

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293347

研究課題名(和文)内耳障害において細胞内タンパク質分解系による生体制御機構が果たす役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of biological defense mechanisms by the intracellular proteolysis systems in damages of the inner ear

研究代表者

岩崎 真一 (Iwasaki, Shinichi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10359606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の品質管理において重要な役割を果たすタンパク質分解系が、内耳障害の際に果たす役割について、細胞レベルで明らかにすることを目的として、主たるタンパク質分解系である、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の双方に介して解析を行った。オートファジー・リソソーム系に関しては、内耳有毛細胞特異的にオートファジーがノックアウトされたマウスを作製したところ、生後早期より内耳機能の低下と有毛細胞の消失を認めた。ユビキチン・プロテアソーム系については、内耳培養細胞において、プロテアソーム阻害剤は、低濃度では細胞保護機能を認め、高濃度では細胞障害作用があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of the intracellular proteolysis systems in damages in the inner ear, we analyzed the roles of the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosome system.

To investigate the role of the autophagy-lysosome system in the inner ear, we generated mice deficient in a gene essential for autophagy (Atg5) in hair cells in the inner ear. Deletion of Atg5 resulted in hair cell degeneration and profound congenital hearing loss. To investigate the role of the ubiquitin-proteasome system in the inner ear, we analyzed the effect of proteasome inhibitor (MG-132) in cultured inner ear cells under oxidative damage. The low concentration of proteasome inhibitor had some protective effect, but it had toxic effect in the higher concentration.

研究分野：耳科学、神経耳科学、細胞生理

キーワード：脳・神経 内耳 タンパク質 オートファジー プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

身体のあるあらゆる細胞は、細胞内構成成分の分解と合成を絶えず行うことによって機能を維持している。近年、細胞内タンパク質分解系の破綻が、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患や、発癌、炎症反応、心不全等の様々な疾患の発症に関与することが明らかにされつつあり、難治疾患に対する新たな治療のターゲットとして、注目されている (Tai and Schuman, *Nat Rev Neurosci* 2008)。

細胞内のタンパク質分解系は、ユビキチン・プロテアソーム系(UPP系)とオートファジー・ライソソーム系(オートファジー系)とに大別され、前者ではユビキチン分子の結合により、個々のタンパク質ごとに厳密に制御された分解が行われるのに対して、後者ではオートファゴソームが一度に多くのタンパク質を無作為に分解する。細胞内の恒常性維持において、それぞれの系が異なる役割を果たすものと考えられている。

感音難聴や末梢性前庭障害等の内耳疾患は頻度の高い身体障害であるにもかかわらず、選択できる治療法は限定されており、根本的な治療は未だ確立されていない。アミノ配糖体による薬剤性内耳障害や騒音性難聴、老人性難聴においては、その発症に有毛細胞内の酸化ストレスが強く

関与することが示されている (Someya et al. *PNAS* 2009)。これらの病的状態においては、異常タンパク質や不良ミトコンドリアなどが細胞内に蓄積されることから、細胞内タンパク質分解系によって、これらを除去することは、細胞の機能維持に重要な役割を果たすことが予想される。しかしながら、細胞内タンパク質分解系が内耳障害において果たす役割に関しての研究はほとんど進められていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の品質管理に重要な役割を果たす細胞内タンパク質分解系が、内耳障害の際に果たす役割を多角的に解析し、細胞レベルで明らかにすることを目的とする。主たる細胞内タンパク質分解系である、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の双方に関して、*in vitro*, *in vivo* の両面から解析を行う。具体的には、以下の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 内耳におけるオートファジー機能の確認。

オートファジーを光学顕微鏡で蛍光的にモニター可能なマウス (green fluorescence protein-labeled microtubule-associated protein 1 light chain 3b puncta: GFP-LC3 マウス) より摘出した蝸牛の器官培養を行い、オートファゴソームの形成の有無について検討する。さらに、オートファジーの流れを

