

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月27日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659797

研究課題名（和文） スフィンゴミエリン合成酵素欠損による難聴発症の分子・細胞機構

研究課題名（英文） Mechanisms for the hearing loss in sphingomyelin synthase-1 deficient mice.

研究代表者

宋文杰 (Song Wen-Jie)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90216573

研究成果の概要（和文）： スフィンゴミエリン（SM）ホメオスタシスが聴覚における役割を知るために、SM合成酵素（SMS1, SMS2）欠損マウスを解析した。行動実験および聴性脳幹反応の解析より、SMS1欠損マウスは感音性難聴を示すことが分かったが、SMS2欠損マウスは野生型と同等な聴力を有した。SMS1欠損マウスの難聴は低周波数領域で起きる特徴と、年齢依存的に進行する特徴を示した。SMS1欠損マウスの内耳を調べたところ、蝸牛電位の明確な低下が明らかとなった。組織学的検査により、血管条の萎縮と血管条上皮細胞の変形、及び血管条におけるカリウムチャネル発現の異常が認められた。これらの知見は蝸牛電位の低下を説明する機構の一部として考えることができる。以上より、SMS1が内耳の機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： Sphingomyelin (SM) is a sphingolipid reported to function as a structural component of plasma membranes and to participate in signal transduction. The role of SM metabolism in the process of hearing remains controversial. Here, we examined the role of SM synthase (SMS), which is subcategorized into the family members SMS1 and SMS2, in auditory function. Measurements of auditory brainstem response (ABR) revealed hearing impairment in *SMS1*^{-/-} mice in a low frequency range (4-16 kHz). As a possible mechanism of this impairment, we found that the stria vascularis (SV) in these mice exhibited atrophy and disorganized marginal cells. Consequently, *SMS1*^{-/-} mice exhibited significantly smaller endocochlear potentials (EPs). As a possible mechanism for EP reduction, we found altered expression patterns and a reduced level of KCNQ1 channel protein in the SV of *SMS1*^{-/-} mice. These mice also exhibited reduced levels of distortion product otoacoustic emissions. Quantitative comparison of the SV atrophy, KCNQ1 expression, and outer hair cell density at the cochlear apical and basal turns revealed no location-dependence, but more macrophage invasion into the SV was observed in the apical region than the basal region, suggesting a role of cochlear location-dependent oxidative stress in producing the frequency-dependence of hearing loss in *SMS1*^{-/-} mice. Elevated ABR thresholds, decreased EPs, and abnormal KCNQ1 expression patterns in *SMS1*^{-/-} mice were all found to be progressive with age. Mice lacking SMS2, however, exhibited neither detectable hearing loss nor changes in their EPs. Taken together, our results suggest that hearing impairments occur in *SMS1*^{-/-} but not *SMS2*^{-/-} mice. Defects in the SV with subsequent reductions in EPs may account, at least partially, for hearing impairments in *SMS1*^{-/-} mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：スフィンゴミエリン、内耳、血管条、蝸牛電位、KCNQ1

1. 研究開始当初の背景

聴覚を失うと、我々の社会活動に著しい障害が生じる。聴覚系がどのような分子・細胞機構で形成され、そしてどのような機構で破綻するかを知ることは、聴覚系の理解と難聴治療方法の開発に重要である。しかし、現在我々の聴覚系の形成機構や破綻原因に対する理解は乏しく、難聴に対する治療法もステロイドと循環改善薬の投薬に留まっている。

本申請者らは聴覚系の形成における脂質代謝の役割を調べるために、ノックアウトマウスを用いた探索的な研究を続けてきた。その中で、スフィンゴミエリン合成酵素1 (SMS1) 欠損マウスに難聴があることを見出した。すなわち、野生型マウスに比べ、聴性脳幹反応 (ABR) の閾値が 20dB 上昇した。一方、スフィンゴミエリンのもう一つの合成酵素である SMS2 の欠損マウスは、野生型と比べ、ABR 閾値に全く変化が見られない。従って、SMS1 が関わる分子・細胞または神経回路機構と難聴との関係が考えられる。SMS1 欠損マウスの ABR 第一波の閾値も上昇しているため、SMS1 欠損マウスの難聴は蝸牛に起因すると考えられる。

