

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10743

研究課題名(和文) 内耳におけるミトコンドリア機能の定量的評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of quantitative methods to evaluate mitochondrial function in the inner ear

研究代表者

藤本 千里 (Fujimoto, Chisato)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：60581882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：内耳由来細胞株HEI-OC1および蝸牛器官培養系有毛細胞を用いて、蛍光色素JC-1によるミトコンドリア膜電位の定量評価系を確立した。また、細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸機能の測定系を確立した。H2O2処理したHEI-OC1細胞により作製した内耳細胞老化モデルでは、ミトコンドリアの酸素消費速度の低下を認め、ミトコンドリアの最大呼吸能の低下が示された。また、この内耳細胞老化モデルでは、JC-1の赤色/緑色蛍光強度比の減少を認め、ミトコンドリア膜電位の低下が示された。

研究成果の概要(英文)：We established quantitative method to evaluate mitochondrial membrane potential by using JC-1 fluorescence dye in HEI-OC1 auditory cell line and cochlear explants. We also established quantitative method to evaluate mitochondrial respiratory function by using an extracellular flux analyzer in HEI-OC1 auditory cell line and cochlear explants. We then evaluated mitochondrial function of a senescence model of HEI-OC1 cells induced by H2O2 exposure, by these established quantitative methods. We revealed that relative value of oxygen consumption rate on FCCP injection was dose dependently decreased in the H2O2-exposed cells. This suggests damage of the mitochondrial respiratory capacity in the senescence model. We also revealed that JC-1 red/green ratio was decreased in a dose-dependent manner in the H2O2-exposed cells. This suggests decreased mitochondrial membrane potential in the senescence model.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 ミトコンドリア 加齢 有毛細胞 蝸牛 電子伝達系 ミトコンドリア膜電位 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

内耳は聴覚および前庭平衡覚の受容器である。その感覚細胞である有毛細胞は、様々な特化された微細構造を持ち、音や加速度といった機械的刺激を生体内の電気信号に変換するという非常に巧妙な機能を担うが、細胞分裂せず一度障害を受けると機能的再生が困難である。内耳障害の原因としては、加齢性、薬剤性、騒音性など様々であるが、その多くは不可逆性の難聴や平衡障害を来し、有効な治療法は存在しない。内耳障害の発症のメカニズムについては諸説あるが、最も重要な要因の一つとしてミトコンドリア機能障害が挙げられる。ミトコンドリア障害説は、ミトコンドリア遺伝子異常に起因する疾患の多くが難聴を合併する臨床的背景や、ミトコンドリア遺伝子変異が蓄積する遺伝子改変マウスにおいて、早期に聴覚閾値が上昇する (Kujoth GC et al., Science, 2005) などのミトコンドリア障害モデル動物を用いた研究により支持されている。

内耳障害においてミトコンドリア障害がもたらされる機序としては、活性酸素種の産生による障害や抗酸化防御機能の低下による酸化ストレスの蓄積、ミトコンドリア DNA 変異、ミトコンドリアターンオーバー機構の破綻などの要因が考えられているが (Fujimoto C et al., Oxid Med Cell Longev, 2014)、解明されていない部分は多い。また、ミトコンドリア機能解析は、がん、循環器疾患、代謝疾患、神経変性疾患などの研究分野において行われているが、内耳障害とミトコンドリア障害との関連性はこれまで示唆されているにも関わらず、内耳におけるミトコンドリア機能をリアルタイムで定量的に評価する系は、世界的に十分に確立されていない。聴覚系の機能低下や組織学的変化とミトコンドリア機能低下との関連性についても、依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、内耳疾患におけるミトコンドリア機能の関与を明らかにするため、まず、内耳ミトコンドリア機能のリアルタイム定量評価法を確立することを目的とした。さらに、内耳障害モデルにおいて、確立した評価法を用いてミトコンドリア機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生後 2~5 日の蝸牛器官培養および不死化内耳培養細胞 HEI-OC1 に、ATP 阻害剤 (オリゴマイシン)、脱共役剤 (FCCP、カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン)、ミトコンドリア複合体 III 阻害剤 (アンチマイシン A)、ミトコンドリア複合体 I 阻害剤 (ロテノン) を投与し、酸素消費速度を細胞外フラックスアナライザー XF24 (Seahorse Bioscience) を用いて計測した。

