

Title	内耳特異的オートファジー欠損モデルマウスを用いた蝸牛における恒常性維持機能の解析
Sub Title	Homeostasis with inner ear specific autophagy deficit model mice
Author	小島, 敬史(Kojima, Takashi) 神崎, 晶(Kanzaki, Sho) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 三井, 綾乃(Mitsui, Ayano)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	蝸牛におけるオートファジーの活性化部位の同定と, その生理的機能を明らかにすることを目的とした。GFP-LC3レポーターマウスを用いて蝸牛におけるオートファジー活性可視化を試みたところ, 外有毛細胞を含む蝸牛感覚上皮に恒久的オートファジーが生じていることが示唆された。有毛細胞特異的オートファジー欠損マウスは高音優位な進行性難聴を認めた。また, 4-HNEを用いた免疫組織染色で, オートファジーによる蝸牛有毛細胞での酸化ストレスに対する保護作用が示唆された。蝸牛有毛細胞においてオートファジーは有毛細胞を保護する作用を有しており, とくに酸化ストレス抑制を介して細胞老化を抑制している可能性がある。 The purpose of this research was to identify the location and physiologic function of autophagy in the cochlea. We tried to visualize autophagy-activated area in the cochlea. GFP-LC3 reporter mouse revealed autophagy-activation at the cochlear neuroepithelium including outer hair cell. Then, outer hair cell specific autophagy deficit model mouse showed progressive high-frequency hearing loss. Also, immunostaining with 4-HNE indicated the protective action of autophagy against oxidative stress in outer hair cell. At outer hair cell, autophagy may maintain homeostasis to the external environment. Suppressive function of autophagy against oxidative stress may inhibit cellular aging in the cochlea.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2015 ~ 2016 課題番号 : 15K20223 研究分野 : 耳科, 聴覚医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20223seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 9 年 6 月 2 日現在

機関番号 : 3 2 6 1 2

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2015 ~ 2016

課題番号 : 1 5 K 2 0 2 2 3

研究課題名 (和文) 内耳特異的オートファジー欠損モデルマウスを用いた蝸牛における恒常性維持機能の解析

研究課題名 (英文) Homeostasis with Inner Ear Specific Autophagy Deficit Model Mice

研究代表者

小島 敬史 (Kojima, Takashi)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・共同研究員

研究者番号 : 6 0 5 2 8 6 6 0

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) : 蝸牛におけるオートファジーの活性化部位の同定と、その生理的機能を明らかにすることを目的とした。

GFP-LC3レポーターマウスを用いて蝸牛におけるオートファジー活性可視化を試みたところ、外有毛細胞を含む蝸牛感覚上皮に恒久的オートファジーが生じていることが示唆された。有毛細胞特異的オートファジー欠損マウスは高音優位な進行性難聴を認めた。また、4-HNEを用いた免疫組織染色で、オートファジーによる蝸牛有毛細胞での酸化ストレスに対する保護作用が示唆された。

蝸牛有毛細胞においてオートファジーは有毛細胞を保護する作用を有しており、とくに酸化ストレス抑制を介して細胞老化を抑制している可能性がある。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of this research was to identify the location and physiologic function of autophagy in the cochlea.

We tried to visualize autophagy-activated area in the cochlea. GFP-LC3 reporter mouse revealed autophagy-activation at the cochlear neuroepithelium including outer hair cell. Then, outer hair cell specific autophagy deficit model mouse showed progressive high-frequency hearing loss. Also, immunostaining with 4-HNE indicated the protective action of autophagy against oxidative stress in outer hair cell.

At outer hair cell, autophagy may maintain homeostasis to the external environment. Suppressive function of autophagy against oxidative stress may inhibit cellular aging in the cochlea.

