

eroplasmの内耳での割合は組織学的変性を示す組織と示さない組織で差がなかった¹⁸⁾。Lindsay & Hinojosa¹⁹⁾が報告した Kearns-Sayre Syndrome 症例ではミトコンドリア遺伝子の欠失は確認されていないが、その病理の特徴は cochleo-saccular degeneration であり、コルチ器は全回転で消失していた。またラセン神経節は約2/3が減少し、ラセン板の蝸牛神経線維は高度に変性していた。

以上の側頭骨病理の報告から、ミトコンドリア遺伝子異常では蝸牛、特に血管条、有毛細胞、蝸牛神経、ラセン神経節が主に障害されることが示唆される。

4.5 障害モデル動物

ミトコンドリア病のモデル動物には種々なものが報告されている²⁰⁾が、主にミトコンドリア遺伝子の遺伝子操作によるものと薬剤投与によりミトコンドリア機能を低下させたものがある。前者としてはミトコンドリアDNA欠失の cybrid を受精卵に導入したもの (mito-mouse)²¹⁾があるが、このマウスでは heteroplasm (変異DNAの率) が80%以上の場合は難聴を生じたが、変異DNAの割合がそれ以下の場合は難聴を生じていない²²⁾。このモデルでは内耳の組織学的検索はなされていない。mitochondrial DNA polymerase gamma に点変異を導入して proof-reading 機能が障害

されてミトコンドリアDNAの変異が集積するマウスでは、アポトーシスが增加して早期に老化症状を呈し、蝸牛では有毛細胞、蝸牛神経線維、ラセン神経節の変性を来して難聴が生じていた²³⁾。

薬剤によるものでは mitochondrial toxin やゲルマニウムが挙げられる。Hoyaら²⁴⁾はラットに3-nitropropionic acid を投与し、500 mM ではラセン靭帯やラセン唇の fibrocyte が高度に変性して permanent threshold shift を生じたが、300 mM では閾値上昇は一時的なものであったとしている。ゲルマニウムは過剰摂取でミトコンドリア脳筋症類似の症状・所見が生じることがヒトおよびラットで報告されている。ゲルマニウムを食餌に加えてマウスおよびモルモットに投与したところ、マウスでは0.15%食の投与で、モルモットでは0.5%食の投与で体重減少、骨格筋萎縮、腎障害とともに高度難聴が出現した。ゲルマニウムはミトコンドリアに取り込まれて封入体を形成し、骨格筋のCOX活性は低下していた。組織学的には血管条・支持細胞の変性、基底回転でのラセン神経節の萎縮が見られたが、蝸牛有毛細胞や前庭感覚上皮は保たれていた (図7.4.5)。

4.6 治療

ミトコンドリア病にはコエンザイムQ10などが試み

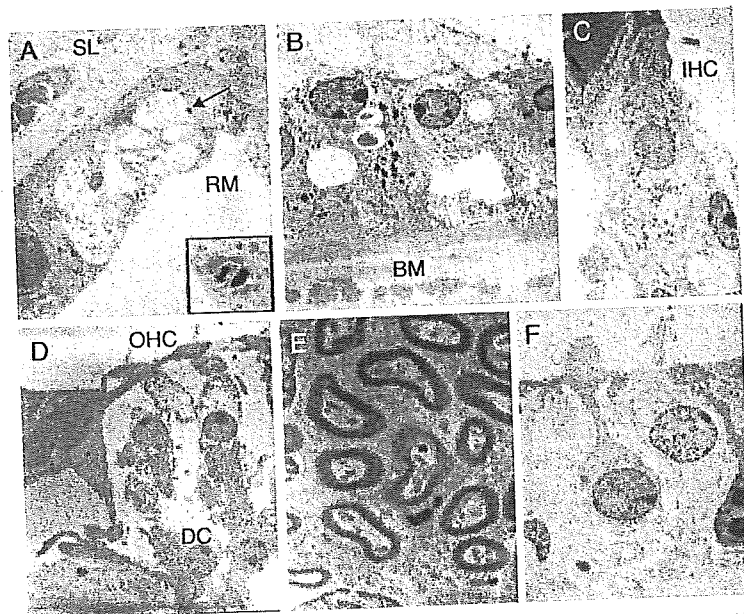


図7.4.5 0.4%ゲルマニウム食投与モルモットの内耳所見 (透過電顕像)

