

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670737

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能障害による難聴の新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment strategy for deafness associated with mitochondrial impairment

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：CBAマウスに二酸化ゲルマニウムを投与して進行性難聴を作成した結果、apoptosisなどに関する遺伝子発現が増え、エネルギー代謝、聴覚などに関する遺伝子の発現が低下した。タウリン、水素水、CoQ10を投与し、その予防効果を調べたところ、タウリン、CoQ10、水素水の順に聴力低下は有意に抑えられ、組織の変性も抑えられた。ミトコンドリア3243位点変異の難聴患者に対してCoQ10、タウリン内服、水素水の投与を行っところ、大多数の症例で難聴の進行はほとんどないが、1例だけ急性増悪を示した。平衡障害は緩徐ではあるが、進行した。

研究成果の概要(英文)：CBA mice that were given germanium dioxide (GeO₂) orally developed progressive hearing loss and became deaf by 5 months. DNA microarray analysis demonstrated upregulation of genes associated with apoptosis, etc and downregulation of genes associated with energy metabolism, hearing, etc. QRT-PCR also confirmed downregulation of genes related to mitochondrial respiratory chain enzymes. Histopathologically, degeneration of the cochlear tissues, especially the stria vascularis and spiral ganglion, was observed in animals given GeO₂. When given also taurine, hydrogen-rich water, or CoQ10, the animals showed less hearing loss and cochlear degeneration, with taurine showing the strongest effect. When a combination of taurine, CoQ10, and hydrogen-rich water was given to patients with mitochondrial DNA 3243 point mutation, a majority of them showed little progression of hearing loss during follow-up period, and only one developed acute exacerbation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 ミトコンドリア 水素 タウリン コエンザイムQ10 ゲルマニウム

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物で唯一の酸素呼吸の場所であり、生体のエネルギー生産に重要な働きを担っている。ミトコンドリア遺伝子に変異が生じた場合、エネルギーに大きく依存している骨格筋、中枢神経、内耳などにおいて様々な症状が出現する。ミトコンドリア遺伝子変異では進行性難聴が生じやすいことが知られ、このうち3243位の点変異 (A>G) は最も頻度が高く、日本人の原因不明両側感音難聴の3%に認められる。3243位点変異では、変異率 (heteroplasmy) が数十%以上と高い場合ミトコンドリア脳筋症の MELAS を発症し、heteroplasmy が比較的低い (多くは30%以下) の場合には糖尿病と感音難聴 (MIDD) が生じる。

我々はミトコンドリアと難聴の関連についてこれまで研究を続けており、二酸化ゲルマニウム摂取によりミトコンドリア脳筋症と類似した内耳障害が作成できること (Yamasoba T, et al, *Neurosci Lett* 2006)、ミトコンドリア遺伝子障害の修復が出来ない遺伝子改変マウス (POLG) では内耳組織の apoptosis が早期に起こり、加齢に伴う難聴が早期から出現すること (Kujoth GC, et al, *Science* 2005; Someya S, et al, *Neurobiol Aging* 2008)、活性酸素・酸化ストレスの増加が老人性難聴を引き起こし、抗酸化物質である CoQ10 やアルファリポ酸が apoptosis に関わる Bak 遺伝子の発現を抑制し、老人性難聴の発症を遅延すること (Someya S, et al. *PNAS* 2009) を報告した。またヒトにおいて MIDD 患者の側頭骨病理から 3243 位点変異を検出することに初めて成功し、蝸牛では血管条が著明に変性し、有毛細胞とラセン神経節が次いで障害されること (Yamasoba T, et al. *Neurology* 1999)、MIDD 患者の難聴発症時期が heteroplasmy の程度と逆相関し、難聴の進行と相関しないこと (Yamasoba T, et al. *Laryngoscopy* 1996)、平衡障害は難聴の発症より 10 年以上遅れて生じるが、耳石器も半規管膨大部の両者共徐々に障害されること (Iwasaki S, et al, *Laryngoscope* 2011) を報告した。

水素ガスは活性酸素を除去し抗酸化作用を持つ。我々は水素水の摂取により音響外傷から内耳を保護できること (Lin Y, et al. *Neurosci Lett* 2011)、水素ガスを飽和させた培養液が蝸牛を薬剤性障害から保護すること (Kikkawa Y, et al. *Neuroreport* 2009) を報告した。CoQ10 は強力な酸化ストレス抑制因子であると同時にエネルギー代謝に不可欠な補酵素でもある。ミトコンドリア病にも試みられ、その機序は明らかではないが、一部の患者に一定の効果が報告されている。

タウリンはミトコンドリアを増やし、またミトコンドリアのみに異常を有するサイブリッド細胞をタウリンと共培養すると酸素消費能等の機能異常を改善する結果が得られたとされる。これら 3 つの薬剤・サプリメントは広く用いられて安全性が確立しており、安心して投与する事ができる。

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリア機能異常モデル動物を用いて、難聴の発現機序と酸化ストレスの関係および水素水・CoQ10・タウリンの効果を調べ、また MELAS・MIDD 患者の全身酸化ストレス状態と炎症状態を調べ、水素水・CoQ10・タウリン摂取により、酸化ストレスと炎症状態、難聴の進行、および糖尿病が改善するか検討する。

