様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　8 月 29 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2018
課題番号：１５Ｋ１０７４４

研究課題名（和文）ミトコンドリア・蝸牛神経系の in situ ３次元イメージング

研究課題名（英文）In situ 3D imaging of the inner ear mitochondria and cochlear nerve

研究代表者

吉川　弥生（KIKKAWA, Yayoi）

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：００４５２３５０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：蝸牛などの硬組織を透明化して観察するための新たな方法を開発し、特許を出願した。mThy1-YFP蛍光発色マウスと蝸牛透明化手法を組み合わせることで、蝸牛有毛細胞とらせん神経系の詳細な構造の同時観察が可能であった。
　さらに、マウス蝸牛を体外培養し、グリシンやメトフォルミンなどの薬剤の薬剤性内耳障害に対する保護効果を示した。耳毒性薬剤により障害された内耳組織ではカスパーゼ染色が陽性となり、アポトーシス経路の活性化が起きていること、また蝸牛保護効果はアポトーシス活性化剤（アニソマイシン）により打ち消されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年の研究で、内耳障害のあらゆる面にミトコンドリアー活性酸素系が関わっていることが明らかになってきた。したがって、本研究は感音難聴や耳鳴制圧のための大きなブレークスルーをもたらす可能性がある。具体的には、この3Dライブイメージングシステムにより NMN、Necrostatinなどのミトコンドリア保護剤などの神経保護薬剤の蝸牛保護能の評価が簡便に行えるようになれば、新たな防薬の開発も期待できる。
またこのmt-GFPマウスおよびBrainbowマウスのイメージングは、前庭系、嗅覚系、味覚系など様々な耳鼻咽喉科領域でのミトコンドリア・感覚神経回路の解明の基礎的手法・データとして利用が可能である。

研究成果の概要（英文）：We developed a new analytical pipeline based on optical clearing of tissue, for the construction of a single-cell resolution map of the organ of Corti. Application of this method to samples from young, adult, and noise-exposed mice extracted essential information regarding cellular pathology, including longitudinal and radial spatial characteristics of cell loss, implying that multiple mechanisms underlie clustered cell loss.
Also, we studied protective effects of glycine and metformin against gentamicin induced ototoxicity on cultured cochlear explants. Results provided evidence of anti-apoptotic effect of metformin in parallel with prevention of ROS production and enhancement of cell viability.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳　鼻科学　解剖学　細胞生物学　有毛細胞　難聴　抗加齢医学

１．研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリア活性酸素と難聴

ミトコンドリアは、エネルギー代謝を行う細胞内小器官である。各細胞にミトコンドリアは数百個存在し、筋肉や脳などの代謝の活発な部位では、細胞質の40%を占めることもある（図１）。

多くの内耳組織障害で、酸化ストレスによる細胞障害、細胞死誘導が共通のメカニズムとなっている。われわれはミトコンドリアにおける酸化ストレス障害の増加がアポトーシス促進遺伝子Bakの活性化を誘導して老人性難聴を引き起こすことを明らかにしている（Someya 2009, *PNAS*)。また、ミトコンドリア脳筋症など、ミトコンドリア遺伝子異常に起因する疾患の中には難聴を呈するものが多く（70-80%が進行性の感音難聴を合併)、その他にも、突発性難聴や騒音難聴などミトコンドリア／活性酸素系が関与すると言われる疾患は数多い。

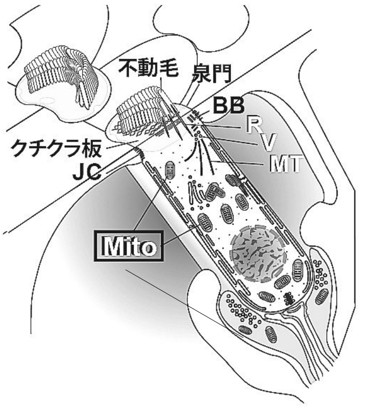


図１　蝸牛有毛細胞・神経終末内のミトコンドリア概念図 (Mito)。Kikkawa 2008 より改変

しかし今まで、蝸牛有毛細胞におけるミトコンドリアの観察手法の開発は不十分であった。ミトコンドリアの形態は卵円形の固定された構造体ではなく、細胞内で位置と形態を劇的に変化させており、同時に分裂・融合・輸送などの動的変化を示す。これまでミトコンドリアの形態学的観察には透過型電子顕微鏡や免疫染色が用いられてきたが、*in vivo* 即ち「生きた」状態でのミトコンドリア挙動解析は不可能であった。