- A: 血管条の空胞化変性 (inlet: 矢印部の拡大。ミトコンドリアに取り込まれたゲルマニウム封入体)。RM: ライスネル膜。SL: ラセン靭帯。
 B: ゲルマニウムを取り込んだ蝸牛支持細胞の変性。BM: 基底膜。
 C: 正常の内有毛細胞 (IHC)。
 D: 正常な外有毛細胞 (OHC) とダイテルス細胞 (DC)。
 E: 保たれた蝸牛神経線維。ゲルマニウムがわずかに見られる。
 F: 正常な卵形嚢感覚上皮。

られたが、確実に効果のある治療法はまだないのが現状である。同様に難聴の発症および進行を予防する治療法も確立されていない。我々は聴力が急速に悪化した3243A→G点変異のMIDD2症例に副腎皮質ホルモンを突発性難聴に準じて投与したが、その治療効果は限られていた。

難聴が高度になった場合は人工内耳が適応となる。これまでの報告²⁵⁾ではMELAS、MIDD、CPEO、1555A→G点変異によるものすべて、難聴の原因遺伝子に関わらず人工内耳術後の成績は良好であった。このことはミトコンドリア遺伝子異常による難聴が蝸牛障害によることを支持しており、ミトコンドリア遺伝子異常による高度感音難聴は人工内耳の良い適応であると言える。

文献

- 1) Fukuhara N: Clinicopathological classification of mitochondrial myopathies. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **24**: 125-132, 1986
- 2) Usami S et al: Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* **107**: 483-490, 1977
- 3) Yamasoba T et al: Atypical muscle pathology and a survey of cis-mutations in deaf patients harboring a 1555 A-to-G point mutation in the mitochondrial ribosomal RNA gene. *Neuromuscul Disord* **12**: 506-512, 2002
- 4) Santorelli FM et al: Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation. *Am J Hum Genet* **64**: 295-300, 1999
- 5) Shoffner JM et al: A mitochondrial DNA mutation associated with maternally inherited deafness and Parkinson's disease. *Neurology Suppl* **46**: A331, 1996
- 6) Yamasoba T et al: Auditory findings in patients with maternally inherited diabetes and deafness harboring a point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) Gene. *Laryngoscope* **106**: 49-53, 1996
- 7) Sue CM et al: Cochlear origin of hearing loss in MELAS syndrome. *Ann Neurol* **43**: 350-359, 1998
- 8) Yamasoba T et al: Cochlear pathology associated with mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Neurology* **52**: 1705-1707, 1999
- 9) Seviour KB et al: Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* **75**: 179-185, 1998
- 10) Tiranti V et al: Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene. *Hum Mol Genet* **4**: 1421-1427, 1995
- 11) Ensink RJ et al: Early-onset sensorineural hearing loss and late-onset neurologic complaints caused by a mitochondrial mutation at position 7472. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**: 886-891, 1998
- 12) Sue CM et al: Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA^{(Ser)(UCN)} gene. *Neurology* **52**: 1905-1908, 1999
- 13) Friedman RA et al: Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet* **84**: 369-372, 1999
- 14) Li M et al: Identification of the paramomycin-resistance mutation in the 15S rRNA gene of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**: 5921-5928, 1982
- 15) Hutchin T et al: A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucl Acid Res* **21**: 4174-4179, 1993
- 16) Inoue K et al: Mutant mtDNA at 1555 A to G in 12S rRNA gene and hypersusceptibility of mitochondrial translation to streptomycin can be co-transferred to rho0 HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 496-501, 1996
- 17) Yamasoba T et al: Ototoxicity after use of neomycin ear drops is unrelated to A1555G point mutation in mitochondrial DNA. *J Otol Laryngol* **118**: 546-550, 2004
- 18) Takahashi K et al: Temporal bone histopathological and quantitative analysis of mitochondrial DNA in MELAS. *Laryngoscope* **113**: 1362-1368, 2003
- 19) Lindsay JR, Hinojosa R: Histopathologic features of the inner ear associated with Kearns-Sayre syndrome. *Arch Otolaryngol* **102**: 747-752, 1976
- 20) Wallace DC: Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* **106**: 71-93, 2001
- 21) Inoue K et al: Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* **26**: 176-181, 2000
- 22) Nakada K et al: Accumulation of pathogenic delta mtDNA induced deafness but not diabetic phenotypes in mito-mice. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 175-184, 2004
- 23) Kujoth GC et al: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science* (in press)
- 24) Hoya N et al: A novel animal model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. *Neuroreport* **15**: 1597-1600, 2004
- 25) Sinnathuray AR et al: A review of cochlear implantation in mitochondrial sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* **24**: 418-426, 2003

