様　式　C－19、F－19、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 26 年　 6 月 11 日現在

機関番号： １１３０１
研究種目： 挑戦的萌芽研究
研究期間： 2012～2013
課題番号： ２４６５９７４４
研究課題名（和文） 蝸牛における脂肪酸シグナルと老人性難聴

研究課題名（英文） The role of fatty acid signaling in the cochlea

研究代表者
高田　雄介（TAKATA, YUSUKE）

東北大学・医学（系）研究科（研究院）・非常勤講師

研究者番号：６０６２３９９９
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　1,700,000円、（間接経費）　510,000円

研究成果の概要（和文）：必須脂肪酸とその細胞内キャリアである脂肪酸結合タンパク質（fatty acid binding protein：Fabp）に着目し研究を行った。Fabp3ノックアウトマウスは聴力に関し表現型を認めなかったが、Fabp7ノックアウトマウスは加齢性難聴の進行が遅く、蝸牛の老化に伴う組織変性も軽度であった。Fabp7が量依存的に加齢性難聴の進行に関与することが示唆された。当研究により、①蝸牛のグリア系細胞に発現するFabp7が欠損すると加齢性難聴の進行が遅くなること、②Fabp7の欠損により脂質代謝に関与する遺伝子群の発現低下と、糖代謝に関与する遺伝子群の発現上昇が引き起こされることが示された。

研究成果の概要（英文）：The fatty acid-binding proteins (Fabps) bind to fatty acids and mediate their uptake and transport, thereby regulating metabolic pathways and gene expression. In the mouse cochlea, Fabp3 and Fabp7 have been identified. However, the role of these Fabps remains unknown. Wild-type, Fabp3 KO, and Fabp7 KO mice on the C57BL/6 background were used. Auditory thresholds were measured by the ABR. Cochlear morphology was assessed via HE staining, immunostaining, and TEM. Transcriptome analysis was also performed. Fabp3 (-/-) mice exhibited no auditory phenotypes. In contrast, the ABR thresholds of Fabp7 (-/-) mice were significantly reduced compared to Fabp7 (+/+) mice at 12 months. The numbers of SG neurons and fibrocytes were remarkably preserved in Fabp7 (-/-) mice at 12 and 15 months. Transcriptome analysis indicated that Fabp7 deficiency caused up-regulation of carbohydrate metabolism-related genes and conversely caused down-regulation of lipid metabolism-related genes.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学、耳鼻咽喉科学

キーワード： 脂肪酸結合タンパク質　Fabp　蝸牛　難聴　脂肪酸

１．研究開始当初の背景

加齢性難聴（ヒトでは老人性難聴）は老化に伴う進行的な感音性難聴である。高齢社会の進行に伴い患者数の増加が予想されるが、発症メカニズムに関して不明な点が多く、予防法・治療法は確立されていない。

必須脂肪酸であるアラキドン酸（ARA）やドコサヘキサエン酸（DHA）は、リン脂質として細胞膜を構成するのみならず、脂肪酸結合タンパク質（fatty acid binding proteins: Fabps）と結合して細胞内にも存在し、シグナル伝達制御、転写制御などを介して様々な生理現象に関わる。中枢神経領域では、ARA 高含有食餌の長期投与によりラットの空間学習能力が保持されることや[Kotani et al., 2003]、ARA 高含有食餌を摂取した母親の母乳で育ったラットの海馬神経新生が亢進すること[Maekawa et al., 2009]、DHA 欠乏条件下で飼育したラットに DHA を投与すると神経新生が亢進すること[Kawakita et al., 2006]などが報告されている。

一方、聴覚領域では、DHA 高含有食餌を摂取した母親の母乳で育ったラットの auditory brainstem conduction times が延長するという否定的な報告がされた[Haubner et al., 2002]後、新しい研究発表はなかった。ところが近年、omega-3 脂肪酸（DHA を含む）の高摂取が加齢性難聴を予防する可能性が疫学調査で示されたり[Gopinath et al., 2010]、Fabps のマウス蝸牛での発現が報告されるなど [Saino-Saito et al., 2010]、内耳蝸牛での必須脂肪酸機能が注目されている。

