

新規難聴候補因子としての酸感受性イオンチャネル遺伝子の機能解析

金城学院大学 薬学部薬学科

名古屋市立大学大学院医学研究科 機能組織学分野

星川 真理子

1. 諸言

聴覚は、人間の日常生活活動度（Activity of daily life : ADL）と生活の質（Quality of life : QOL）に密接に関係する五感の1つである。しかし、先天性難聴は出生児 1,000 人に 1~2 人、老人性難聴は 70 代で罹患率が 5 割を超えるなど、その障害の頻度は社会一般からの認識よりも非常に多い。また、難病の1つとして知られている若年発症型両側性感音難聴は、さまざまな遺伝子の関与が示唆されるものの、その機序の詳細はいまだに不明とされる。聴覚の本態はすなわち、空气中を音波という波の状態で行く力学エネルギーを神経の電気活動に変換するという細胞生理機構の上に成り立っている。これら聴力を低下させる変性疾患を理解するにあたっては、内耳有毛細胞が波の形で伝わってくる音圧を電気信号に変換するチャネル分子機構の理解が重要となる。

聴覚を受容する内耳有毛細胞の感覚毛には、機械刺激により電流を発生する正体不明のメカノセンサー（Mechano-Electrical transduction channel : MET チャネル）が存在し、チップリンクによりその開閉が制御されていることが、解剖学的・電気生理学的解析から想定されている。しかし、有毛細胞上の MET チャネル分子はいまだに確定的とはいえない状態である。このため、先天性難聴や加齢性難聴、めまいといったありふれた疾患について、分子レベルでの病理・病態の根本的な理解がいまだに困難である。

聴覚の機能障害は、生活をする上での活動度および満足度を低下させることは容易に推測され、社会的なインパクトは非常に大きい。本研究は、これら内耳有毛細胞を起点とする難病を含めた疾患群について、より詳細な分子メカニズムを明らかにするための基礎的研究となりうる。将来的に本研究結果が病態に沿った新規の創薬の標的分子となることが期待され、上記疾患を抱える多数の人々にとって社会的活動性を向上させる一助になることが最終的な目標である。

2. 方法

聴覚機能の出発点である MET チャネルの本体を明らかにするため、私たちは酸感受性イ

オンチャネル (Acid-sensing Ion Channel : ASIC) を標的とした研究を立案した。ASIC ファミリーは、線虫の機械刺激受容体遺伝子であるデジェネリンの哺乳類ホモログとして同定された経緯を持つイオンチャネル分子群である。このことから、ASIC ファミリーは哺乳類の機械刺激受容体の候補と考えられている。ASIC ファミリーは 6 種類のサブタイプ (1a、1b、2a、2b、3、4) が存在し、互いにサブユニットとして、ホモ/ヘテロ 3 量体を形成すると想定される。私たちはこれまでに、ASIC が MET チャネルであることを想定し解析を続けてきた。ASIC1b ノックアウトマウスによる検討では、英国 Sussex 大学の Corné Kros 教授との共同研究によって、外有毛細胞の機械刺激電流が減弱し感音性難聴が生じることを見出した。この知見は、ASIC が MET チャネルを構成するサブユニットの一つであることを示唆したが、聴覚の完全消失は伴わなかった。さらに、ASIC4 レポーターマウスを用いて内耳における発現と分布を調べたところ、蝸牛と前庭器官 (球形囊・卵形囊・膨大部稜) の有毛細胞における発現を確認した。これらの知見は、ASIC ファミリーが MET チャネルもしくは聴覚関連遺伝子の候補である可能性を示唆するものであり、本研究においては、聴覚における ASIC ファミリーの果たす役割のうち、特に ASIC4 を標的として詳細を検討することを目的とした。

本研究では、レポーターマウスによって内耳有毛細胞への発現が明らかとなった ASIC4 について、その局在の詳細を明らかとするために C 末端にタグ配列を付加した ASIC4 ノックインマウスを作出するとともに、抗タグ抗体を用いてその免疫学的特異性を確認し、whole mount 標本を用いて ASIC4 の詳細な発現様式を明らかにすることを目的とした。

