

## イオン輸送体を標的とした加齢性難聴発症機序の解明と 創薬応用

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	スズキ サリ 鈴木 沙理
所属等	株式会社サイバーコネクトツー
プロフィール	2015年3月東京農業大学生物産業学研究科で博士後期課程卒業。博士後期課程所属中、東京都医学総合研究所および理化学研究所で研修生となる。その際、聴発症系統マウスの表現型解析と新規難聴関連遺伝子座を同定研究に携わる。博士号を習得後、東京都医学総合研究所で研究補助員として2年間就業した後、2017年4月より福岡大学医学部薬理学助教に赴任。イオン輸送体を標的とした、加齢性難聴治療薬の開発研究に従事している。

### 1. 研究の概要

難聴は、世界的にみても患者数の多い感覚器疾患であり、国内の難聴患者は 630 万人以上と推定されている。難聴有病率は加齢に伴って上昇し、難聴患者の約半数は遺伝的な要因により発症することが知られているが、遺伝性難聴（加齢性難聴）に対して、人工内耳や補聴器の適応はあるものの、根本的な治療法や効果的な薬物療法は未だ確立されていない。申請者は、これまでに、難聴発症系統マウスの表現型解析と QTL 連鎖解析から新規難聴関連遺伝子座を同定するとともに、いくつかの関連遺伝子 (*Cdh23*, *Fscn2*) の重要性を報告してきた。本研究では、さらに難聴発症機序を解明する目的で、加齢性難聴モデルマウス (*Cdh23* 機能低下マウス) と各種  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 (NCX) 欠損マウスを二重交配したマウスを用いて、難聴発症における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル異常の病態学的意義の解明を目指し、以下の 3 項目の実験を行った。

(1) 内耳蝸牛における各種  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体遺伝子の発現およびの局在の検討 (2) 各種 NCX 欠損マウスの加齢に伴う聴力機能 (加齢性難聴感受性) (3) 内耳の形態変化観察。これらの結果より、NCX1、NCX2 および NCX3 はそれぞれ内耳蝸牛において異なる発現局在を示しており、蝸牛内の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送に個々に機能することが示唆された。また、聴力機能試験により、加齢性難聴モデルである C57BL/6J (B6J) マウスと比較して、各種 NCX 欠損マウスは、音刺激による感受性が異なることを見出した。本研究成果は、難聴の新しい治療法や新規創薬に繋がることが期待される。

### 2. 研究の動機、目的

多くの高齢者は加齢に伴い聴力が低下し、70 歳以上の高齢者のうち約 60%以上は何らかの聴覚異常をもつことが示されている (Pacala *et al.* JAMA, 2012)。加齢性難聴は内耳の機能障害を由来とした感音難聴であるが、内耳では、多様なイオンチャネルやイオン輸送体が局在・機能制御されており、それらは内リンパ液のイオン組成 (濃度勾配) を巧みに調節している (Jentsch *et al.* Nat Cell Biol, 2004; Yamauchi *et al.* Equilibrium Res, 2009; Ceriani *et al.* Cell Commun Signal, 2012)。また、内耳蝸牛の内リンパ腔には内リンパ直流電位があり、音の機械的エネルギーを神経伝達のための電気信号に変換する駆動力として重要な役割を担っている。しかしながら、内リンパ液は細胞外組成にもかかわらず、高  $\text{K}^+$  濃度で低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度となる分子機序は未だ不明であり、さらに、難聴発症におけるイオンチャネル・イオン輸送体の病態生理学的意義についても明確でない。本研究では、*Cdh23* 点突然変異の報告がある C57BL/6J (B6J) マウス (Noben-

Trauth *et al.* Nat Genet, 2003) を加齢性難聴モデルとし、B6J (*Cdh23* 変異マウス) を遺伝的背景とした各種  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体欠損マウス (*Ncx1*<sup>-/-</sup>, *Ncx2*<sup>-/-</sup> および *Ncx3*<sup>-/-</sup>) を二重変異マウスとして用いて、加齢性難聴発症に関与する  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体を介した難聴発症機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の結果

まず初めに、内耳蝸牛における  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体の発現を確認するため、生後 3 日齢の内耳蝸牛から抽出した RNA を用いた real-time RT-PCR により、各トランスポーターおよびチャネル遺伝子の *Gapdh* に対する相対定量を行った。その結果、内耳において *Ncx1*, *Ncx3*, *Mcu*, *Trpc3*, *Trpc5* および *Trpc6* 遺伝子が他に比べて、多く発現していた (図 1)。