研究分野 : 耳科、聴覚医学

キーワード : 内耳 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーの現象そのものは古くから知られており、哺乳類でも 1960 年代から報告されていた。その実態は永らく謎に包まれていたが、遺伝学や分子生物学・発生工学的アプローチによって昨今急速に解明が進み、その重要性が次々と明らかにされている。例えば肝細胞においては異常蛋白の蓄積をきたし腫瘍発生の一因と考えられ(Komatsu et al 2005)、神経細胞ではオートファジー機能障害によるアミロイドやグルタミン、異常ミトコンドリアの蓄積が神経変性疾患の病態と深く関わっていることが示唆されている。しかし、蝸牛におけるオートファジーの生理的意義はほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では蝸牛におけるオートファジーの活性化部位の同定と、蝸牛・末梢聴覚系におけるオートファジーの in vivo での役割を明らかにすることを第一の目的とした。また予備実験で蝸牛感覚上皮において酸化ストレスとの関連性が示唆されていたため、遺伝子改変動物を用いてその詳細を検討し、蝸牛におけるオートファジーの生理的意義と、蝸牛疾患、すなわち内耳性難聴におけるオートファジーの治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

当研究では細胞内代謝系の 1 つであり、細胞の恒常性維持に必須の機能であるオートファジーが蝸牛においていかなる生理的意義を持つか生体レベルで明らかにする。まず蝸牛内での生理現象としてのオートファジー活性をレポーターマウスを用いて in vivo で示し、続いて条件付けノックアウトマウスを用いて loss of function 解析することによりその作用機序に迫ることとした。

具体的には、以下の研究を行った。

(1) GFP-LC3 レポーターマウスを用い、蝸牛におけるオートファジー活性を可視化し、時空間的な蝸牛内におけるオートファジー活性の変化を解析した。
本マウスにおいては、オートファゴソーム構成タンパクである LC3 に蛍光色素の GFP を融合させたレポーター遺伝子が全身に発現している。このタンパクはオートファジーが実行される際に細胞内に凝集体を形成することが知られているため、GFP 凝集体の経時的発現を観察することでオートファジーの可視化が概ね可能となっている。

(2) 内耳有毛細胞特異的ノックアウトマウスとし

て Pou4f3Cre; flox-Atg7 を樹立し、有毛細胞選択的に、オートファジー実行に必須な遺伝子である Atg7 を欠損したマウスを作製した。このマウスに於いて、経時的な聴力および組織学的変化を観察した。

(3) (2)の結果から両側進行性難聴が誘導され、加齢性難聴の進行が促進している所見とも考えられた。オートファジーはタンパク質や小器官の品質維持を行う細胞内でのクリアランス系として機能し、近年、ミトコンドリアの品質維持機構としてもオートファジーが働くことが示されている。加齢性難聴のメカニズムとして酸化ストレスの関与が古くから言われていることを鑑み、今回、オートファジー欠損マウスでの酸化ストレスを、酸化ストレス発生時の代謝産物に対する免疫組織化学染色を行うことで検討した。

(4) 内耳神経節有毛細胞ノックアウトマウスとして Ngn1Cre; flox-Atg7 を樹立し、神経節細胞でオートファジー実行に必須な遺伝子である Atg7 を欠損したマウスを作製した。このマウスにおいて、聴力および組織学的変化を観察した。

4. 研究成果

(1) GFP-LC3 レポーターマウスの解析では、レポーター活性を外有毛細胞を含む蝸牛感覚上皮に認め、恒久的オートファジーが生じていることが示唆された。

(2) 有毛細胞特異的な Atg7 のノックアウトマウスを作製し、その表現形を検討することとしたところ、有毛細胞特異的オートファジー欠損マウスは 8 週齢で同腹対照群と比べて高音に優位な進行性難聴を認めた (Fig. 1)。組織学的検討を行ったところ、基底回転を中心にコルチ器の脱落と scar formation の像を認めた (Fig.2)。