蝸牛においては Fabp3 と Fabp7 がらせん神経節神経細胞やコルチ器支持細胞に発現しており、これらの部位は加齢性難聴の主な病変部位と一致している。必須脂肪酸の欠乏や Fabps 異常に起因する脂質恒常性維持の破綻が、加齢性難聴の一因となることが推測されるが、これらを直接的に証明した報告はなかった。

２．研究の目的

(1) Fabp3・Fabp7 ノックアウト（KO）マウスに対し聴覚生理的解析と組織学的解析（蝸牛形態）、生化学的解析を行い、蝸牛における Fabps の機能解明を目指す。
(2) 上記 KO マウスから摘出したらせん神経節・コルチ器を利用し、neurosphere 法（選択的な神経幹細胞の培養方法）を確立する。培養液に ARA・DHA を添加し、培養細胞の増殖能や分化能を検討する。
(3) 野生型マウスである C57BL/6 系統に、ARA・DHA 高含有餌の長期投与を行う。その後に聴覚生理的解析と組織学的解析を行い、加齢性難聴の発症を抑制できるかを検討する。

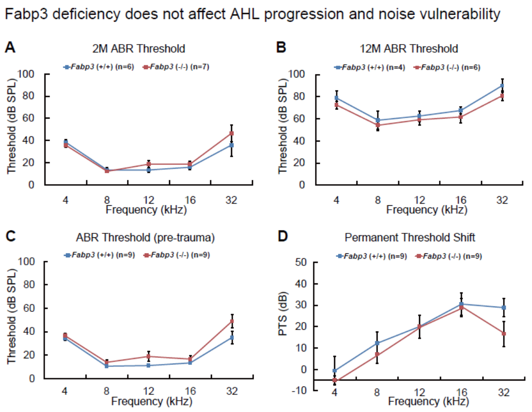
３．研究の方法

(1) C57BL/6 系統の野生型マウス、*Fabp3* KO マウスおよび *Fabp7* KO マウスを用いた。各群のマウスに対し、各タイムポイントにおいて聴性脳幹反応（ABR）で聴覚閾値を測定した。ABR 測定後に蝸牛を摘出し、免疫染色、HE 染色、surface preparation 法、透過電顕観察を行い蝸牛形態を評価した。各群の若年マウスに音響曝露を行って一過性（TTS）または恒久的な聴覚閾値上昇（PTS）を引き起こした後、ABR を測定した。更に、*Fabp7* KO マウスと野生型マウスに対し、DNA マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った。
(2) (3)については予備的検討の施行にとどまった。

４．研究成果

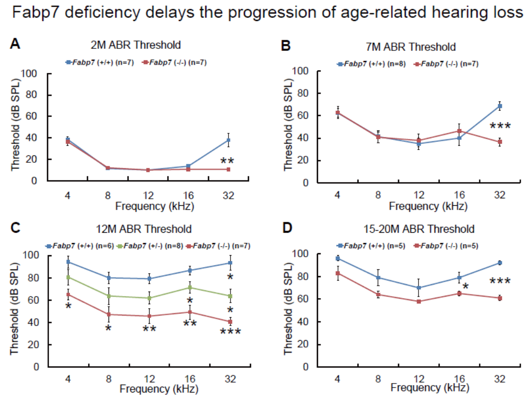
らせん神経節細胞とコルチ器支持細胞において発現する Fabp3 に関して、その KO マウスの聴力閾値は、老化後・音響曝露後（PTS 条件）ともに野生型と差を認めなかった（図 1）。

