

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06174

研究課題名(和文) MnSOD遺伝子改変動物による内耳活性酸素種処理機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the processing mechanism of reactive oxygen species in the inner ear in MnSOD genetically modified animals

研究代表者

木下 淳 (Kinoshita, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：10755648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Manganese superoxide dismutase (MnSOD)はミトコンドリア内に局在する抗酸化酵素である。本研究では全身性MnSODヘテロ欠損マウス(Sod2<sup>+/-</sup>)を背景動物を対照として騒音曝露後の聴力変化、内耳組織学的変化を解析した。騒音曝露より7、14日後の聴力閾値はSod2<sup>+/-</sup>群で20dB程度の有意な上昇を示した。組織学的には外有毛細胞障害が主でSod2<sup>+/-</sup>群では蝸牛の全回転で有意に生存率が低下していた。MnSOD減少に伴い騒音曝露後の聴力回復遅延と外有毛細胞障害が生じることが示され、内耳における酸化ストレス処理にMnSODが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is one of the antioxidant enzymes acting within the mitochondria. To investigate the pathological role of mitochondrial antioxidant stress in the cochlea, we generated systemic MnSOD heterozygous knockout (Sod2<sup>+/-</sup>) mice, and investigated hearing loss and histological damage after noise exposure. The mean thresholds of auditory brainstem responses were significantly worse in the Sod2<sup>+/-</sup> group on post-noise days 7 and 14. Histologically, compared with control group, outer hair cell survival rate in the Sod2<sup>+/-</sup> group was significantly decreased in all cochlear turns. We showed that delay of hearing recovery and outer hair cell damage occur after noise exposure with decreasing MnSOD. These findings suggest that MnSOD has important role to reduce reactive oxygen species in hair cell, thereby protecting from noise induced hearing loss.

研究分野：耳科学

キーワード：MnSOD SOD2 騒音性難聴 酸化ストレス ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内で発生する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の大部分はミトコンドリア呼吸の副産物として産生され、生体物質を酸化することで機能不全を起こし、細胞毒性を発生させる。内耳障害においても薬物、加齢、騒音など様々な要因から内耳における ROS が増加し、ミトコンドリア機能不全に陥ることがその重要な原因の一つと考えられている (図 1)。Manganese superoxide dismutase (MnSOD、SOD2) はミトコンドリア内に存在する主要な抗酸化酵素である。しかしながら、全身性 *MnSOD* ホモ欠損マウスは拡張型心筋症および神経変性を伴い生後早期に死亡するため成熟マウスでの研究が困難である。一方、心筋・骨格筋や肝などの組織特異的 *MnSOD* 欠損マウスや全身性 *MnSOD* ヘテロ欠損マウスを用いた種々の研究では ROS に対する感受性が個別臓器ごと及びストレス環境の有無によって大きく異なることが示唆されている。ミトコンドリア機能と関連する内耳において、哺乳類内耳感覚細胞における MnSOD の生理機能の詳細は未だ明らかにされておらず、内耳障害の結果として生じる難聴の予防、治療のためには内耳障害と MnSOD 活性との関連、その ROS 処理機構の解明が求められている。

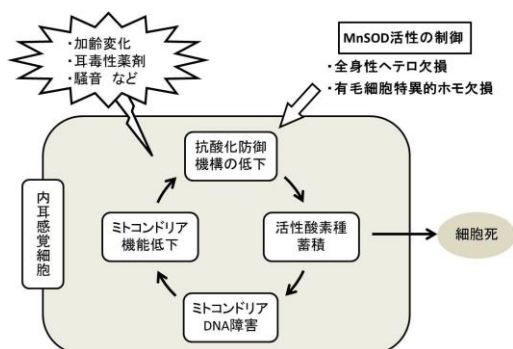


図 1. 酸化ストレスによる内耳障害と本研究のアプローチ.

### 2. 研究の目的

内耳における MnSOD の ROS 処理機構を下記のとおり解析し、内耳障害時の ROS 処理機構の解明を目的とする。

- (1) 全身性 *MnSOD* ヘテロ欠損マウスにおける騒音暴露後の内耳 ROS 処理機構の電気生理学的、組織学的解析
- (2) 有毛細胞特異的 *MnSOD* 欠損マウスを作製し、その表現型 (聴力、内耳組織変化) の電気生理学的、組織学的解析

### 3. 研究の方法

*MnSOD*<sup>flox/+</sup>マウスと CAG (chicken actin promoter) -Cre マウスとの交配から全身性 *MnSOD* ヘテロ欠損マウス (*Sod2*<sup>+/-</sup>) を作製し、背景動物である C57BL/6 マウスを対照

