

医療・健康

遺伝性難聴の原因メカニズムを解明

～ギャップ結合複合体の劇的崩壊による難聴発症様式を発見～

【本研究成果のポイント】

- ・遺伝性難聴で最大の原因であるコネキシン26変異は内耳のギャップ結合複合体を劇的に崩壊、減少させる
- ・コネキシン26は内耳ギャップ結合を集積・安定化させるために必須
- ・患者の異常ギャップ結合は培養細胞でも再現でき、薬剤スクリーニングが可能になる

概要：

順天堂大学医学部耳鼻咽喉科学講座(主任教授・池田勝久)の神谷和作講師ら研究チームは、遺伝性難聴の最大の原因であるGJB2(コネキシン26遺伝子)変異による難聴の原因メカニズムを明らかにしました。これは理化学研究所バイオリソースセンター、がん研究所、ペンシルバニア大学、との共同研究による成果です。今回、研究チームは、重度の感音性難聴を示す遺伝性難聴のモデルとなるコネキシン26遺伝子改変マウスを開発し、内耳の細胞間のイオン輸送を担うギャップ結合プラークと呼ばれるタンパク質複合体の役割を調べました。これらのマウスでは、コネキシン26遺伝子の変異によりギャップ結合の集合体が分断され、機能を補完するはずの他のコネキシンの量も33%程度にまで減少していました。これにより内耳のイオン輸送ができなくなり、音の振動を神経の電気信号に変換する内耳リンパ液の組成が異常になるために聴力が低下すると考えられます。従来、内耳には同じ機能を持つ他のコネキシンも豊富に存在するため、なぜコネキシン26だけの変異で重度の難聴になるかはわかっていませんでした。しかし今回の研究成果により、通常はギャップ結合プラークを集積・安定化させているコネキシン26の異常や欠損が、ギャップ結合の複合体全体を崩壊させるという新たな様式がわかりました。現在のところ、この遺伝性難聴に対する根本的な治療法は存在しません。しかし今回、患者が持つ遺伝子変異による異常ギャップ結合がヒト培養細胞においても容易に再現して健常者のものと比較できることがわかりました。これを新薬の有効性判定に活用すれば、今まで判定基準のなかった薬剤スクリーニングが可能になると考えられます。この結果は、内耳におけるギャップ結合の機能を回復させる難聴の新しい治療方針と創薬研究に役立ちます。さらに、コネキシン遺伝子の変異に起因する他の難治性疾患、例えば、心疾患、眼疾患、皮膚疾患への原因の解明と治療への応用も期待できます。なお、本研究は3月4日付で科学雑誌 *Journal of Clinical Investigation* に発表されました。

背景:

聴覚障害は出生児1000人に1人の割合で発症し、先天性疾患の中で最も高頻度に発生する疾患の一つです。その半数以上は遺伝子変異を原因とする遺伝性難聴です。更にその50%以上もの割合を占めているのがGJB2変異遺伝性難聴(コネキシン26遺伝子変異型難聴)であり、難病に指定されている感音性難聴で、言語発達や教育にも大きな支障をきたします。現時点では本疾患に対する根本的な治療法や治療薬は存在しません。コネキシン26は、内耳の細胞間のイオン輸送を行うギャップ結合の構成要素の一つであり、内耳リンパ液のイオン組成を保つことにより音の振動を神経活動へ変換することを可能とする重要な分子です(図1)。しかし内耳には同等のイオン輸送機能を持つ他のコネキシン分子も豊富に存在するため、コネキシン26だけ働きが低下しても、そのイオン輸送機能はある程度補完されることが予想されます。にもかかわらず、なぜコネキシン26の変異を持つ遺伝性難聴患者が重篤な聴覚障害を示すのか、その原因は不明でした。

内容:

今回、神谷講師らの研究チームは、コネキシン26変異がどのように難聴の原因となっているのかを調べるため、内耳においてコネキシン26遺伝子が部分的に欠損する新しい疾患モデルマウスを作成しました。コネキシン26変異を持つ患者は劣性遺伝型と優性遺伝型という異なる二種類の遺伝形式により発症し、類似した症状を示します。この点に注目し二つの遺伝形式を持つコネキシン26遺伝子改変マウスにおける共通点を詳しく調べました。その結果、二種類の難聴モデルマウスでは共に内耳の細胞から細胞へイオンを輸送するギャップ結合プラークと呼ばれるタンパク質の複合体が劇的に分断され(図2)、大きさが27%程度にまで縮小し、それに伴い他のコネキシンの量も33%程度にまで減少することを発見しました。これにより内耳のイオン輸送ができなくなり、音の振動を神経の電気信号に変換するための内耳リンパ液の組成が異常になるために難聴になると考えられます(図3)。この現象は胎生期から始まり、内耳のギャップ結合プラークの正常構造はコネキシン26の発現に完全に依存して維持されていることが証明されました(図4)。つまりギャップ結合プラークの集積・安定化には正常なコネキシン26が必須であり、変異または欠損があると、このタンパク質複合体は劇的に分断されてしまい、他のコネキシンと共に減少していくことが明らかになりました。

そこで、さらに詳しく調べたところ、コネキシン26の変異により分断されたギャップ結合プラークの周囲では、「カベオリン1」および「カベオリン2」という分子の量が増加し、これらが行うエンドサイトーシスと呼ばれる細胞膜の取り込みが過剰になることがギャップ結合崩壊の原因である可能性が示唆されました(図5)。

加えて、研究チームは患者と健常者のコネキシン26および他のコネキシンを同時にヒト培養細胞にて発現させ、ギャップ結合プラークの形状と物質輸送能の変化を解析しました。患者が持つ変異型コネキシン26やコネキシン26が欠損した状態のギャップ結合プラークは、やはり断片化されており、それに伴い物質輸送能も大きく低下していました(図6)。

これまでコネキシン26変異型遺伝性難聴は、コネキシン26単独でのイオン輸送能の低下が原因であると考えられてきましたが、本研究によりコネキシン26がギャップ結合全体のタンパク質複合体を安定化させる役割を持ち、その働きが異常になった際に起こるギャップ結合複合体の崩壊によって内耳のイオン輸送能が低下することが、GJB2変異型遺伝性難聴の大きな原因になっていることが初めて明らかとなりました。

今後の展開:

現在のところ、この遺伝性難聴に対しては人工内耳や補聴器の適用があるものの、根本的な治療法、治療薬は存在しません。現在研究チームでは、今回開発されたコネキシン26遺伝子欠損マウスを用いて、iPS由来細胞とコネキシン26の遺伝子治療を組み合わせた難聴治療実験を試行し、すでに有効な成果が得られています。さらに、今回発見された患者の変異コネキシン26によるギャップ結合プラークの劇的崩壊現象は、培養細胞によっても容易に再現可能なため、この現象を有効性判定に利用すれば判定基準のなかった薬剤スクリーニングが可能になります。これらはコネキシン遺伝子の変異に起因する多くの遺伝性・難治性疾患(心疾患:心臓伝導障害、眼疾患:白内障、皮膚疾患:掌蹠角化症、等)の病態メカニズム解明や創薬スクリーニングの指標としても大いに活用できると考えられます。

