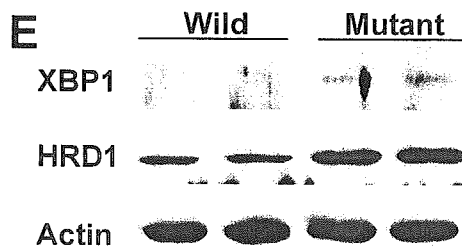
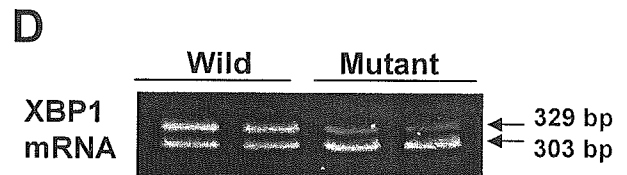
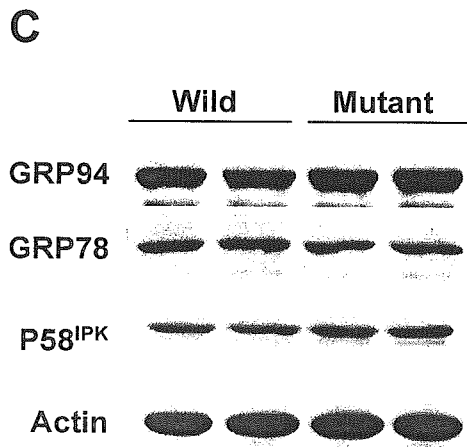
