

オートファジーはマウスの聴覚に重要である

1. 発表者：

藤本 千里（東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教）
山嵜 達也（東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 感覚・運動機能講座
耳鼻咽喉科学分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆オートファジー（注1）に必須の遺伝子である autophagy-related 5 (*Atg5*) を有毛細胞にて欠損させたマウスは、先天性の高度難聴の聴力像を呈し、蝸牛有毛細胞（注2）の障害を認めました。
- ◆蝸牛有毛細胞における恒常的オートファジーが、マウスの聴覚と細胞形態の維持に重要な役割を果たすことを示しました。
- ◆オートファジーと聴覚障害の病態形成との関連性について、さらなる研究の進展が期待されます。

3. 発表概要：

聴覚系の感覚細胞である、蝸牛有毛細胞は一度障害されると機能的回復は困難であり、その生存・恒常性維持は聴覚機能に非常に重要です。

東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の藤本千里助教、山嵜達也教授らは、細胞の恒常性維持に重要であるオートファジーが、マウスの聴覚機能に重要な役割を果たすことを明らかにしました。

藤本助教らは、オートファジーに必須の分子である autophagy-related 5 (*Atg5*) を有毛細胞にて欠損させた遺伝子改変マウスを作製し、有毛細胞におけるオートファジー活性が聴覚機能および細胞形態に及ぼす影響を検討しました。有毛細胞における *Atg5* の欠損により、マウスは先天性の高度難聴を呈しました。また、*Atg5* 欠損マウス有毛細胞の組織学的検討では、14日齢において聴毛の変性、および一部の細胞の脱落を認めました。8週齢においては、有毛細胞の変性がさらに進行していました。

本研究により、有毛細胞における恒常的オートファジーは聴覚機能および細胞形態の維持に重要であることが示されました。オートファジーと聴覚障害の病態形成との関連性について、さらなる研究の進展が期待されます。

なお、本研究は、日本時間 5月11日に英国科学雑誌「Cell Death & Disease」にて発表されました。

4. 発表内容：

①研究の背景

内耳の感覚細胞である有毛細胞は、さまざまな特化された微細構造を持ち、音や加速度といった機械的刺激を生体内の電気信号に変換するという非常に巧妙な機能を担いますが、細胞分裂せず一度障害を受けると機能的再生が困難なため、障害の多くは不可逆的です。このため、有毛細胞においては、細胞の恒常性維持・機能維持が特に重要と考えられます。オートファジーは細胞内のバルク分解系（注3）であり、恒常的に細胞質成分を入れ替えることで細胞内品

質管理に貢献しています。近年オートファジーは、さまざまな生命現象や病態との関連が指摘されていますが、内耳有毛細胞における役割については全く知られていません。オートファジー関連疾患である Vici 症候群は、後生動物に特異的なオートファジーの関連遺伝子である ectopic P granules protein 5 (EPG5) を責任遺伝子とする先天性多臓器疾患であり、その一部の患者に感音難聴を認めるという報告があります。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかになっていません。

②研究内容

本研究では、細胞内品質管理を担う恒常的オートファジーの機能が、有毛細胞の機能維持に非常に重要な役割を保持している可能性を考え、蝸牛有毛細胞における恒常的オートファジーの生理機能について検討を行いました。

まず、POU domain, class 4, transcription factor 3 (*Pou4f3*) -Cre トランスジェニックマウスと floxed *Atg5* マウスを用いて、Cre-loxp システム (注 4) によって蝸牛有毛細胞にてオートファジーが欠損するコンディショナルノックアウトマウス (注 5) (*Atg5^{lox/lox};Pou4f3-Cre* マウス) を作製しました。このマウスの蝸牛有毛細胞にて実際にオートファジーが欠損しているかを確認するため、オートファジー不全によって生じるユビキチン-p62 陽性封入体形成 (注 6) を観察しました。ノックアウトマウス群 (*Atg5^{lox/lox};Pou4f3-Cre* マウス群) とヘテロ対照群 (*Atg5^{lox/+};Pou4f3-Cre* マウス群) において、有毛細胞内の封入体数を比較したところ、ノックアウトマウス群では、5 日齢と 14 日齢のいずれにおいても、ヘテロ対照群に比べ封入体数が多く、ノックアウトマウス群における 5 日齢と 14 日齢の比較では、14 日齢が 5 日齢に比べて多いという結果でした (図 1)。一方、ヘテロ対照群においては、5 日齢と 14 日齢のいずれも、封入体数は少なく、両日齢間で差は認めませんでした (図 1)。