図２　高解像度共焦点顕微鏡にて３次元再構成した外有毛細胞内のミトコンドリア(生後３日)。

(2) 蝸牛神経系の *in situ* イメージング

人工内耳などの聴覚補助デバイスは近年高性能化が進んでいる。この開発に当たっては、２万本あると言われる蝸牛ラセン神経節と感覚上皮有毛細胞の周波数別の詳細な対応地図（Frequency Mapping）が必要であるが、神経細胞１本ずつを染める染色法や画像処理技術の限界のため、特に立体構造の分化度が低い頂回転（低周波数帯）での地図作製は困難であった（Nomura & Kirikae1967, Greenwood 1996, Canlon 2004, Kikkawa 2007 など）。

この分野の画期的なイメージング技術が、2007 年に発表されたBrainbow マウスである。この手法は、３原色蛋白のランダムな発現により脳回路内にある多数の細胞を一度に多色で可視化し、数百ものニューロンをそれぞれ色分けして標識できるもので、神経回路の詳細なマップを作ることが可能である。さらに近年、ハイスループットのビブラトーム付き２光子トモグラフィー（断層撮影法、TissueCyte）を組み合わせることで脳組織全体の連続した接続マトリックスを得ることが可能になった。仮想トラクトグラフィーにより、相互接続した領域間の 3D トポグラフィーが描き出される。

２．研究の目的

(1) ミトコンドリア活性酸素と難聴

われわれは東京都臨床医学総合研究所・設楽浩志博士との共同研究で生体ミトコンドリアを GFP 色素で標識したトランスジェニックマウス (mtGFP-Tg) の解析を開始した (図２)。本マウスの観察では、小脳、心臓、腎臓などで組織毎にミトコンドリアの大きさ・形態に大きな差があることが確認されている。蝸牛有毛細胞は特定の周波数へのチューニング特性を示し、特に外有毛細胞では部位 (周波数) による形態学的な差異が大きい。ミトコンドリア密度にも違いが見られ（Hashimoto 1988)、この分布や形態の動的変化は、有毛細胞自体の生物学的機能と密接に関連していると考えられる。本研究では、レーザー共焦点顕微鏡や 1 秒間に 420 コマの高解像度画像を取得できる Nikon A1R 高速共焦点顕微鏡を利用して蝸牛内のミトコンドリアを観察する。

(2) 蝸牛神経系の *in situ* イメージング

本研究では、Brainbow マウス、TissueCyte 断層撮影法などの技術を蝸牛領域に応用することで蝸牛有毛細胞―ラセン神経系に至る周波数別詳細地図を作成することを目的とする。

３．研究の方法

1． 蝸牛における *in situ* ミトコンドリアイメージング

a．mtGFP-Tg マウスを用いた、正常蝸牛組織内でのミトコンドリア分布の３次元観察

予備的な研究で研究代表者らはマウス蝸牛体外培養と共焦点顕微鏡を用いた実験系により、蝸牛有毛細胞の上部構造の経時的な発達を可視化しているが（図１、Kikkawa 2008）、本課題ではこれに mtGFP-Tg 技術を加えて発展させ、蝸牛有毛細胞ミトコンドリアの全体的な発生課程を可視化する。具体的には胎生 14 日（E14）、E17、生後０日（P0）、P3、P10 までの蝸牛組織の体外培養を行ったのちにイメージング、三次元再構築して有毛細胞の形態完成までのミトコンドリアの挙動を可視化する。有毛細胞の識別には Myosin VIIa 抗体染色を使用する。

2． 蝸牛における *in situ* ミトコンドリアイメージング

Brainbow マウスを米国 Jackson Laboratory より入手し、蝸牛を採取して断層撮影～３次元再構築の手法を用いてラセン神経の周波数マッピングを行う。ただし、Brainbow マウスの軸索の発色は個体差が大きくまた発生過程では充分に発色しない場合があることが知られており（Livet 2007）、予備実験でイメージングが困難な場合、単色発色の mThy1-YFP の使用を考慮する。

4．研究成果

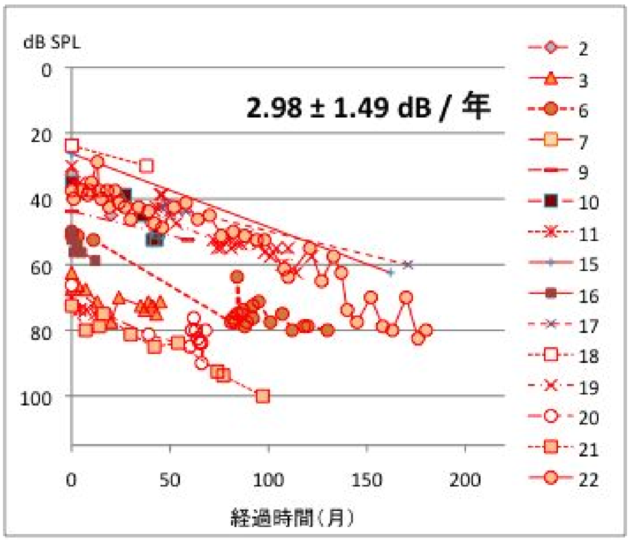
我々は先ず、蝸牛などの硬組織を透明化して観察するための新たな方法を開発し、特許の出願を行った（特願）。更に高速共焦点顕微鏡を組み合わせて蝸牛有毛細胞におけるミトコンドリアの立体的実時間的観察手法の開発に成功した。また、有毛細胞の損傷を自動的にカウントするプログラムを開発した。

Brainbow マウスを入手することはできなかったものの、mThy1-YFP 蛍光発色マウスと蝸牛透明化手法を組み合わせることで、蝸牛有毛細胞とらせん神経系の詳細な構造の同時観察が可能であった。

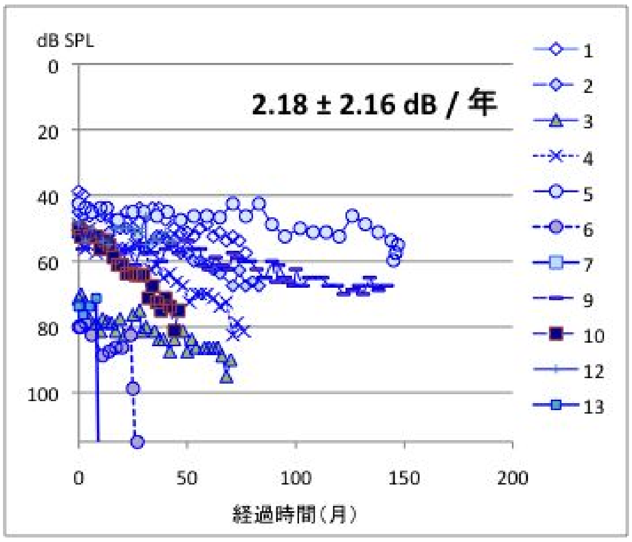
さらに、マウス蝸牛の体外培養技術を確立し、ゲンタマイシンやシスプラチンなどの耳毒性薬剤を用いた障害評価システムを作成した。モルモットと HPF（hydroxyphenyl fluorescein）、高速コンフォーカル顕微鏡を用いた実験系ではフリーラジカル（活性酸素）の組織内での発生をリアルタイムに可視化できた。

上記の培養系を用い、グリシンや血糖降下剤メトフォルミンなどの薬剤障害に対する保護効果を示した。耳毒性薬剤により障害された内耳組織ではカスパーゼ染色が陽性となり、アポトーシス経路の活性化が起きていること、また蝸牛保護効果はアポトーシス活性化剤（アニソマイシン）により打ち消されることも明らかにした。