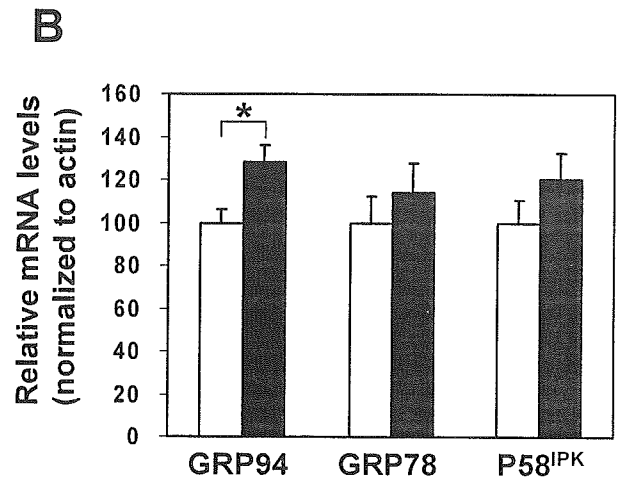
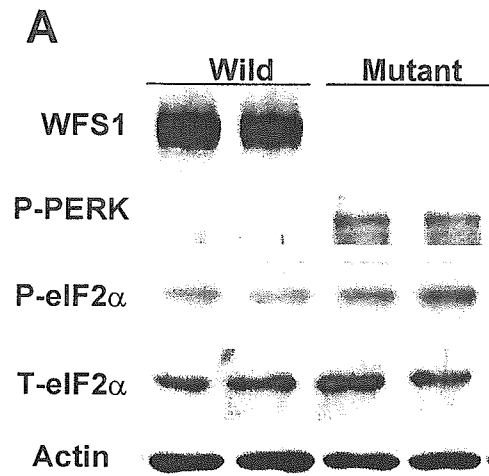
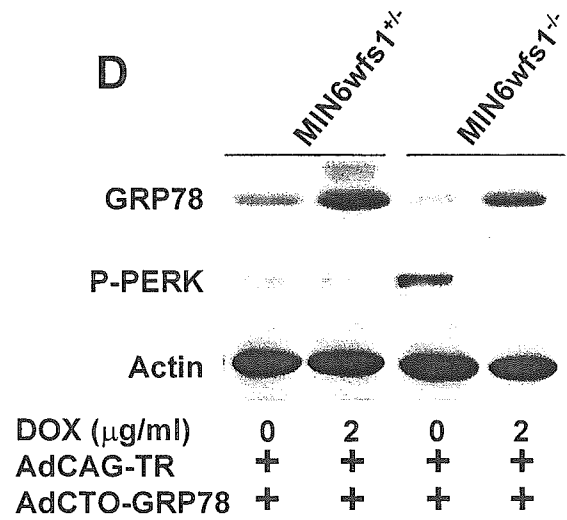