(山嵜達也)

5. 老人性難聴の予防

5.1 老人性難聴

5.1.1 老人性難聴の特徴

老人性難聴とは両側耳にほぼ対称に生じる、老化に伴う進行的な感音性難聴である。老化により生じる難聴は、組織学的な障害部位に応じて三つに大別することができる¹⁾。感覚細胞性難聴は、内耳の末梢感覚器である蝸牛の有毛細胞障害が主な原因であり、神経性難聴は、蝸牛のラセン神経節細胞の障害が主な原因である。また血管条性難聴は蝸牛の血管条萎縮が主であると考えられている。米国では65～75歳までの人口の約35%が老人性難聴を発症していると推定されており、近年この65歳以上の高齢者人口は増加傾向にある²⁾。老化による聴力低下をもたらす因子としては動脈硬化、高血圧、職場騒音、薬剤、環境化学物質、高脂肪食、ストレス、遺伝子などが考えられてい

る³⁾。しかしながら、老人性難聴の分子レベルでの発症機構は不明であり、老化による聴力低下に対する有効な予防法や治療法はない。本稿では、筆者らが老人性難聴モデルマウスを用いて得られた研究成果を交えて、老人性難聴の発症機構・抑制機構について解説する。

5.1.2 老化による聴力障害・蝸牛障害

C57BL/6 (B6) マウスは老化分野などで幅広く用いられている老人性難聴モデル動物である。この系統のマウスは10月齢から高周波音域において加齢性難聴を発症し、ほぼ20月齢で重篤な難聴となることが報告されている⁴⁾。また、このモデル動物における加齢性難聴の病理的特徴として、蝸牛基底回転における有毛細胞とラセン神経節細胞の障害が老化に伴い進行することなどが報告されている⁵⁾。

表 7.5.1 老化による ABR 閾値への影響

Mice	4 kHz		8 kHz		16 kHz	
	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.
4 月齢若年群	25.8	2.0	22.5	2.7	18.3	6.8
15 月齢老齡群	59.2	12.0	41.7	9.8	35.0	13.4

C57BL/6 マウスを生後2ヵ月目から2群に分け、4月齢若年群、15月齢老齡群とした。各群の4、8、16 kHzにおけるABR閾値(dBSPL)を測定した。15月齢コントロール群では老化による難聴の出現が示された。

