様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 4 月 16 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長　殿

所属機関・部局名　京都府立医科大学・耳鼻咽喉科
職　　名　准教授
研究代表者名　坂口　博史

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281005)

1. 共同利用研究課題名	内耳有毛細胞の発生および機能維持に関与する分子シグナルの解明			
2. 共同利用研究目的	モデル動物および分子機能解析のための技術・設備の共同利用			
3. 共同利用研究期間	平成 29 年 4 月 1 日　～　平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏　　名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者)	坂口　博史	准教授	研究統括	
(分担研究者)	毛利　宏明	大学院生	研究遂行	
5. センター内受入研究者	研究部門・分野名	バイオシグナル研究センター・分子薬理学分野	氏　名	齋藤　尚亮

※　次の6, 7, 8の項目は, 枠幅を自由に変更できます。但し, 6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

（課題番号:281005）

6．共同利用研究計画

内耳障害の病態の解明と新規治療法の開発を目指して、内耳機能の中枢を担う有毛細胞に着目し、その機能維持に関わる分子機構について研究を進める。有毛細胞の維持生存・形態形成に関与し得るシグナル分子に関して in vitro および in vivo での発現スクリーニングや機能解析を行うため、細胞内シグナル伝達研究に必要な技術と設備を有するバイオシグナル総合研究センター分子薬理研究分野（以下、齋藤研）との共同研究を行う。過去に申請者は、齋藤研と共同で、Rho GTPase のうち Cdc42 が内耳有毛細胞の形態制御に重要な役割を果たすことを解明してきた。本研究では、Rac など他の Rho GTPase や mDia のようなアクチン関連タンパクによる不動毛の形態制御、ROS による細胞傷害、各種 NADPH oxidase の内耳における機能について検証し、有毛細胞の形態制御に関わる分子シグナルを包括的に解明することを目指す。

7．共同利用研究の成果

(1) 主要な Rho-GTPase である Rac 分子種は内耳有毛細胞の不動毛形態形成には関与しないものの、小脳分葉構造の形成に関与する事が判明した。そのメカニズムとして顆粒細胞の細胞移動に Rac が必須であり、かつその下流に Mid1 が関与していることを解明した。本成果は英文学術誌に掲載された 1)。
(2) 上記（1）の研究において、有毛細胞特異的な分子機能欠失モデルマウスの作成方法を確立した。さらに同モデルマウスでは小脳顆粒細胞の機能も同時に評価できることから、末梢性ならびに中枢性めまい疾患のモデル動物として有用であることを報告し、その内容を解説として和文学術誌に掲載した2)。
(3) NOX4 トランスジェニックマウスを作成して、内耳における ROS 過剰産生モデルを確立し、その機能解析を行なった。生理的な条件下では ROS 過剰産生による聴覚への影響は見られなかったが、騒音を負荷することにより聴力の脆弱性が生じ、内耳において高度の音響障害をきたすことが判明した。また、その障害は外有毛細胞の細胞死が関与しており、抗酸化物質により制御できること、さらに ROS の過剰産生は有毛細胞において HSP47 分子の発現を亢進していることがわかった。これらの結果から生理的条件下での ROS の過剰産生はフィードバック経路によって抗酸化に関わる細胞内シグナルを活性化していること、そのシグナルの下流で HSP47 が関与していることが示唆された。本研究の成果は英文学術誌に掲載予定である 3)。
(4) ヒト遺伝性難聴である DFNA1 の病態解明のため DIA 変異マウスを用いて機能解析した結果、DIA 変異は機能獲得型変異でありアクチン重合を促進することで有毛細胞不動毛の形成に影響を与えることが判明した。同研究の成果について日本耳鼻咽喉科学会で報告した 4)。また同じモデルマウスにおいて有毛細胞得意的なリボンシナプスの形成が阻害されることを見出し、現在も研究を継続している。

8．共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況
（本センターの担当教員の氏名の記載，又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお，論文の場合は，別刷りを1部提出してください。）

論文

1） Nakamura T, Ueyama T, Ninoyu Y, Sakaguchi H, Choijookhuu N, Hishikawa Y, Kiyonari H, Kohta M, Sakahara M, de Curtis I, Kohmura E, Hisa Y, Aiba A, Saito N. Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development. Development. 144(10):1863-1875. 2017
2） 坂口博史、中村高志、上山健彦．めまい疾患のモデル動物-遺伝子医療・再生医療への扉 聴覚・平衡覚の成立における Rho-GTPase の関与. Equilibrium Research. 76(6)： 720-726, 2017
3） Morioka S, Sakaguchi H, Yamaguchi T, Ninoyu Y, Mohri H, Nakamura T, Hisa Y, Ogita K, Saito N, Ueyama T. Hearing vulnerability after noise exposure in a mouse model of reactive oxygen species overproduction. J Neurochem. 2018, in press

学会発表

4） 二之湯 弦、北尻真一郎、坂口博史、宇佐美真一、齋藤尚亮、上山健彦．DIA1 変異マウスを用いた DFNA1 の病態解明．日耳鼻. 2017 年 5 月 18 日．広島

9．共同利用研究に関連した受賞，博士学位論文の取得，大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。