定

TRIC-KO マウスと野生型マウスを麻酔した後、中耳骨包経由で内耳に電極を挿入、内リンパ電位を測定した。

(4) 上皮バリア機能の評価

麻酔下に中耳骨包経由で *TRIC-KO* マウスの外リンパ腔にビオチンを注入し、蝸牛を摘出して固定、ストレプトアビジンで染色し、内リンパ腔へのビオチンの漏出を組織学的に評価した。

(5) TJ のストランド構造の解析

TRIC-KO マウスの上皮細胞の細胞間結合を TEM で観察し、タイト結合に形態学的な破綻がないかどうか検証した。

4. 研究成果

1) 聴性脳幹反応を用いて *Tric-KO* マウスの聴覚を解析したところ、幼若期に高度難聴を示し、成体ではさらに難聴が進行して聾になることが判明した。難聴は低音から高音まで全周波数帯域でみられた。

2) *Tric-KO* マウスでは難聴以外に病的な表現型は見られず、繁殖性であった。過去に報告された部分的な *Tric* 遺伝子変異を持つマウスモデルでは野生型に比べて体が小さいことが報告されていたが、*Tric-KO* マウスでは野生型と全身の形態に差がなかった。さらに組織学的検索でも心、肺、腎、甲状

腺など上皮間タイト結合を有する主要な臓器に形態学的な異常は見られなかった。

3) 上皮バリアの破綻による内リンパ電位の低下が難聴の原因と推測されたが、電気生理学的手法を用いて測定したところ、予想に反して *Tric-KO* マウスの内リンパ電位は正常に維持されており、電位は野生型との間に差はなかった。

4) 蝸牛感覚上皮の組織学的変化を調べたところ、*Tric-KO* マウスでは有毛細胞が進行性に脱落することが判明した。生後12日では有毛細胞の脱落はほとんど見られなかったが、生後14日では外有毛細胞に一部脱落が見られ、さらに生後21日目になると外有毛細胞はほとんど残存せず、内有毛細胞も半数が脱落していた。生後60日目では内外有毛細胞が全て脱落しており、難聴の原因は有毛細胞障害と考えられた。

5) 有毛細胞の細胞死の詳細を解明するため、TUNEL法を用いてアポトーシスの関与を調べた。その結果、生後15日の段階で多くの外有毛細胞にアポトーシスが生じていることが判明した。

6) 内耳においてタイト結合は、高 K^+ を含む内リンパ腔と低 K^+ を含む外リンパ腔を境界するバリアとして機能しているため、バリアの破綻による外リンパ腔への K^+ のリークが有毛細胞死の原因になると予測した。そこで蝸牛感覚上皮を摘出し、外リンパと同様のイオン組成をもつ培養液中で器官培養したところ、有毛細胞死は生じなかった。

以上の結果から、*tricellulin* の欠失により生後早期に有毛細胞のアポトーシスが生じ、進行性難聴を生じることが判明した。 K^+ イオン濃度が保たれた器官培養系では有毛細胞死を生じないこと、および内リンパ電位が上昇する時期に一致して細胞死が生じることから、内リンパ電位を駆動力として内リンパ腔の高濃度 K^+ が外リンパ腔に漏出し、有毛細胞周囲の K^+ 濃度が上昇するこ

とで細胞死をきたすものと考えられた。

本研究により生体内での tricellulin 欠失の影響が初めて明らかになった。tricellulin 欠失による内耳障害の病態が解明されたことで、遺伝性難聴に対する新たな治療的アプローチの開発につながる可能性が期待される。さらに tricellulin は全身の上皮細胞に普遍的に発現するにもかかわらず、その欠失により内耳以外の臓器が障害されないことは驚きであり、細胞生物学において重要な知見である。本研究の成果はタイト結合構成蛋白の組織特異性や代償のメカニズムの解明にも寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1) 坂口 博史、神谷 透、宮下 武憲、稲本 隆平、徳増玲太郎、森 望、月田 早智子、久 育男。蝸牛における tricellulin の機能。耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 30: 8-10. 2016 (査読なし)

2) Kamitani T, Sakaguchi H, Tamura A, Miyashita T, Yamazaki Y, Tokumasu R, Inamoto R, Matsubara A, Mori N, Hisa Y, and Tsukita S. Deletion of Tricellulin Causes Progressive Hearing Loss Associated with Degeneration of Cochlear Hair Cells. *Sci Rep* 5: 18402, 2015. (corresponding author) (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1) Kamitani T, Sakaguchi H, Tamura A, Miyashita T, Yamazaki Y, Tokumasu R, Inamoto R, Matsubara A, Mori N, Hisa Y, and Tsukita S. Tricellulin Knockout Mice, a Model of DNFB49, Show Severe Hearing Loss With Cochlear Hair Cell Apoptosis. 38th Annual MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Feb. 23, 2015 Baltimore,

USA.

2) Sakaguchi H. Maintenance of Cochlear Tight Junction System by Tricellulin. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dec 3, 2015 Hitotsubashi Hall, Tokyo, Japan.

3) 蝸牛における tricellulin の機能. 坂口 博史. 第33回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会. 2015年8月29日 大阪 ホテルグランピア大阪

4) **内耳タイト結合の構成分子トリセルリンの機能**. 坂口 博史. 第24回日本耳科学会. 2014年10月16日 新潟 朱鷺メッセ

5) タイトジャンクション蛋白 tricellulin の内耳における機能. 神谷 透、坂口 博史、宮下 武憲、稲本 隆平、徳増玲太郎、森 望、月田 早智子、久 育男. 第115回日本耳鼻咽喉科学会. 2014年5月15日 福岡 ヒルトン福岡シーホール

〔その他〕

ホームページ

京都府立医科大学耳鼻咽喉科/研究/内耳研究グループ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/ent/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 博史 (SAKAGUCHI, Hirofumi)

京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 准教授

研究者番号: 00515223

(2) 研究分担者

宮下 武憲 (MIYASHITA, Takenori)

香川大学 医学部 准教授

研究者番号: 60363214