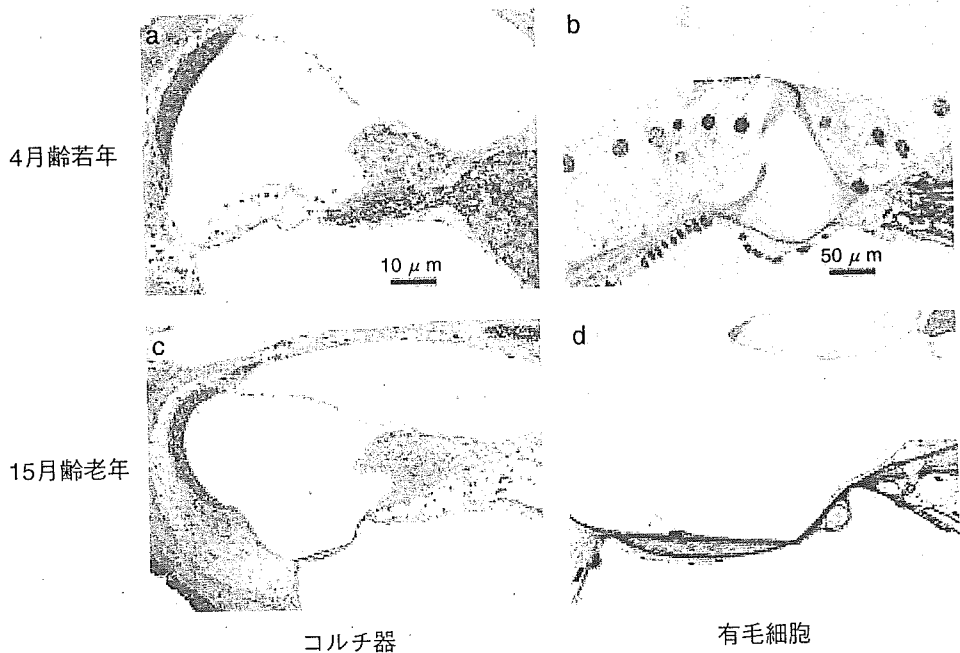


図 7.5.1 老化による蝸牛障害 (口絵 17 参照)

4月齢若年動物(a,b)に明らかな異常はなかったが、15月齢老齡動物(c,d)では基底回転のコルチ器の著明な変性、有毛細胞およびラセン神経節細胞の著明な消失が見られ、老化による蝸牛障害が示された。

我々がこのモデルマウスを用いて ABR 閾値を検討したところ、4月齢若年群で平均約18~26 dB SPLの閾値であったが、15月齢老齢群では平均35~59 dB SPLと閾値が上昇し、老化により難聴が出現することが示された(表7.5.1)。また、この動物の蝸牛切片を光学顕微鏡下で観察したところ、組織学的には4月齢若年動物に明らかな異常はなかったが、15月齢老齢動物では基底回転のコルチ器の著明な変性、有毛細胞、ラセ

ン神経節細胞、蝸牛神経線維の著明な消失が見られ、ABRの結果を支持する所見を示した(図7.5.1)。これらの結果により、この老人性難聴モデルマウスでは老化に伴い聴力が低下し、蝸牛基底回転における有毛細胞およびラセン神経節細胞に変性・消失が起きることが明らかとなった。

表 7.5.2 ミトコンドリア DNA 変異の蓄積による ABR 閾値への影響

Mice	4 kHz		8 kHz		16 kHz	
	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.
2月齢野生型群	23.0	2.7	19.0	2.2	11.0	2.2
2月齢 D257A 群	22.0	2.7	18.0	2.7	15.0	3.5
9月齢野生型群	22.0	2.7	20.0	3.5	13.0	4.5
9月齢 D257A 群	52.0	4.5	41.0	4.2	41.0	2.2

野生型マウス (Polg^{+/+}) と D257A (Polg^{D257A/D257A}) マウスを4群に分け、2月齢野生型群、2月齢 D257A 群、9月齢野生型群、9月齢 D257A 群とした。各群の4、8、16 kHzにおける ABR 閾値 (dB SPL) を測定した。2月齢野生型群、2月齢 D257A 群、9月齢野生型群ではほぼ正常な ABR 閾値が示されたが、9月齢 D257A 群では老化による難聴が出現し、ミトコンドリア DNA 変異の蓄積による加齢性難聴への関与が示された。