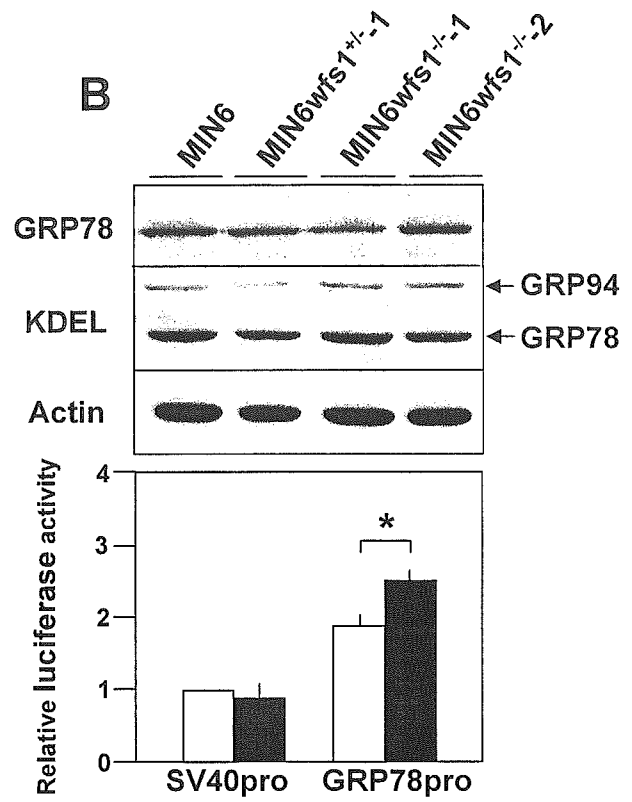
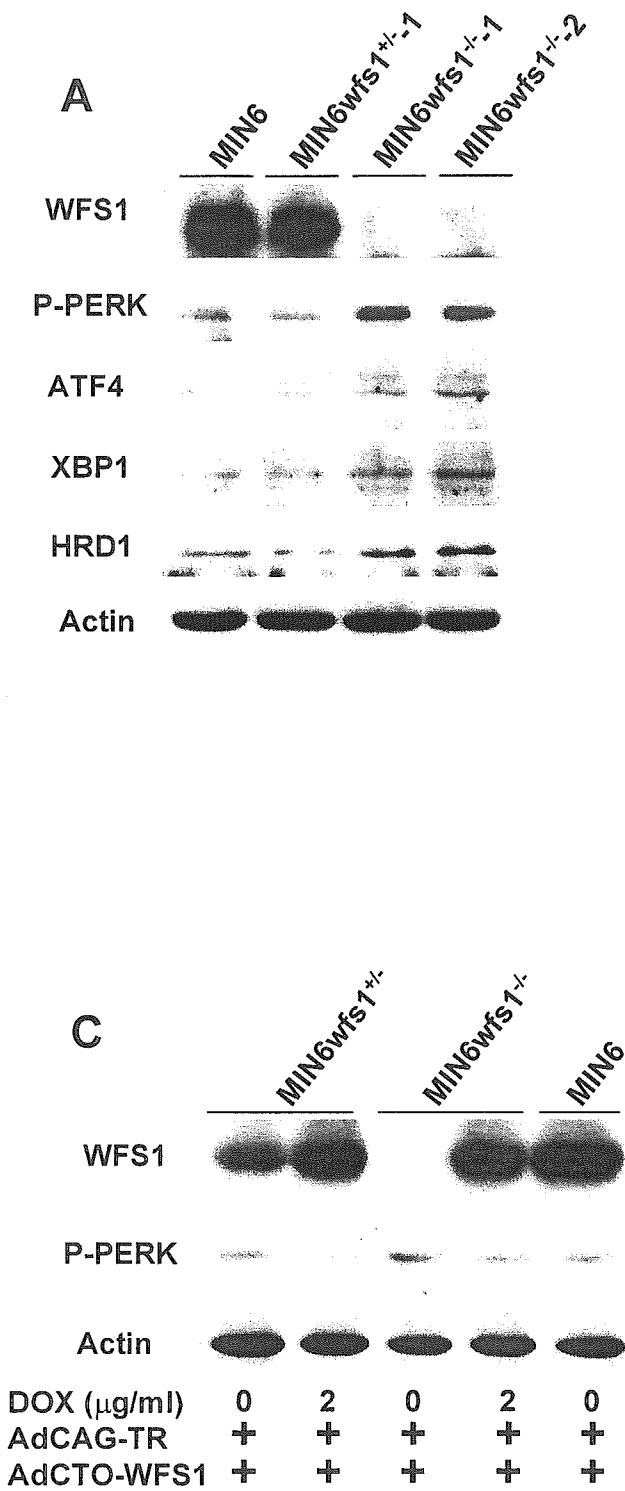
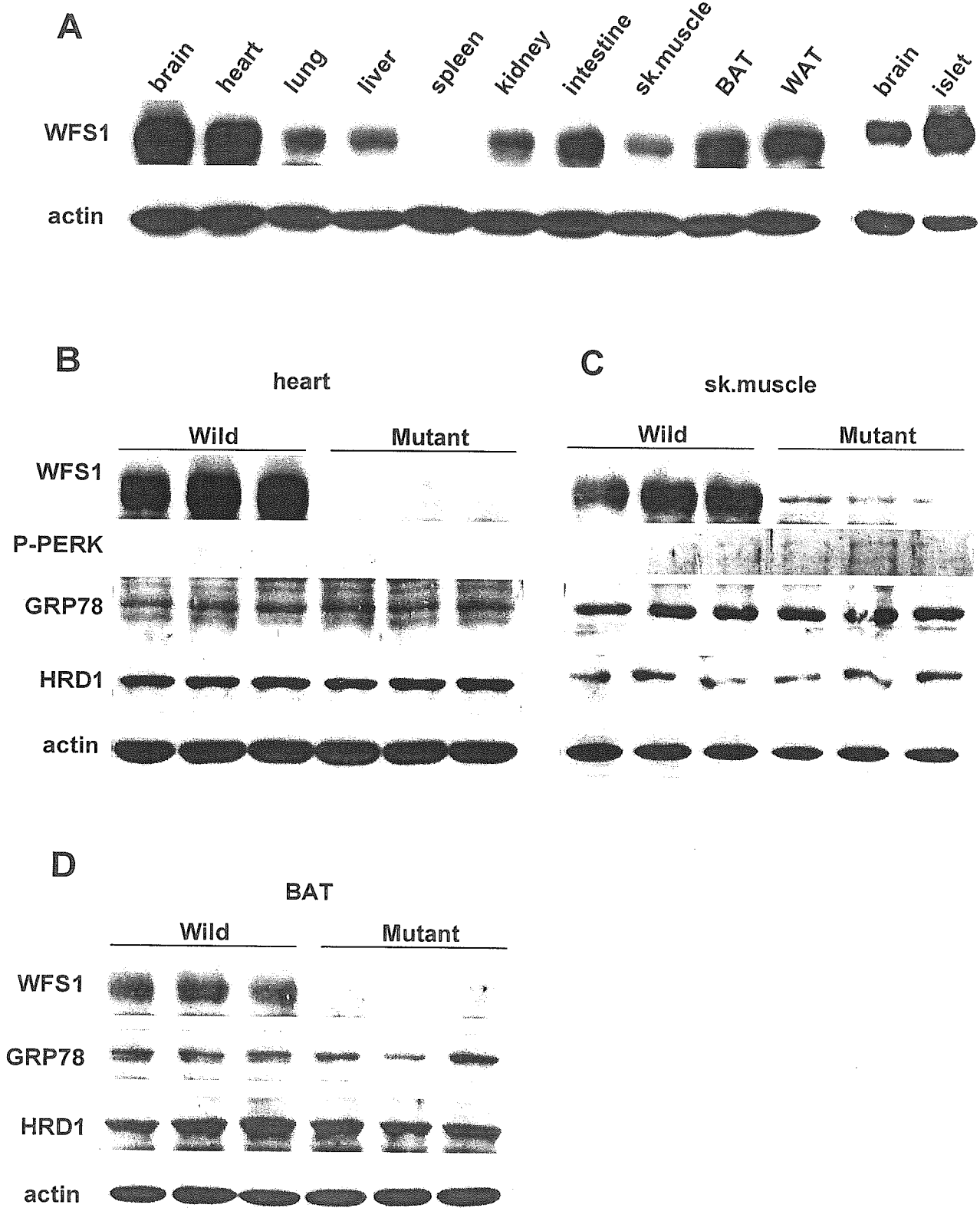