【図 1】*Fabp3* KO マウスの聴力解析



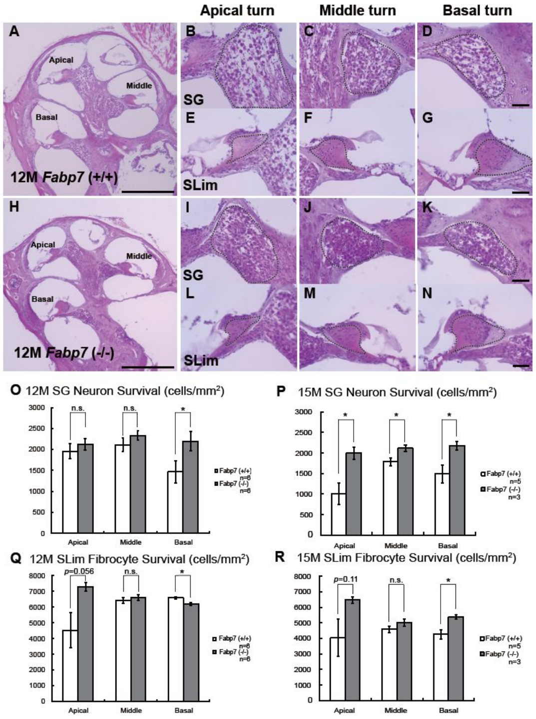
一方、らせん神経節衛星細胞、らせん靭帯・らせん板縁線維細胞、コルチ器支持細胞で発現する Fabp7 に関して、その KO マウスの聴力閾値は、難聴が著明となる 12 ヶ月齢において野生型マウスに比較し全音域で有意に低値であった。*Fabp7* ヘテロ KO マウスの聴力閾値は、*Fabp7* KO マウスと野生型マウスの中間程度であった（図 2）。

【図 2】*Fabp7* KO マウスの聴力解析



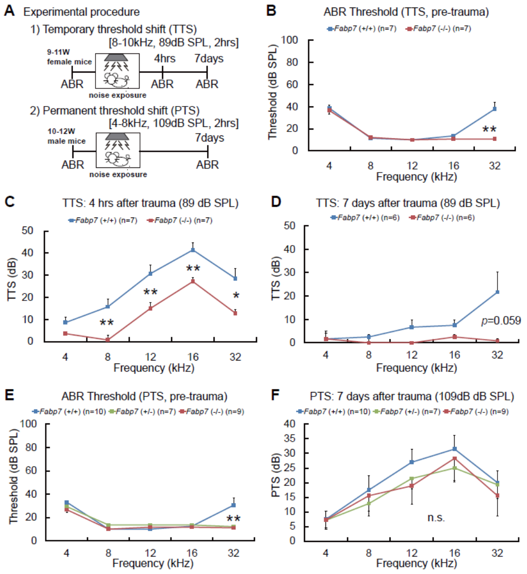
12～15 ヶ月齢において、*Fabp7* KO マウスでは加齢に伴う蝸牛構成細胞数の減少が軽度であった（図 3）。

【図 3】老齢 *Fabp7* KO マウスの蝸牛組織像



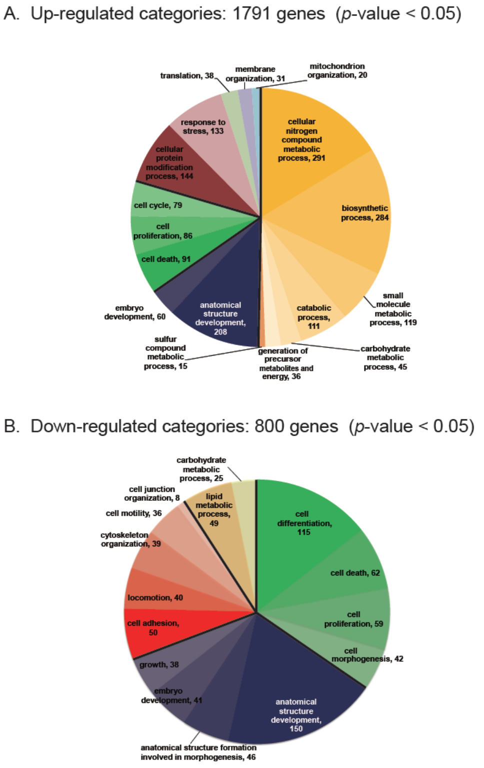
また、音響曝露（8-10kHz, 89dB SPL, 2hrs）後の *Fabp7* KO マウスの TTS は野生型に比較し有意に減少していた（図 4）。

