

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11332

研究課題名(和文)細胞核DNA変異によるミトコンドリア機能異常が聴覚に及ぼす影響についての検討

研究課題名(英文)Hearing loss caused by abnormal mitochondrial function derived from mutation of nuclear DNA

研究代表者

三輪 徹 (Miwa, Toru)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究員

研究者番号：70535591

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)：MT01 cKOマウスの産出に多くの時間を要した。MT01 cKOマウスでは、コントロールマウスと比較して、早期からの難聴進行を呈し、加齢性難聴モデルとなりうることを示した。H&E染色を行い光学顕微鏡で観察したが、蝸牛形態的には大きな変化は認めなかった。また、有毛細胞とラセン神経節細胞の脱落については、脱落時期に乖離があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、感音難聴の原因としてmt機能異常が注目されつつあるが、詳細な発症メカニズム、病態については、未だ不明な点が多い。本研究は、mt-tRNAにおける細胞核DNA変異によるmt機能異常が、聴覚にどのような影響を及ぼすのかを検討することにより、mt機能異常による難聴の発症メカニズム、病態の一端を明らかにしようとする研究である。tRNAの化学修飾に関する研究は、近年精力的に行われているが、哺乳動物については未だ不明な点も多い。ましてや聴覚機能におけるその詳細なメカニズムについてはほとんど明らかになっていないのが現状である。本研究によりその一端が明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Age-related hearing loss progressed earlier in the inner ear specific MT01 Knockout mice (MT01 cKO mice) compared to control hetero mice. Morphology of cochleae in MT01 cKO mice were almost normal. However, Hair cell loss and spiral ganglion cell loss occurred in the different timing between MT01 cKO mice and control hetero mice.

研究分野：加齢性難聴

キーワード：加齢性難聴 tRNA修飾異常 ミトコンドリア MT01

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア(mt)は、全身の細胞内に分布し、好気呼吸およびエネルギー代謝、Ca 代謝、感染防御において非常に重要な働きを行っている。mt 機能に異常が生じると、エネルギー需要の多い器官が主に障害され、てんかん、脳卒中様発作、眼瞼下垂、運動不耐性、心筋症、感音難聴、視神経萎縮、網膜色素変性、糖尿病など多彩な症状を呈する。mt 機能異常は、細胞核 DNA 変異あるいは mtDNA 変異によって起こり、好気呼吸やエネルギー代謝が障害され活性酸素(ROS)が生じることで細胞・組織が傷害されることが知られている(Chinney, 2014 etc)。mt 機能異常と感音難聴の関連について述べた報告は、ヒトでは数多く存在する(Scrpelli, 2012 etc)が、詳細な機序については不明なままである。これまでの mt 機能異常の動物モデルとしては、mtDNA 修復異常モデルや酸化ストレスモデルがあり、感音難聴の一つである老人性難聴の発症機序を探る研究が行われてきた(Yamasoba, 2013, Chen, 2013, Han, 2014, Fujimoto, 2014)。これらの研究では、加齢に従って、酸化ストレスや循環障害、動脈硬化などが生じることで、mtDNA に変異が生じ、mt 機能異常を来し活性酸素(ROS)が発生することで、聴覚に関わる組織(有毛細胞やラセン神経節、血管条など)が傷害され、老人性難聴が発症すると考えられている。しかしながら、細胞核 DNA 変異によって起こった mt 機能異常が、聴覚機能に関してどのような影響を及ぼすかどうかについては不明な点が多かった。

常染色体 6q13 に存在する細胞核 DNA である MT01(Mitochondrial tRNA Translation Optimization 1)遺伝子は、mt におけるトランスファーRNA(mt-tRNA)をタウリン修飾(m5)するために必須の遺伝子であり(Suzuki, 2014)、MT01 が欠失すると mRNA のコドンの読み取り(翻訳)異常が生じ、mt 機能異常が生じる。MT01 遺伝子をノックアウトした ES 細胞を用いた研究においては、同細胞において mt-tRNA のタウリン修飾が完全に消失し、mt 電子伝達系の蛋白質合成および複合体活性が障害され、mt の膜電位が低下することが示されている(Wei, 2015)。以上の知見より、MT01 欠失マウスは、mt-tRNA におけるタウリン修飾欠損により、翻訳異常が生じ、mt 機能異常を呈する細胞核 DNA 変異による mt 機能異常モデルマウスである。mt-tRNA におけるタウリン修飾の欠損は、mt-tRNA の点変異(A3243G)によっても起こり、これは mt 病の一つである MELAS(Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes)の原因でもある(Kirino, 2004)。さらに、同患者では約 10%に感音難聴を認める(Hirano & Pavlakis, 1994)。MELAS の他にも mt-tRNA の点変異によるタウリン修飾の欠損が認められている疾患には、糖尿病と感音難聴が特徴の MIDD(Maternally inherited diabetes and deafness)が存在する。以上のことより、mt-tRNA におけるタウリン修飾欠損による mt 機能異常は、感音難聴と関連性を持つことが示唆される。

2. 研究の目的

mt-tRNA におけるタウリン修飾欠損による mt 機能異常が、感音難聴と関連性を持つことを示す。

3. 研究の方法

MT01 欠失マウスは、細胞核 DNA 変異が聴覚に及ぼす影響を評価するためには、最適のモデル動物であると考えられる。しかし、MT01 欠失マウスは胎生致死であるため(未発表データ)、本研究では、Cre-loxP システムにより MT01 cKO マウスを作製した。内耳特異的 cre レポーターをもつ Pax2-cre マウス(Ohyama, development, 2008)と MT01 floxed マウスを交配した。

次に MT01 cKO マウスの評価を行った。聴性脳幹反応(ABR)は生後 30 日(P30)、P90、P150、P360 の時点で、聴力閾値の測定を行った。電極は閉電極を計測耳の乳様突起の皮下に、不閉電極を対側耳の乳様突起の皮下に置き、接地電極は頭頂部の皮下に置き、4、8、12、20、32kHz の各周波数における閾値を計測した。形態学的評価は各ステージで蝸牛を摘出し、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンとエオジンで染色し、光学顕微鏡にて形態評価を行った。また、免疫組織染色は、各ステージで凍結切片を作成し、ラセン神経節を抗 Tuj1 抗体で免疫蛍光染色し、細胞数カウントを行った。有毛細胞数は、蝸牛を摘出し蝸牛骨壁を削除し、蝸牛軸を除去した後、Phalloidin 染色を行い、蝸牛有毛細胞の形態を蛍光顕微鏡で確認し、有毛細胞カウントを行った。

4. 研究成果

MT01 cKO マウスの産出に多くの時間を要した(図 1)。MT01 cKO マウスでは、コントロールマウスと比較して、早期からの難聴進行を呈し、加齢性難聴モデルとなりうることを示した(図 2)。H&E 染色を行い光学顕微鏡で観察したが、蝸牛形態的には大きな変化は認めなかった。また、有毛細胞とラセン神経節細胞の脱落については、脱落時期に乖離があることがわかった。