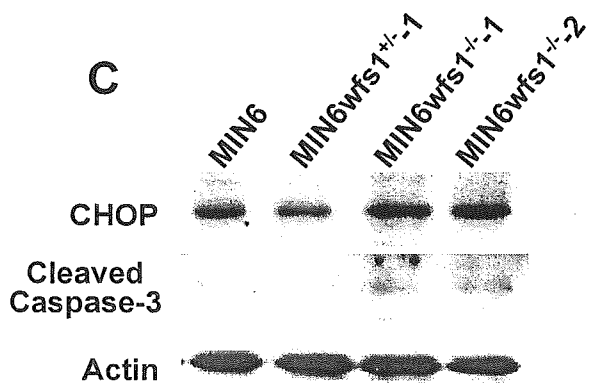
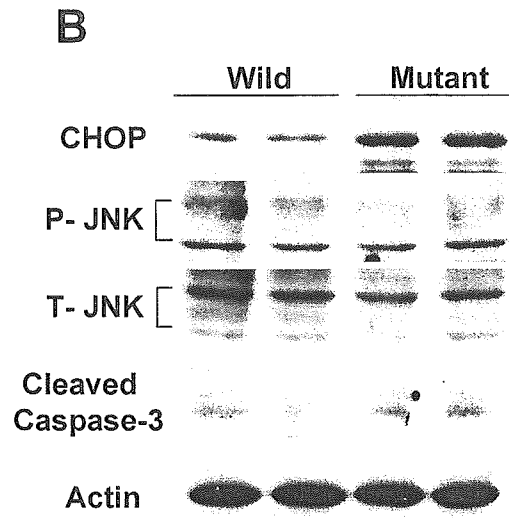
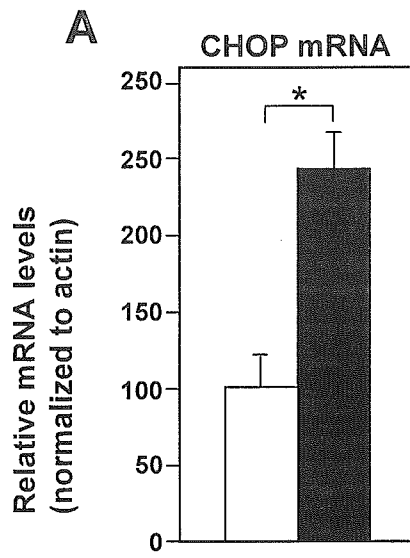
Table 1. Primers used for quantitative real-time RT-PCR