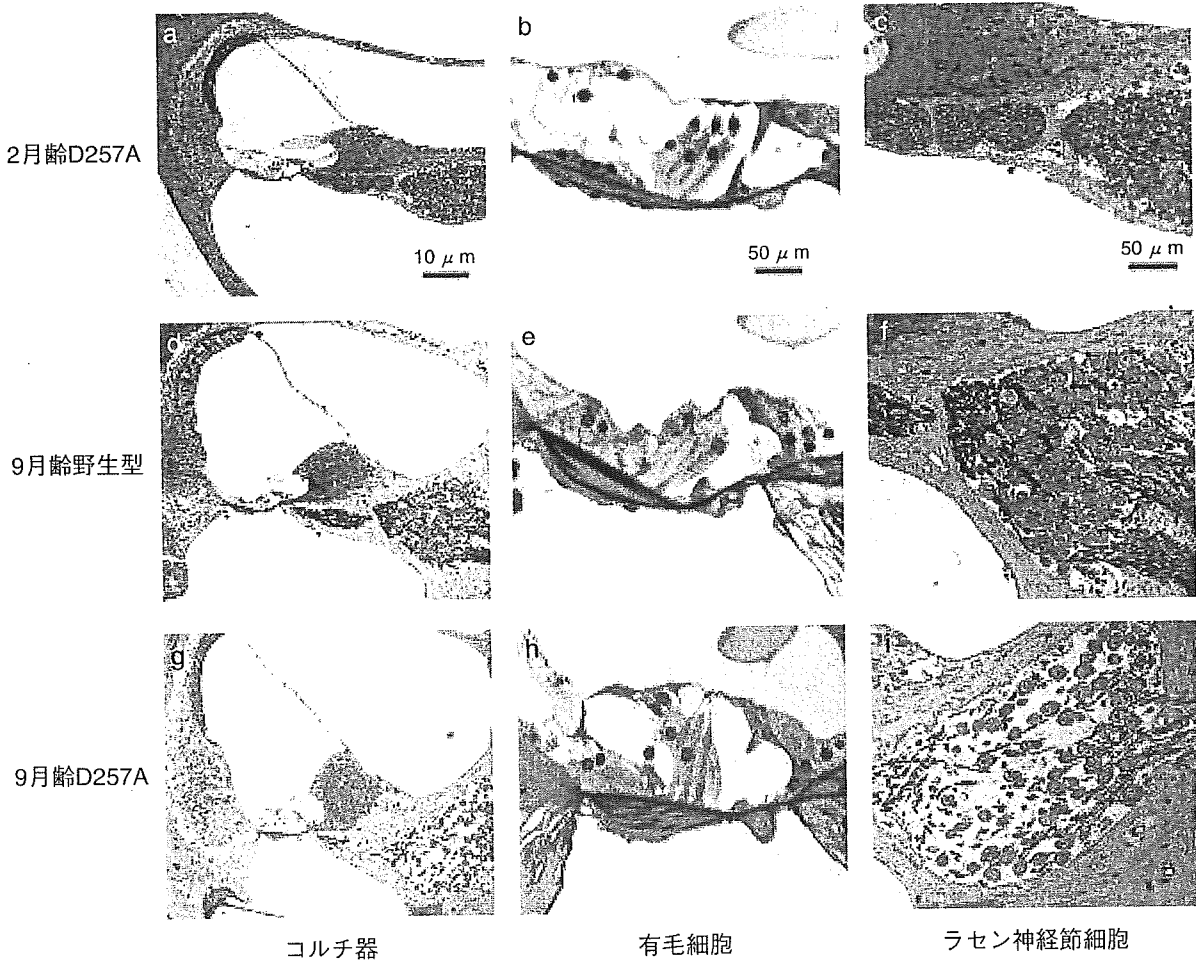


図 7.5.2 ミトコンドリア DNA 変異の蓄積による蝸牛障害 (口絵 18 参照)

2月齢 D257A (a~c) と 9月齢野生型 (d~f) の病的組織変化は軽度であったが、9月齢 D257A (g~i) では基底回転の有毛細胞の軽度の消失、ラセン神経節細胞の著明な消失が示され、ミトコンドリア DNA 変異の蓄積により蝸牛障害が生じることが示された。

5.2 摂取カロリー制限による老人性難聴抑制効果

5.2.1 摂取カロリー制限と老化遅延

摂取カロリー制限 (CR) は哺乳類の老化を抑制する唯一の方法として知られており、その老化関連疾患の抑制効果や寿命延長効果について数多くの報告がなされている⁶⁾。また、パーキンソン病のモデル動物やアルツハイマー病のモデル動物を用いた研究では、CRにより脳神経細胞の消失が抑制されることが報告されている⁷⁾。このCRによる老化遅延メカニズムについてはエネルギー代謝レベルの低下による酸化ダメージ (活性酸素による障害) の減少が主因ではないかと考えられていたが⁸⁾、その分子メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

5.2.2 摂取カロリー制限による加齢性難聴の抑制

Seidman⁹⁾はラットを用いてCRによる加齢性難聴進行に対する影響を検討した結果、26月齢コントロール群ではABR閾値が平均約110 dB SPLと著明に上昇し、高度な難聴が出現したが、同月齢CR群では約80 dB SPLとその閾値上昇が有意に抑制されたと報告している。さらにこのCR動物の脳・筋肉組織においてミトコンドリアDNA欠失の増加が有意に抑制されたことから、この欠失増加が加齢性難聴発症機構に関与していると推察している。また摂取カロリーが制限されたマウスの検討では、そのラセン神経節細胞の消失が有意に減少したことが報告されている¹⁰⁾。

我々がB6マウスを用いて、加齢性難聴進行に対するCRの影響を調べたところ、15月齢コントロール群では難聴が出現したが、同月齢CR群ではほぼ正常なABR閾値を示し、CRによる加齢性難聴のほぼ完全な抑制効果が確認された (未発表データ)。またこの動物の蝸牛切片を光学顕微鏡下で観察したところ、組織学的には15月齢CR動物に明らかな異常はなかったが、

15月齢コントロール動物では基底回転のコルチ器に著明な変性がみられ、CRによる有毛細胞・ラセン神経節細胞障害の著明な抑制効果が確認された (未発表データ)。これらの結果は、CRによる老人性難聴の予防の可能性を示唆している。

5.3 老人性難聴抑制のメカニズム

5.3.1 ミトコンドリアDNA変異の老人性難聴発症機構への関与

老人性難聴の発症メカニズムとしては、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の変異の蓄積により難聴が出現する可能性が報告されている¹¹⁾。しかしながら、このmtDNA変異が老人性難聴の原因であるかについてはいまだ不明な点が多い。Polg^{D257A/D257A} (D257A) マウスは、DNAポリメラーゼガンマ (Polg) のエキソヌクレアーゼ領域 (Proof Reading 活性領域) に特定の点変異を導入することにより作製されたトランスジェニックマウスである。このD257AマウスではmtDNAの修復機能が失われたDNAポリメラーゼが発現されるために、mtDNAの変異が加齢に伴い加速的に蓄積することで早老症など、さまざまな老化関連疾患を示すことが報告されている¹²⁾。

我々はこのmtDNA変異の老人性難聴発症機構への関与を調べるために、D257Aマウスと野生型マウス (Polg^{+/+}) を用いてABR閾値を検討したところ、2月齢野生型群では平均約11~23 dB SPLの閾値、9月齢野生型群では平均約13~22 dB SPLの閾値、2月齢D257A群では平均約15~22 dB SPLの閾値であったが、9月齢D257A群では平均41~52 dB SPLと著明に閾値が上昇し、加齢による中等度の難聴が出現することが示された (表7.5.2)。また組織学的には2月齢D257A動物と9月齢野生型動物の病的組織変化は軽度であったが、9月齢D257A動物では基底回転のラセン神経節細胞の著明な消失、有毛細胞の軽度の消失が見

表 7.5.3 ミトコンドリアDNA変異の蓄積・摂取カロリー制限による遺伝子発現プロファイルへの影響

機能分類	ミトコンドリアDNA変異	
	9月齢D257A群	15月齢CR群
聴力機能	↓	↑
ミトコンドリア機能	↓	↑
神経伝達機能	↓	↑
アポトーシス機能	↑	↓