実患者の研究では、ミトコンドリア病による難聴の患者に水素水、タウリン、コエンザイム Q10 等の抗酸化剤を６ヶ月以上投与し、安全性と効果を検証した。これらの投与による有害事象は認められなかった。タウリン投与患者では長期（10 年以上）にわたって難聴の進行を抑制できた例が複数見られた（グラフ）。



タウリン非投与群



タウリン投与群

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　6　件）

1. Tuerdi A, Kikuta S, Kinoshita M, Kamogashira T, Kondo K, Iwasaki S, Yamasoba T. Dorsal-zone-specific reduction of sensory neuron density in the olfactory epithelium following long-term exercise or caloric restriction. ***Scientific Reports*** 査読有 2018; 8(1), 1-16.
2. Kikuta S, Matsumoto Y, Kuboki A, Nakayama T, Asaka D, Otori N, Kojima H, Sakamoto T, Akinori K, Kanaya K, Ueha R, Kagoya R, Nishijima H, Toma-Hirano M, Kikkawa YS, Kondo K, Tsunoda K, Miyaji T, Yamaguchi T, Kataoka K, Mori K, Yamasoba T. Longer latency of sensory response to intravenous odor injection predicts olfactory neural disorder. ***Sci Rep***. 査読有 6:35361, 2017.
3. Ueha R, Ueha S, Kondo K, Sakamoto T, Kikuta S, Kanaya K, Nishijima H, Matsushima K, Yamasoba T. Damage to Olfactory Progenitor Cells Is Involved in Cigarette Smoke-Induced Olfactory Dysfunction in Mice. ***Am J Pathol***. 査読有 186(3):579-86, 2016.
4. Takei Y, Kikkawa YS, Atapour N, Hensch TK, Hirokawa N. Defects in Synaptic Plasticity, Reduced NMDA-Receptor Transport, and Instability of Postsynaptic Density Proteins in Mice Lacking Microtubule-Associated Protein 1A. ***J Neurosci***. 査読有 25;35(47):15539-54, 2015.
5. Sakamoto T, Kikuta S, Kikkawa YS, Tsutsumiuchi K, Kanaya K, Fujimaki Y, Ueha R, Saito Y, Yamasoba T. Differences in Postoperative Hearing Outcomes and Vertigo in Patients with Otosclerosis Treated with Laser-Assisted Stapedotomy versus Stapedectomy. ***ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec***. 査読有 77(5):287-93, 2015.
6. Sakamoto T, Kikuta S, Kikkawa YS, Kinoshita M, Saito Y, Kobayashi K, Kakigi A, Suzuki M, Yamasoba T. Prognostic factors for long-term hearing preservation after canal-tympanoplasty for congenital aural atresia. ***Eur Arch Otorhinolaryngol***. 査読有 272(11):3151-6, 2015.

〔学会発表〕（計　2　件）

7. 吉川弥生、浦田真次、木下淳、山岨達也．ミトコンドリア蛍光（mtGFP）マウスを用いた蝸牛有毛細胞内ミトコンドリア動態の検討．第27回日本耳科学会総会・学術講演会 2017.11.23-25,横浜市．
8. 吉川弥生、樫尾明憲、木下淳、山岨達也．メトフォルミンの蝸牛有毛細胞保護効果についての検討　第28回日本耳科学会総会・学術講演会　2018.10.4-6,大阪市．

〔図書〕（計　2　件）

9. 吉川弥生．第II章2-4 難聴に対する抗酸化物質治療．細胞機能から見た内耳性難聴の病態とその治療（宿題報告2017）,34-37頁．東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室，2017年．
10. 吉川弥生．第X章1-2 蝸牛感覚上皮における活性酸素イメージング．細胞機能から見た内耳性難聴の病態とその治療（宿題報告2017）,182-184頁．東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室，2017年．

〔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：特願
番号：2016-178127
出願年：2016
国内外の別：国内

○取得状況（計　0　件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等　なし

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：菊田 周

ローマ字氏名：KIKUTA, Shu

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教
研究者番号（8 **桁）：**00555865

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。