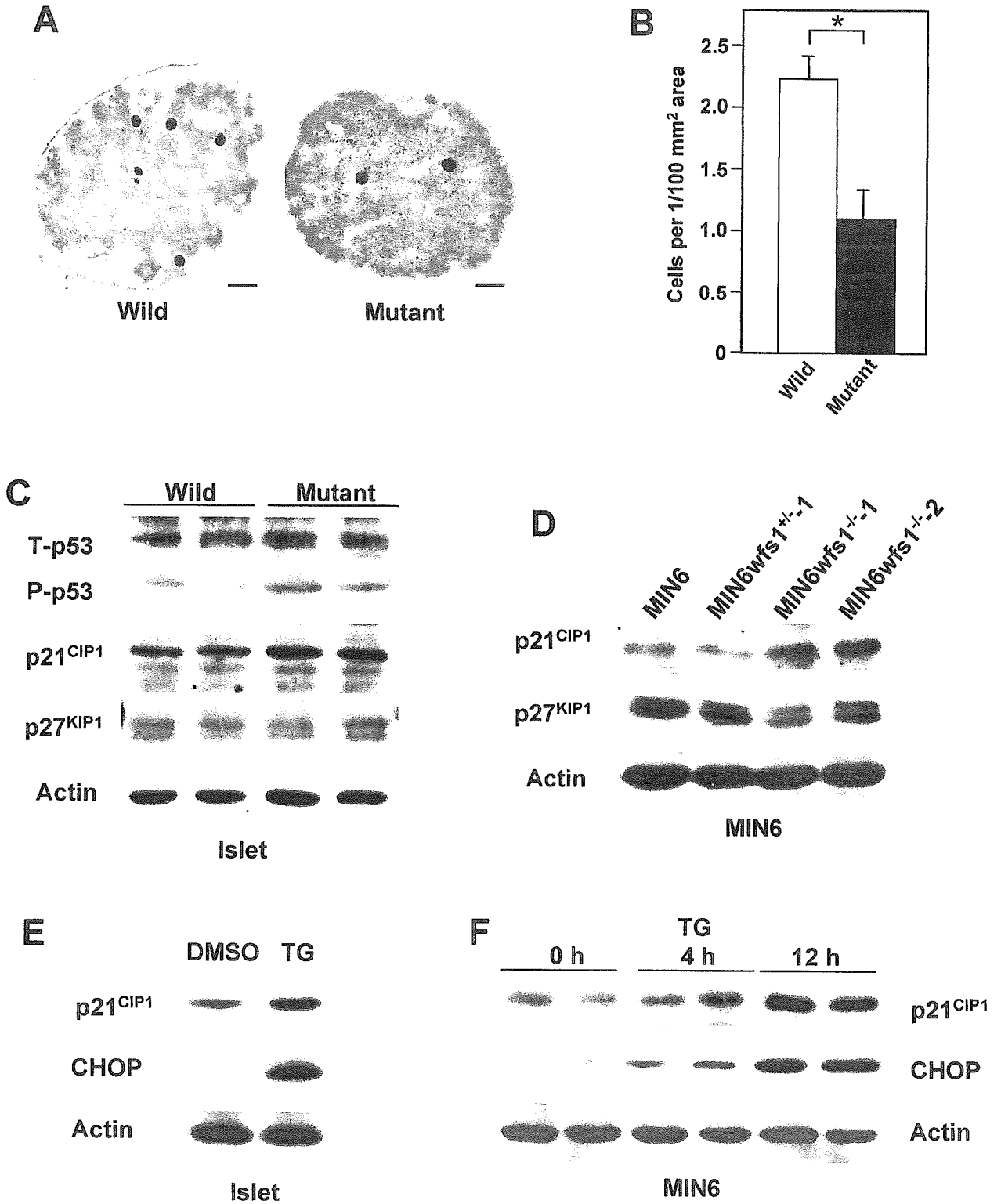
Genes	Forward	Reverse
ATF4	5'-TCCTGAACAGCGAAGTGTTG-3'	5'-ACCCATGAGGTTTCAAGTGC-3'
GRP94	5'-TGATGAAGTCGACGTGGATG-3'	5'-TCCTGTTCACTTCAGCTTGG-3'
GRP78	5'-GACATTTGCCCCAGAAGAAA-3'	5'-CTCATGACATTCAGTCCAGCA-3'
P58 ^{IPK}	5'-CCTTATCGGACAGTCCTTCG-3'	5'-TCAGAGTCCTGATTTTCATCTTCA-3'
EDEM	5'-GGAAATTCATCCGAGTTCCA-3'	5'-GGCCATGTACAACAATTCA-3'
CHOP	5'-CCTAGCTTGGCTGACAGAGG-3'	5'-CTGCTCCTTCTCCTTCATGC-3'
GADD34	5'-CGGAGAGAAGCCAGAATCAC-3'	5'-CAGCAAGGAAATGGACTGTG-3'
P21 ^{CIP1}	5'-ACATCTCAGGGCCGAAAAC-3'	5'-CCTGACCCACAGCAGAAGAG-3'