次に、ノックアウトマウスの聴覚機能を調べるため、14 日齢、4 週齢、8 週齢において、ノックアウトマウス群とヘテロ対照群で、聴性脳幹反応における聴力閾値を比較しました。14 日齢、4 週齢、8 週齢いずれにおいても、ヘテロ対照群が正常聴力である一方で、ノックアウトマウス群は高度難聴を呈しました (図 2)。

また、ノックアウトマウス群とヘテロ対照群で、有毛細胞の組織学的検討を行ったところ、ノックアウトマウス群は、5 日齢では正常形態でしたが、14 日齢では多くの聴毛の障害、および一部の細胞の脱落を認めました (図 3)。8 週齢では、多くの有毛細胞の脱落を認め、有毛細胞の変性がさらに進行していました。 (図 3)。

以上より、蝸牛有毛細胞において恒常的オートファジー不全を来す *Atg5^{lox/lox};Pou4f3-Cre* マウスが、有毛細胞障害および先天性の高度難聴を呈することが示されました。恒常的オートファジーがマウスの聴覚機能と有毛細胞の形態維持に重要な役割を果たすことが明らかとなりました。

③社会的意義

本研究は、蝸牛有毛細胞における恒常的オートファジーがマウスの聴覚機能に重要であることを示した世界初の報告です。近年、オートファジーと、神経変性疾患、2 型糖尿病等の生活習慣病、発がん、先天性多臓器疾患等などの病態の発症との密接な関連が、オートファジー関連遺伝子の改変マウスを用いた研究や、ヒト遺伝子解析研究などにより報告されています。今回の研究報告を足がかりとして、オートファジーと聴覚障害の病態形成との関連性について、さらなる研究の進展が期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Cell Death & Disease（オンライン版）

論文タイトル：Autophagy is essential for hearing in mice.

著者：Chisato Fujimoto*, Shinichi Iwasaki, Shinji Urata, Hideaki Morishita, Yuriko Sakamaki, Masato Fujioka, Kenji Kondo, Noboru Mizushima and Tatsuya Yamasoba*

DOI 番号：10.1038/cddis.2017.194

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

助教 藤本 千里（ふじもと ちさと）

教授 山嵜 達也（やまそば たつや）

Tel：03-5800-8665（医局直通）

E-mail：cfujimoto-tky@umin.ac.jp（藤本）／ tyamasoba-tky@umin.ac.jp（山嵜）

<取材に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター

担当：小岩井、渡部

Tel：03-5800-9188（直通） E-mail：pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）オートファジー

細胞質成分をリソソームに輸送し分解するシステムであり、細胞内の主要分解機構の一つである。オートファジーの膜動態は以下の2つの過程からなる。まず、細胞質に出現する隔離膜と呼ばれる膜区画が細胞質成分を包み込み、約1 μ mの2重膜構造であるオートファゴソームとなる。次に、オートファゴソームの外膜にリソソームが融合し、流入した加水分解酵素が内膜と包み込んだ内容物を分解する。