阻害するリソソーム阻害剤 (E64d および pepstatin A) を投与した条件で、オートファゴソームの形成の有無について検討した。

(2) 内耳有毛細胞においてオートファジー機能が欠損したマウスの作製

オートファジーに不可欠な Atg5 の floxed mice と、蝸牛の全ての有毛細胞に発現している蛋白である、Pou4f3-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせ、内耳の有毛細胞のみでオートファジー機能が欠損した、Atg5(flox/flox);Pou4f3-Cre (Cre/+)マウスを作製した。このマウスの蝸牛において、GFP-LC3 の免疫染色を行い、オートファゴソームの消失、すなわちオートファジーが欠損しているのを確認した。

(3) 内耳有毛細胞におけるオートファジー機能が欠損したマウスの聴力の解析。

生後 2 週目、4 週目、8 週目の

Atg5(flox/flox);Pou4f3-Cre (Cre/+)マウスの聴力について、聴性脳幹反応 (Auditory brainstem response: ABR) にて、評価を行った。

(4) 内耳有毛細胞におけるオートファジー機能が欠損したマウスの内耳の組織学的解析

生後 5 日目、14 日目の Pou4f3-Cre (Cre/+) ; Atg5(flox/flox) マウスより蝸牛の器官培養を行い、有毛細胞の形態学的観察を行うとともに、内耳における p62-ユビキチン凝集体の蓄積の有無について免疫染色について、検討を行う。さらに、走査型電子顕微鏡にて、内耳有毛細胞の詳細な形態学的検討を行った。

(5) 内耳障害におけるプロテアソーム阻害剤の影響の検討

マウス由来の内耳感覚上皮細胞株である、HEI-0C1 株において、過酸化水素 (H₂O₂) にて、酸化ストレスを与え、HEI-0C1 の増殖能に対するプロテアソーム阻害剤 (MG-132 および bortezomib) 処理の効果について検討した。

4. 研究成果

(1) 内耳におけるオートファジー機能の確認。

オートファジーを光学顕微鏡で蛍光的にモニター可能な GFP-LC3 より摘出した蝸牛の器官培養において、リソソーム阻害剤のない状態では、オートファゴソームの形成は少数であったが、リソソーム阻害剤の投与により、多数のオートファゴソームの形成有毛細胞内に観察された。このことは、マウスの内耳において、内耳の有毛細胞においては、継続的にオートファジーのターンオーバーが生じていることを示す (図 1)。

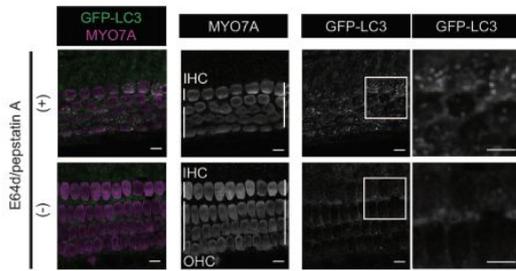


図1 . GFP-LC3 マウスの蝸牛におけるオートファジー。リソソーム阻害剤 (E64d/pepstatin A) 存在下では、多数のオートファゴソームの形成が認められた。

(2) 内耳有毛細胞においてオートファジー機能が欠損したマウスの作製

オートファジーに不可欠な Atg5 の floxed mice と、蝸牛の全ての有毛細胞に発現している蛋白である、Pou4f3-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせ、内耳の有毛細胞のみでオートファジー機能が欠損した、Atg5(flox/flox);Pou4f3-Cre (Cre/+)マウスを作製し、このマウスの蝸牛において、GFP-LC3 の免疫染色を行い、オートファゴソームの消失、すなわちオートファジーが欠損しているのを確認した (図2)。