内耳・蝸牛の構造とギャップ結合 ～ギャップ結合によるイオン輸送が音を聴くための内耳リンパ液をつくる～

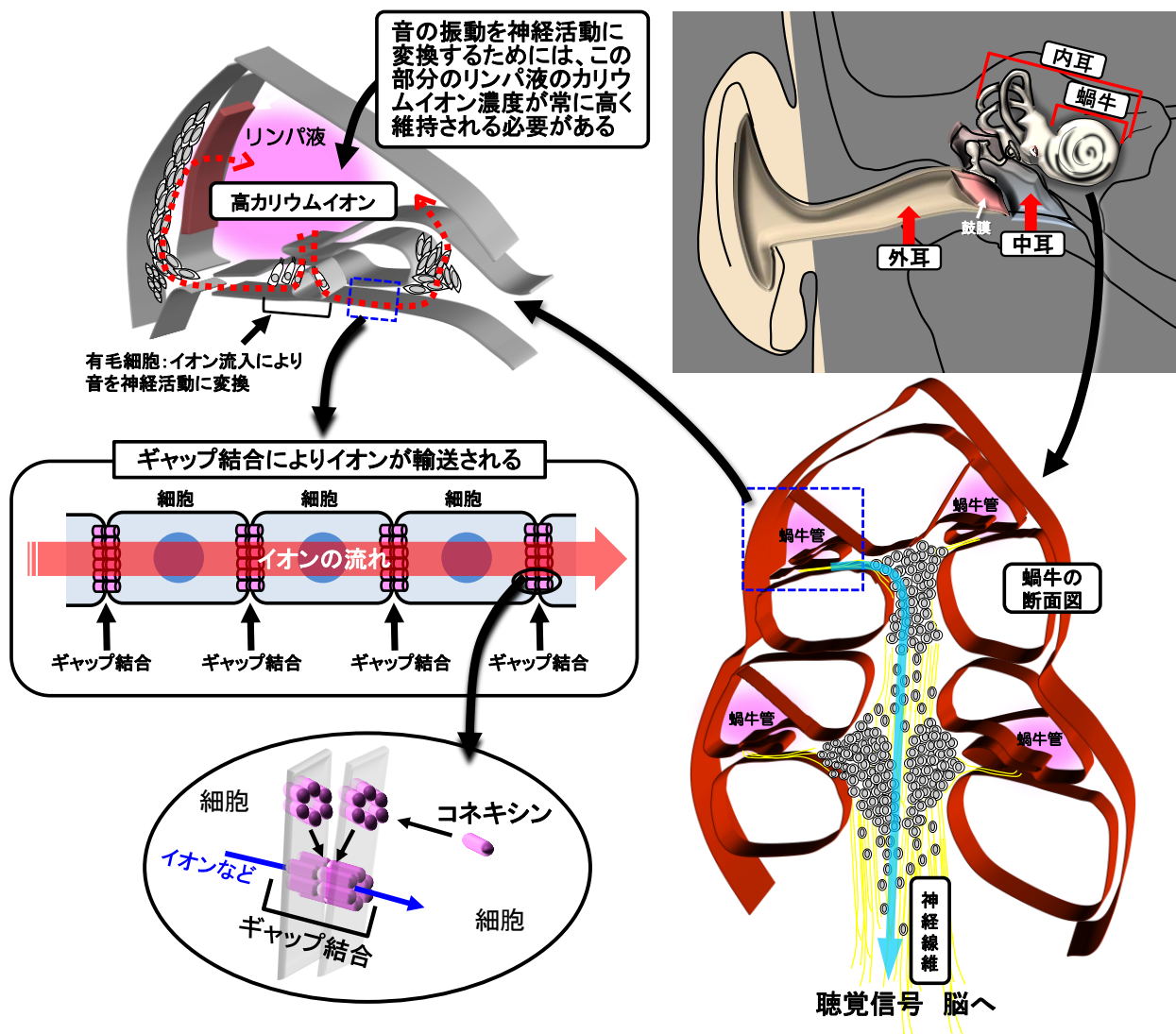


図1. 内耳・蝸牛の構造。(右上)内耳・蝸牛の位置。(右下)蝸牛の断面図。蝸牛管と呼ばれる空間は高いカリウムイオン濃度のリンパ液で満たされている。(左上)蝸牛管の拡大図。音の振動を受けた有毛細胞では、リンパ液中の高濃度のカリウムイオンが細胞内に一気に流入することで、振動を電気信号に変換し神経活動を生み出している。(左中央)このカリウムイオンはギャップ結合により細胞間で輸送され、再びリンパ液に戻されることにより、常に高いカリウムイオン濃度を維持している。つまりイオン輸送ができなければ、このリンパ液のカリウムイオン濃度が下がり、振動によるイオンの流入が起こらないために、音から神経活動への変換ができずに聴覚障害の状態となる。(左下)コネクシンは細胞膜で6個の集合体を形成し、これが隣合う細胞の集合体と連結することにより、中央に分子の通路を持つギャップ結合を形成する。コネクシン26、コネクシン30は内耳ギャップ結合の主な構成要素。ギャップ結合の集合体をギャップ結合プラークと呼ぶ。

