

論文内容の要旨

論文提出者氏名 毛利 宏 明

論文題目

Nox3-derived superoxide in cochleae induces sensorineural hearing loss

論文内容の要旨

【背景】感音難聴は、感覚神経障害中最も多い疾患であるが、根本的な治療法が確立されていない。加齢性難聴、騒音性難聴、薬剤性難聴など種々の後天性感音難聴の発症に活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) が関与するという報告が蓄積されているが、ROS に注目した個体レベルでの内耳研究は限られている。活性酸素産生酵素 (NADPH oxidase: Nox) はヒトでは7種存在する。その中で、内耳特異的 Nox である Nox3 由来の ROS が耳石形成に必須であることは、恒常的に頭位傾斜を呈する自然発症 Nox3 変異マウス (head-tilt mouse) の存在により明らかにされている。しかし、Nox3 の発現を検出する有用な抗体はなく、内耳における Nox3 の発現細胞や機能・機序の詳細は不明であった。本研究では、マウス内耳 (特に蝸牛) における Nox3 の発現局在を明らかにし、Nox3 由来 ROS による難聴発症機序の解明を試みた。

【方法】まず、Nox3 の promoter の下流の Exon1 に Cre recombinase を挿入したノックインマウス (Nox3-Cre KI) を作製、Cre recombinase の存在下で tdTomato を発現するレポーターマウス (CAG-STOP^{lox}-tdTomato) と交配し、Nox3 発現細胞が tdTomato で標識されるマウス (Nox3-Cre;tdTomato) を作出した。本研究では、Nox3 による ROS 産生が残存するヘテロ Nox3 ノックアウト (KO) マウス (Nox3-Cre^{+/+};tdTomato^{+/+}) と Nox3 由来の ROS 産生が消失する Nox3 KO マウス (Nox3-Cre^{+/+};tdTomato^{+/+}) を用い、内耳における Nox3 発現細胞を経時的に同定した。次に、野生型と Nox3-KO マウスを用い、加齢や音響暴露、耳毒性薬物 (シスプラチン) によって生じる後天性感音難聴における Nox3 由来の ROS が果たす役割を評価した。具体的には、Auditory brainstem response (ABR) を用いた聴力、外有毛細胞残存率、TUNEL 法を用いた外有毛細胞アポトーシス、および内毛細胞におけるリボンシナプス数の比較検討を行った。加えて、これらの後天性感音難聴の中で、Nox3 の関与の程度を、野生型と Nox3-KO マウスの ABR 閾値比の比較検討にて評価した。更に、加齢や音響暴露、シスプラチンにより Nox3 の発現が、蝸牛のどの部位でどう変化し、どのような機序で難聴をきたしているかを、レポーターシステム (Nox3-Cre^{+/+};tdTomato^{+/+} と Nox3-Cre^{+/+};tdTomato^{+/+}) を用い、tdTomato 陽性細胞を指標にして解析した。最後に、シスプラチン投与による難聴と加齢の関係性を、ABR による聴力と蝸牛における tdTomato 陽性細胞を用いて評価した。

【結果】内耳において、Nox3 はまず E18.5 で内リンパ嚢と内リンパ管に、P0 で平衡

斑や半規管に発現し、その後、蝸牛 (基底回転優位) に発現が認められた。蝸牛においては、コルチ器の有毛細胞やそれを解剖的に支える支持細胞、聴覚の第一ニューロンであるラセン神経節細胞、および外側壁のルート細胞で Nox3 の発現が認められた。加齢・音響暴露・シスプラチンのいずれにおいても、野生型に比して Nox3-KO マウスで高音域における難聴の程度が有意に抑制され、基底回転の外有毛細胞が有意に残存していた。Nox3-Cre^{+/+};tdTomato^{+/+} (ヘテロ Nox3-KO) では、加齢・音響暴露・シスプラチンのいずれにおいても、蝸牛基底回転で Nox3 を発現するコルチ器支持細胞が有意に増加した。一方で、Nox3 による ROS 産生のない Nox3-Cre^{+/+};tdTomato^{+/+} (Nox3-KO) では、支持細胞に加え、Nox3 を発現する外有毛細胞が基底回転で有意に増加した。これらの結果により、基底回転における支持細胞や外有毛細胞から発現する Nox3 が後天性感音難聴において、本質的な役割を果たすことが明らかとなった。同時に、Nox3 を発現 (ROS を産生) する外有毛細胞は、自身や周囲の支持細胞からの ROS により脱落することが示唆された。後天性感音難聴において、Nox3 が関与する程度は、シスプラチン>加齢>音響暴露の順であることが考えられた。また、シスプラチン投与による Nox3 発現細胞の増加や難聴の発症は、加齢に伴い減少することが分かった。

【結論】Nox3-Cre;tdTomato レポーターマウスを作製し、内耳における Nox3 の発現局在を明らかにした。更に、ヘテロ及びホモ Nox3-KO マウスを用いることにより、加齢・騒音・シスプラチン等の刺激が、蝸牛基底回転を中心としたコルチ器内の支持細胞や外有毛細胞での Nox3 発現を誘発し、Nox3 由来の ROS が外有毛細胞の脱落をもたらすことで、後天性感音難聴 (加齢、騒音、薬剤性) を引き起こすことを明らかにした。以上より、蝸牛における Nox3 の発現誘導や活性抑制が、後天性感音難聴の発症予防や治療をもたらし、延いては、感音難聴の根本的な治療法開発に繋がると考えられる。