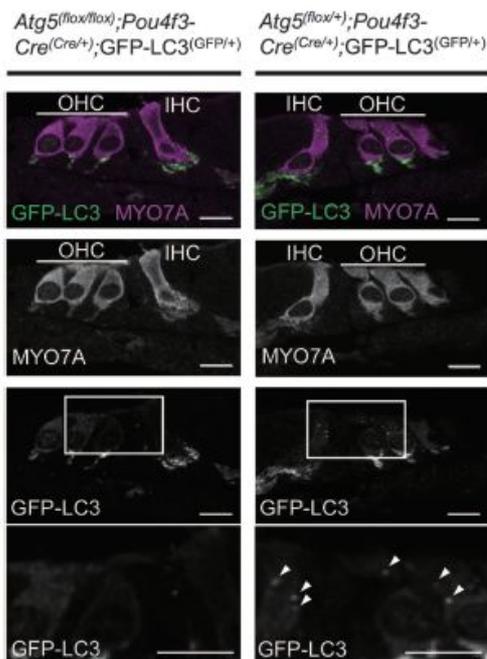


図2 . Atg5(flox/flox);Pou4f3-Cre (Cre/+)マウスでは、オートファゴソームが消失していた。

(3) 内耳有毛細胞におけるオートファジー機能が欠損したマウスの聴力解析

内耳の有毛細胞でオートファジー機能が欠損した Pou4f3-Cre (Cre/+) ;Atg5(flox/flox) マウスの聴力を聴性脳幹反応 (ABR) にて測

定したところ、生後2週目の時点で全ての周波数で約100dB SPLの高度難聴を呈しており、生後4週目、生後8週目のマウスでも同様の結果であった (図3)。一方、オートファジー機能正常な Atg5(flox/+);Pou4f3-Cre (Cre/+)マウスにおいては、生後2週目、生後4週目、生後8週目のいずれの週齢においても聴力低下を認めなかった。このことは、内耳有毛細胞におけるオートファジーが聴力の発達に不可欠なことを示唆する。

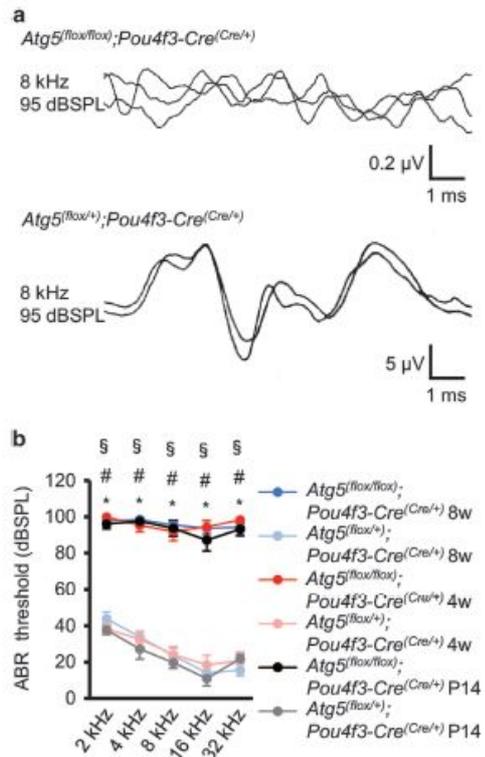


図3 . Atg5(flox/flox);Pou4f3-Cre (Cre/+)マウスでは、聴性脳幹反応閾値の著明な上昇を認めた。

(4) 内耳有毛細胞におけるオートファジー機能が欠損したマウスの内耳有毛細胞の形態学的解析

内耳の有毛細胞でオートファジー機能が欠損した Pou4f3-Cre (Cre/+) ;Atg5(flox/flox) マウスでは、生後5日目においては、内耳有毛細胞の形態は正常であったが、生後2週目になると、有毛細胞の線毛の形態異常と外有毛細胞の損傷が認められた。生後8週目になると、外有毛細胞、内耳有毛細胞ともに著明な損傷が認められた (図4)。

