

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：23592475

研究課題名(和文)ミトコンドリア 活性酸素系の蝸牛内ライブイメージング

研究課題名(英文)Live imaging of the cochlear mitochondria and reactive oxygen species

研究代表者

吉川 弥生(Kikkawa, Yayoi S.)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医

研究者番号：00452350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内耳(蝸牛)における活性酸素ライブイメージング法の確立および抗酸化剤の聴力保護能測定を行った。

【内容】 蝸牛における live ROS イメージング a.体外培養したマウス蝸牛をリアルタイム断層撮影し、3次元再構築を行って活性酸素の発生を可視化した。b.蝸牛を露出したモルモットを用い、騒音下の活性酸素の発生を上記のシステムで観察した。ミトコンドリア機能障害マウスでのミトコンドリア分布の観察：薬剤障害マウスの蝸牛を摘出し、共焦点顕微鏡で観察した。抗酸化メカニズムの解明：水素飽和水を一定期間投与したマウス内耳を用い、障害(シスプラチン)曝露時の蝸牛内酸化ストレスの増減を定量した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a real-time imaging method of reactive oxygen species (ROS) in the live inner ears (cochlea). Also, we analyzed the mechanisms of cochlear protective agents against ROS.

[Contents] (1) Live ROS imaging in the cochlea. (a) Mouse cochlear explants were imaged using an ultra-high-speed confocal microscope (Nikon A1R). Tomographic images were then 3D reconstructed to pinpoint the active position for producing inner ear ROS. (b) Live, in vivo ROS production was imaged using cochlear-exposed guinea pigs. (2) Monitoring mitochondria distribution in the damaged inner ear: Mouse cochlear explants were incubated in medium containing various concentrations of cisplatin, and mitochondria distribution and ROS production were examined. (3) Elucidation of anti-ROS mechanism in the inner ear: Mouse cochlear explants were cultured in cisplatin-containing medium with hydrogen gas dissolved directly into the media and ROS production and hair cell survival was evaluated.

研究分野：耳科学

キーワード：耳科学 抗加齢医学 内耳 有毛細胞 難聴

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)。

エネルギー産生のある場であるミトコンドリアにおいて活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)が発生しているという仮説は1956年にHarmanらによって提唱されたが、ROS実験の難しさから、様々な疾患においてミトコンドリア由来活性酸素の役割が大きいことが知られるようになるまで20年が経過した。

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。われわれは最近ミトコンドリアにおけるROSレベルの増加や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)合併する糖尿病以上に本疾患の患者は日常生活上で不便を強いられている。その他にも、突発性難聴や騒音難聴など活性酸素が関与すると言われる疾患は数多い。

しかしこれまで、内耳での活性酸素そのものの測定は高い反応性と短い寿命(10^{-6} 秒程度)のためにきわめて困難であったことから、薬剤や虚血などの内耳障害から活性酸素発生までのタイムラグや発生部位と量の時間的な変化など、基礎研究的にはいくつか未解明の点が残されていた。

(2) ミトコンドリアのライブイメージング

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。

これを解決するため、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)が開発された。レーザー

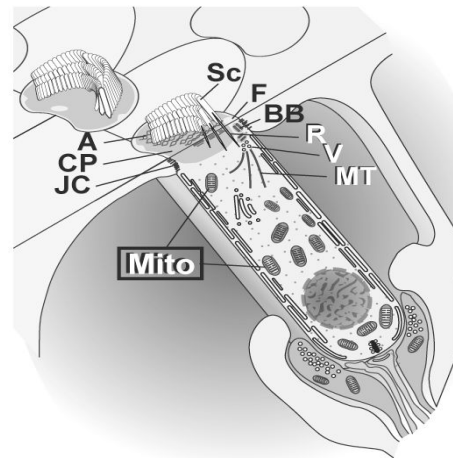


図1 蝸牛有毛細胞内のミトコンドリア(Mito)。Kikkawa 2008

共焦点顕微鏡による観察では、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。

(3) 抗酸化剤による感覚器・神経系の保護

2007年に日本医大Ohtaらの研究グループが、水素ガス(H_2)をラットに吸入させることで、大脳神経細胞を脳虚血後のフリーラジカル障害から防御できることをNature Medicine誌に発表した(Ohsawa 2007)。続く動物実験では肝細胞の保護効果(Fukuda 2007)やストレス下での認知機能低下予防効果(Nagata 2008)が報告され、その後も臨床試験など相次ぐ発表を経て、水素分子は新たな抗酸化剤としての地位を確立しつつある。

研究代表者らは、水素を騒音難聴など種々の内耳有毛細胞障害モデルに適用することで、水素分子の内耳での抗酸化能を証明した。また、抗酸化物質であるアルファリポ酸とコエンザイムQ10がBakを抑制し老人性難聴の発症を遅延することも明らかにしている。しかしながら、これらの物質が具体的にどのようにミトコンドリアからのROSを抑えるのかはまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

内耳のミトコンドリア-活性酸素系におけるまだ解明されていない基礎研究を緻密化し、新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤とする。

また本研究では、通常の蛍光顕微鏡や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(図2)を利用して蝸牛有毛細胞を観察する。

さらに、薬剤障害モデル動物蝸牛に対しても、上記の新規蛍光試薬や高速共焦点顕微鏡を駆使してROS発生やミトコンドリア分布の変化を確認する。

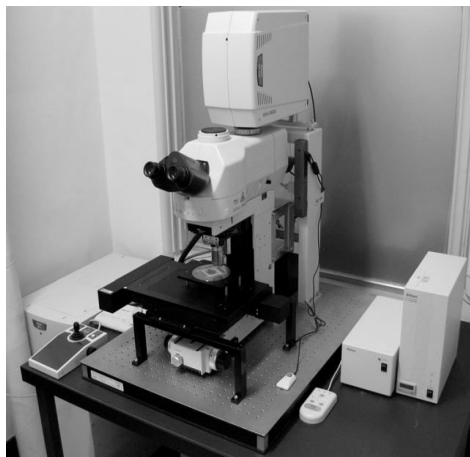


図2 Nikon A1R 高速レーザー共焦点顕微鏡

3. 研究の方法

(1) 蝸牛における live ROS イメージング

ex vivo系での内耳活性酸素発生量可視化システムの確立

予備的な研究で研究代表者らはマウス蝸牛体外培養とHPFを用いた実験系により、フリーラジカルの組織内での発生を可視化しているが(図3、Kikkawa 2009)、本課題ではこれを発展させ、活性酸素の発生を定量的・定位的に測定可能な方法を開発する。具体的には高速コンフォーカル顕微鏡Nikon A1R(図2)を用いた断層撮影により、有毛細胞・支持細胞のどの部分で活性酸素が発生しているのかを測定する。

音響曝露下での in vivo、live ROS イメージング(最適音源、周波数の設定)

騒音難聴モデルとして、モルモットの蝸牛に騒音曝露により活性酸素を直接発生させ、これを上記のシステムを用いて検出する。蝸牛を露出したモルモットを顕微鏡で観察しながら、外耳道に挿入した高出力イヤホンから騒音曝露を行う。検出には高速コンフォーカル顕微鏡Nikon A1Rを用い、リアルタイム

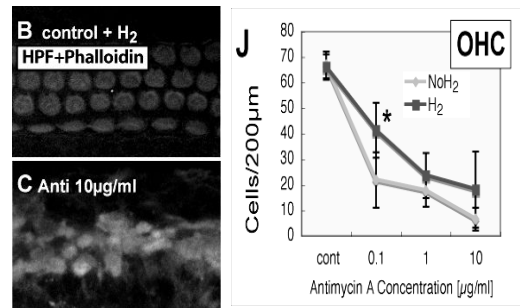


図3 (左)アンチマイシンAによる有毛細胞障害と、活性酸素マーカーHPFの呈色。HPFは細胞傷害性のヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)のみと反応して緑色蛍光を発する。(右)水素は残存有毛細胞数を有意に増加させる(Kikkawa 2009)

に撮影したデータを3次元再構築する。これにより、騒音曝露の何分後に蝸牛内活性酸素が発生してくるのか、および蝸牛内のどこで発生しているかを詳細に測定する。現在予備実験を実施中であるが、いまの蝸牛露出手術で観察可能な頂回転(低周波)では音曝のエネルギーが弱く、活性酸素が検出できない。このため手術法や撮影角度を工夫し、基底回転での撮影を可能にする。種々のサイズのスピーカーを試し、最適な音源を選ぶ。

(2) マウス蝸牛有毛細胞内ミトコンドリア分布の立体的観察

mtGFP-Tgマウスの内耳を摘出し蝸牛をwhole mount処理し、共焦点顕微鏡で観察する。ミトコンドリアの有毛細胞内分布を高倍率で観察し、低周波数部位と高周波数部位での違いを調べる。幼若マウスでの観察が成功すれば、胎仔から成体まで観察対象を拡げ、成長～老化に伴うミトコンドリア分布の立体的な変化を調べる。

(3) 種々の内耳保護剤の抗酸化作用・遺伝子異常の内耳脆弱性の検証

上記のシステムを用い、種々の感音難聴への抗酸化剤の予防および治療効果を調べる。具体的には水素飽和水を一定期間投与したモルモットを用い、障害曝露時の蝸牛内酸化ストレスの増減を定量する。障害には音響曝露ないし耳毒性薬剤としてゲンタマイシンなどのアミノ配糖体抗生物質、シスプラチンなどの抗悪性腫瘍剤を使用する。