コネキシン26変異難聴マウスの内耳では ギャップ結合プラークが劇的に崩壊する

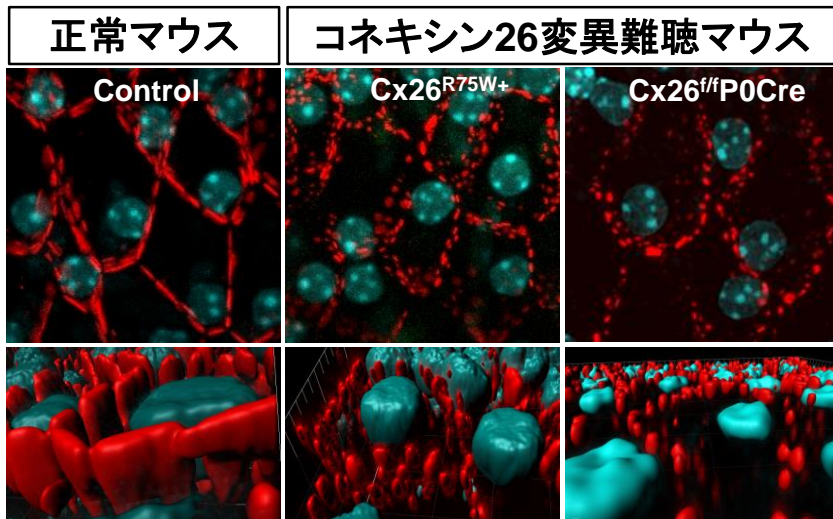


図2. 正常マウス（左）の内耳では、大きな平板構造のギャップ結合プラーク（赤）が作られるが、2種類のコネキシン26変異難聴マウス（中央、右）は、ギャップ結合プラークが劇的に崩壊している。下段はグラフィック化した三次元画像。

