

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870498

研究課題名(和文)内耳有毛細胞におけるRac分子種の機能解明と進行性難聴治療への応用

研究課題名(英文)The function of Rac GTP-ases in inner ear haircells

研究代表者

中村 高志(Nakamura, Takashi)

京都府立医科大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：80724179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：内耳有毛細胞/小脳顆粒細胞において、アクチン細胞骨格の制御因子であるRac1とRac3をダブルノックアウトマウスした作成した。Rac1,3はいずれも内耳有毛細胞に発現し、活性化していることを確認(後者に関してはFRETバイオセンサートランスジェニックマウスを用いて確認)したが、このマウスは聴覚の発達と機能維持に関して異常を示さなかった。一方で、小脳に関しては内顆粒層の部分的な形成不全(一部では消失)を呈し、生後数日で歩行を開始する段階から著明な失調性歩行を呈した。Rac分子種は聴覚の発達や機能維持には寄与しておらず、小脳顆粒細胞層の形成に必須であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We employed inner ear hair-cell and cerebellar granule neuron specific Rac GTPases conditional knockout mice to analyze the role of Rac1 and Rac3 which are key regulators of the actin cytoskeleton. We confirmed expression and activation of Rac1 and Rac3 mRNA in cochlea using in situ hybridization (ISH) and a Rac1 fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor (Rac1-FRET biosensor mice). However the Rac1,3 double knockout mice showed normal hearing function and structure of cochlea hair cells. On the other hand, the mice showed severe ataxic gait when they started walking, and the phenotype was retained throughout life. We revealed that the Rac GTPases have not contributed the development and maintenance of cochlear hair cells but been essential for the formation of cerebellar granule layers.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：Rac GTPase 内耳有毛細胞 小脳顆粒細胞

1. 研究開始当初の背景

2004年 Paffenholz らによって、耳石の欠損から内耳性平衡機能障害をきたす Head-tilt マウスの病因は、活性酸素産生酵素である Nox3 の変異であることが明らかにされた (Paffenholz et al. Genes Dev. 2004)。さらに2006年本研究の研究協力者でもある上山らによって、上皮細胞で機能する Nox3 の活性化には、Rhoファミリー GTP 結合タンパク質である Rac1 が必要であることが明らかにされた (Ueyama et al. Mol Cell Biol. 2006)。そして申請者は大学院生時代、神戸大学バイオシグナル研究センター 齋藤研究室の上山健彦准教授の指導のもと、内耳における Rac を始めとした Rho ファミリータンパク質の機能に強い関心をもって、2年余りの研究を行った。

内耳は多くの特殊化した細胞群により構成されているが、聴覚・平衡覚において中心的な役割を担うのは内耳有毛細胞である。その頂側面には特殊に発達した微絨毛 (= 不動毛) が存在し、内部はアクチンの束によって構成されている。それぞれ長さの異なる不動毛が線対称をなして整然と配列する中で、隣あう不動毛同士は微細構造により連結され、音刺激によってこれらは一体となって運動する (Vollrath et al. Annu Rev Neurosci. 2007)。有毛細胞はこのような特殊な細胞形態を利用することで、音による機械的信号を電気的信号に変換する機能を獲得し、聴覚の中心的役割を果たしている。

低分子量 GTP 結合タンパク質の中で Rho ファミリーに属する Rac は、細胞骨格の再編成を担うことで、細胞形態の主な制御因子として機能する (Sandrine et al. Nature. 2002)。例えば、Rho サブクラス特異的不活性化因子である C3 (ボツリヌス菌体外毒素) が培養細胞の神経突起様突起の伸展を誘導すること (Nishiki. Biochem Biophys Res. 1990) や、線維芽細胞における Rac の活性化がアクチン線維の網目構造からなるラメリポディアを誘導することが明らかにされている (Hall et al. Science. 1998)。

一方で、同じ Rho ファミリーに属する Cdc42 の活性化は、結合タンパク質で架橋されたアクチン束からなるフィロポディアを

誘導することが明らかにされている。前述したように特殊な細胞形態を生体において維持する内耳有毛細胞において、Rho ファミリータンパク質が特異的な作用を發揮していることが予想される。