4. 研究成果

(1) 蝸牛における live ROS イメージング

活性酸素発生剤(ミトコンドリア電子伝達系酵素の特異的阻害剤であるAntimycin A)、活性酸素により蛍光を発する色素HPFまたはAPF、活性型ミトコンドリア標識剤(Mitotracker Orange)を用い、モルモット蝸牛における薬剤障害時のミトコンドリア

分布を可視化した。得られたデータに3次元再構成を行ったところ、アンチマイシンAによる障害の11分後より活性型ミトコンドリアの蛍光量が減少していることが判明した。アンチマイシンAによる活性酸素の発生量は、アミノグリコシド系抗生物質ネオマイシンと同等であった。

音響障害モデルでは、スピーカーによる音響曝露では十分な音量が得られず活性酸素の発生が検出できなかった。外耳道イヤホン挿入モデルではわずかな蛍光量の増加がみられたが、安定した結果は得られなかったため現在実験継続中である。

(2) マウス蝸牛有毛細胞内ミトコンドリア分布の立体的観察

Antimycin A およびアミノグリコシド系抗生物質として臨床現場でよく用いられるゲンタマイシンを用い、マウス培養蝸牛における活性型ミトコンドリアの分布計測を行った。コンフォーカル顕微鏡を用い3次元再構成を行ったところ、活性型ミトコンドリアは薬剤障害により減少したが、減少幅は内有毛細胞よりも外有毛細胞に多い傾向が認められた。

また、ミトコンドリアGFP-トランスジェニックマウスの入手には多少の遅延が生じたが、こちらのマウスについても、ミトコンドリア分布計測をさらに詳細に行うことができた。ミトコンドリア分布はアンチマイシンやゲンタマイシン投与により変化し、有毛細胞内の核周囲に凝縮する傾向にあることが判明した。

(3) 種々の内耳保護剤の抗酸化作用・遺伝子異常の内耳脆弱性の検証

抗腫瘍剤として臨床で多用されるシスプラチンを作用させた場合のマウス内耳における活性酸素の発生を可視化した。活性酸素は蝸牛有毛細胞及びラセン神経節に多く発生していた(図4)。水素ガスを飽和した培養液中においては残存有毛細胞数が著しく

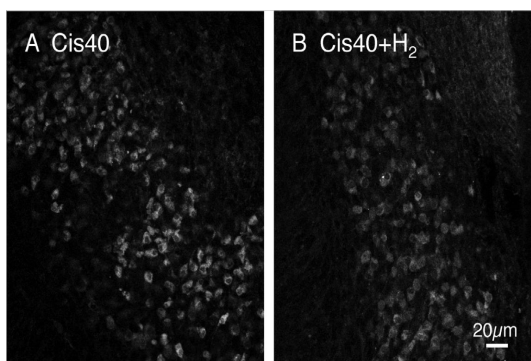


図4 ラセン神経節における活性酸素発生量の可視化。(右)水素はROS量を有意に減少させる(Kikkawa 2014)

増加しかつ活性酸素の発生も減少しており、分子状水素は内耳活性酸素の発生を抑制して新たなシスプラチン聴力障害の予防・治療手段として使えることが明らかになった。

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4件)

1. Kikkawa YS, Nakagawa T, Taniguchi M, Ito J. Hydrogen protects auditory hair cells from cisplatin-induced free radicals. *Neurosci Lett*. 査読有、2014 5;579:125-9. doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.025.
2. Kikkawa YS, Nakagawa T, Ying L, Tabata Y, Tsubouchi H, Ido A, Ito J: Growth factor-eluting cochlear implant electrode: impact on residual auditory function, insertional trauma, and fibrosis. *J Transl Med*. 査読有、2014;4:12:280. doi: 10.1186/s12967-014-0280-4.
3. Sakamoto T, Kikkawa YS, Kikuta S, Kinoshita M, Ueha R, Suzukawa K, Kashio A, Kakigi A, Ito K, Suzuki M, Yamasoba T: Favorable prognostic factors for long-term postoperative hearing results after canal tympanoplasty for congenital aural stenosis. *Otol Neurotol*. 査読有、2014;35(6):966-71. doi: 10.1097/MAO.0000000000000335.
4. 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、[in print] doi:10.1007/s00405-014-3164-6, <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-014-3164-6>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 弥生 (KIKKAWA, Yayoi)
 東京大学・医学部附属病院・病院診療医
 研究者番号: 00452350

(2) 研究分担者

坂本 幸士 (SAKAMOTO, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50323548