基礎呼吸、ATP 代謝回転、最大呼吸 (予備呼吸能) の指標にてミトコンドリア機能の評価を行った。

(2) 内耳におけるミトコンドリア膜電位を測定する実験系を確立するため、蝸牛器官培養および HEI-OC1 に FCCP を添加し、有毛細胞における蛍光色素 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) の赤色/緑色蛍光強度比の減少を、共焦点レーザー顕微鏡 (ニコン) にてタイムラプス測定した。

(3) Tsuchihashi らの報告を参考に、HEI-OC1 を H₂O₂ にて短時間処理し、細胞増殖率低下と細胞生存率不変の条件から内耳細胞老化モデルを作製した (Tsuchihashi NA et al., Oncotarget, 2015)。ミトコンドリア呼吸機能測定系およびミトコンドリア膜電位測定を用いて、内耳細胞老化モデルにおけるミトコンドリア機能を解析した。

4. 研究成果

(1) HEI-OC1 および蝸牛器官培養系有毛細胞ともに、オリゴマイシン添加による酸素消費速度の低下、FCCP 添加による酸素消費速度の上昇、アンチマイシン A・ロテノン添加による酸素消費速度の低下、がそれぞれ確認でき、ミトコンドリア呼吸機能測定系を確立しえた。

(2) FCCP 添加による JC-1 赤色/緑色蛍光強度比の減少を確認し、FCCP によるミトコンドリア膜電位の低下を測定しえた。即ち、ミトコンドリア膜電位の定量評価系を確立しえた。

(3) H₂O₂ 処理した HEI-OC1 細胞により作製した内耳細胞老化モデルでは、FCCP 投与によるミトコンドリアの酸素消費速度の低下を H₂O₂ の濃度依存性に認め、ミトコンドリアの最大呼吸能の低下が示された。また、この内耳細胞老化モデルでは、JC-1 の赤色/緑色蛍光強度比の減少を H₂O₂ の濃度依存性に認め、ミトコンドリア膜電位の低下が示された。

< 引用文献 >

Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. Science. 2005 Jul 15;309(5733):481-4.

Fujimoto C, Yamasoba T. Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:582849.

Tsuchihashi NA, Hayashi K, Dan K, Goto F, Nomura Y, Fujioka M, Kanzaki S, Komune S, Ogawa K. Autophagy through 4EBP1 and AMPK regulates oxidative stress-induced premature senescence in auditory cells. *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):3644-55.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

- [1] Iwasaki S, Fujimoto C, Egami N, Kinoshita M, Togo F, Yamamoto Y, Yamasoba T. Noisy vestibular stimulation increases gait speed in normals and in bilateral vestibulopathy. *Brain Stimul*. Publish on line. 査読有
- [2] Fujimoto C, Suzuki S, Kinoshita M, Egami N, Sugawara K, Iwasaki S. Clinical features of otolith organ-specific vestibular dysfunction. *Clin Neurophysiol*. 2018 Jan;129(1):238-245. 査読有
- [3] Mizushima Y, Fujimoto C, Kashio A, Kondo K, Yamasoba T. Macrophage recruitment, but not interleukin 1 beta activation, enhances noise-induced hearing damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 18;493(2):894-900. 査読有
- [4] Yamamoto M, Ishikawa K, Aoki M, Mizuta K, Ito Y, Asai M, Shojaku H, Yamanaka T, Fujimoto C, Murofushi T, Yoshida T. Japanese standard for clinical stabilometry assessment: Current status and future directions. *Auris Nasus Larynx*. 2018 Apr;45(2):201-206. 査読有
- [5] Kamogashira T, Hayashi K, Fujimoto C, Iwasaki S, Yamasoba T. NPJ Aging Mech Dis. 2017 Jan 25;3:2. Functionally and morphologically damaged mitochondria observed in auditory cells under senescence-inducing stress. 査読有
- [6] Fujimoto C, Iwasaki S, Urata S, Morishita H, Sakamaki Y, Fujioka M, Kondo K, Mizushima N, Yamasoba T. Autophagy is essential for hearing in mice. *Cell Death Dis*. 2017 May 11;8(5):e2780. 査読有
- [7] Nishi T, Kamogashira T, Fujimoto C, Kinoshita M, Egami N, Sugawara K, Yamasoba T, Iwasaki S. Effects of Peripheral Vestibular Dysfunction on Dynamic Postural Stability Measured by the Functional Reach Test and Timed Up and Go Test. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2017 Jun;126(6):438-444. 査読有
- [8] Iwasaki S, Karino S, Kamogashira T, Togo F, Fujimoto C, Yamamoto Y, Yamasoba T. Effect of Noisy Galvanic Vestibular Stimulation on Ocular Vestibular-Evoked Myogenic Potentials to Bone-Conducted Vibration. *Front Neurol*. 2017 Feb 3;8:26. 査読有
- [9] Tuerdi A, Kinoshita M, Kamogashira T, Fujimoto C, Iwasaki S, Shimizu T, Yamasoba T. Manganese superoxide dismutase influences the