これまでに、内耳において Rho ファミリーに属する RhoA、Rac1、Cdc42 が発現しているという報告はされているが (Kalinec. J Biol Chem. 2000)、内耳有毛細胞に限定した機能解析を行った報告はない。その要因の一つとして、多くの Rho ファミリーノックアウトマウスは胎生致死になる事が挙げられる。申請者はこれまでに内耳有毛細胞特異的に Cre recombinase を発現するプロモーターマウスを用いて、Rac1 もしくは Cdc42 のコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを複製した。そして現在までに、Cdc42 CKO マウスは生後、一度は正常聴力を獲得するものの、生後2週間頃から徐々に有毛細胞が脱落して進行性難聴を呈することを見出した。一方で、Rac1 CKO マウスは難聴にはならず、有毛細胞の形態も正常であることを確認している。このことは Rac1 と相同性の高い Rac3 が、機能を代償している可能性が考えられた。申請者は実際に in situ hybridization の手法を用いて、成熟した内耳有毛細胞には Rac1 だけではなく、Rac3 も発現していることを見出している。(血球特異的に発現する Rac2 は、内耳において発現がないことも、RT-PCR にて確認済みである。)

本研究では、Rac1 CKO マウスに Rac3 コンペンショナル CKO マウスを交配させ、Rac1/3 ダブルノックアウト (DKO) マウスを複製し解析を行う。過去には、海馬の神経細胞において、Rac1 のみを欠損させるよりも Rac1, 3 を同時に欠損させることでその表現型が強く現れ、両者の間で機能代償が存在するという報告がある (Corbetta et al. FASEB J. 2009)。このことから、内耳有毛細胞で両者が欠損した Rac1/3 DKO マウスは聴覚における表現型を呈すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では以下の点に関して明らかにすることを目的とする。まず内耳有毛細胞において Rac 分子種が、発生以降どの段階の、細胞内のどの部位で、どの様な機能を果たしているのか解析する。さらに、

内耳有毛細胞における Rac 分子種間での機能代償を明らかにする。具体的には、

Rac1/3 DK0 マウスの経時的な聴覚・平衡覚評価と、内耳有毛細胞の形態観察をする。

内耳有毛細胞内での Rac1 の活性化部位を明らかにする。

内耳有毛細胞において、Rac シグナルの下流で関わる分子機構について解明する。

コントロールマウスと Rac1 CK0 マウスでの、Rac3 の発現量の違いを検討する。

3. 研究の方法

聴覚は、ABR（聴性脳幹反応聴力検査）で評価する。平衡覚は、VEMP と行動観察（スイムテスト等）で評価する。形態観察については、まず共焦点レーザー顕微鏡にて行う。固定した内耳からコルチ器を摘出し、ファロイジン染色した後に whole mount の形でスライドガラス上に包埋する。この手法によりコルチ器内での有毛細胞の配列、周囲支持細胞との関係（tight junction を含む）、細胞脱落の有無、有毛細胞頂側面の不動毛の大きな配列や本数、不動毛の基部にあたるクチクラ板の形態などを確認することができる。

次に、共焦点レーザー顕微鏡で不動毛に変化が確認できるのであれば、次に走査型電子顕微鏡による観察に進む。これにより不動毛 1 本 1 本の長さや太さ、具体的な本数や細胞頂側面での配列などが詳細に確認できる。一方で、共焦点レーザー顕微鏡で tight junction やクチクラ板の形態などに変化が確認できるような場合には、透過型電子顕微鏡による観察に進む。これにより tight junction やクチクラ板の電子密度を含めた詳細な形態が確認できる。内耳のサンプル作成 (Sakaguchi H et al. Euro Hear. 2007) から、共焦点レーザー顕微鏡や電子顕微鏡の取り扱い (Sakaguchi H et al. Nature. 2007) については、当教室の坂口博士講師と研究協力者である上山健彦准教授の指導のもとに経験があり、技術的に可能である。

内耳有毛細胞内での Rac1 の活性化部位を明らかにする。申請者はこれまでの研究で、Cdc42 FRET バイオセンサートランスジェニ

ックマウスを用い、内耳有毛細胞における Cdc42 の活性化部位を明らかにした。FRET バイオセンサーとは、活性化によって立体構造が変化すると共鳴エネルギー移動が生じる事で、同じ励起光をあてた時に活性化部分と不活性部分で異なる波長の蛍光を発する分子である。同様の手法を用いて、内耳有毛細胞における Rac1 の活性化部位を明らかにする。