また、走査電子顕微鏡による内耳有毛細胞の解析においても、生後5日目の Pou4f3-Cre (Cre/+) ;Atg5(flox/flox) マウス有毛細胞の線毛の形態はほぼ正常であったが、生後2週目、生後8週目になると、著明な形態異常を認めた。これらの結果は、オートファジーは、内耳有毛細胞の形態の維持に不可欠であることを示唆する。

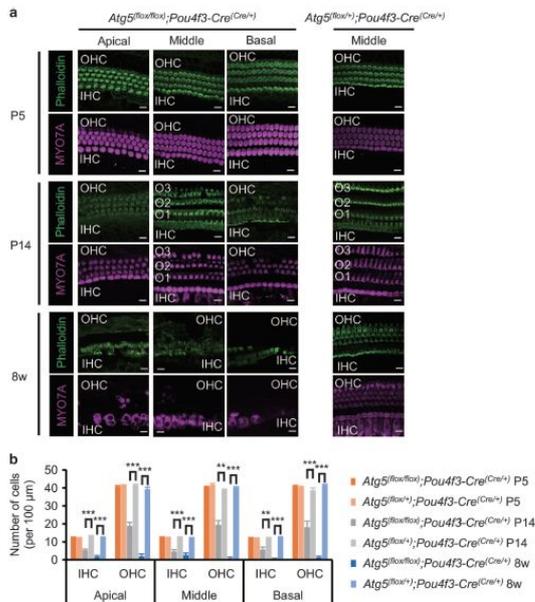


図4 . Atg5(flox/flox);Pou4f3-Cre (Cre/+) マウスでは、生後2週目以降に著明な内耳有毛細胞の損傷を認めた。

(5) 内耳障害におけるプロテアソーム阻害剤の影響の検討

マウス由来の内耳感覚上皮細胞株 HEI-OC1 を用いて検討を行った。過酸化水素 (H₂O₂) 細胞老化モデルにおいて、WST 細胞増殖アッセイを指標に HEI-OC1 の増殖能に対するプロテアソーム阻害剤 (MG-132 および bortezomib) 処理の効果を検証した。その結果は、プロテアソーム阻害剤が高濃度域では HEI-OC1 の増殖低下 (細胞死と考えられる) をきたすが、低濃度域では、逆に H₂O₂ 老化モデルでの増殖能の低下を防ぐ効果がみられた (図5)。低濃度のプロテアソーム阻害剤処理は逆にプロテアソーム活性を高めるとの報告²があるが、今回の検討ではプロテアソーム阻害剤は dose dependent にプロテアソーム活性を抑制していた。同様の現象は心臓³や網膜由来細胞⁴においても報告があり、至適濃度であれば相対的に cyto-protective な細胞内分子が蓄積する可能性もあると考えられる。

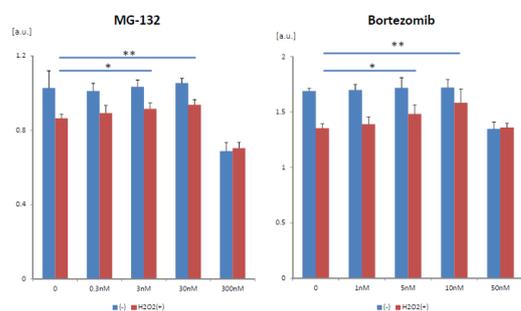


図5 . HEI-OCI の過酸化水素負荷あり・なし状態での細胞増殖能に対するプロテアソ

ーム阻害薬 (MG-132 と bortezomib) の効果

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 10 件)

Kamogashira T, Hayashi K, Fujimoto C, Iwasaki S, Yamasoba T. Functionally and morphologically damaged mitochondria observed in auditory cells under senescence-inducing stress. *Aging Mechanisms Dis* (in press)

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* 642: 123-128, 2017.