ギャップ結合プラークの崩壊がイオン 輸送能を低下させ難聴を引き起こす

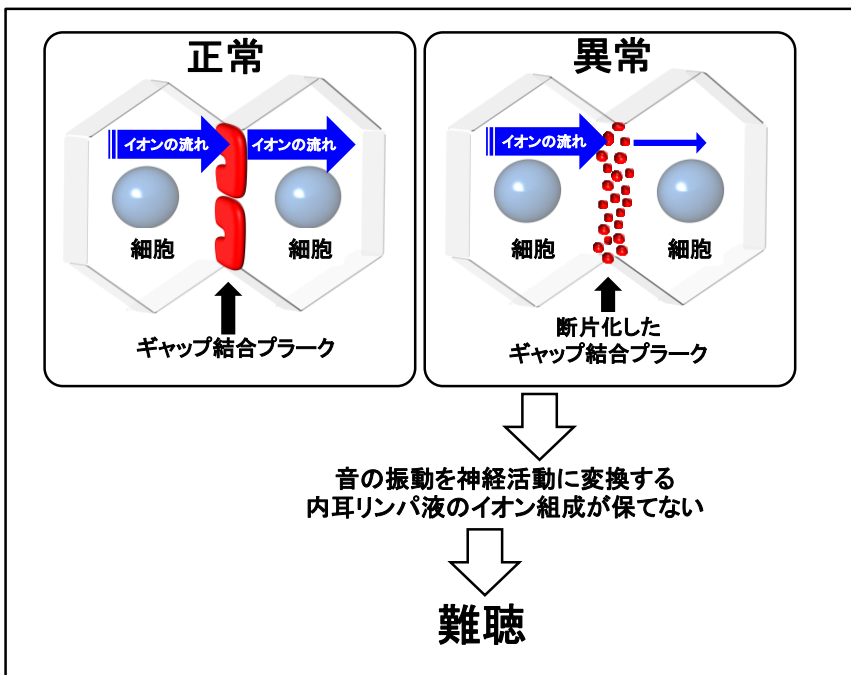


図3. コネキシン26の変異または欠損があると、内耳の細胞間でイオン輸送をするギャップ結合プラークが崩壊、減少し、内耳リンパ液の組成が保てず、難聴になる。

コネキシン26はギャップ結合 プラークの集積に必要

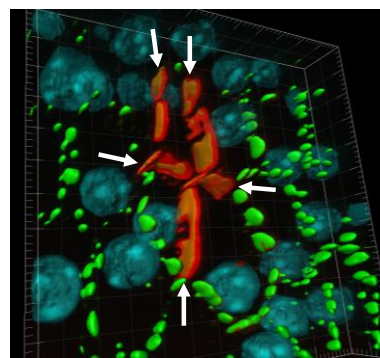


図4. 内耳の細胞間で作られるギャップ結合の三次元画像。内耳ではコネキシン26（赤）を持つと正常な大きさのギャップ結合を作る。他の種類のコネキシン30（緑）のみだと構造が崩壊する。このことはコネキシン26の部分的欠損マウスを用いることにより初めて証明された。

断片化したギャップ結合プラークの周囲に見られるエンドサイトーシス

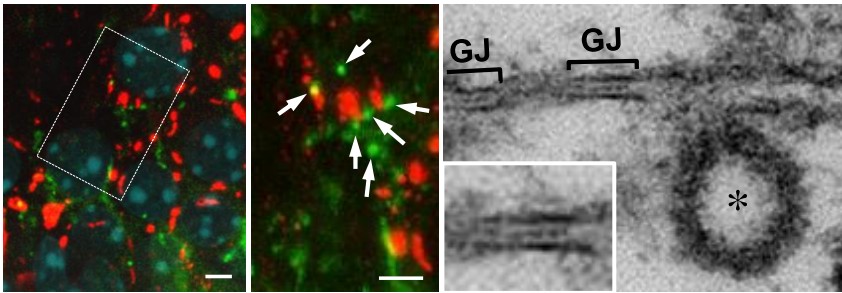
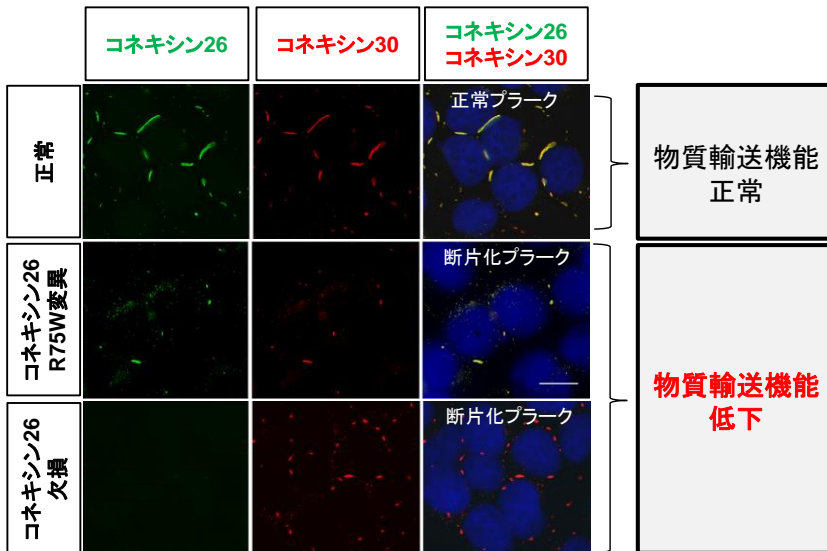


図5. (左、中央) コネキシン26変異マウスでは一部の断片化したギャップ結合(赤)の周囲にカベオリン分子(緑、矢印)が集積する(中央は左の拡大像)。(右)細胞膜の電子顕微鏡像。短く断片化したギャップ結合(GJ)の近傍にカベオリンが行うと思われるエンドサイトーシス(*)と呼ばれる細胞膜の取り込み現象が過剰になっていた。