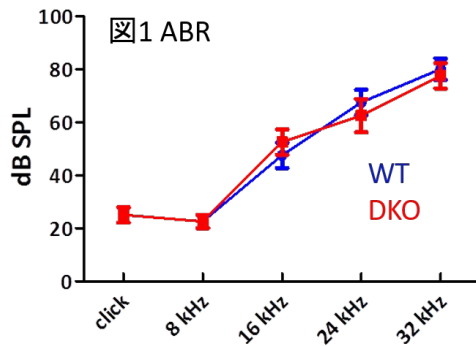
次に内耳有毛細胞における Rac シグナルの下流因子を明らかにする。コントロールマウスと DK0 マウスそれぞれからコルチ器を摘出して RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子解析を行う。解析結果の中から、内耳有毛細胞における Rac シグナルの下流因子を 2~3 種類に絞り込む。続いてそれぞれのアデノウイルス plasmid を作成し、初代器官培養した DK0 マウスのコルチ器に感染させる。その分子が実際の下流因子であれば、DK0 マウスにおける形態学的な表現型が、やや回復する方向に向かうと考えられる。問題点として、マイクロアレイの結果で出される膨大な種類の分子から、適格な分子が絞り込めるかという点がある。アデノウイルス作成の時間と労力を考えると、多くて 3 種類が限界と思われる。遺伝子解析の結果から絞り込みが困難であれば、先述した Cdc42 CK0 マウスでも同様にマイクロアレイを行って、両者で共通の分子を候補とするというアイデアもある。もう一点、コルチ器からの RNA では有毛細胞が占める割合が低く、解析結果に反映してこない可能性もある。その場合、有毛細胞の占める割合が多い前庭を用いるというアイデアもある。アデノウイルスの取り扱いについては、既に上山健彦准教授から指導を得て扱った経験もあり、技術的には支障がない。

最後にコントロールマウスと Rac1 K0 マウスでの、Rac3 の発現量の違いを検討する。コントロールマウスと Rac1 CK0 マウスそれぞれのコルチ器から RNA を抽出し、RT-PCR にかけて Rac3 の発現量の違いを確認する。一つのコルチ器を採取するには 15 分程度の時間がかかるため、作業は常に 4 に冷却した状態で行き、摘出後のコルチ器は速やかに RNA 安定化溶液の中に入れる。Rac1 CK0 マウスにおいて Rac3 が代償的に機能してい

るとすれば、Rac3 の発現量が増加していることが予想される。

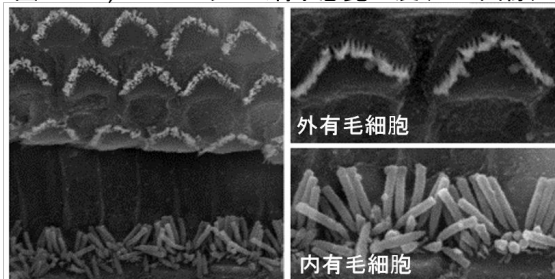
4. 研究成果

平成 26 年度の研究により、アクチン細胞骨格の制御因子であり GTP 結合タンパク質に属する Rac 分子種のうち、Rac1 を内耳有毛細胞特異的に KO したマウスと、Rac3 を全身的に KO したマウスを交配することにより、内耳有毛細胞特異的に Rac1,3 を DKO したマウスを作成した。このマウスは生後数日で 歩行を開始する段階から、明らかな失調性歩行を呈した。ABR にて聴覚を解析したところ、生後 10 週と十分に成熟した段階においても、同腹のコントロールと比較して有意な聴覚障害は認められなかった (図 1)。また、同様のマウスを用いて共



焦点レーザー顕微鏡や走査型電子顕微鏡により形態学的な解析も行った。しかし Rac1,3DKO マウスの蝸牛感覚上皮に有意な異常所見は認めず (図 2)、更に予想に反して平衡 覚に寄与する前庭や三半規管膨大部ですら、異常は認められなかった。

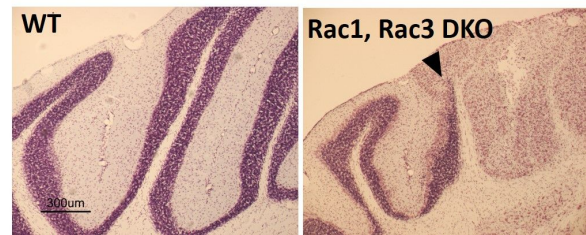
図2 Rac1,3 DKOマウス 蝸牛感覚上皮(SEM画像)



