慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	転写因子AP-1構成タンパクの内耳支持細胞における発現誘導と感音難聴に対する防御的役割
Sub Title	
Author	志津木, 健(Shizuki, Ken)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.47-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0047

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

転写因子AP-1構成タンパクの内耳支持細胞における発現誘導と感音難聴に対する防御的役割

志　津　木　　健

内容の要旨

感音難聴の代表的モデルである音響外傷では、蝸牛内の血管条でreactive oxygen species（ROS）の産生が確認されている。このROSは有毛細胞を傷害する主要な原因ではないかと疑われている。ROSのような酸化的ストレスで誘導される転写因子のひとつActivator protein-1（AP-1）は、音響外傷の場合にも蝸牛内で誘導され、その一部はc-Fosによることが、既に明らかになっている。本研究では、AP-1が転写制御を介して防御的機能と関連する可能性を考察することを目的とした。そのために、有毛細胞にアポトーシスを生じない可逆的閾値変動temporary threshold shift（TTS）をきたす音響外傷をモルモットに加え、AP-1構成タンパクのコルチ器における発現を検討した。聴覚閾値変動をABRにて確認し、TTSモデル動物を作成。その音響負荷後に蝸牛コルチ器を採取して、AP-1構成タンパクに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析と、surface preparation法による蝸牛回転別免疫組織染色を行い、発現の有無と局在を確認した。その結果、少なくともc-Fos，Fra-2，c-Junの発現を、ヘンゼン細胞、クラウディウス細胞、ダイテルス細胞などの支持細胞群の核内に確認した。発現は、蝸牛基底回転から第２回転に認められ、音響負荷の直接的影響を受ける特徴周波数領域よりも広範に生じていた。また、音響負荷後１時間という早期に広範な発現が確認された。より長い５時間音響負荷では、外有毛細胞直下のダイテルス細胞にも発現が確認された。これら支持細胞は、音響外傷によって有毛細胞のようには障害されない上、TTSは有毛細胞にもアポトーシスを生じない。したがって、AP-1の役割は防御的なものであると推測した。ダイテルス細胞は、クラウディウス細胞やヘンゼン細胞に比べると、血管条からの距離が遠いので、より大量のROS産生下や、外有毛細胞に強い負荷が加わった場合にAP-1が誘導されるのだろう。支持細胞が細胞内ROSレベルを低減する能力を持つ可能性が報告されているので、支持細胞には、音響負荷などの酸化ストレス下で、AP-1による転写制御を介してROSスカベンジャーを誘導する機構があるかもしれない。c-Fos，Fra-2，c-Junの発現が急速かつ広範であったことは、支持細胞の持つシグナル伝達の入力系の鋭敏さを示し、期待される蝸牛防御機能の迅速性も予想された。感音難聴を予防するために有毛細胞障害を防ぐべきであることは言うまでもないが、支持細胞機能を維持または賦活化する戦略も、臨床上有用であると予想される。

論文審査の要旨

感音難聴のモデルである音響外傷では、不可逆的音響外傷（permanent threshold shift：PTS）のコルチ器で転写因子Activator protein-1（AP-1）が誘導される。しかし、このAP-1の誘導が細胞障害のためなのか、細胞防御のためなのかが不明であった。本研究では可逆的音響外傷（temporary threshold shift：TTS）モデルを用いて、AP-1構成タンパクであるc-Fos，Fra-2がコルチ器で音響負荷後に発現増強することがウエスタンブロットにより示された。また、免疫組織染色により、c-Fos，Fra-2，c-Junが、音響負荷後のヘンゼン細胞、クラウディウス細胞、ダイテルス細胞などの支持細胞の核に発現することが確認された。TTSでは支持細胞は障害を受けず、有毛細胞障害も限定的で細胞死は生じないことを考慮すると、AP-1は防御的に機能していることが示唆された。また、音響外傷では血管条でROS（reactive oxygen species）が発生するため、これがAP-1を誘導する可能性が考えられ、支持細胞におけるAP-1の役割もROSに対する抗酸化能の誘導が考えられた。また、支持細胞における抗酸化能は、ギャップジャンクション機能を維持し、カリウムを有毛細胞から支持細胞経由で血管条へとリサイクルするのに役立っていると考察した。

審査では、まず、ウエスタンブロットで発現量を比較するために、定量的検討が必要であるとの指摘があった。つぎにc-Fosなどのタンパクが AP-1として機能していると言えるかと質問され、先に行なわれたPTSにおけるスーパーシフトアッセイでc-Fosが構成タンパクとして関与することが示されており、今回の実験でもAP-1として機能していると考えていると回答した。さらに、AP-1が細胞防御に関与していると結論するためには、今後、AP-1のカスケードを阻害、またはAP-1をノックアウトする実験が必要であると回答した。ROSがAP-1を誘導する機序として、チオレドキシンとRef-1によるAP-1発現調節がレドックス調節を受けていること、チオレドキシンは酸化型になるとカスケードのリン酸化が促進される例があること、酸化ストレスで核内異動をきたす例があることを述べ、ROSによるAP-1誘導証明のためには、グルタチオンなどROSスカベンジャーによるAP-1発現抑制を確認することが必要であると回答した。有毛細胞でのAP-1発現の可能性に関する質問に対して、PTSでは負荷直後だけではなく負荷後約15時間にも発現のピークがあり、このときは有毛細胞にもAP-1が発現していることから、有毛細胞障害との関連が疑われると回答した。さらに、ROSによるギャップジャンクションの障害機序についての質問に対して、ROSが細胞内Ca^{2+}の上昇を招くと、Ca^{2+}がギャップジャンクションに結合し、コンダクタンスが低下すると回答した。

以上のように、本研究はなお検討されるべき課題を残しているものの、音響外傷におけるコルチ器内AP-1構成タンパクの発現を明らかにし、支持細胞に蝸牛防御機能が存在する可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者　主査　耳鼻咽喉科学　小川　郁
解剖学　仲嶋　一範　　外科学　河瀬　　斌
生理学　岡野　栄之
学力確認担当者：北島　政樹、仲嶋　一範
審査委員長：仲嶋　一範

試問日：平成16年３月30日