

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11170

研究課題名(和文) 加齢性難聴になりにくいマウスを用いた感音難聴発症機序の解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Studies on Age Related Hearing Loss Using Transgenic Mice

研究代表者

鈴木 淳 (Suzuki, Jun)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80735895

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)：本研究により、アストロサイトのミトコンドリア機能に関する基礎的知見(呼吸活性の雌雄差や培養アストロサイトの高い酸化能力)、内耳への遺伝子導入系の確立(成体マウスに対するアデノ随伴ウイルスの後半規管投与)、遺伝子改変マウスの表現型を評価する際の注意点に関する知見(Cdh23遺伝子のpassenger gene問題)、 $n-3$ 脂肪酸負荷が加齢性難聴の進行を抑制するというデータ(遺伝学的に $n-3$ 脂肪酸が体内に豊富に存在するFat-1マウスの解析)の入手が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感音難聴は主に内耳の蝸牛の障害で生じる聴覚障害であり、加齢性難聴や音響性聴覚障害(音響外傷・騒音性難聴等)が代表的である。感音難聴の発症メカニズムの多くは未だ不明であり、有効な治療や予防法は確立されていない。本研究によって、アストロサイトのミトコンドリア機能に関する基礎的データの入手、内耳への遺伝子導入系の確立、遺伝子改変マウスの表現型を評価する際の注意点に関する知見、 $n-3$ 脂肪酸負荷が加齢性難聴の進行を抑制するというデータの入手が可能であった。本研究の成果により、感音難聴に対する研究が今後より進んでいくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Results of this study revealed that (1) cultured astrocytes have sex differences in mitochondrial respiration, and a high ability to induce beta-oxidation; (2) adeno-associated virus injection into the posterior semicircular canal successfully transduces genes to hair cells in an adult cochlea; (3) studies on hearing loss using traditional transgenic mice on C57BL/6 background have the "passenger gene" problem as to the Cdh23 gene; (4) enriched endogenous  $n-3$  PUFAs produced due to the expression of the Fat-1 transgene partially alleviate age-related hearing loss in male C57BL/6 mice.

研究分野：耳科学・聴覚医学

キーワード：Fabp7 加齢性難聴 蝸牛  $n-3$ 多価不飽和脂肪酸 遺伝子改変マウス 感音難聴 アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は主に内耳の蝸牛の障害で生じる聴覚障害であり、加齢性難聴や音響性聴覚障害(音響外傷・騒音性難聴等)が代表的である。加齢性難聴の発症メカニズムに関しては、酸化ストレスやミトコンドリア障害が複合的に関与するとされるが(Yamasoba et al., *Hear. Res.*, 2013)、その発症機序の多くは未だ不明である。また、音響性聴覚障害の発症メカニズムについても、有毛細胞シナプス障害や血管条での代謝・循環障害などがその一因とされるが、やはりその発症機序については不明な点が多い(Ohlemiller, *Hear. Res.*, 2008)。これらの感音難聴に対し、一般臨床ではステロイド、ATP 製剤、ビタミン B12 などの投与が行われているが、治療効果や作用機序には疑問な点も多いとされる。

申請者は、脂肪酸の欠乏やその細胞内輸送蛋白である Fabp の異常に起因する脂質恒常性維持の破綻が、難聴発症の一因となると推測し、これまで研究を行ってきた(Suzuki et al., *Neurosci. Res.*, 2014)。研究開始時点において、蝸牛のグリア系細胞で発現し、DHA(ドコサヘキサエン酸)を代表とする  $\omega$ 3-多価不飽和脂肪酸(PUFA)と高い親和性を持つ Fabp7 の遺伝子を欠損した Fabp7 KO マウスにおいて、加齢性難聴の進行が全周波数において遅延することを発見していた(未発表)。更に、Fabp7 KO マウスでは老化のマスターゲーンとされる FoxO3a(Ziv and Hu, *Ageing Res. Rev.*, 2011)の発現が上昇していることも確認していた(未発表)。しかしながら、Fabp7 と  $\omega$ 3-PUFA 対象とした感音難聴発症メカニズムの検討には未着手であった。

一方、急性音響外傷モデル(一過性の聴覚閾値変動: Temporary threshold shift、以下 TTS モデル)を用いた実験においても、Fabp7 KO マウスが TTS をきたしにくいことを併せて発見していた。近年、聴力閾値の上昇が自然回復する TTS であっても、恒久的なシナプス障害により加齢性難聴になりやすくなることが報告されており(Kujawa and Liberman, *J. Neurosci.*, 2009)、加齢性難聴予防のために TTS に対し積極的に介入するという新規治療戦略が想定できた。Fabp7 はコルチ器ではグリア系細胞にのみ発現を認めており、欠損により騒音からの保護効果を認めることから、内毛細胞・神経節細胞間のシナプス機能を調整する役割が想定できた。しかしながら、Fabp7 の欠損が TTS を軽減するメカニズムは不明のままであった。