- extent of noise-induced hearing loss in mice. *Neurosci Lett*. 2017 Mar 6;642:123-128. 査読有
- [10] Fujimoto C, Yamamoto Y, Kamogashira T, Kinoshita M, Egami N, Uemura Y, Togo F, Yamasoba T, Iwasaki S. Noisy galvanic vestibular stimulation induces a sustained improvement in body balance in elderly adults. *Sci Rep*. 2016 Nov 21;6:37575. 査読有
- [11] Inoue A, Egami N, Fujimoto C, Kinoshita M, Yamasoba T, Iwasaki S. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016 Nov;125(11):931-937. Vestibular Evoked Myogenic Potentials in Vestibular Migraine: Do They Help Differentiating From Menière's Disease? 査読有
- [12] Nishijima H, Kondo K, Toma-Hirano M, Iwasaki S, Kikuta S, Fujimoto C, Ueha R, Kagoya R, Yamasoba T. Denervation of nasal mucosa induced by posterior nasal neurectomy suppresses nasal secretion, not hypersensitivity, in an allergic rhinitis rat model. *Lab Invest*. 2016 Sep;96(9):981-93. 査読有
- [13] Omura G, Ando M, Saito Y, Kobayashi K, Yoshida M, Ebihara Y, Kanaya K, Fujimoto C, Sakamoto T, Kondo K, Asakage T, Yamasoba T. Association of the upregulated expression of focal adhesion kinase with poor prognosis and tumor dissemination in hypopharyngeal cancer. *Head Neck*. 2016 Aug;38(8):1164-9. 査読有
- [14] Saito Y, Ando M, Fujimoto C, Omura G, Kobayashi K, Asakage T, Yamasoba T. Human Papillomavirus 16 Physical Status and the TP53 Codon 72 Polymorphism in Japanese HPV-Positive Oropharyngeal Cancer Patients. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2016;78(1):46-54. 査読有
- [15] Fujimoto C, Kinoshita M, Kamogashira T, Egami N, Sugawara K, Yamasoba T, Iwasaki S. Characteristics of vertigo and the affected vestibular nerve systems in idiopathic bilateral vestibulopathy. *Acta Otolaryngol*. 2016;136(1):43-7. 査読有
- [16] Saito Y, Yoshida M, Omura G, Kobayashi K, Fujimoto C, Ando M, Sakamoto T, Asakage T, Yamasoba T. Prognostic value of p16 expression irrespective of human papillomavirus status in patients with oropharyngeal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2015 Sep;45(9):828-36. 査読有
- [17] Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Biomed Res Int*. 2015;2015:617207. 査読有
- [18] Ando M, Saito Y, Morikawa T, Omura G, Kobayashi K, Akashi K, Yoshida M, Ebihara Y, Fujimoto C, Fukayama M, Yamasoba T, Asakage T. Maxillary carcinosarcoma: Identification of a novel MET mutation in both carcinomatous and sarcomatous components through next generation sequencing. *Head Neck*. 2015 Dec;37(12):E179-85. 査読有
- [19] Iwasaki S, Fujimoto C, Kinoshita M,

Kamogashira T, Egami N, Yamasoba T. Clinical characteristics of patients with abnormal ocular/cervical vestibular evoked myogenic potentials in the presence of normal caloric responses. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2015 Jun;124(6):458-65. 査読有

[20] 藤本千里. VEMP (vestibular evoked myogenic potential) . 耳喉頭頸 . 2017;89:143-148. 査読無

[21] 藤本千里. 頭痛に対する向精神薬の適応と使い方 . MB ENT. 2017;210:86-89. 査読無

[22] 藤本千里. ラバー負荷検査の有用性と今後の展望 . Equilibrium Res. 2016;75(3):142-146. 査読有

[23] 藤本千里. 【めまい-新しい流れとその周辺-】新しい検査・解釈 重心動揺計 . JOHNS. 2016;32:33-35. 査読無

〔学会発表〕(計15件)

[1] Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Naoya Egami, Yoshiharu Yamamoto, Tatsuya Yamasoba. Noisy galvanic vestibular stimulation induces a sustained improvement in body balance in patients with bilateral vestibulopathy. ARO 41st Annual MidWinter Meeting. 2018年