(*Sod2*<sup>+/+</sup>) として、防音室内で 120 dB SPL、4000 Hz オクターブバンドノイズを 4 時間暴露した (各群 8 週齢、N=6)。騒音暴露前、暴露 1 時間後、1、3、7、14 日後に 4000、8000、16000、31250 Hz の聴性脳幹反応 (ABR) 閾値を電気生理学的に測定した。騒音暴露 14 日後に内耳を採取しパラフィン切片を作製。蝸牛基底回転から頂回転における内・外有毛細胞生存率、ラセン神経節細胞密度、血管条厚を比較した。内・外有毛細胞生存率については、内有毛細胞生存率 (%) = 100 × 観察試料中の内有毛細胞数 / 観察試料数、外有毛細胞生存率 (%) = 100 × 観察試料中の外有毛細胞数 / 3 × 観察試料数 より算出した。

ラセン神経節細胞密度 (/mm<sup>2</sup>) については蝸牛各回転に対応するラセン神経節に対して Rosenthal 管内のラセン神経節細胞数 / Rosenthal 管面積 より算出した (図 2)。

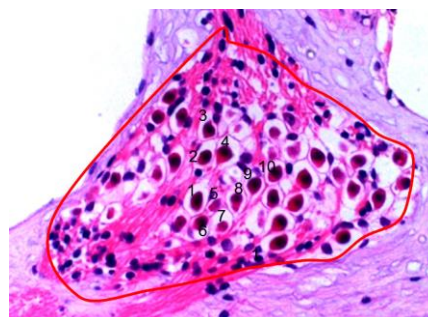


図 2. ラセン神経節細胞密度の測定.

血管条厚は蝸牛各回転の血管条についてラセン隆起とライスネル膜のラセン靭帯付着部を結び、その中線と交わる部位の血管条厚を測定した (図 3)。

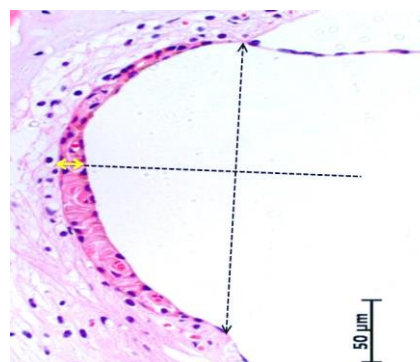


図 3. 血管条厚の測定.

同切片を用いて抗酸化酵素 (CuZn、MnSOD、グルタチオンペルオキシダーゼ) 活性および酸化ストレスマーカー (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine、3-nitrotyrosine) の挙動を蛍光免疫染色にて解析した。さらに *Pou4f3*-Cre トランスジェニックマウスと

floxed *MnSOD* マウスを交配させて Cre-loxp システムによる有毛細胞特異的 *MnSOD* 欠損マウスを作製し、その表現型解析を試みた。

#### 4. 研究成果

騒音暴露前、1 時間後の聴力においては両群間の各周波数における平均 ABR 閾値に有意差を認めなかった。騒音暴露後 7、14 日では各周波数で *Sod2*<sup>+/-</sup> 群の方が *Sod2*<sup>+/+</sup> 群と比較して概ね 20dB の有意な閾値上昇を認め (図 4)、*MnSOD* 活性が低下している *Sod2*<sup>+/-</sup> 群では騒音暴露により一過性に生じた聴力低下の回復が遅延していることが確認された。

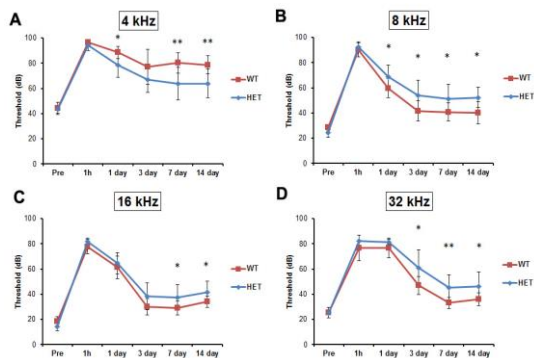


図 4. 騒音暴露後の聴性脳幹反応の経時的変化。

騒音暴露後 14 日目の検体を用いた組織学的評価については、有毛細胞の障害は外有毛細胞が主であり、蝸牛の基底回転から頂回転にかけて *Sod2*<sup>+/-</sup> 群において生存率が有意に低下していた ( $p < 0.01$ ) (図 5)。内有毛細胞は頂回転において *Sod2*<sup>+/-</sup> 群で生存率低下を認めた ( $p < 0.05$ )。