Fujimoto C, Iwasaki S, Urata S, Morishima H, Sakamaki Y, Fujioka M, Kondo K, Mizushima N, Yamasoba T. Autophagy is essential for hearing in mice. *Cell Death Dis* 8: e2780, 2017

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* 6: 37575, 2016.

Kamogashira T, Akamatsu Y, Kashio A, Ogata E, Karino S, Kakigi A, Iwasaki S*, Yamasoba T. Development of auditory skills after cochlear implantation in children with inner ear malformations. *Acta Otolaryngol* 136: 78-82, 2016

Fujimoto C, Egami N, Demura S, Yamasoba T, Iwasaki S. The effect of aging on the center-of-pressure power spectrum in foam posturography. *Neurosci Lett* 585: 92-97, 2015

Yoshimoto R, Iwasaki S*, Takago H, Nakajima T, Sahara Y, Kitamura K. Developmental increase in hyperpolarization-activated current regulates intrinsic firing properties in rat vestibular ganglion cells. *Neuroscience* 284: 632-642, 2015

Iwasaki S, Yamasoba T. Dizziness and imbalance in the elderly: Age-related decline in the vestibular system. *Aging Dis* 6: 38-47, 2015

Iwasaki S, Yamamoto Y, Togo F, Kinoshita M, Yoshifuji Y, Fujimoto C, Yamasoba T. Noisy vestibular stimulation improves body balance in bilateral vestibulopathy. *Neurology* 82: 969-975, 2014.

Inoue A, Iwasaki S*, Fujimoto C, Nakajima T, Yamasoba T. Developmental changes in the protective effect of exogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 against ototoxic drugs in cultured rat vestibular ganglion. *Cell Tissue Res* 356: 299-308, 2014

〔学会発表〕(計 9 件)

岩崎真一、狩野章太郎、鴨頭輝、木下淳、藤本千里、山岨達也. 経皮的ノイズ前庭電気刺激が前庭誘発眼筋電位(oVEMP)に及ぼす影響. 第24回日本耳科学会総会 2014年10月16日 朱鷺メッセ、(新潟県、新潟市)

藤本千里、発表演題：内耳有毛細胞におけるオートファジーの役割、学会名：第8回オートファジー研究会、発表年月日：2014年11月11日~2014年11月12日、シャトレゼガトーキングダム札幌(北海道、札幌市)

Iwasaki S. Ocular vestibular evoked myogenic potential. 13th Asia-Oceania ORL-HNS congress, March 20, 2015 Taipei, Taiwan

岩崎真一. めまい・平衡機能の老化への対策と積極的介入治療. 第15回日本抗加齢医学会総会 2015年5月31日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

Iwasaki S. Clinical aspects of vestibular neuropathy. 30th Politzer Society Meeting, July 2, 2015, 朱鷺メッセ、(新潟県、新潟市)

藤本千里、発表演題：内耳有毛細胞におけるオートファジーの役割、学会名：第9回オートファジー研究会、発表年月日：2015年11月16日~2015年11月17日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県、淡路市)

Iwasaki S. Probing vestibular function from postural stability. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dec 3, 2015, 一ツ橋ホール(東

京都、千代田区)

Iwasaki S. Vestibular rehabilitation. 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. March 30, 2016, ハイアットリージェンシーホテル(東京都、新宿区)

Iwasaki S, Fujimoto C, Egami N, Kinoshita M, Kamogashira T, Yamasoba T. Effect of noisy galvanic vestibular stimulation on locomotion in patients with bilateral vestibular dysfunction. 2016 Annual CORLAS Meeting, Aug 31, 2016, Bordeaux, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 真一 (IWASAKI, Shinichi)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10359606

(2) 研究分担者

中島 敏明 (NAKAJIMA, Toshiaki)
獨協大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：50227790

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

藤本 千里 (FUJIMOTO, Chisato)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60581882

榎尾 明憲 (KASHIO, Akinori)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20451809