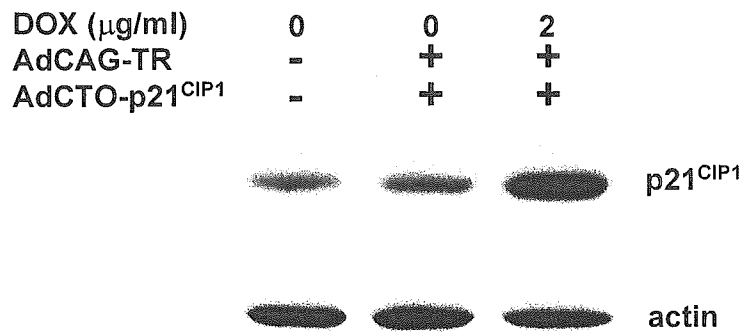




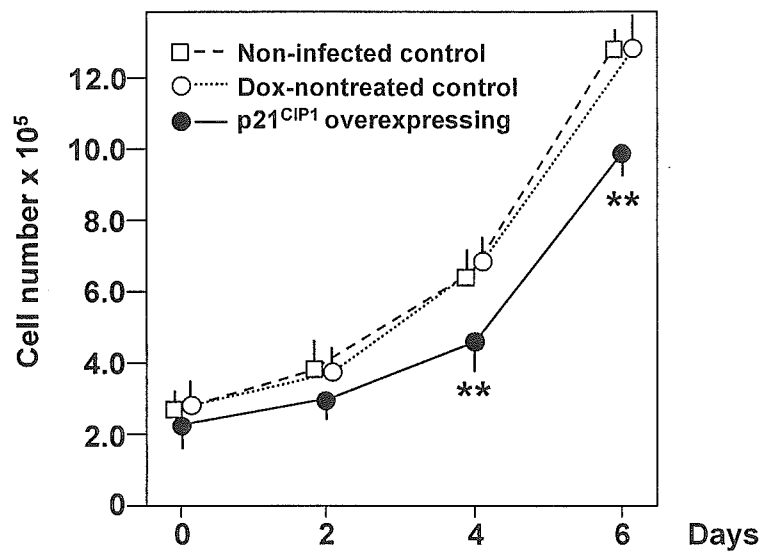




A



B



Abbreviations

BrdU, 5-bromodeoxyuridine; DOX, doxycycline; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ;
ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; PERK,
RNA-dependent protein kinase-like ER kinase; UPR, unfolded protein response.

4. ミトコンドリア遺伝子異常による感音難聴

4.1 はじめに

ヒトのミトコンドリアDNAは16, 569bpの環状二本鎖で、22種の転移RNA (tRNA) 遺伝子と2種のリボソームRNA (rRNA) 遺伝子のほかに13種の酸化リン酸化酵素複合体のサブユニットがほぼ隙間なくコードされている(図7.4.1)。一つの細胞あたり数千コピーも存在しており、完全な母系遺伝を示す。ミトコンドリア病では変異型DNAと野生型DNAが共存している状態(heteroplasmy)がしばしば見られる。

ミトコンドリア遺伝子の障害により難聴が生じうるが、どの遺伝子の異常でも難聴が生じるわけではない。表7.4.1に難聴を来す代表的なミトコンドリア遺伝子異常とその随伴症状を示す。難聴の三大疾患、MELAS(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)、MERRF(myoclonus epilepsy associated with ragged-red fiber)、CPEO(chronic progressive external ophthalmoplegia)では症例の約半数に難聴が生じるとされる⁹⁾。1555位A→G点変異ではアミノ配糖体抗生物質による蝸牛の易受傷性が亢進し、少量のアミノ配糖体抗生物質(AG)投与で難聴を生じるが、この変異家系内にはAG

未使用で難聴を生じることもある^{2,3)}。またこの変異が心筋症やパーキンソン病に関与する可能性も報告されている^{4,5)}。3243位A→G点変異はMELASのほかに糖尿病・難聴(maternally-inherited diabetes and deafness: MIDD)家系の原因となる⁶⁻⁸⁾。7445位点変異は難聴のみ生じると初期に報告されたが、palmoplantar keratodermaを来すことが後に示されている⁹⁾。7472位のheteroplasmic insertion-mutationでは難聴の他に晩発性の神経症状を来すことが報告されている^{10,11)}。7511位の点変異では難聴以外の症状はまずないとされる^{12,13)}。