【図 4】*Fabp7* KO マウスを用いた騒音暴露実験



７ヶ月齢の野生型および *Fabp7* KO マウスの蝸牛を用いたマイクロアレイ解析により、*Fabp7* KO マウスの蝸牛では、糖代謝やエネルギー産生に関与する遺伝子群の発現が上昇し、逆に脂質代謝に関与する遺伝子群の発現減少を認めた（図 5）。

【図 5】GO Slim analysis: “Biological Process”



Fabp7 KO マウスでは加齢性難聴の進行が遅延し、蝸牛の老化に伴う組織変性も軽度であり、Fabp7 が量依存的に加齢性難聴の進行に関与することが示唆された。当研究により、(1) 蝸牛の支持細胞・グリア系細胞に発現する Fabp7 が欠損すると加齢性難聴の進行が遅延すること、(2) Fabp7 の欠損により脂質代謝に関与する遺伝子群の発現低下と、糖代謝に関与する遺伝子群の発現上昇が引き起こされることが示された。

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. Suzuki J, Oshima T, Yoshida N, Kimura R, <u>Takata Y</u>, Owada Y, Kobayashi T, Katori Y, Osumi N. Preservation of cochlear function in Fabp3 (H-Fabp) knockout mice. Neurosci. Res. (2014, in press) 査読有

〔学会発表〕（計　5 件）

1. Suzuki J, Oshima T, Kimura R, Yoshida N, Yoshizaki K, <u>Takata Y</u>, Owada Y, Kawase T, Kobayashi T, Katori Y, Osumi N: Fatty Acid-Binding Protein 7 Deficiency Slows the Progression of Age-Related Hearing Loss in Mice by Modulating Metabolic Pathways, 37th ARO MidWinter

Meeting (San Diego,USA), 22-26 Feb, 2014.

2. 鈴木　淳、大島猛史、吉田尚弘、木村龍一、吉崎嘉一、高田雄介、大和田祐二、小林俊光、大隅典子：脂肪酸結合タンパク質の蝸牛における機能解析—聴覚アンチエイジングモデルマウスの発見—, 第 5 回聴覚アンチエイジング研究会（東京）, 2013 年 7 月 6 日
3. 鈴木　淳、大島猛史、吉田尚弘、木村龍一、吉崎嘉一、高田雄介、大和田祐二、小林俊光、大隅典子：脂肪酸結合タンパク質（Fabp）の蝸牛における機能解析 —加齢性難聴になりにくいマウスの発見—, 第 13 回日本抗加齢医学会総会（横浜）, 2013 年 6 月 28-30 日
4. 鈴木　淳、大島猛史、高田雄介、小林俊光：Fabp7 の蝸牛における機能解析　—加齢性難聴になりにくいマウスの発見—, 第22回日本耳科学会総会(名古屋), 2012 年 10 月 4-6 日
5. Suzuki J, Oshima T, Kimura R, Yoshizaki K, Takata Y, Owada Y, Kobayashi T, Osumi N: Lack of Fatty Acid Binding Protein7 Slows The Progression of Age-Related Hearing Loss In Mice, the 49th Workshop on Inner Ear Biology (Tubingen,Germany), 29 Sep- 02 Oct, 2012

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　1 件）
名称：加齢性難聴の発症／進行が遅延するモデル動物
発明者：鈴木　淳、大隅典子、高田雄介、大和田祐二
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-202027
出願年月日：2012 年 9 月 13 日
国内外の別：国内

○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：なし

６．研究組織
(1)研究代表者
　高田　雄介（TAKATA YUSUKE）
　東北大学・医学系研究科・非常勤講師
　研究者番号：60623999
(2)研究分担者：なし
(3)連携研究者：なし