[2] 藤本千里, 岩崎真一, 江上直也, 木下淳, 川原拓也, 上村夕香理, 菅澤恵子, 山岨達也. 経皮的ノイズ前庭電気刺激の長期刺激が両側前庭障害患者の体平衡機能に及ぼす影響 . 第76回日本めまい平衡医学会 . 2017年

[3] Chisato Fujimoto. Autophagy is essential for hearing in mice. IFOS 2017. 2017年

[4] 藤本千里, 岩崎真一, 浦田真次, 藤岡正人, 近藤健二, 山岨達也. オートファジー活性の低下による有毛細胞の変性 . 第17回日本抗加齢医学会 . 2017年

[5] 藤本千里, 岩崎真一, 浦田真次, 藤岡正人, 近藤健二, 山岨達也. 有毛細胞における恒常的オートファジーは聴覚機能に重要である . 第118回日本耳鼻咽喉科学会 . 2017年

[6] 藤本千里, 岩崎真一, 鴨頭輝, 木下淳, 江上直也, 山岨達也. 経皮的ノイズ前庭電気刺激による体平衡機能改善効果 . 第15回姿勢と歩行研究会 . 2017年

[7] 藤本千里, 岩崎真一, 鴨頭輝, 木下淳, 鈴木さやか, 江上直也, 牛尾宗貴, 菅澤恵子, 山岨達也. Video head impulse test における catch-up saccade の性状と温度刺激検査における canal paresis との関連 . 第75回日本めまい平衡医学会 . 2016年

[8] 藤本千里, 岩崎真一, 鴨頭輝, 木下淳, 鈴木さやか, 江上直也, 牛尾宗貴, 山岨達也. 温度刺激検査で一側半規管麻痺を呈した症例における video head impulse test の catch-up saccade について . 第26回日本耳科学会 . 2016年

[9] 藤本千里, 岩崎真一, 鴨頭輝, 木下淳, 江上直也, 山岨達也. 経皮的ノイズ前庭電気刺激が健常者の立位体平衡機能に及ぼす影

響 . 第16回日本抗加齢医学会 . 2016年

[10] Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Teru Kamogashira, Makoto Kinoshita, Naoya Egami, Yukari Uemura, Fumiharu Togo, Yoshiharu Yamamoto and Tatsuya Yamasoba. Effect of noisy galvanic vestibular stimulation on gait performance in patients with bilateral vestibulopathy. 29th Barany Society Meeting. 2016年

[11] 藤本千里, 岩崎真一, 鴨頭輝, 木下淳, 江上直也, 山岨達也. 経皮的ノイズ前庭電気刺激による長期的な静的体平衡機能改善効果 . 第117回日本耳鼻咽喉科学会 . 2016年

[12] Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Teru Kamogashira, Makoto Kinoshita, Naoya Egami, Yukari Uemura, Fumiharu Togo, Yoshiharu Yamamoto, Tatsuya Yamasoba. Noisy galvanic vestibular stimulation provides sustained improvement of body balance. ARO 39th Annual MidWinter Meeting. 2016年

[13] 藤本千里. 重心動揺検査の現状と将来展望 「ラバー負荷検査の有用性と今後の展望」 . 第74回日本めまい平衡医学会 . 2015年

[14] 藤本千里. 内耳有毛細胞におけるオートファジーの役割 . 第9回オートファジー研究会 . 第3回「オートファジー」班会議 . 2015年

[15] 藤本千里, 岩崎真一, 鴨頭輝, 木下淳, 鈴木さやか, 江上直也, 牛尾宗貴, 山岨達也. 温度刺激検査とラバー負荷重心動揺検査を複数回施行した前庭神経炎症例の検討 . 第25回日本耳科学会 . 2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 生物試料の透明化方法
発明者: 山岨達也, 岡部繁男, 浦田真次, 吉川弥生, 松本有, 藤本千里
権利者: 国立大学法人東京大学
種類: 特許
番号: 案件番号 16-0364-001
出願年月日: 2016年9月13日
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 前庭機能評価装置及び非ヒト動物における前庭機能の評価方法
発明者: 岩崎真一, 松本有, 藤本千里, 鴨頭輝
権利者: 岩崎真一, 松本有, 藤本千里, 鴨頭輝
種類: 特許
番号: 6280075
取得年月日: 2018年1月26日

国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

藤本 千里 (FUJIMOTO CHISATO)
東京大学・医学部附属病院・登録診療員
研究者番号：60581882

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

木下 淳 (KINOSHITA MAKOTO)

鴨頭 輝 (KAMOGASHIRA TERU)