

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861532

研究課題名(和文) 栄養源検知機構制御による新しい内耳障害予防戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of inner ear protection by nutrient regulation.

研究代表者

藤本 千里 (Fujimoto, Chisato)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60581882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい内耳障害の予防戦略を構築するため、mTORC1複合体シグナルに着目した。mTORC1を抑制すると、異常ミトコンドリアを排除するなど細胞内の品質管理に貢献するオートファジーが誘導される。我々は、mTORC1の下流シグナルであるオートファジーのモニターが可能であるGFP-LC3トランスジェニックマウスの蝸牛器官培養系を用い、有毛細胞においてオートファジー活性の検出系を確立し得た。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on mTORC1 complex signaling to establish a new method for inner ear protection. Inhibition of mTORC1 signaling induces autophagy, which contributes to the cellular quality control such as clearance of damaged mitochondria. We established the evaluation system of the autophagic activity in the cochlear hair cells by using cochlear explant culture of GFP-LC3 transgenic mice, which can monitor autophagy.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 内耳障害 オートファジー ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

内耳は聴覚および平衡覚の末梢受容器である。内耳障害は、薬物、加齢、騒音など様々な原因で生じるが、多くは不可逆性の障害であり有効な治療手段がない。聴覚系の不可逆性の障害は持続する難聴や耳鳴症状をもたらす。患者の生活の質は大きく低下する。内耳障害の原因の一部は、酸化ストレスとの関連が示唆されている。酸化ストレスは、生体内で生成する活性酸素種の酸化損傷力と生体内の抗酸化システムの抗酸化ポテンシャルとの差として定義される。

加齢性難聴や騒音性難聴においては、有毛細胞内の活性酸素種の増加が難聴を引き起こす可能性が示唆されており、近年、酸化ストレス制御による内耳障害の予防に関する研究が、動物実験において進められている。例えば加齢性難聴においては、活性酸素除去効果のあるビタミン C、ビタミン E の加齢性難聴予防、活性酸素除去効果のあるサプリメントの加齢性難聴予防効果、などの報告が挙げられる。また、カロリー制限・食餌制限が加齢性難聴を予防する分子メカニズムとして、ミトコンドリア脱アセチル化酵素 Sirt3 (sirtuin 3) が、カロリー制限による酸化ストレス性のラセン神経節細胞死・有毛細胞死の抑制に必須であることが解明された。

薬剤・加齢による内耳障害は、ミトコンドリアの機能障害も要因として考えられている。ミトコンドリアの機能障害は酸化ストレスの増大をもたらす。またミトコンドリア DNA は、活性酸素の生成部位の近傍に存在し、ヒストン構造を欠くために酸化傷害を受けやすく修復能が低い。ミトコンドリア DNA の修復機能を持つ polymerase に点変異が導入され、ミトコンドリア DNA の変異加速的に蓄積するマウスでは、早期から有毛細胞・ラセン神経節の変性を認める。

以上の背景から、本研究では、内耳における不良ミトコンドリアのクリアランス機構の解明が、内耳障害の予防に繋がるという着想のもとに、栄養源検知機構である mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナルに着目することにした。mTOR は、細胞内の栄養環境を感知し、細胞の増殖や代謝、生存における調節因子の役割を果たすセリンスレオニンキナーゼである。この酵素が形成する mTORC1 (mTOR Complex1) 複合体シグナルは、異常ミトコンドリアを排除するなど、恒常的に細胞質成分を入れ替えることで細胞内品質管理に貢献するオートファジーを誘導する。

2. 研究の目的

本研究では、内耳障害の予防戦略として、内耳における細胞内品質管理機構の解明を目指す。栄養源検知機構である mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル、その下流の細胞内成分分解機構であ