2. 研究の目的

上記背景のもとで、本研究では SMS1 欠損マウスを用い、SMS2 欠損マウスや野生型マウスと比較しながら、SMS1 欠損による難聴の分子・細胞機構を探索することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) SMS1 欠損マウスと SMS2 欠損マウスの聴力を行動学的に検討するために、純音の音と水報酬を組み合わせた学習を行った後に、純音の周波数と音圧を系統的に変化させ、それぞれの周波数における聴力を調べた。

(2) 生理学的な指標を用いて、聴覚検査を行うために、聴性脳幹反応閾値を周波数ごとに調べた。

(3) SMS1 欠損マウス難聴の機構の一つとして考えられるのは有毛細胞の脱落である。そ

れを調べるために、F アクチン染色を行った。

(4) 内耳機能を調べるために、耳音響放射歪成分測定系を開発し、測定を行った。

(5) 二連電極を用いて、蝸牛電位と内リンパカリウムイオン濃度を計測した。カリウムイオン濃度の測定は、イオン交換液 (IE190, WPI, Sarasota, FL, USA) を用いた。

(6) 蝸牛と血管条の組織学的検査のために、HE 染色を行った。

(7) 血管条のイオンチャネル発現を調べるために、免疫組織化学法を採用した。また、チャネルタンパク質の量を調べるために、ウェスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) 条件学習実験により、SMS1 欠損マウスの聴力の低下を認めたが、SMS2 欠損マウスは野生型との間に有意差がなかった。

(2) ABR 閾値を用いた聴力評価においても、行動学習実験の結果を支持した。さらに、ABR 閾値評価により、SMS1 欠損マウスの難聴は低い周波数側に生じていること、生後一ヶ月からすでに認められること、生後半年の間に急速に進行することが明らかとなった。

(3) SMS1 欠損マウス難聴の機構を調べるために、内耳有毛細胞の脱落を検索した。蝸牛フラット標本の F アクチン染色により、有毛細胞数の脱落が殆ど認められないことが明らかとなった。

(4) SMS1 欠損マウス難聴の機構を調べるために、次に、蝸牛電位と蝸牛内リンパのカリウムイオン濃度を測定した。カリウムイオン濃度に変化が認められなかったが、蝸牛電位の明確な低下が明らかとなった。さらに、この低下は年齢依存的に発現し、ABR 閾値上昇の年齢依存性と相関関係にあった。

(5) 蝸牛電位低下の原因を追究するために、蝸牛血管条の組織染色を行い、その萎縮を明

らかにした。萎縮も年齢依存的で、蝸牛電位の低下の年齢依存性と相関関係にあった。しかし、血管条の萎縮は蝸牛の場所に関係しなかった。

(6) 蝸牛電位低下の原因をさらに追究するために、蝸牛血管条に発現するイオンチャネルを調べた。その結果、辺縁細胞における **KCNQ1** の発現低下が、免疫組織とウェスタンブロットの両方により、明らかとなった。

(7) **SMS1** 欠損マウス難聴の機構をさらに調べるために、耳音響放射歪成分を測定した。その結果、中間周波数領域における放射の低下が認められた。

(8) **SMS1** 欠損マウスの難聴はなぜ低周波数領域に起きるかを探索した結果、血管条におけるマクロファージの密度が蝸牛先端部に有意に高いことが分かった。

上記の結果より、以下の結論を得た：

① **SMS1** 欠損マウスは難聴を示すが、**SMS2** 欠損マウスは難聴を示さない。

② **SMS1** 欠損マウスの難聴は低周波数領域に起き、生後発達において、急速に悪化する。

③ **SMS1** 欠損マウスの難聴の一因は蝸牛血管条の萎縮とそれにおける **KCNQ1** 発現の低下にある。

④ **SMS1** 欠損マウスの難聴はなぜ低周波数領域に起きるかは現在説明できず、今後の研究が待たれる。

本研究によって、**SMS1** が内耳の機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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 7 件)

(1) Lu M-H, Takemoto M, Watanabe K, Luo H, Nishimura M, Yano M, Tomimoto H, Okazaki T, Oike Y, Song W-J. Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. *The Journal of Physiology*, 2012, 590(Pt 16):4029-44. doi: 10.1113/jphysiol.2012.235846. 査読有