ヒト細胞と患者・健常者の遺伝子を組み合わせ内耳の病態を再現



* 緑:コネキシン26、赤:コネキシン30、青:細胞核

図6. ヒト培養細胞に健常者の正常コネキシン26遺伝子および難聴者の変異遺伝子を内耳に存在する他のコネキシン(コネキシン30)と共に導入することにより、内耳での病態を再現することが可能となった。ヒト遺伝性難聴で検出されているコネキシン26・R75W変異およびコネキシン26欠損状態においては、難聴モデルマウスと同様、ギャップ結合プラークが断片化していた。それに伴い物質輸送能も大きく低下した。

【用語の補足説明】

先天性難聴・遺伝性難聴

先天性難聴は世界中で出生児1000人に1人の割合で発症し、最も多い先天性障害である。その半数以上は遺伝子に原因を持つ遺伝性難聴とされている。遺伝性難聴は難聴以外の症状を伴う症候群性と難聴を主症状とする非症候群性に分類される。

コネキシン26・GJB2変異遺伝性難聴(コネキシン26遺伝子変異型難聴)

コネキシン26は遺伝子GJB2(GAP JUNCTION PROTEIN, BETA-2)により合成され、内耳のギャップ結合を構成する主要タンパク質の一つ。世界で最も高頻度に検出される遺伝性難聴の原因因子。GJB2変異遺伝性難聴(コネキシン26遺伝子変異型難聴)は、我が国では遺伝性難聴の50%以上もの割合を占めるとされており、常染色体劣性と常染色体優性の遺伝形式を持つ感音性難聴。まれに皮膚疾患を伴うものもあるが、主には非症候群性。

コネキシン・ギャップ結合 (図1、左下)

コネキシンは細胞膜で6個の集合体により分子の通り道を作り、隣の細胞の集合体と連結してギャップ結合を作る。このギャップ結合は分子量約1000以下の低分子やイオンを濃度勾配によって透過させ、細胞間の物質輸送を可能とする。コネキシンは心筋、眼の水晶体、皮膚など、体の様々な場所に存在してギャップ結合を形成している。心筋のギャップ結合は細胞同士を電気的に結合させ、同期的な興奮伝達を行っている。体の様々なコネキシン遺伝子の変異により、多くの難治性疾患が引き起こされる。

ギャップ結合プラーク

ギャップ結合は細胞膜上で集積し、ギャップ結合プラークと呼ばれる巨大なタンパク質複合体を作り安定化している。

掲載誌:「*Journal of Clinical Investigation*」2014年3月3日オンライン版 (<http://www.jci.org/>)
Volume 214. Number 4 2014 DOI: 10.1172/JCI67621

英文タイトル: **Assembly of gap junction macromolecular complex in cochlea requires**

Connexin26, Kazusaku Kamiya, Sabrina W. Yum, Nagomi Kurebayashi, Miho Muraki, Kana Ogawa, Keiko Karasawa, Asuka Miwa, Xueshui Guo, Satoru Gotoh, Yoshinobu Sugitani, Hitomi Yamanaka, Shioko Ito-Kawashima, Takashi Iizuka, Takashi Sakurai, Tetsuo Noda, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda

なお、この研究は厚生労働科学研究・障害者対策総合研究事業、文部科学省科学研究費 基盤(B)、基盤研究(C)、若手研究(B)、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業、テルモ科学技術振興財団などの研究助成により行われました。



研究内容に関するお問い合わせ先

順天堂大学医学部・耳鼻咽喉科学講座

講師 神谷 和作

TEL:03-5802-1229 FAX:03-5840-7103

E-mail: kkamiya@juntendo.ac.jp

<http://www.juntendojibi.com/>

取材に関するお問い合わせ先

順天堂大学 総務局総務部文書・広報課
担当: 植村

TEL:03-5802-1006 FAX:03-3814-9100

E-mail: pr@juntendo.ac.jp

<http://www.juntendo.ac.jp/>