3. 研究の方法

動物実験

二酸化ゲルマニウム (0.15%) を CBA マウスに摂取させ、難聴の進行を経時的に ABR で調べ、難聴の確定した時点で断頭し、蝸牛の組織変化と遺伝子発現変化を調べた。

予防実験としては水素水、CoQ10、タウリンを投与した群と非投与群 (薬剤コントロール) に分け、水素水は水素の抜けない特殊なボトルで自由摂取とした。CoQ10 及びタウリンは食事に混入し、毎日 30mg/kg、300mg/kg 摂取するように調整した。

聴力はキシラジンとケタミンによる麻酔下に ABR により測定した。計測周波数は 4、8、16、32kHz とし、閾値周辺では 5dB ステップで double trace により閾値を決定した。治療開始前の 2 カ月齢にまず測定し、以後毎月聴覚評価を行い、治療群と非投与群の間に統計的に有意な差が出た段階で終了した。

組織検査は有意な聴力差が出た段階でマウスを断頭し、蝸牛を摘出・固定して行った。組織はパラフィン切片とし、有毛細胞、ラセン神経節細胞の細胞数の評価、および TUNEL 染色を行った。

ヒト臨床実験

対象患者は東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で経過観察している MELAS または MIDD 患者である。水素水・CoQ10・タウリンをすべて投与した群とコントロールを比較検討した。得られたデータは匿名化し、ネットに接続せず本研究用に設置したコンピューターに取り込み、集積後に解析した。

治療群には水素飽和水 1000ml、CoQ10 300mg、

タウリン3.06 gを継続して飲用させ、聴力は3カ月ごとに計測し、適宜語音聴力検査、歪耳音響放射（DPOAE）等を追加で行った。

4. 研究成果

CBA マウスに二酸化ゲルマニウムを投与して進行性難聴を作成した結果、3カ月の経過ではほぼ全例が高度難聴となり、4カ月で聾となった。組織を検討すると、血管条の変性が著明で、ラセン神経節細胞も減少し、支持細胞も空胞変性が目立ったが、有毛細胞の変性は限られていた。透過電子顕微鏡では血管条や支持細胞にゲルマニウムを取りこんだミトコンドリアが見られ、空胞変性していた。DNA マイクロアレイでの遺伝子発現を見ると、ゲルマニウム投与動物の蝸牛ではコントロールに比べ、apoptosis や inflammation などに関する遺伝子発現が増加し、エネルギー代謝、聴覚、神経伝達、DNA 修復などに関する遺伝子の発現が低下していた。さらにミトコンドリア呼吸鎖複合体の代表的遺伝子5つの蝸牛内の発現を定量的 RT-PCR で見たところ、ゲルマニウム投与動物で有意に発現が低下していた。

タウリン、水素水、CoQ10 をゲルマニウム投与動物に摂取させて、蝸牛変性・難聴の予防効果を調べたところ、ABR の閾値上昇はタウリン、CoQ10、水素水の順に有意に抑えられていた。組織の変性も抑えられ、血管条の厚さ、ラセン神経節細胞は有意に温存されていたが、その効果もタウリン、CoQ10、水素水の順であった。

ミトコンドリア 3243 位点変異の難聴患者に対して CoQ10、タウリン内服、水素水の投与を行っところ、大多数の症例で難聴の進行はほとんど見られなく、コントロールと比して若干進行が遅い傾向にあったが、有意ではなかった。経過観察中、1例だけ一側の聴力の急性増悪を示し、入院加療でも回復しなかった。平衡障害は緩徐ではあるが、進行しており、数年の経過で温度眼振における眼振数の低下、c - VEMP の消失などが見られた。

以上の結果から、タウリン、CoQ10、水素水はミトコンドリア機能障害による進行性難聴に対して予防効果があることが示唆された。今後臨床ではさらに長期経過観察を行い、有効性を確立する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Fujimoto C, Yamasoba T. Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing

loss. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2014, Article ID 582849,

2. Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T. Reactive Oxygen Species, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss. BioMed Research International. 2015:617207
3. 山岨達也. 加齢に伴う聴覚障害. Audiology Japan 57:52-62, 2014
4. 山岨達也. 耳鼻咽喉科のアンチエイジング. 老人性難聴の予防. Therapeutic Research 35:808-810,2014
5. 山岨達也. 難聴の基礎と臨床, Anti-aging medicine 10:916-924,2014
6. Sakamoto T, Yamasoba T. Current Concepts of the Mechanisms in Age-Related Hearing Loss. J Clin Exp Pathol. 5 : 2161-0681, 2015
7. Yamasoba T. Interventions to Prevent Age-Related Hearing Loss. Josef Mille, Colleen G Le Prell, Leonard Rybak (Eds) Free Radicals in ENT Pathology. Springer International Publishing. pp335-349, 2015

〔学会発表〕(計2件)

1. Yamasoba T, Kashio A, Yamada C, Kamogashira T, Fujimoto C, Someya S. Prevention of cochlear damage due to GeO2-induced mitochondrial dysfunction by antioxidants. CORLAS annual meeting: Aug.23-26, 2015: San Francisco (USA)
2. Yamasoba T. The effect of mitochondrial damage on hearing loss. Gwangju Otology & Neurotology Symposium: Nov.1, 2015: Gwangju (Korea)

〔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

山岨 達也 (YAMASOBA, Tatsuya)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 60251302

(2)研究分担者

中島 敏明 (NAKAJIMA, Toshiaki)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録員

研究者番号：50227790