(2) Nishimura M, Song W-J. Temporal sequence of visuo-auditory interaction in multiple areas of the guinea pig visual cortex. *PLOS ONE*, 2012, 7(9): e46339. doi:

10.1371/journal.pone.0046339. 査読有

(3) Sawatari H, Tanaka Y, Takemoto M, Nishimura M, Hasegawa K, Saitoh K, Song W-J. Identification and characterization of an insular auditory field in mice. *Eur J Neurosci*, 2011, 34(12):1944-52. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07926.x. 査読有

(4) Okuda Y, Shikata H, Song W-J. A train of electrical pulses applied to the primary auditory cortex evokes a conditioned response in guinea pigs. *Neurosci Res*, 2011, 71:103-6. doi: 10.1016/j.neures.2011.05.020. 査読有

(5) Yamagata K, Senoguchi T, Lu M-H, Takemoto M, Karim F, Go C, Sato Y, Hatta M, Yoshizawa T, Araki E, Miyazaki J, Song W-J. Voltage-gated K⁺ channel **KCNQ1** regulates insulin secretion in MIN6 beta-cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 2011, 407(3):620-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.083. 査読有

(6) Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song W-J, Node K, Taguchi R, Yamagata K, Oike Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1 null mice. *J Biol Chem* 2011, 286(5):3992-4002. doi: 10.1074/jbc.M110.179176. 査読有

(7) 宋文杰、聴覚野の区分とトノトピー、*Clinical Neurosci*, 2011, 29(12): 1401-1404. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

① Makoto Takemoto, Masataka Nishimura, Wen-Jie Song. Mouse insular auditory field receives projections from the ventral division of the medial geniculate body. 第 17 回聴覚研究フォーラム、2012 年 12 月 8 日、同志社びわこリトリートセンター。

② Mei-Hong Lu, Makoto Takemoto, Masataka Nishimura, Ken Watanabe, Wen-Jie Song. Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. 第 17 回聴覚研究フォーラム、2012 年 12 月 8 日、同志社

びわこリトリートセンター。

③ Makoto Takemoto, Masataka Nishimura, Wen-Jie Song. Mouse insular auditory field receives projections from the ventral division of the medial geniculate body. 第 42 回北米神経科学学会、2012 年 10 月 15 日、Morial Convention Center, New Orleans, USA。

④ 竹本誠、西村方孝、長谷川佳代子、宋文杰、マウス島皮質聴覚野は内側膝状体腹側核からの投射を受ける、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 21 日、名古屋国際会議場。

⑤ 宋文杰、スフィンゴミエリン合成酵素遺伝子欠損による難聴とその内耳機構、第 7 回 STC 研究会、2012 年 7 月 13 日、能登ロイヤルホテル。

⑥ 竹本誠、西村方孝、宋文杰、マウス島皮質聴覚野は脳新皮質聴覚野とは独立した視床入力神経回路を有する。第 14 回ブレインサイエンス研究会、2012 年 6 月 3 日、霧島国際ホテル。

⑦ 宋文杰、大脳皮質の in vivo イメージング、第 14 回ブレインサイエンス研究会、2012 年 6 月 2 日、霧島国際ホテル。

⑧ 竹本誠、呂美紅、渡辺研、矢野正人、西村方孝、富本秀和、岡崎俊郎、尾池雄一、宋文杰、スフィンゴミエリン合成酵素遺伝子欠損による難聴とその内耳機構に関する研究、第 62 回西日本生理学会、2011 年 10 月 14 日佐賀大学医学部。

[図書] (計 2 件)

(1) Song W-J, Nishimura M, Takemoto M. Practical methods for suppressing random and nonrandom noise in fluorescence imaging. In "Optical Imaging: Technology, Methods and Applications ", eds: Akira Tanaka & Botan Nakamura, (in press), Nova Science Publishers, Inc.

(2) Song W-J, Nishimura M, Saitoh K. Auditory cortex in guinea pigs: subfield organization and functional domains. Pp. 73-82 in "Auditory Cortex: Anatomy, Functions and Disorders", ed: Mounya Elhilali, 2012, Nova Science Publishers, Inc.

[その他]

ホームページ等

熊本大学 生命科学研究部 知覚生理学教室

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep/physiol2/physiol2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宋文杰 (Song Wen-Jie)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90216573