そこで Rac 分子種の内耳における発現 (mRNA レベルでは in situ hybridization にて確認済み)と活性化を確認する目的で、Rac1 の FRET バイオセンサー (活性化により共鳴エネルギー移動が生じるこ とで、不

活性化部分と異なる蛍光を発する分子) トランスジェニックマウスにおける内耳の解析を行った。するとやはり、Rac1 は内耳 有毛細胞に存在し、かつ有毛細胞不動毛で活性化していることが確認できた。一方で、失調性歩行の原因解明のため小脳 (Rac1 を特異的に KO するために用いた Atoh1 プロモーターは小脳顆粒細胞にも発現している) の組織を確認したところ、小脳顆粒細胞層の部分的な形成不全・欠損を認めた (図 3)。

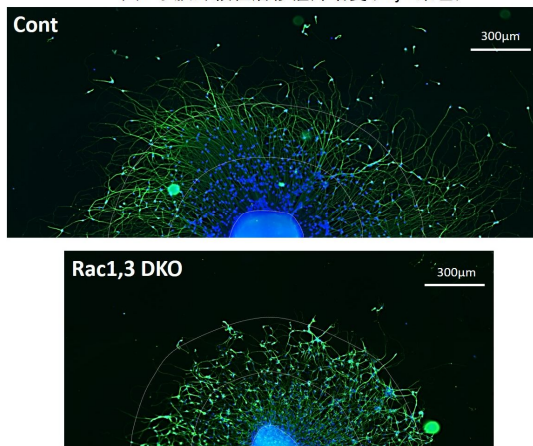
図3 小脳顆粒細胞層 (Nissle染色)



ここまでの研究により全身に広く発現する Rac 分子種は、内耳有毛細胞においても発現し活性化しているものの、その発生や成熟、更に聴覚の獲得や維持には根幹的な働きを果たすわけではない。しかし、小脳顆粒細胞層の形成においては Rac1,3 が必須であることを見出した。

平成 27 年度は、小脳顆粒層の形成過程において、どの段階で Rac 分子種が機能しているのかを最初に確認した。結果、顆粒細胞前駆細胞が小脳原器表層を接線方向に移動し、その後増殖して外顆粒層を形成するまでの過程において Rac は殆ど寄与しておらず、外顆粒層から内顆粒層に向けて垂直方向に移動する過程に必須であることを、組織切片を用いた実験系で明らかにした。更に初代培養した Rac 欠失顆粒細胞は神経突起の形成不全を呈し、Rac 欠失外顆粒層の移植片培養にて、顆粒細胞の移動能の低下を確認した (図 4)。Rac 欠失顆粒細胞 は、神経突起の形成不全が原因で移動能が低下し、内顆粒層への垂直移動が障害されるものと考えられた。

図4 小脳外顆粒層移植片培養(Tuj-1染色)



続いて申請者が作成した小脳顆粒層形成不全マウスにおいて Rac の下流因子を同定する目的で、小脳顆粒層をマイクロアレイに供したところ、「Mid1」の発現低下を発見した。Mid1 とは全身の正中部分で臓器形成不全をきたす Opitz G/BBB 症候群の原因遺伝子である。Mid1 の変異マウスは、小脳においてもその正中部分で顆粒層の形成不全を生じることが報告されている。申請者が作成した Rac ノックアウトマウスは小脳正中部分において、Mid1 変異マウスよりも更に顕著に顆粒層形成不全を呈することが、Mid1 は Rac の下流で機能していることを更に示唆している。Opitz G/BBB 症候群は、その発症機序が未だ完全には解明されておらず、本研究はその病態解明につながる可能性が十分にあると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中村高志, 二之湯弦, 森岡繁文, 瀧 正勝, 兵庫美砂子, 久 育男, 坂口博史. 内耳有毛細胞と小脳顆粒細胞における Rac 分子種の機能解析. 第 25 回日本耳科学会総会・学術講演会. 2014 年 10 月 9 日; 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

Sakaguchi H, Morioka S, Nakamura T, Ueyama T, Saito N, Hisa Y. Maintenance of Stereocilia and Apical Junctional Complex by Rho GTPase. The 37th MidWinter Meeting

of the Association for Research in Otolaryngology. 2014 Feb 23; San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 高志 (NAKAMURA, Takashi)

京都府立医科大学・耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室・病院助教

研究者番号: 8 0 7 2 4 1 7 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: