

S2-03

内耳有毛細胞における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の役割

上山 健彦, 齋藤 尚亮

神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬理分野

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、アクチン細胞骨格の制御、細胞接着、細胞極性決定など様々な機能に関わる。これらの知見の多くは、細胞レベルでの結果に基づいている為、同一分子やサブタイプが相反して機能するとの矛盾する報告もあり、生体内における真の機能については未だ不明な点が多い。この問題を克服し、Rho ファミリー蛋白の生体内における真の機能の解明する為、我々は内耳有毛細胞特異的ノックアウト (KO) マウスを作製し、細胞内の局在、機能部位、シグナリング経路に着目して、難聴発症機序の解明を行っている。

我々が作製した内耳有毛細胞特異的 Cdc42-KO マウスは、正常聴覚獲得後に蝸牛有毛細胞の進行性脱落により高度難聴を呈したが、Rac1-KO マウスは表現型を呈さなかった。電子顕微鏡解析では、Cdc42-KO マウスは内耳有毛細胞優位な進行性の聴毛 (不動毛) 欠落・癒合および頂側細胞間接着 (AJC) の軽度障害を示した。初代蝸牛器官培養内に発現させたアデノウイルス GFP-Cdc42 は、聴毛を覆う形質膜と頂側に近い側壁に局在した。Cdc42-FRET biosensor TG mice 由来蝸牛有毛細胞の二光子蛍光顕微鏡下観察では、Cdc42 は、聴毛膜の先端部で強い、頂側に近い側壁で弱い活性化を示した。微絨毛を有する MDCK 細胞を内耳有毛細胞のモデル細胞として用いると、1) マトリゲルを用いた 3 次元培養では、GFP-Cdc42 は管腔に面する頂側面と頂側に近い側壁に局在し、2) Cdc42 ノックダウン (KD) 細胞のインサート膜上培養では、微絨毛の減少・癒合と AJC の障害が認められた。細胞内シグナルに関しては、Cdc42-KD 細胞では、Cofilin のリン酸化亢進に代表されるアクチン代謝障害が観察され、蝸牛有毛細胞でもアクチン脱重合障害が確認された。

以上より、Cdc42-KO マウスは、蝸牛有毛細胞内の聴毛及び AJC でのアクチン代謝の維持障害により、正常発達後に進行性難聴を呈することを明らかにした。

S2-04

聴覚上皮における市松模様の細胞配列を形成する分子機構

富樫 英

神戸大学大学院医学研究科

聴覚に重要な内耳蝸牛管の聴覚上皮では、音の振動を伝達するための不動毛を持つ有毛感覚細胞が支持細胞によって隔てられて 2 種類の細胞が互い違いに並ぶ市松模様の細胞配列を示す。このような細胞配列がどのように形成されるかは未解明であったが、近年、私達はこの市松模様の細胞配列の形成が細胞接着分子ネクチンによって制御されることを見出した。ネクチンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通型のカルシウム非依存的な細胞接着分子で、4 つのメンバーでファミリーを形成している。上皮細胞において、ネクチンはカドヘリンとともに細胞間接着の形成に働き、サブタイプ間でホモフィリックにもヘテロフィリックにも結合できるが、ヘテロフィリック結合がホモフィリック結合より強い。ネクチン-1 とネクチン-3 をそれぞれ発現する 2 種類の細胞を混合培養すると、これらの細胞がヘテロフィリックな相互作用によってモザイク様に並ぶことがわかった。マウス聴覚上皮では、感覚細胞と支持細胞においてそれぞれネクチン-1 とネクチン-3 が相補的に発現しており、ネクチン-1 とネクチン-3 は感覚細胞と支持細胞の細胞境界に強い局在を示した。これらのネクチン遺伝子をノックアウト (KO) したマウスでは、内耳蝸牛管の大まかな形態などに異常は見られず、また、聴覚上皮の感覚細胞と支持細胞の数には変化が見られなかった。しかし、聴覚上皮の細胞配列に着目すると、これらの KO マウスでは感覚細胞どうしが接する例が高い頻度で観察され、正常な市松模様の細胞配列が形成されなかった。この結果は、聴覚上皮の感覚細胞と支持細胞でそれぞれ発現しているネクチン-1 と-3 によるヘテロフィリックな相互作用が、聴覚上皮の市松模様の細胞配列の形成に重要であることを示している。