（注2）蝸牛有毛細胞（かぎゅうゆうもうさいぼう）

内耳にあり、聴覚をつかさどる感覚器官である蝸牛に存在する、感覚受容器細胞である。

（注3）バルク分解系

オートファジーでは、オートファゴソーム内の空間にあるタンパク質やオルガネラをまとめて分解するため、オートファジーによる分解は、バルク分解系と呼ばれている。

（注4）Cre-loxP システム

loxP 配列と呼ばれる DNA 配列に対し、バクテリオファージ P1 由来の DNA 組換え酵素 Cre が働くことにより生じる部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験系である。人工的に2個の loxP を染色体 DNA の中に挿入しておいた細胞に対し、Cre を発現させると、loxP に挟まれた DNA 領域が不可逆的に除去される。

（注5）コンディショナルノックアウトマウス

特定の遺伝子について、臓器・時期特異的な欠失・改変操作がなされるように作製されたマウスである。

(注 6) ユビキチン-p62 陽性封入体形成

p62 は、オートファジーの選択的分解基質であり、LC3 結合ドメインとユビキチン結合ドメインを有するタンパク質である。オートファジー不全の細胞においては、p62 が蓄積し、ユビキチン-p62 陽性の封入体を形成する。

8. 添付資料 :

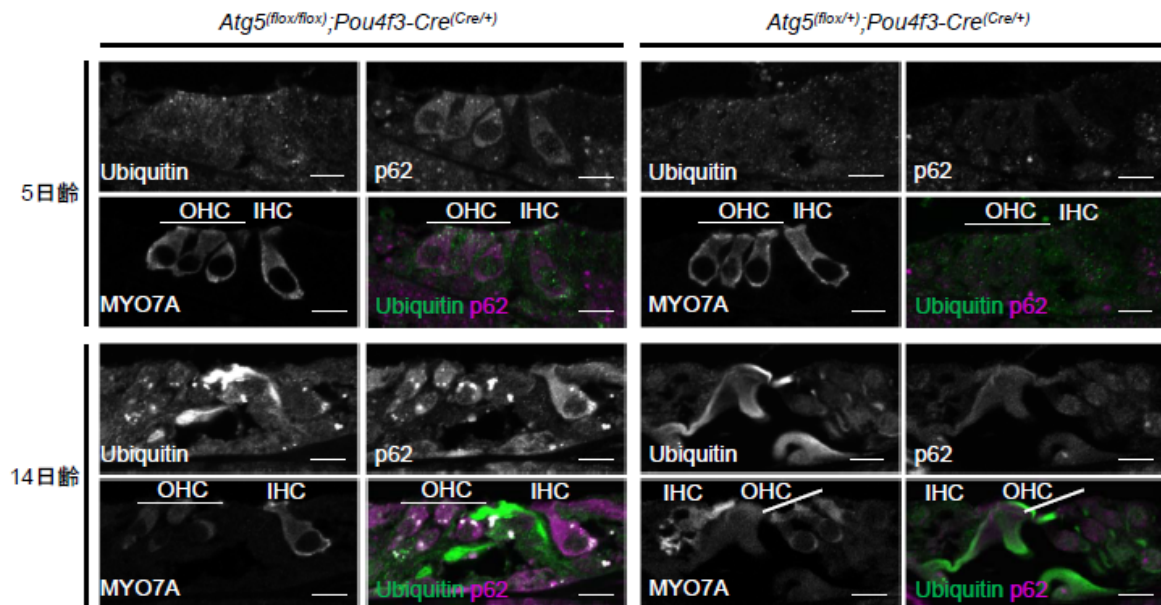


図1 ノックアウトマウス群 (*Atg5(flox/flox); Pou4f3-Cre(Cre/+)*) とヘテロ対象群 (*Atg5(flox/+); Pou4f3-Cre(Cre/+)*) におけるユビキチン-p62封入体形成。MYO7A, ミオシン7a, IHC, 内有毛細胞; OHC, 外有毛細胞。スケールバー: 10 μ m.

