

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

令和元年 5月 8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 30 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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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	耳鼻咽喉科	准教授	研究総括	
(分担研究者) 毛利 宏明 ニ之湯 弦	耳鼻咽喉科 耳鼻咽喉科	大学院生 専攻医	研究遂行 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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9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

申請者は以前から内耳障害の病態の解明と新規治療法の開発を目指して、内耳の機能維持に関わる分子機構について研究を進めてきた。本研究をさらに発展させ、内耳における細胞内シグナルの解明を進める目的で、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（齋藤研）との共同研究を行う。過去の研究では齋藤研と共同で、Rho GTPaseのうち Cdc42 がアクチン代謝の制御を通じて内耳有毛細胞の形態と機能維持に重要な役割を果たすこと、同じくアクチン制御分子である DIA1 が有毛細胞の不動毛形態の維持に関与することなどを報告してきた。本研究においてはこれらの成果を手がかりとして、蝸牛における活性酸素の機能と細胞障害性、および有毛細胞のシナプス形成に関わる細胞内シグナルの解明を進める。なお、本研究は客員研究員として派遣している大学院生ならびに申請代表者と分担研究者が神戸大学に赴いて行う。

7. 共同利用研究の成果

1) 内耳における活性酸素種の機能について

活性酸素種 (ROS) は老人性難聴、薬剤性難聴、騒音性難聴など様々な難聴の発症に関与すると考えられている。我々は全身性に ROS を過剰発現するモデルマウスを作成し、ROS が内耳に及ぼす影響について検討した。モデル作製にあたっては、ROS 産生酵素である NADPH oxidase (Nox) familyのうち、唯一恒常的に ROS を産生する Nox4 に着目し、N 末端を FLAG で標識した Nox4 を過剰発現する FLAG-Nox4 トランスジェニックマウス (Nox4-TG マウス) を作成した。

通常飼育条件下において Nox4-TG マウスの聴力は正常であり、また組織学的解析でも、内耳に異常を認めなかった。一方で、強低音への暴露聴力によって、特に高音域において NOX4-TG マウスで聴力が有意に悪化した。組織学的解析では外有毛細胞の脱落数が有意に増加した。抗酸化剤である Tempol を投与して同様の音響暴露を行ったところ、音響暴露後の聴力悪化と外有毛細胞の脱落が有意に改善した。

次いで質量分析を用いて Nox4 に結合する分子の同定を試みた結果、培養細胞に対して ROS 曝露による細胞死を軽減させると報告があるコラーゲン特異的分子シャペロンである Heat shock protein 47 (Hsp47) が同定された。さらに HEK293 細胞において、Nox4 の導入によって Hsp47 の発現が有意に増加し、H2O2 濃度依存性に Hsp47 発現が亢進することが確認された。最後に、免疫染色ならびにウエスタンブロッティングにより Nox4-TG マウスの内耳でコントロールマウスに比べて Hsp47 発現が有意に増加している事が確認できた。以上の結果より Nox4 による慢性的な ROS の過剰産生は、定常状態では Hsp47 などの保護因子により代償されるが、音響曝露による酸化ストレス負荷を加えることで内耳脆弱性をもたらすと考えられた。

2) 有毛細胞における DIA1 の機能について

これまでの研究において、我々はアクチン制御分子である DIA1 が有毛細胞の不動毛形態の維持に関与することを解明してきた。一方で、活性型 DIA1 を過剰発現する変異マウスにおいて音響暴露を加えると、有毛細胞のシナプス形成に障害が生じることが判明した。免疫組織化学的検討では、有毛細胞の不動毛、細胞間結合、シナプス部位に DIA1 の発現がみられ、これらの部位において DIA1 はアクチン制御に関わることが示唆された。これらの結果は、変異型 DIA1 が不動毛のみならず、細胞間結合やシナプス形成にも関与している可能性を示しており、DIA1 変異による遺伝性難聴の病態に新たな知見が得られた。今後さらにシナプス障害による難聴の発症機序の詳細を解析する予定である。

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。)

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 Aug;146(4):459-473.

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。

なし