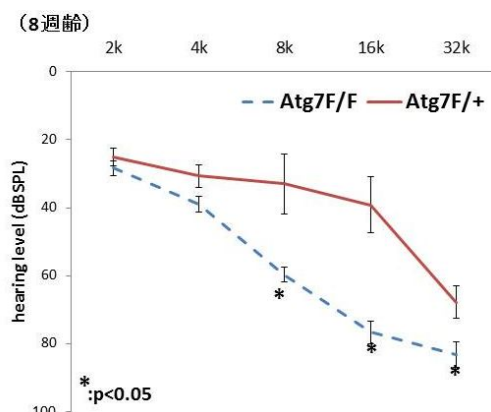


Fig. 1 有毛細胞特異的オートファジー欠損モデルマウスにおける早期難聴

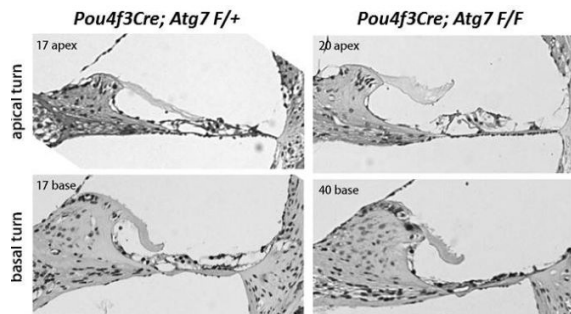


Fig. 2 オートファジー欠損モデルマウスにおける蝸牛有毛細胞の消失

この難聴は進行性であり、32 週齢では水平型の難聴を呈していた。また、高齢になるとその聴力は同腹対照群と有意差を認めなくなり、加齢性難聴が促進している所見として矛盾のないものだった。

(3) 酸化ストレスによる代謝産物である 4-HNE を免疫組織染色で検討したところ、有毛細胞特異的オートファジー欠損においては、とくに外有毛細胞での 4-HNE の濃染を認め、オートファジーによる蝸牛有毛細胞での酸化ストレスに対する保護作用が示唆された(Fig.3)。

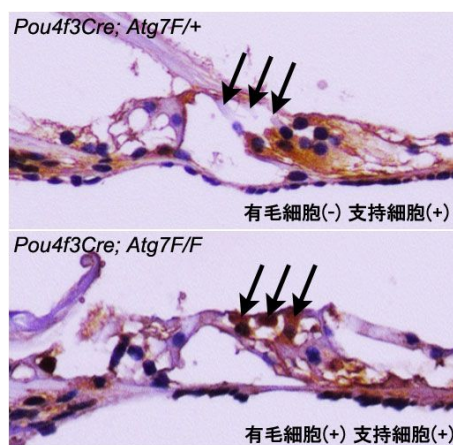


Fig. 3 蝸牛外有毛細胞では Atg7 欠損により、酸化ストレスが亢進する。(内有毛細胞にはこの所見は認められない。)

(4) (1) の解析から、有毛細胞に加えて蝸牛らせん神経節細胞においても基底レベルでのオートファジー活性が見出されていた。そこで神経節細胞でのオートファジーの機能を検討すべく、蝸牛内では神経節細胞に特異的に発現する Ngn1-Cre マウスと flox-Atg7 マウスを交配した。本 Ngn1-Cre; Atg7 F/F においては、らせん神経節でオートファジー活性が欠損していることがわかった。

続いて聴力を測定したが、F/F マウスは、同腹対照群とわずかに聴力閾値が高い傾向があるものの、同腹対照群と比較して有意差は認めなかった(Fig.4)。

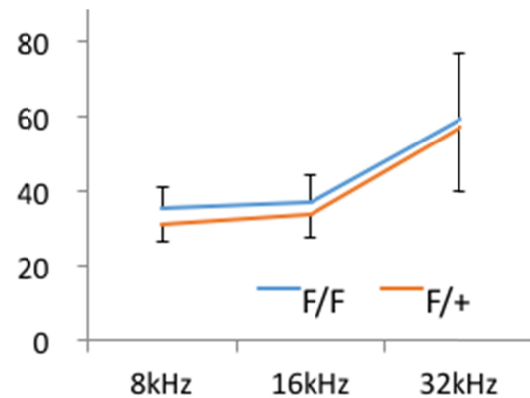


Fig.4 らせん神経節での Atg7 欠損は、ABR 聴力閾値を上昇させる傾向にあるものの、同腹対照群と比べて有意差を認めなかった。(F/F: N= 7, F/+ : n=9、 Error bar は SD)

組織学的にもらせん神経節の細胞数に同腹対照群と比較して差を認めなかった。

以上をまとめると、本研究の結果から、蝸牛有毛細胞においてオートファジーは有毛細胞を保護する、細胞維持作用を有しており、とくに酸化ストレス抑制を介して細胞老化を抑制している可能性を有している。

加齢性難聴との関係を中心に、今後、さらなる検討を加えていきたい。

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 0 件)

(学会発表) (計 0 件)

(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]

ホームページ等

<http://www.ent.med.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 敬史 (KOJIMA, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 60528660

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
神崎 晶 (KANZAKI, Sho)
藤岡 正人 (FUJIOKA, Masato)
三井 綾乃 (MITSUI, Ayano)