9月齢野生型群と9月齢D257A群の蝸牛組織を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行ったところ、9月齢D257Aマウス群ではミトコンドリア機能の低下、アポトーシス機能の誘導などが示され、老化に伴うミトコンドリアDNA変異の蓄積が、ミトコンドリア機能の変動などを誘導することが示された。また15月齢コントロール群と15月齢CR群の蝸牛組織を用いた遺伝子発現プロファイル解析では、CR群でミトコンドリア機能の維持、アポトーシス機能の抑制などが示され、CRによるミトコンドリア機能の維持が、加齢性難聴の抑制機構に関与していることが示唆された。

られ、ABRの結果を支持する所見を示した(図7.5.2)。さらに45,037の遺伝子およびESTを搭載するDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルを検討したところ、9月齢D257Aマウス群の蝸牛では聴力機能の低下、ミトコンドリア機能の低下、神経伝達機能の低下が示され、一方でアポトーシス機能の誘導が示された(表7.5.3)。以上の結果により、加齢に伴うmtDNAの変異の蓄積が、加齢性難聴発症の原因となりえることが明らかとなった¹²⁾。

5.3.2 摂取カロリー制限による老人性難聴抑制機構

老人性難聴の発症時期、進行速度・重症度には個人差があるが、この原因として個人の遺伝的背景の相違に加え、食生活による摂取カロリーの相違などの二次的因子の影響も考えられている。CRによる老化関連疾患の抑制効果については数多くの報告があるが、CRによる老人性難聴の抑制機構はいまだ不明な点が多い。そこで我々はCRによる老人性難聴抑制機構を調べるために、B6マウスを用いた遺伝子発現プロファイルを検討した。マウスを2群に分け、15月齢コントロール群と、15月齢CR群の両群の蝸牛組織を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行ったところ、CR群の蝸牛では聴力機能の維持、ミトコンドリア機能の維持、神経伝達機能の維持が示され、一方でアポトーシス機能の抑制が示された(表7.5.3)。以上の知見とD257Aマウスを検討した知見を総合的に検討した結果、CRによるミトコンドリア機能の維持が、加齢性難聴の抑制機構に関与していることが示唆された。また、CRによるアポトーシス機能の抑制が有毛細胞・ラセン神経節細胞の変性・消失の進行抑制に関与している可能性も示唆された。

今回の検討では摂取カロリーの制限が老人性難聴の予防法となる可能性が示された。高齢化社会白書¹³⁾によると、現在日本国民の5人に1人は65歳以上の高齢者であり、2040年には国民の3人に1人が高齢者とな

ることが予測されている。したがって、この高齢者人口の増加に伴い、老人性難聴患者人口の大幅な増加も予測される。現在、我々は複数の老人性難聴モデルマウスを用いて、分子生物学的アプローチによる老人性難聴抑制の分子機構解明について検討しており、これらの成果が老人性難聴の予防法・治療法の確立に大いに役立つものと期待している。

文献

- 1) Gacek RR et al : Pathology of presbycusis. *Int J Audiol* **8**: 199-203, 1969
- 2) Seidman M et al : Molecular mechanism of age-related hearing loss. *Ageing Res Rev* **1**: 331-343, 2002
- 3) Johnson KR et al : A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics* **70**: 171-180, 2000
- 4) Willott JF : Hand book of mouse auditory research: From behavior to molecular biology. CRC Press. New York, p37-45, 2001
- 5) Johnson KR et al : A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J. *Hear Res* **114**: 83-92, 1997
- 6) Lee CK : Gene expression of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**: 1390-1393, 1999
- 7) Bordone L et al : Calorie restriction, Sirt1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **298**: 298-305, 2005
- 8) Koubova J et al : How does calorie restriction work? *Genes Dev* **17**: 313-321, 2003
- 9) Sediman MD : Effect of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* **110**: 727-738, 2000
- 10) Willott JF et al : Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds. *Hear Res* **88**: 143-155, 1995
- 11) Pickles JO : Mutation in mitochondrial DNA as a cause of presbycusis. *Audiol Neurootol* **9**: 23-33, 2003
- 12) Kujoth GC et al : Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**: 481-484, 2005
- 13) 内閣府(編集) : 高齢社会白書平成17年版(2005)「暮らしと社会」シリーズ。ぎょうせい、東京、p2-8, 2005

(染谷慎一、山嵜達也、田之倉 優)