

アクチンの構造制御による 特発性両側性感音難聴治療法の開発

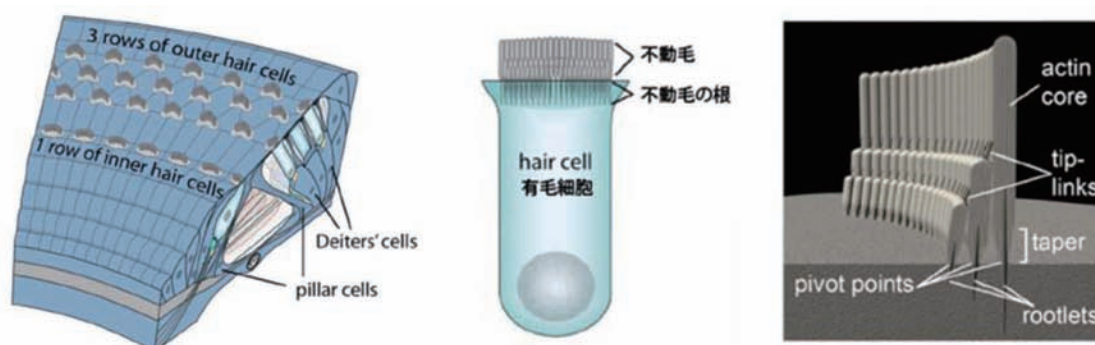
京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教 北尻 真一郎



【研究の背景】

聴覚は言語コミュニケーションの根幹をなし、その障害はQOL（生活の質）の著しい低下をまねく。感音難聴は最も頻度の高い身体障害で、その有病率は20%にもものぼり、大きな社会的問題となっている。にもかかわらず、感音難聴は根本的治療法が確立されていないばかりか、構造上、内耳組織は生検できないため、その病態すら十分に解明されていないのが現状である。しかし、ヒト特発性両側性感音難聴患者では、有毛細胞機能の指標である耳音響放射が障害されていること、蝸牛神経を刺激すると音感が得られることから、特発性両側性感音難聴が神経系の異常ではなく、内耳の中でも有毛細胞の障害であることが強く示唆されている。我々はこれまでに遺伝性難聴からアプローチするという戦略で、難聴をきたす遺伝子変異を同定した。その遺伝子、TRIOBPの解析を行い、TRIOBPタンパク質が細胞骨格の1つであるアクチンを束化して、図1にあるような内耳有毛細胞の不動毛の根を形成し、この根が機械的なストレスによる不動毛変性を防いでいることを見いだした。内耳有毛細胞の不動毛は、音刺激で振動し電気信号を発生するという聴覚受容で鍵となる機能を有する構造で、長期あるいは過剰な音振動による機械的ストレスによって損傷を受けると変成していき、一度変性してしまった不動毛は回復しない。

図1 内耳の構造、および有毛細胞不動毛とその根の概略図



【研究の目的】

多くの感音難聴において、内耳障害は不動毛変性から始まるため、不動毛の変成防止は感音難聴の克服に繋がると期待できる。本研究では、TRIOBPを始めとしたアクチン制御による有毛細胞における根の強化や不動毛の保護効果によって、不動毛変性の抑制、また変性した不動毛の再生を促すことを目指す。そのためにまず、根を形成するアクチン束化分子TRIOBP分子自体の性質の解析と、器官培養細胞上へ遺伝子の導入によるTRIOBPの不動毛保護効果の検証および、根を強化する化学物質のスクリーニング等、治療・創薬へ繋げるための評価実験システムの構築を目的とした。

【研究の方法】

TRIOBP分子の、アクチン細胞骨格との相互作用および、不動毛のような細胞構造への作用の解析はTRIOBPタンパク質の部位欠損変異体等を用いて、生化学的、細胞生物学的な解析によって検証を進めた。