るオートファジーに着目し、内耳感覚細胞における機能解析および内耳障害に対する予防効果の検討を行う。

3. 研究の方法

本研究で行った具体的な研究方法は以下の通りである。

(1) マウス内耳器官培養系において、mTORC1 の下流シグナル応答を検出する実験系の確立を目指した。mTORC1 の下流シグナルであるオートファジーのモニターが可能である GFP (green fluorescence protein)-LC3 (MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain C) トランスジェニックマウスを導入した。本マウスでは、オートファゴソームの形成が LC3 のドット状の蛍光像 (LC3 dots) で確認できる。成齢 2-5 日の内耳器官培養系において、有毛細胞における LC3 dots の形成が確認できるかを検討した。

(2) 蝸牛有毛細胞におけるオートファジーの活性を見るため、成齢 2-5 日の内耳器官培養系に、リソソームプロテアーゼ阻害剤 pepstatin A と E64d を投与し、有毛細胞における非投与群と LC3 dots の蓄積を比較した。

(3) アミノグリコシド系薬剤による内耳有毛細胞障害の原因の一つとして、ミトコンドリアリボソームの障害によるミトコンドリア機能不全が考えられる。そこで、mTORC1 の下流シグナルであるオートファジーの細胞内分解機能に着目し、硫酸ゲンタマイシンによる内耳毒性を障害のモデルとし、で確立したオートファジー活性の評価系を用いて、アミノグリコシド毒性のオートファジーシグナルへの影響を検討した。

(4) mTORC1 阻害剤であるラパマイシン投与による有毛細胞でのオートファジー誘導を、で確立したオートファジー活性の評価系を用いて検討した。

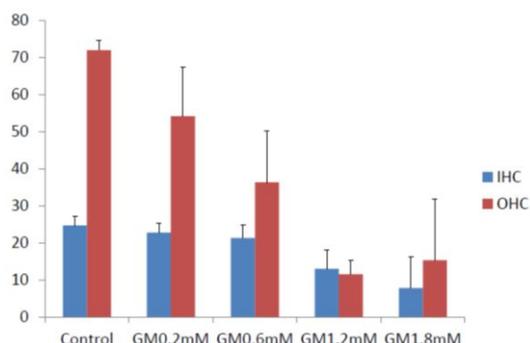
4. 研究成果

(1) GFP-LC3 トランスジェニックマウスの内耳器官培養系において、内・外有毛細胞で LC3 dots が多く形成されていた。内耳有毛細胞においてオートファゴソームが形成されていることが確認できた。

(2) GFP-LC3 トランスジェニックマウスの内耳器官培養系において、pepstatin A と E64d を 4 時間投与した群と、両薬剤の非投与群において、有毛細胞における LC3 dots の蓄積比較したところ、前者において LC3 dots の蓄積がより多く認められていた。よっ

て、内耳有毛細胞におけるオートファジーフラックスを確認でき、内耳有毛細胞においてmTORC1の下流シグナルであるオートファジー活性の検出系を確立しえた。

(3)



上は、成齢 2 日齢のマウス器官培養系に、硫酸ゲンタマイシン(GM)を 4 時間投与後 wash out し、一晚培養後の 200µm 中の内毛細胞(inner hair cell; IHC)、外毛細胞(outer hair cell; OHC)の細胞数を示した図である。硫酸ゲンタマイシン 0.6mM 投与群では、4 時間投与直後は有毛細胞の障害が認められないが、wash out し一晚培養後には外毛細胞の約 50%が障害されている。

このデータをもとに、硫酸ゲンタマイシン(0.2mM, 0.6mM) 4 時間投与群と非投与群において、それぞれ内耳有毛細胞におけるオートファジーフラックスを比較した。0.2mM 投与群、0.6mM 投与群ともに、4 時間投与直後の時点では、有毛細胞の障害は認められなかった。また、pepstatin A と E64d 投与による LC3 dots の蓄積量の変化は明らかではなかった。

(4)

ラパマイシン投与による有毛細胞でのオートファジー誘導については、現在検討を行っている。

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 19 件)

1. Kamogashira T., Fujimoto C., Yamasoba T. Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss. *Biomed Res Int.* 2015;2015:617207.
2. Fujimoto C., Egami N., Kinoshita M., Sugawara K., Yamasoba T., Iwasaki S. Idiopathic latent vestibulopathy: a clinical entity as a cause of chronic postural instability. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015 Jan;272(1):43-9.
3. Fujimoto C., Egami N., Kinoshita M., Sugawara K., Yamasoba T., Iwasaki S.

