

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21646

研究課題名(和文)難聴におけるmitophagyの役割に関する研究

研究課題名(英文)A study of the role of mitophagy in hearing disorder

研究代表者

山嵜 達也(Yamasoba, Tatsuya)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60251302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：HEI-OC1細胞老化モデルではミトコンドリア呼吸能、ATP産生速度、ミトコンドリア膜電位・融合・運動性が障害され、sirtuin 1とPGC-1 の発現は減少した。PQQ前処理は保護効果を示した。加齢性難聴モデルではPQQは難聴の予防効果を示し、有毛細胞・らせん神経節細胞・リボンシナプスの数などで保護効果を示した。GeO<sub>2</sub>含有餌投与マウスは重度難聴を発症し、血管条が著しく変性した。GeO<sub>2</sub>を投与マウス蝸牛組織ではミトコンドリア、ミトコンドリア内膜、ミトコンドリア電子輸送鎖を含む16のカテゴリが関連した。タウリン、コエンザイムQ10、水素水の抗酸化物質は著明な予防効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳細胞の老化モデルではミトコンドリア呼吸能、ATP産生速度、ミトコンドリア膜電位・融合・運動性が障害され、sirtuin 1およびPGC-1 の発現減少が関与することが初めて示された。また加齢性難聴が酸化還元酵素の補酵素であるpyrroloquinoline quinone (PQQ)により予防できることがin vivoでも示されたこと、GeO<sub>2</sub>による内耳障害ではミトコンドリア関連遺伝子発現が減少して障害が起きるが、抗酸化物質によりそれも予防できることを示したことで、加齢性難聴やミトコンドリア病に伴う難聴の予防や治療法の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the HEI-OC1 cell senescence model, mitochondrial respiratory capacity, ATP production rate, mitochondrial membrane potential, mitochondrial fusion and motility were impaired, and the expression of sirtuin 1 and PGC-1 was decreased. PQQ pretreatment showed a protective effect against these. In C57BL/6 mice showing age-related hearing loss, PQQ had a protective effect, such as amelioration of hearing loss, prevention of the loss in the number of the hair cells, the spiral ganglion cells, and ribbon synapses. CBA mice treated with GeO<sub>2</sub>-containing food developed severe to profound hearing loss and severe degeneration of the stria vascular in the cochlea. These mice treated with GeO<sub>2</sub> showed reduction of gene expression in 16 categories associated with mitochondria, mitochondrial inner membrane, and mitochondrial electron transport chain. Three antioxidants, taurine, coenzyme Q10, and hydrogen water, showed marked preventive effects against GeO<sub>2</sub>-induced cochlear damage.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ミトコンドリア オートファジー 内耳 加齢性難聴 ミトコンドリア病 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

内耳研究において、難聴における autophagy の役割についてほとんど研究がされていない状況にあり、我々の研究グループの報告のほか、数編の論文しかない。一方、ミトコンドリアの障害が蝸牛障害に大きく関与することは我々の研究グループを含めて広く研究されてきた。mitophagy とはミトコンドリアを丸ごと分解する選択的オートファジーであり、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たす。過剰な酸化ストレスは reactive oxygen species 産生の際であるミトコンドリアの障害に影響し、障害されたミトコンドリアは内因性経路の apoptosis を誘導するが、この過程で機能障害を来したミトコンドリアが mitophagy により除去される。このことから、病的侵襲における mitophagy の役割が注目され、神経変性や老化の病態生理における研究が進んでいるが、内耳における mitophagy に関する研究はほとんど手つかずの状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリア遺伝子異常および老化に伴う難聴における mitophagy の役割について解析することを目的とした。具体的には加齢性難聴や mitochondria 障害動物を用い、聴覚機能、組織観察などを用い、ミトコンドリア機能や Mitophagy の量を障害前後で調べ、また HEI-OC1 細胞に過酸化水素による酸化ストレスを与え(老化モデル)ミトコンドリアの変性、細胞生存率、膜電位、ATP の変化等を調べ、同時に抗酸化剤の予防効果についても調べることも目的とした。

## 3. 研究の方法

HEI-OC1 細胞を用い、過酸化水素(100  $\mu$ M)を1時間曝露し、ミトコンドリア機能(ミトコンドリア呼吸能、ATP 産生速度、ミトコンドリア膜電位・融合・運動性及び sirtuin 1/PGC-1 経路の機能など)を評価した。また、酸化還元酵素の補酵素である pyrroloquinoline quinone (PQQ) (0.1、1.0nM)に1日間曝露した後の解析も行い、この薬剤による影響も解析した。

加齢性難聴モデルでは C57BL/C マウスを用い、対照群には通常の水道水、PQQ 投与群では PQQ 24mg/L を溶解した水道水を与え、2ヶ月齢、6ヶ月齢、8ヶ月齢における聴力を ABR にて評価した。組織学的評価は8ヶ月齢の ABR 評価後に組織を固定し、HE 染色、Myo7A、CtBP2、GluR2、NF200 等による蛍光免疫染色を行い、有毛細胞数・らせん神経節細胞数・血管条の面積・リボンシナプス数の密度・神経線維数の密度を ImageJ/FIJI による画像処理を用いて計数評価した。

二酸化ゲルマニウム (GeO<sub>2</sub>) による mitochondria 機能障害動物 CBA マウスを用いて作成し、聴覚機能を ABR 等で評価し、組織変化を解析し、また蝸牛内で発現が変動する遺伝子について解析した。さらにタウリン、コエンザイム Q10、水素水による障害予防効果について調べた。