3.結果

ASIC4 を特異的に染色することができる市販抗体が存在しなかったため、まず ASIC4 遺伝子をコードするゲノムの終止コドン直前に、タグ配列として AU1 tag (DTYRYI epitope tag) を付加したノックインマウスを作出した。作出には CRISPR/Cas9 システム (px330-u6-chimeric_bb-cbh-hspcas9 ベクターを使用) による HDR 促進法を用い、供与ベクターにはノックイン配列の前後に 1kbp 長の Homology arm を備えた環状プラスミドを使用した。得られた KI マウスを用いてウエスタンブロッティング法を行ったところ、KI マウスでは予測される高さに特異的なバンドを検出できたが、野生型マウスではバンドを検出できなかったことから、KI マウスでは抗タグ抗体により ASIC4 を特異的に検出可能であると判断した。

図 1、図 2 に KI マウスの蝸牛および卵形囊斑の Whole mount 標本を用いた免疫組織化学染色の結果を示す。蝸牛の内毛細胞および外毛細胞ともに細胞体に一致して ASIC4 の発現が観察された。不動毛の同定のためにアクチンのマーカーである phalloidin との 2 重染色を行ったが、これと重なる蛍光は内毛細胞、外毛細胞および前庭系有毛細胞ともに観察されなかった。野生型マウスにおいてはこれらの蛍光染色パターンは認められな

った。前庭系有毛細胞の代表として図 2 に卵形囊斑の結果を示す。フラスコ型かつ核が深部にあることを特徴とする 1 型有毛細胞の一部に ASIC4 が発現している様子が観察された。シリンジ型かつ核が表層に近い 2 型有毛細胞には ASIC4 の発現は観察されなかった。

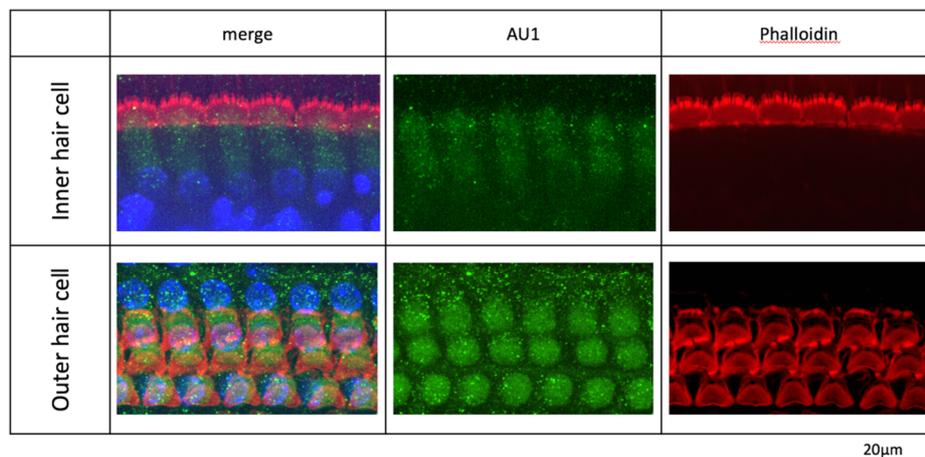
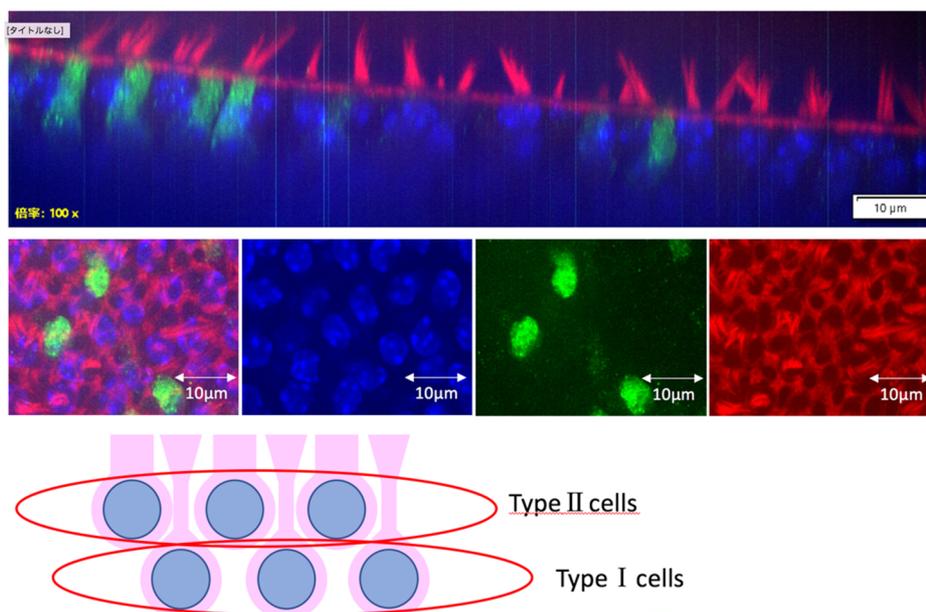