NCX は、哺乳類において NCX1~3 の 3 種類が存在し、それらが発現する臓器は異なる輸送体である。本研究結果は、内耳において NCX1 および 3 が特に高発現することを見出し、これらが内耳蝸牛で機能していることが示唆された。また、内耳において MCU が高発現していることも明らかとなった。MCU はミトコンドリアにおいて  $\text{Ca}^{2+}$  単輸送体として機能することが知られている。ミトコンドリア機能の低下はアポトーシスを引き起こし、加齢性難聴の原因となることから、MCU が内耳においてミトコンドリアの品質の維持に機能し、その異常は加齢性難聴の原因となる可能性がある。TRPC1, 3, 5 および 6 は聴覚機能に関与することがすでに報告されており (Quick *et al.* Neurosci Lett, 2016)、TRPC3 および 6 は内耳蝸牛有毛細胞に発現している (Sexton *et al.* Open Biol, 2012)。しかしながら、それらは単独で難聴発症に効果を示さないため、他の分子との相互作用を介したネットワークにより作用することが示唆されている。

次に、内耳蝸牛における  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体の局在を確認するため、生後 4 ヶ月齢の B6J マウスから、免疫組織学的解析により蝸牛における各種  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体の発現・局在解析を実施した。ここでは、図 1 の実験により高発現が確認された NCX1, 2, 3 に着目し検討を行った。その結果、内耳蝸牛の血管条、支持細胞、神経線維細胞およびラセン神経節細胞に NCX1 および 2 が局在していた (図 2a, b, e, f および d)。特に、NCX1 および 2 は内耳蝸内電位を維持する血管条に強く発現し、このことは血管条に発現していることが知られている  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ポンプのみでなく、NCX が存在しており、相互的に機能している可能性を示唆している (図 2a および b)。また、NCX1 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の音のシグナル変換機能をもつ有毛細胞においても強い発現が確認されたことから、有毛細胞においても機能することが示唆された (図 2a および d)。神経線維細胞およびラセン神経節細胞において NCX1 および NCX2 の局在が明らかになり (図 2a, f および h)、神経細胞から聴覚皮質へ伝達する過程において、 $\text{Ca}^{2+}$  が重要な役割を担っていると考えられた。また、NCX1 および NCX2 は類似した局在を示したが、NCX2

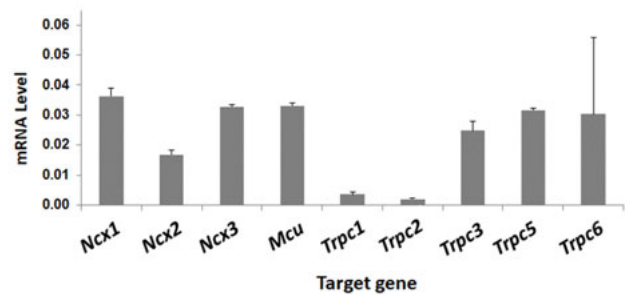


図1: real-time RT-PCRによる生後3日齢における内耳蝸牛に発現する各 $\text{Ca}^{2+}$ 輸送体遺伝子のmRNA発現比較。

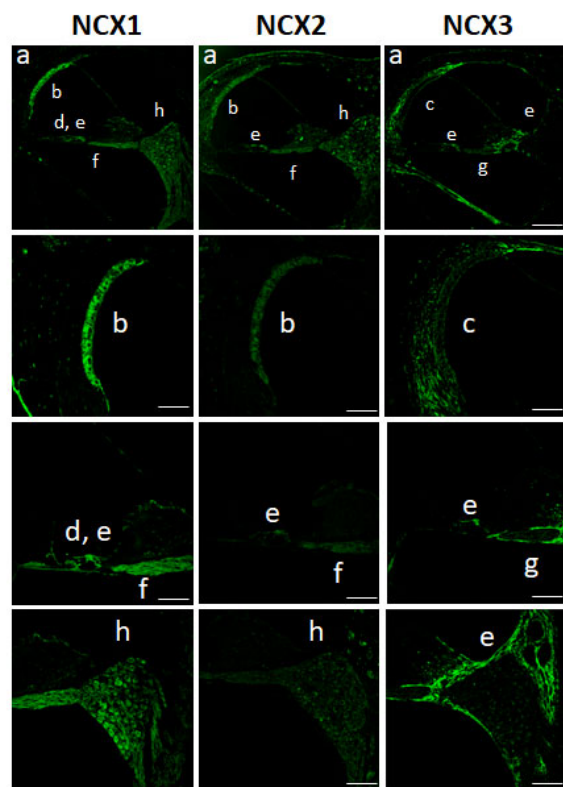


図2: 免疫組織学的解析による生後4ヶ月齢の野生型マウス(C57/BL6J)の内耳蝸牛における各NCXの局在。\* a: 蝸牛中回転全体図; b: 血管条; c: ラセン初帯; d: 有毛細胞; e: 支持細胞; f: 神経線維細胞; g: 骨ラセン板; h: ラセン神経節細胞 Scale bar: a: 100um; b, c, d, e: 50um