図 1 : Genotyping 像 上段 : 1-7 が Cre、下段 : 1、12 が flox/flox

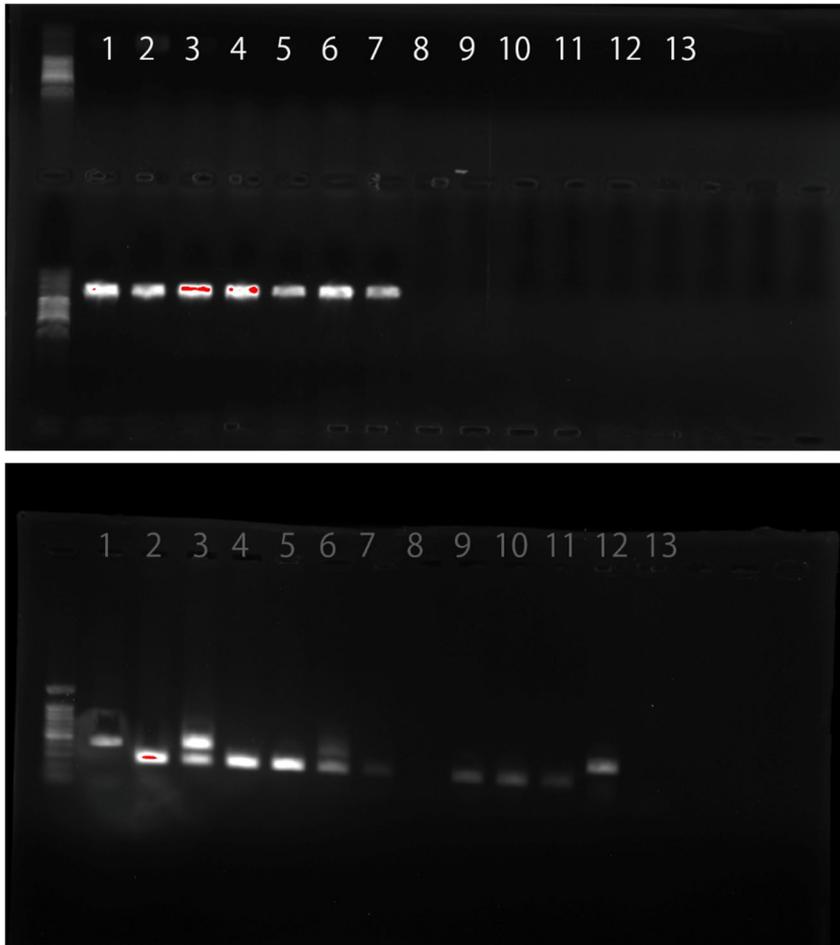
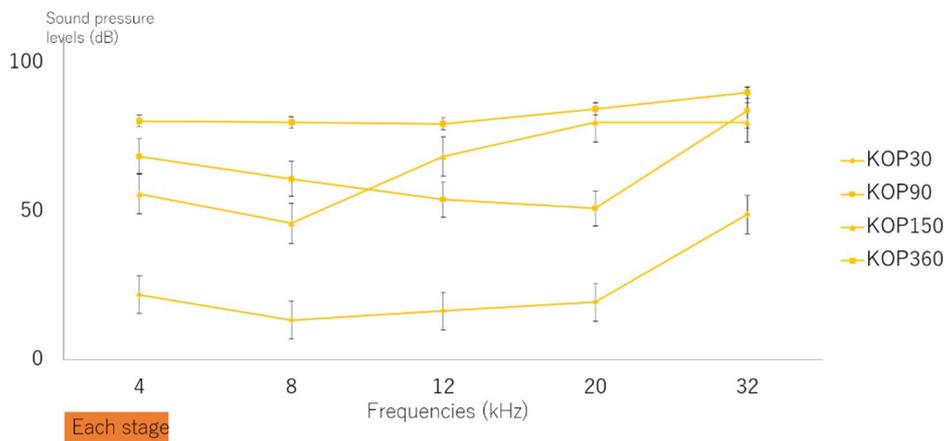
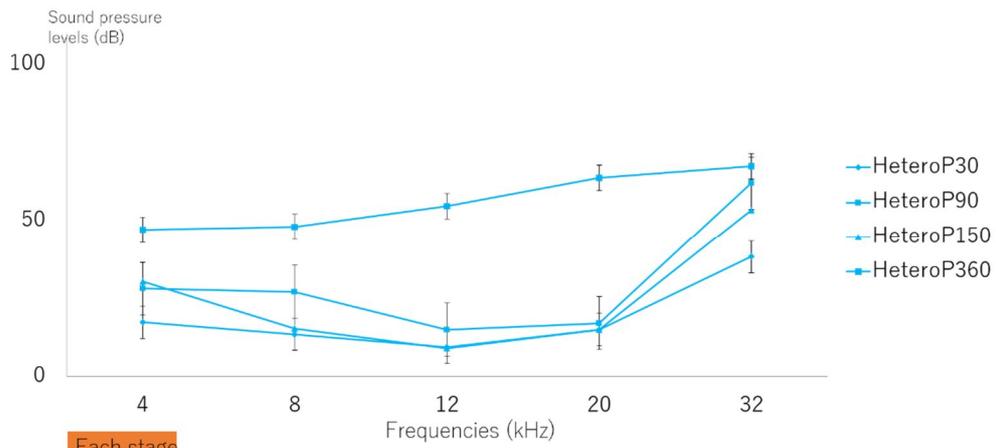


図2 上段：コントロールマウスの聴力推移、下段：MT01 cK0 マウスの聴力推移



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----