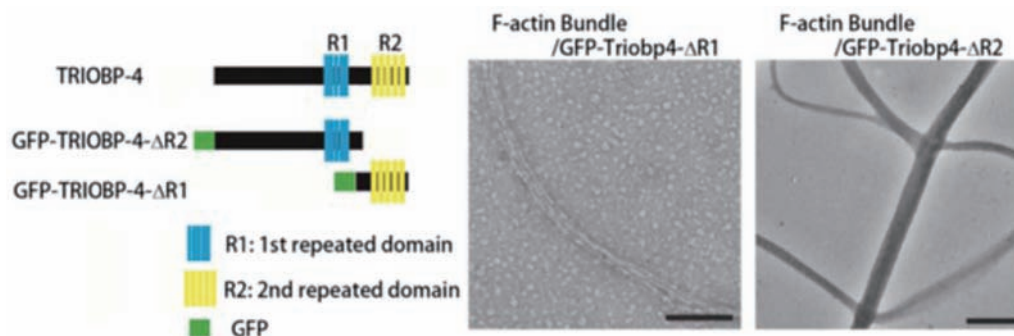
TRIOBPの不動毛保持、保護効果の検証は、モデル動物内耳の器官培養等を用いた、音響外傷、内

耳毒性薬物投与、加齢等の不動毛変性の障害モデル実験系を構築し行う。障害のモデルは、培養上清にアミノグリコシド系抗生剤を混入することや、培養デッシュを震盪する機械刺激等を加えることによって作り、その実験系上でTRIOBPの遺伝子導入を行い、根の強化やその保護効果を検証する。そのために、蛍光タンパク質GFP融合TRIOBPをマウス内耳器官培養細胞へ導入する方法の確立、およびTRIOBP遺伝子を組み込んだモデル動物の作製、さらには根を強化する化学物質をスクリーニングできる実験系の構築を進めている。

【研究の結果】

TRIOBPのアクチン束化機構の解析を、アイソフォームの1つであるTRIOBP-4 (T4) の部位欠損変異体を用いて行い、図2のようにこれまでにT4に2つある特徴的な反復配列 (R1ならびにR2) がそれぞれアクチン束化能を持っているという結果を得た。面白いことに、R1はイオン結合、R2は疎水結合と、それぞれ異なる様式でアクチンと結合しており、R1がアクチン束に新たなアクチンを捕捉して束を太くするのに対し、R2はその束の中でのアクチン間接着を強めるという機構が明らかとなった。これはTRIOBPによる不動毛の根の形成に複数のステップが存在することを示唆しており、この分子メカニズムの解析を進めることによって、より効果的な不動毛の根の形成や強化の誘導が可能になると期待できる。

図2 TRIOBPドメインはそれぞれ異なるアクチン束化活性を持つ



TRIOBPによる不動毛の維持、保護効果を検証するため、蛍光タンパク質GFPを融合させたTRIOBPを器官培養組織上の内耳有毛細胞へ遺伝子導入する実験系を構築した。複数の遺伝子導入法を検討した結果、遺伝子銃を用いた導入方法がもっとも安定しており、現在これを用いて解析を進めている。また理化学研究所（神戸）と共同で、GFP-TRIOBP-4遺伝子を全身で発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスからは、常時GFPによって可視化されたTRIOBPを発現している内耳組織が得られるため、今後の障害モデルでのTRIOBPの機能評価や、不動毛の変成を防ぐ化学物質のスクリーニング、さらにはTRIOBP自身の細胞内動態を安定的に解析することが可能となった。

【まとめ】

以上のように、内耳有毛細胞において不動毛の根を形成に重要な役割を果たしているTRIOBP分子に焦点を当てた、アクチンの構造制御による感音難聴治療法の開発を進めている。これまでにTRIOBPのアクチン制御機構の一端と、器官培養を用いた評価実験のシステムの基礎が構築できた。これにより、今後、治療・創薬へと繋がるであろう、根を強化する化学物質のスクリーニングやTRIOBPを始めとするアクチン制御分子の不動毛保護効果を、この実験系を用いて検証することが可能となった。次いで、そこで得られた知見を元に、根を強化するコンパウンドの投与やTRIOBP等遺伝子導入モデル動物での音響外傷・内耳毒性薬物投与・加齢を行い、聴性脳幹反応による聴力機能評価と内耳形態評価により*vivo*での治療効果を検証する。不動毛変性は遺伝性難聴家系から発見されたものであるが、生理的なものであり、本研究で得られる知見は遺伝性難聴にかぎらず感音難聴に広く応用できると考えられる。