図 1 蝸牛有毛細胞における ASIC4 の発現様式。内有毛細胞および外有毛細胞の双方の細胞体に ASIC4 の発現を認めた。



4.考察

本研究においてはタグ分子として AU1 を選択し、ASIC4 の検出のために抗 AU1 抗体を使用した。タグ分子およびそれを検出する抗タグ抗体は感度・特異度ともにこれまでに報告があるが、本研究において確認のために行った Western blotting 解析によっても野生型マウ

スではみられないバンドが明瞭に確認され、特異度に問題はないと判断された。

前項に示したとおり、蝸牛および前庭系有毛細胞の細胞体に ASIC4 が発現していることが確認された。その発現様式は細胞体が中心であり、不動毛への蛍光集積は確認できなかった。また、蝸牛においては外有毛細胞・内有毛細胞ともに発現がみられたが、前庭系においてはフラスコ状で核が深部に存在する、形態学的に 1 型と判断される細胞群¹⁾に ASIC4 が発現していた。しかし、深部に核のある有毛細胞すべてに ASIC4 が陽性ではなく、1 型細胞の一部が ASIC4 陽性であった。

これまでの報告では、前庭系有毛細胞のマーカには Spp1、Calb2、Anxa4、Mapt4 など複数の分子があり、同報告内で、これらの分子が発生と分化の過程によってその発現量やマーカとしての有用性が変遷することが示されている²⁾。このことより、ASIC4 が形態学的に 1 型有毛細胞とされる細胞群をさらにサブクラスに分類する可能性や、発生分化の過程によりその陽性頻度が変遷する可能性などが示唆された。今後、ASIC4 陽性/陰性によりマーカの発現に差があるか、また機能的な差異として接続するシナプスの形状に差異があるかなどを検討する必要があると考えられた。

今後、蝸牛有毛細胞などを用いて電気生理学的解析を行い、ASIC4 の野生型およびノックアウトマウスを比較して、内耳における ASIC4 の機能的な発現を証明することを目標とする。

5.結語

ノックインマウスを用いた検討の結果、ASIC4 が内耳蝸牛および前庭系有毛細胞に発現していることが示された。また、前庭系有毛細胞において ASIC4 が 1 型有毛細胞の新規マーカとなる可能性が示された。

6.文献

- 1) Climer LK, Cox AM, Reynolds TJ, Simmons DD. Oncomodulin: The Enigmatic Parvalbumin Protein. *Front. Mol. Neurosci.* 2019;12:235.
- 2) McInturff S, Joseph C, Burns JC, Kelley MW. Characterization of spatial and temporal development of Type I and Type II hair cells in the mouse utricle using new cell-type-specific markers. *Biol Open.* 2018;7(11):bio038083.

7.成果発表

なし