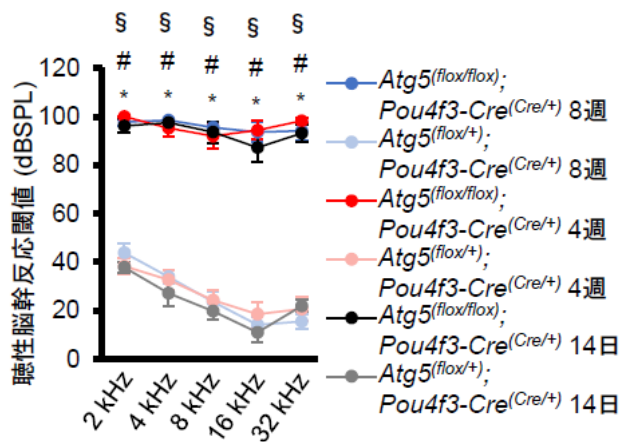


図2 ノックアウトマウス群 (*Atg5^(flox/flox); Pou4f3-Cre^(Cre/+)*) とヘテロ対象群 (*Atg5^(flox/+); Pou4f3-Cre^(Cre/+)*) における聴性脳幹反応閾値の比較。*P < 0.001 (14日齢); #P < 0.001 (4週齢); § P < 0.001 (8週齢).

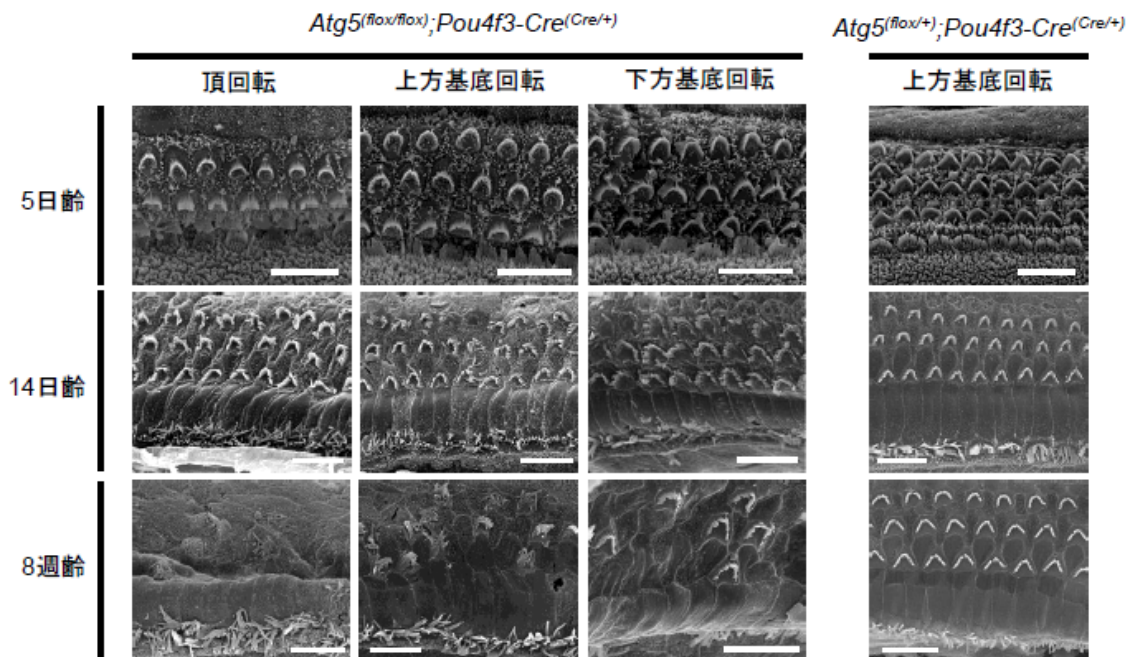


図3 ノックアウトマウス群 (*Atg5^(flox/flox); Pou4f3-Cre^(Cre/+)*) とヘテロ対象群 (*Atg5^(flox/+); Pou4f3-Cre^(Cre/+)*) における走査型電子顕微鏡所見。スケールバー: 10 μ m.