## 4. 研究成果

HEI-OC1 細胞を過酸化水素(100  $\mu$ M)に曝露した老化モデルではミトコンドリア呼吸能、ATP 産生速度、ミトコンドリア膜電位・融合・運動性が障害されたが、PQQ 処理群ではこれらの障害に対して保護効果が見られた。過酸化水素曝露下では sirtuin 1 および PGC-1 のタンパク質発現は有意に減少したが、PQQ 前処理により増加し、PGC-1 のアセチル化は有意に減少した。この結果は PQQ が HEI-OC1 細胞老化モデルにおいてミトコンドリアに対する保護効果を持ち、SIRT1/PGC-1 経路が関与していることを示唆していた。

加齢性難聴モデルでは、PQQ 投与群では非投与の対照群と比べて8ヶ月における8および32kHz の ABR において約 30 および 20dB の保護効果が見られ、有毛細胞数・らせん神経節細胞数・血管条の面積・リボンシナプス数の密度・神経線維数の密度も有意に高く維持されており、PQQ が in vivo においても加齢性難聴に対し保護効果を持つことが示された。

CBA/J マウスに GeO<sub>2</sub> 含有餌を生後2ヶ月から6ヶ月齢まで4ヶ月間にわたり経口投与したところ、6ヶ月齢の ABR では、GeO<sub>2</sub> を投与された動物はすべての周波数で重度難聴を発症した。組織学的検査では、ほぼすべての蝸牛回転において血管条が著しく変性し、基底回転側でより顕著であった。透過型電子顕微鏡では血管条に顕著な空胞変性が認められ、ほとんどすべてのミトコンドリアが電子密度の高い封入物を含んでいた。同様に、腎臓の遠位尿管上皮とヒラメ筋では変性したミトコンドリアの内部に多くの電子密度の高い沈着物が認められた。マイクロアレイ解析では GeO<sub>2</sub> を投与した6ヶ月齢マウスの蝸牛組織では普通

飼料の対照群と比較して、3,827 個の遺伝子が有意に発現低下し、3,327 個の遺伝子が有意に発現上昇した。EASE 解析の結果、「ミトコンドリア」「ミトコンドリア内膜」「ミトコンドリア電子輸送鎖」「酸化的リン酸化」「TCA サイクル」を含む 16 の Go Biological Process カテゴリがゲルマニウムによるミトコンドリア機能障害と有意に関連した。またミトコンドリア呼吸鎖の構成要素をコードする遺伝子のうち 28 の遺伝子が蝸牛では有意に低下した。生後 2 ヶ月から 3 ヶ月間 GeO<sub>2</sub> 含有食を与えた動物では約 30 ~ 50dB の ABR 閾値上昇が見られたが、タウリン、コエンザイム Q10、水素水の 3 つの抗酸化物質を併せて投与したところ、いずれも GeO<sub>2</sub> による難聴と組織変性に対して著明な予防効果を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ying Gao Teru Kamogashira, Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Tatsuya Yamasoba	4. 巻 8
2. 論文標題 Pyrroloquinoline quinone (PQQ) protects mitochondrial function of HEI-OC1 cells under premature senescence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Aging	6. 最初と最後の頁 3 (1-17)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41514-022-00083-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ying Gao, Teru Kamogashira, Chisato Fujimoto, Shinichi Iwasaki, Tatsuya Yamasoba	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of pyrroloquinoline quinone on noise-induced and age-related hearing loss in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 15911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19842-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akinori Kashio, Chikako Yamada, Kazuo Yasuhara, Teru Kamogashira, Shinichi Someya, Tatsuya Yamasoba	4. 巻 428
2. 論文標題 Taurine, Coenzyme Q10, and Hydrogen Water Prevents Germanium Dioxide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Associated Sensorineural Hearing Loss in mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 108678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heares.2022.108678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鴨頭 輝、藤本千里、岩崎真一、山嵜達也
2. 発表標題 マウス騒音性難聴モデルにおけるピロロキノリンキノン(PQQ)の保護効果
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鴨頭 輝、藤本千里、岩崎真一、山嵜達也
2. 発表標題 ピロロキノリンキノン (PQQ) の蝸牛細胞株の老化モデルにおけるミトコンドリア機能の保護効果
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鴨頭 輝
2. 発表標題 加齢性難聴モデルにおけるピロロキノリンキノン(PQQ)の保護効果
3. 学会等名 日本抗加齢医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamasoba T, Kamogashira T, Fujimoto C, Gao Y, Iwasaki S.
2. 発表標題 Pyrroloquinoline quinone, a useful therapeutic agent for the treatment and prevention of noise-induced and age-related hearing loss.
3. 学会等名 Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鴨頭 輝
2. 発表標題 蝸牛培養細胞株及びマウス騒音性難聴モデル及び加齢性難聴モデルにおけるピロロキノリンキノンの保護効果
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	木下 淳  (Kinoshita Makoto)  (10755648)	東京大学・医学部附属病院・助教   (12601)	
研究分担者	榎尾 明憲  (Kashio Akinori)  (20451809)	東京大学・医学部附属病院・准教授   (12601)	
研究分担者	鴨頭 輝  (Kamogashira Teru)  (30807152)	東京大学・医学部附属病院・助教   (12601)	
研究分担者	藤本 千里  (Fujimoto Chisato)  (60581882)	東京大学・医学部附属病院・講師   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------