は NCX1 と比較して蝸牛における発現量が少なく、これは mRNA 発現の結果と一致した (図 1)。一方、NCX3 は NCX1 および NCX2 と異なり、ラセン靭帯、支持細胞および骨ラセン板に局在を示した (図 2a, c, e および g)。ラセン靭帯や支持細胞には、ギャップ結合タンパクが存在し、細胞間ネットワークが結成され、カリウムイオンのリサイクルに関与することが報告されていることから、NCX3 は  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体における細胞間ネットワークに関与する可能性がある。また、ラセン靭帯や骨ラセン板はラセン神経節細胞および神経線維細胞を囲っており、神経細胞においても NCX3 が  $\text{Ca}^{2+}$  輸送に機能していることも予想される結果である。

次に、各種 NCX 欠損マウスの聴覚機能を調査するため、音刺激による反応を観察した。音刺激は、マウス個体に 2~8kHz の周波数において 90dB 以上の音刺激を 10 回与えた。対象区として、65~79 dB 以下の音刺激を 10 回与えた。マウスに与える機械的音刺激の反応を 0, 1, 2 および 3 にスコア化して記録した。また、各種 NCX 欠損マウスにおいて目視およびビデオ観察し、聴覚機能の有無を判定した。その結果、有意な差異は認められないものの、*Ncx1*<sup>-/-</sup>マウスは加齢性難聴モデルである B6J マウスと比較して、低い反応スコアを示す傾向にあった。一方、*Ncx3*<sup>-/-</sup>は B6J マウスと比較して、高い反応スコアを示した。このことは、NCX3 の欠失がマウスにおいて聴覚過敏を引き起こす可能性があることを示している。

さらに、マウス内耳蝸牛の組織形態を観察するため、生後 4 ヶ月齢の B6J マウスおよび *Ncx3*<sup>-/-</sup>マウスにおける内耳蝸牛組織切片を作製し、HE 染色を行った。その結果、生後 4 ヶ月齢の加齢性難聴モデルである B6J マウスと *Ncx3*<sup>-/-</sup>の間に、内耳蝸牛の血管条、有毛細胞、神経線維細胞およびラセン神経節細胞、他の部位の形態に差異は観察されなかった。

以上の結果から、NCX1、NCX2 および NCX3 は内耳蝸牛において異なる発現パターンを示し、蝸牛内の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送に個々に機能することが示唆された。各種 NCX 欠損マウスにおいて聴覚機能の欠損はみられなかったが、内耳蝸牛に  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体が存在しており、内耳蝸牛内の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送・循環や他のタンパクと相互的に機能していることが予想される。本研究において各種 NCX 欠損マウスが内耳蝸牛における  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体機能を解明する上での有用なモデルとなることが示唆され、本モデルを用いた研究結果は、内耳蝸牛の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体をターゲットした創薬開発につながることを期待される。

#### 4. これからの展望

本研究の聴力機能測定結果として、各種 NCX 欠損マウスにおいて有意な差は得られなかったものの、音刺激に対する感受性の違いが見られた。本研究において用いた音刺激による聴力機能測定は、検出感度が高い実験系ではないことから有意な差が見られなかった可能性がある。今後は、聴性脳幹刺激反応測定装置を用いた聴力測定を実施し、各種 NCX 欠損マウスの加齢性難聴モデルとしての有用性を実施していきたい。また、内耳蝸牛内 NCX を介した加齢性難聴発症の詳細な機序を、阻害薬実験や生化学的解析を実施することにより解明し、NCX の治療標的としての有用性を明らかにしていきたいと考えている。

#### 5. 社会に対するメッセージ

女性研究者に対して支援が増えている中、これからの社会は女性が研究しやすい環境になっていくと思われます。このような支援が自分の描く研究テーマの第一歩となり、必ずしも成果が出なくても今後に繋がる重要な準備段階となります。また、研究者が自由に発想して挑戦する機会が増えれば研究者を目指しやすくなり、より日本の研究活動が活発になると思います。