## 2. 研究の目的

Fabp7 の欠損により 加齢性難聴の進行が遅延するメカニズム、 TTS が軽減するメカニズムを解明し、感音難聴に対する予防・治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Fabp7 欠損が加齢性難聴の進行を遅延させるメカニズムの解明

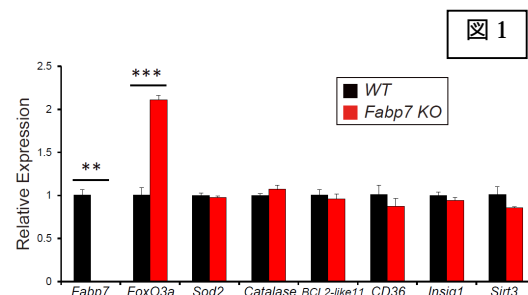
1. Fabp7 KO マウスおよび野生型マウス由来の新生仔アストロサイト初代培養細胞および新生仔蝸牛器官培養を用いて、抗老化・酸化ストレス・抗炎症、シナプス保護等に関わる因子(FoxO3a、IGF-1、TNF- $\alpha$ 、neurotrophin 等)の発現変化の確認、FoxO3a の下流因子の発現変化の確認、過酸化水素による酸化ストレス負荷試験および遺伝子発現変化の確認を行う。
2. 上記実験で有意な変化を認めた分子に対し、各マウスの蝸牛組織を用いて *in vivo* での発現変化を確認する。更に、加齢性難聴の直接原因となるミトコンドリア障害やアポトーシスについても定量し比較検討する。また、蝸牛組織を用いたメタボローム解析を行い、有意に変化した代謝系および PUFA 代謝産物を同定する。
3. 上記 1.2 実験で有意な変化を認めた物質(またはその阻害物質等)を使用し、蝸牛器官培養および生体マウス用いた投与実験を行う(有毛細胞および神経節細胞への保護効果を検討)。

### (2) Fabp7 欠損が音響性聴覚障害を軽減させるメカニズムの解明

1. Fabp7 KO マウスおよび野生型マウスの騒音曝露前後の蝸牛組織を用いて、微細構造の観察(共焦点顕微鏡)および生化学実験を行い、聴力保護のターゲットとなる物質を同定する。
2. 上記実験で同定した物質(またはその阻害薬等)を使用し、蝸牛器官培養および生体マウスを用いた投与実験を行う(シナプス保護効果、有毛細胞および神経節細胞保護効果、TTS 後の加齢性難聴の発症予防効果を検討)。

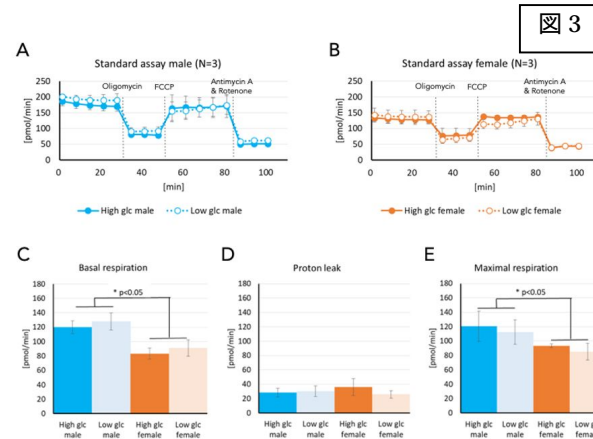
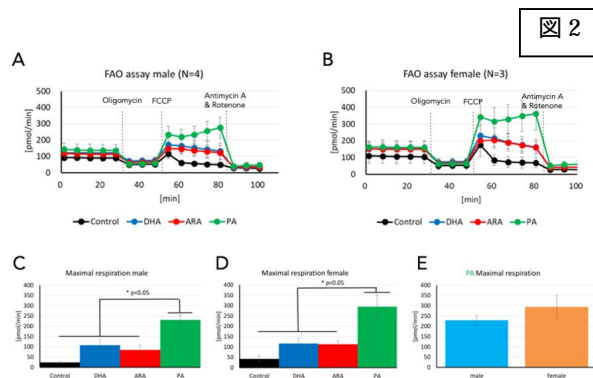
## 4. 研究成果

1) 成体 Fabp7 欠損マウスの蝸牛において、FoxO3a の mRNA の発現が上昇しているというデータを得ていたため、新生仔アストロサイト初代培養細胞を使用し、Fabp7 の欠損により FoxO3a の下流にある抗酸化物質やアポトーシス制御因子の発現に変化が生じるかを、定量 RT-PCR 法を用いて検証した(図 1)。代表的な FoxO3a の下流因子である、Sod2 や Catalase、