Involvement of vestibular organs in idiopathic sudden hearing loss with vertigo: An analysis using oVEMP and cVEMP testing. *Clin Neurophysiol.* 2015 May;126(5):1033-8.

4. Fujimoto C., Egami N., Demura S., Yamasoba T., Iwasaki S. The effect of aging on the center-of-pressure power spectrum in foam posturography. *Neurosci Lett.* 2015 Jan 12;585:92-7.

5. Ando M., Saito Y., Morikawa T., Omura G., Kobayashi K., Akashi K., Yoshida M., Ebihara Y., Fujimoto C., Fukayama M., Yamasoba T., Asakage T. Maxillary carcinosarcoma: Identification of a novel MET mutation in both carcinomatous and sarcomatous components through next generation sequencing. *Head Neck.* 2015 Mar 17.

6. Iwasaki S., Yamamoto Y., Togo F., Kinoshita M., Yoshifuji Y., Fujimoto C., Yamasoba T. Noisy vestibular stimulation improves body balance in bilateral vestibulopathy. *Neurology.* 2014 Mar 18;82(11):969-75.

7. Iwasaki S., Fujimoto C., Kinoshita M., Kamogashira T., Egami N., Yamasoba T. Clinical Characteristics of Patients With Abnormal Ocular/Cervical Vestibular Evoked Myogenic Potentials in the Presence of Normal Caloric Responses. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2014 Dec 21.

8. Inoue A., Iwasaki S., Fujimoto C., Nakajima T., Yamasoba T. Developmental changes in the protective effect of exogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 against ototoxic drugs in cultured rat vestibular ganglion neurons. *Cell Tissue Res.* 2014 May;356(2):299-308.

9. Fujimoto C., Yamasoba T. Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:582849.

10. Fujimoto C., Kamogashira T., Kinoshita M., Egami N., Sugawara K., Demura S., Yamasoba T., Iwasaki S. Power spectral analysis of postural sway during foam posturography in patients with peripheral vestibular dysfunction. *Otol Neurotol.* 2014 Dec;35(10):e317-23.

11. Fujimoto C., Egami N., Kinoshita M., Sugawara K., Yamasoba T., Iwasaki S. Postural stability in vestibular neuritis: age, disease duration, and residual vestibular function. *Laryngoscope.* 2014 Apr;124(4):974-9.

12. Sugawara K., Iwasaki S., Fujimoto C., Kinoshita M., Inoue A., Egami N., Ushio M., Chihara Y., Yamasoba T. Diagnostic usefulness of multifrequency tympanometry for Meniere's disease. *Audiol Neurootol.* 2013;18(3):152-60.

13. Nakaya M., Kimura Y., Onuki Y., Kida W., Shiraiishi A., Fujimoto C., Fuchigami T., Watanabe K., Abe K. Endoscopic-assisted

tonsillectomy. Laryngoscope. 2013 Feb;123(2):360-1.

14. Kinoshita M., Iwasaki S., Fujimoto C., Inoue A., Egami N., Chihara Y., Ushio M., Yamasoba T. Ocular vestibular evoked myogenic potentials in response to air-conducted sound and bone-conducted vibration in vestibular schwannoma. Otol Neurotol. 2013 Sep;34(7):1342-8.