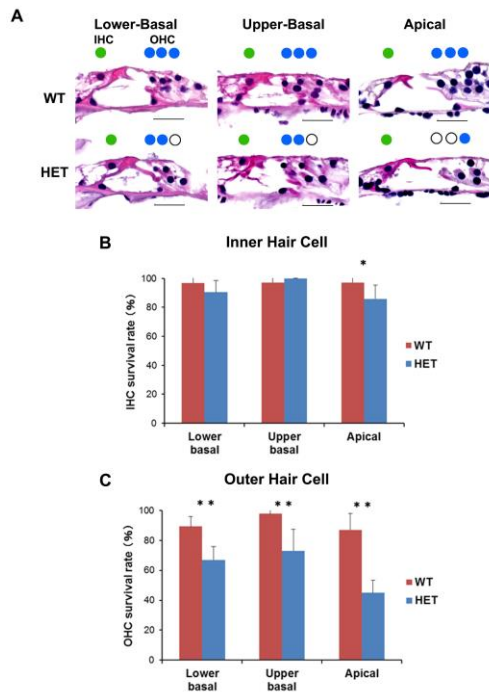


図 5. 騒音暴露 14 日後の内・外有毛細胞生存率。

ラセン神経節密度、血管条厚については蝸牛基底回転から頂回転にかけてどちらも両群間で有意差を認めなかった (図 6、7.  $p > 0.05$ )。

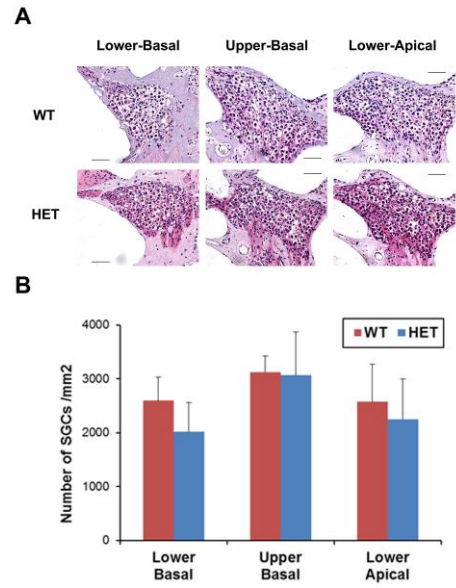


図 6. 騒音暴露 14 日後のラセン神経節密度。

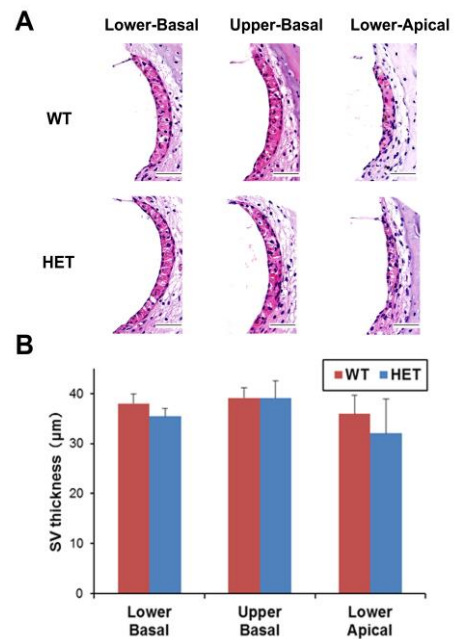


図 7. 騒音暴露 14 日後の血管条厚。

同様に騒音暴露後 14 日目の内耳切片を用いて抗酸化酵素 (CuZn、*MnSOD*、グルタチオンペルオキシダーゼ)、酸化ストレスマーカー (8-hydroxy-2'-deoxyguano-sine、3-nitrotyrosine) の免疫染色を行い、染色性の相違について解析を行ったが有意な差は得られず、騒音暴露直後の内耳組織での評価が必要と考えられた。しかしながら、その後は実験実施施設の移転に伴い、系統の凍結

胚化などが必要となり、実験可能な *Sod2*<sup>+/-</sup>マウスを安定的に作成することができず、騒音暴露直後の酸化ストレスマーカーの挙動について解析することが不能であった。有毛細胞特異的 *MnSOD* 欠損マウス (*MnSOD*<sup>fllox/fllox</sup>; *Pou4f3-Cre* マウス) の作製にも着手していたが、上記理由により安定的に目的とする遺伝子改変マウスを入手することが困難であり、解析不能であった。

以上より *MnSOD* 減少に伴って騒音暴露後の聴力回復遅延と有毛細胞障害が生じることが示され、内耳における ROS の処理に *MnSOD* が関与することが示唆された。

#### 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 1 件)

① 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, *Neuroscience Letters*, 査読有, vol. 6, 2017, pp. 123-128.

[学会発表] (計 3 件)

① Aynur Turdi, 木下淳, 藤本千里, 岩崎真一, 山嵜達也. 騒音暴露による内耳酸化ストレスが *MnSOD* ヘテロ欠損マウスの聴覚に及ぼす影響. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016 年 6 月 10 日~6 月 12 日. パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市).

② Aynur Turdi, Makoto Kinoshita, Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Tatsuya yamasoba. *Mn-SOD* affects Noise Induced Hearing Loss. Association for Research in Otolaryngology, 39th midwinter winter meeting. 2016 年 2 月 20 日~2 月 24 日. サンディエゴ (アメリカ合衆国).

③ Aynur Turdi, Makoto Kinoshita, Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Tatsuya yamasoba. *Mn-SOD* affects Noise Induced Hearing Loss. 13<sup>th</sup> Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2015 年 12 月 3 日~12 月 1 日. 一橋大学一橋講堂・学術総合センター (東京都・千代田区).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :

種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 淳 (KINOSHITA, Makoto)  
東京大学・医学部附属病院・登録診療員  
研究者番号 : 10755648

(2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

該当なし ( )