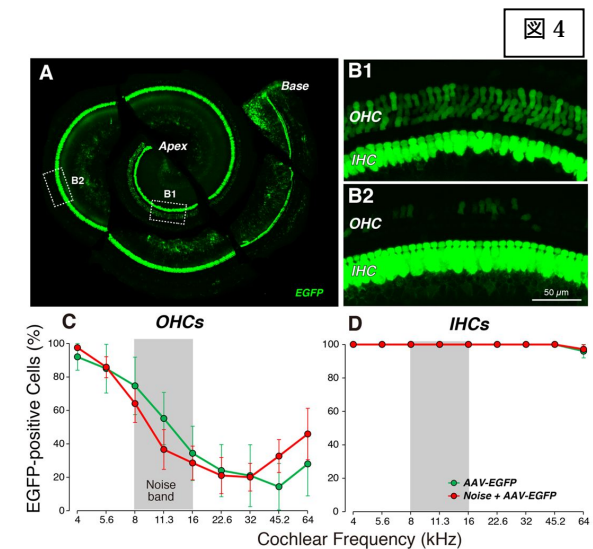


BCL2-like11 に有意な変化を認めなかった。また、長寿遺伝子とされるサーチュイン遺伝子 (Sirt3) についても検討を行ったが、有意な変化を認めなかった

2) Fabp7 欠損マウス由来のアストロサイトは野生型に比較し抗酸化能が高いという予備実験結果があったため、野生型マウス由来の培養アストロサイトのミトコンドリア呼吸活性、同アストロサイトの脂肪酸存在下でのβ酸化活性、Fabp7 欠損マウス由来のアストロサイトの脂肪酸存在下でのミトコンドリア呼吸活性を測定した。アストロサイトのミトコンドリア呼吸活性には雌雄差が存在すること(図2)、培養アストロサイトは高いβ酸化能力を持つこと(図3)が明らかになった。Fabp7 欠損マウス由来のアストロサイトの抗酸化能については、野生型と有意な差を認めなかった。これらの結果より、哺乳類のアストロサイトにおけるエネルギー代謝は、考えられてきたよりも複雑であることが示唆された。

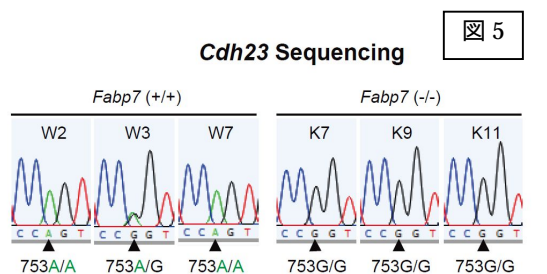


3) Fabp7 や Fabp7 関連遺伝子を内耳に導入することが難聴に対する予防・治療法になるかを検討するために、まず内耳に効率的に遺伝子を導入する方法を確立した。成体マウスに AAV2/Anc80L65 を後半規管経路で投与することにより、蝸牛障害をきたすことなく成体マウスのほぼすべての内毛細胞に遺伝子を導入することができた(図4)。本研究で確立した遺伝子導入法を用いることで、内毛細胞障害に起因する感音難聴に対する遺伝子治療の評価が可能になると考えられた。通常、内毛細胞は Fabp7 を発現していないため、Fabp7 が導入された内毛細胞の変化については今後の検討が必要である。



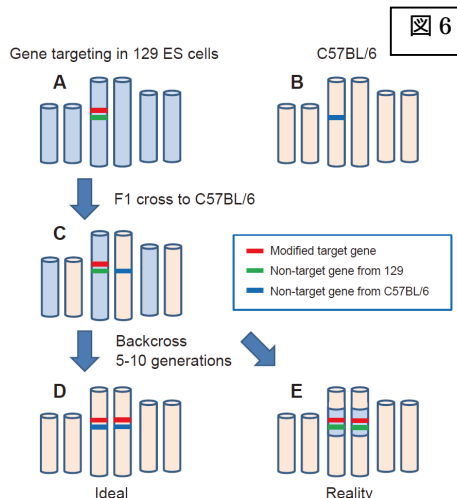
4) 解析を行っていた Fabp7 ノックアウトマウス (C57BL6J 系統) の表現型が、近傍遺伝子 Cdh23 の SNP に依存する可能性が出たため、Cdh23 の genotyping/sequencing を施行した。Fabp7 ノックアウトマウスは Cdh23 753G/753G の genotype であり、ノックアウトマウスを作成する際に使用した 129 系統の Cdh23 遺伝子を引きついでいると考えられた(図5: 通常の C57BL6J 系統は Cdh23 753A/753A となる)。

C57BL6J 系統の加齢性難聴の主な原因は Cdh23 遺伝子の異常とされており、Fabp7 の in vivo 実験については動物モデルの変更が必要になった。in vitro の実験に関しては、Cdh23 遺伝子が新生仔アストロサイト初代培養細胞で発現していないことを PCR で確認した。

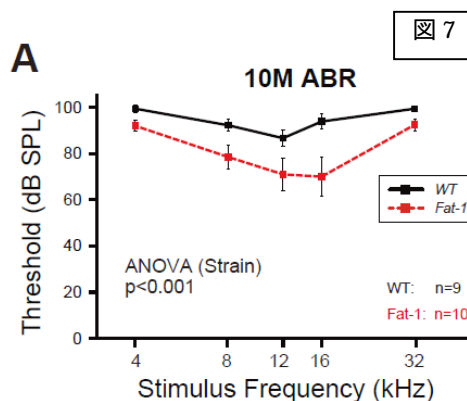


5) C57BL/6 は遺伝的背景がほぼ均一である近交系マウスであり、生物医学研究に最も広く用いられている。難聴研究においても、早期より感音難聴をきたすため、加齢性難聴のモデル動物として広く使用されている。遺伝子改変マウスを作製する場合、129 由来の ES 細胞に遺伝子操

作を加えてから C57BL/6 とのキメラマウスを作製し、その後に戻し交配を反復して C57BL/6 の遺伝的背景を揃える方法が用いられてきた。一般的に 10 世代以上戻し交配を行うことで 99.9% の遺伝的背景が C57BL/6 と同様になり、コンジェニック系統として特定遺伝子の効果を調べることが可能とされる。しかしながら、特定遺伝子の近傍に存在する遺伝子が C57BL/6 由来のものに組み変わる頻度は低く、129 由来の遺伝子が“Passenger Gene”として残存している可能性が残る（図 6）。従って、遺伝子改変マウスの表現型を評価する際には、これらの“Passenger Gene”の影響を熟慮すべきという考え方が広まってきている。本研究で用いた Fabp7 欠損マウスは 129 由来の正常 Cdh23 遺伝子を有しており、“Passenger Gene”の問題を考えるにあたり典型的かつ重要なケースと考えられた。



6) Fabp7 は DHA などの  $\omega$ -3 脂肪酸の細胞内輸送や代謝に關与する。遺伝学的に  $\omega$ -3 脂肪酸が体内に豊富に存在する  $\omega$ -3 脂肪酸変換酵素 Fat-1 の遺伝子改変マウス (Fat-1 マウス) では、13 ヶ月齢の時点で低～中音域の加齢性難聴の進行が野生型に比較して遅くなるというデータを得ていたため、それより早い時期 (10 ヶ月齢) での聴力を評価した。全音域で加齢に伴う閾値上昇が Fat-1 マウスで軽減しており (図 7)  $\omega$ -3 脂肪酸負荷が加齢性難聴の進行を抑制する可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

**Suzuki J**, Takanashi Y, Koyama A, Katori Y. Hearing recovery from deafness caused by bromate intoxication. *J Laryngol Otol.* 2018, Nov;132(11):1039-1041. 査読あり

**Suzuki J**, Hashimoto K, Xiao R, Vandenberghe LH, Liberman MC. Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. *Sci Rep.* 2017 Apr 3;7:45524. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

鈴木 淳、本藏陽平、川瀬哲明、香取幸夫：C57BL/6 背景の遺伝子改変マウスを用いた難聴研究のピットホール，第 28 回日本耳科学会総会（大阪），2018 年 10 月 3-6 日

**Suzuki J**, Hashimoto K, Xiao R, Vandenberghe LH, Liberman MC. Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction, The 14th Japan-Taiwan Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery (Kaohsiung), 1-2 Dec, 2017.

鈴木 淳、橋本 研、香取幸夫：祖先アデノ随伴ウイルス (AAV2/Anc80L65) を用いた成体マウスに対する蝸牛遺伝子治療法の確立，第 27 回日本耳科学会総会（横浜），2017 年 10 月 22-24 日

**Suzuki J**, Hashimoto K, Xiao R, Vandenberghe LH, Liberman MC. Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction, The 2017 Japan-NIH joint Symposium (Sendai), 15-17 Feb, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：稲田 仁

ローマ字氏名：Hitoshi Inada

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科 発生発達神経科学分野

職名：講師

研究者番号（8桁）：60419893

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：香取 幸夫

ローマ字氏名：Yukio Katori

研究協力者氏名：大隅 典子

ローマ字氏名：Noriko Osumi

研究協力者氏名：染谷 慎一

ローマ字氏名：Shinichi Someya

研究協力者氏名：M. Charles Liberman

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。