15. Iwasaki S., Egami N., Inoue A., Kinoshita M., Fujimoto C., Murofushi T., Yamasoba T. Ocular vestibular evoked myogenic potential elicited from binaural air-conducted stimulations: clinical feasibility in patients with peripheral vestibular dysfunction. Acta Otolaryngol. 2013 Jul;133(7):708-13.

16. Inoue A., Iwasaki S., Ushio M., Chihara Y., Fujimoto C., Egami N., Yamasoba T. Effect of vestibular dysfunction on the development of gross motor function in children with profound hearing loss. Audiol Neurootol. 2013;18(3):143-51.

17. Fujimoto C., Murofushi T., Chihara Y., Ushio M., Suzuki M., Yamaguchi T., Yamasoba T., Iwasaki S. Effect of severity of vestibular dysfunction on postural instability in idiopathic bilateral vestibulopathy. Acta Otolaryngol. 2013 May;133(5):454-61.

18. Fujimoto C., Egami N., Kinoshita M., Sugasawa K., Yamasoba T., Iwasaki S. Factors affecting postural instability in Meniere's disease. Otolaryngol Head Neck Surg. 2013 Nov;149(5):759-65.

19. Chihara Y., Sato A., Ohtani M., Fujimoto C., Hayashi T., Nishijima H., Yagi M., Iwasaki S. The effect of a first-generation H1-antihistamine on postural control: a preliminary study in healthy volunteers. Exp Brain Res. 2013 Nov;231(3):257-66.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Fujimoto C., Iwasaki S., Egami N., Yamasoba T. THE EFFECT OF AGING ON THE CENTER-OF-PRESSURE SPECTRUM IN FOAM POSTUROGRAPHY. 13th Asia-Oceania ORL-HNS Congress.2015 年 3 月 19 日~2015 年 3 月 22 日、台北市。

2. 藤本千里:内耳有毛細胞におけるオートファジーの役割、第 8 回オートファジー研究会、2014 年 11 月 11 日~2014 年 11 月 12 日、札幌市。

3. 藤本千里、木下淳、鴨頭輝、木下淳、江上直也、牛尾宗貴、菅澤恵子、山嵜達也、岩崎真一:特発性両側性末梢前庭機能低下症の臨床経過と障害部位に関する検討、第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、2014 年 11 月 5 日~2014 年 11 月 7 日、横浜市。

4. 藤本千里、鴨頭輝、木下淳、岩崎真一、山嵜達也:酸素消費速度を指標としたマウスコルチ器のミトコンドリア機能評価、第 24 回

日本耳科学会総会・学術講演会、2014 年 10 月 15 日~2014 年 10 月 8 日、新潟市。

5. 藤本千里、岩崎真一、鴨頭輝、木下淳、江上直也、菅澤恵子、山嵜達也:末梢前庭障害患者におけるラバー負荷重心動揺検査のパワースペクトル解析、第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2014 年 5 月 14 日~2014 年 5 月 17 日、福岡市。

6. 藤本千里:末梢前庭障害患者の体平衡評価、第 13 回神奈川 Neuro-Otology 研究会(招待講演)、2014 年 2 月 20 日、横浜市。

7. 藤本千里、岩崎真一、江上直也、山嵜達也:めまいを伴う突発性難聴における末梢前庭機能の障害部位について、第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会、2013 年 11 月 23 日~2013 年 11 月 26 日、宮崎市。

8. Fujimoto C. Contribution of Vestibular Dysfunction to Postural Disorders in the Elderly. 2nd Joint World Congress of ISPGR and Gait and Mental Function (招待講演).2013 年 6 月 22 日~2013 年 6 月 26 日、秋田市。

9. 藤本千里、岩崎真一、木下淳、江上直也、菅澤恵子、山嵜達也:前庭神経炎患者のラバー負荷重心動揺検査所見に影響を及ぼす因子の検討、第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2013 年 5 月 15 日~2013 年 5 月 18 日、札幌市。

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本千里 (FUJIMOTO CHISATO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:60581882

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし