

論文審査の結果の要旨

氏名 本田 智子

本論文は1章からなり、Cochlinの新規リガンドの探索、難聴患者に見られる変異により結合が低下すること、難聴重症度とリガンド結合能との相関等について述べられ、新たな視点から病態を説明した論文である。

Cochlinは常染色体優性遺伝性難聴疾患 DFNA9の原因遺伝子 *COCH*のコードするタンパク質であり、内耳の蝸牛や三半規管に高発現している。*N*末端から LCCL、vWA1、vWA2のドメインから構成される分泌タンパク質である。*COCH*遺伝子上に変異が生ずると、20から40代で進行性の難聴障害と平衡感覚障害を呈する。現在までに DFNA9患者では *COCH*遺伝子上に約20種類の変異が報告されており、その変異は LCCLドメインに集中している。しかし、健常人と DFNA9患者では Cochlinの分布や発現量に差は見られず、DFNA9発症メカニズム、優性遺伝形式をとることや遅発性である理由は不明である。

本田は、Cochlinが何らかの細胞外マトリクス成分と相互作用するという仮説を立てリガンドの探索を行った。Cochlinを細胞表面に発現させたレポーター細胞を作成し、細胞外マトリクスを構成するさまざまな分子と結合を調べたところ、ヒト Cochlinはグリコサミノグリカン (GAG)の一つである chondroitin sulfate (CS)-E やヘパリン (Hep)と強く結合した。また、さまざまな脱硫酸化ヘパリンとの結合を調べ、*N*硫酸化が両者の結合に必須であることがわかった。次に DFNA9患者にみられる変異を導入した8種類の Cochlin変異体レポーター細胞を作成し糖結合性を調べたところ、いずれの Cochlin変異体でも wild-type (WT)と比較して GAGに対する結合性が低下していた。しかも、その結合性の低下と難聴発症時期には正の相関が見られ、病態との関連が認められた。これらの変異はいずれも LCCLドメインに集中していることから、Cochlinの LCCLドメインを介して GAGに結合することが示唆された。ヒト Cochlinと同様にマウス Cochlinレポーター細胞を作成し、レポーターアッセイにより GAGとの結合性を調べた。その結果、マウス Cochlinも CS-E、Hep、2-*O*-desulfated Hep、6-*O*-desulfated Hepと結合し、ヒト Cochlin

の結果と類似の傾向を示した。

次にマウスの組織を用いて組織レベルでの解析を行った。マウス内耳から GAG 画分を調製し、その中に Hep や CS-E などがどの程度含まれているかについて検討した。抽出した GAG を heparinase I, II, III により二糖に消化し、ゲルろ過及びイオン交換 HPLC を組み合わせて内耳由来ヘパラン硫酸 (HS)/Hep の二糖組成を定量した。その結果、内耳の HS/Hep は二硫酸化構造が主要な成分であった。また、GAG 画分を chondroitinase ABC で消化して同様の解析を行ったところ、6-*O*-desulfated の構造が多くを占めていた。これらの結果は、内耳組織に存在する GAG に十分に Cochlin が結合できることを示唆していた。次に、マウス Cochlin-Fc 融合タンパク質を作成し、組織化学的解析を行った。作成したマウス Cochlin-Fc 融合タンパク質の GAG 鎖との結合性は、ELISA による解析から、レポーターアッセイと同様の結果が得られた。そこで、マウス内耳組織の連続切片を調製し、Cochlin-Fc 融合タンパク質、抗 Cochlin 抗体等を用いて染色を試みた。その結果、両者は内耳に広く分布していること、またその染色部位が重なっており、Cochlin とそのリガンドが共局在していることが示唆された。

従来の研究では Cochlin そのものの性質や発現量に着目して DFNA9 発症メカニズムを解明しようと試みられていた。一方、今回の研究では、Cochlin のリガンド (GAG) という新たな分子を見出し、それとの相互作用という切り口から DFNA9 の発症のメカニズムや重症度を理解できるようになった点で新しい視点を開いた。GAG は年齢とともにその硫酸化が低下し、さらに発現量が減少することがよく知られている。この知見を考え合わせると、年齢とともに内耳中の GAG 量が減少することにより、もともと GAG に対する結合性の低い患者 Cochlin が相互作用できなくなり、シグナルが閾値以下になることで健常人よりも早期に難聴を発症することを強く示唆した論文である。

本論文の内容は論文提出者が全てに渡って主体となって解析及び考察を行ったものであり、論文提出者の寄与は十分に満たされていると判断できる。

従って、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上、1,976 字