4.2 難聴発症の機序(仮説)

4.2.1 総論

ミトコンドリア遺伝子異常の障害は赤色ぼろ線維(ragged-red fiber, RRF)を筋病理の特徴として示すもの(MELAS, MERRF, CPEOなど)と蛋白質をコードする遺伝子の変異によって生じ、RRFなどを来さない純粋なencephalopathy(Leigh脳症など)に大きく区分される。難聴は前者で約半数と高率に見られるが、後者ではみられない。酸化リン酸化は両者ともに障害されるが、ミトコンドリアの蛋白合成は前者でのみ障害されることから、難聴はRRFの発現と類似の機序(蛋白合成障害など)によって生じていることが示唆される。AGによる難聴との関係が主に注目されている1555位A→G点変異症例の骨格筋でも、cytochrome c oxidase (COX)活性低下を伴うmoth-eaten像、封入体を含むミトコンドリア形態異常、少量のRRF(図7.4.2)³⁾、NADH-dehydrogenaseとCOXの活性低下⁴⁾、complex I activityの低下⁵⁾などが報告されており、難聴のみしか呈さない7511点変異の骨格筋でもCOX活

表7.4.1 難聴を示す代表的なミトコンドリア遺伝子異常

ミトコンドリア遺伝子異常(主)	随伴する臨床症状または診断
delT961Cn	AG感受性亢進
A1555G	AG感受性亢進、心筋症、パーキンソン病
A3243G	MELAS、MIDD(糖尿病)
A7445G	palmoplantar keratoderma
7472insC	晩発性神経症状
T7511C	-
A8344G、T8356C	MERRF
Heteroplasmic large deletion	CPEO(Kearns-Sayre syndrome)

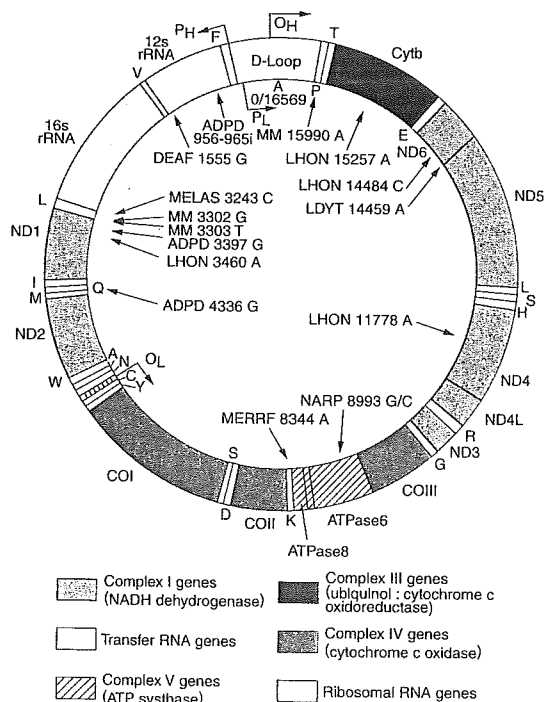


図7.4.1 ミトコンドリアDNAの構造と主要な疾患の遺伝子異常の部位(Wallace DC. Proc Natl Acad Sci USA 91: 8739-8746, 1994より引用)

性低下が見られている^{12,13)}。

4.2.2 1555点変異でのAGによる難聴

AGの作用機序にはリボソームにおける蛋白合成阻害と細胞膜障害があるが、前者が主である。AGはリボソームに不可逆的に結合してmRNAの情報を読み誤ませ、蛋白合成を阻害する。ヒトのミトコンドリアDNA1555位近傍は細菌から哺乳類まで保存された構造で、AGのrRNAに対する結合部位の一つであり、この部位の突然変異が細菌におけるAG耐性を来すことが知られる¹⁴⁾。ヒトでは1555位A→G点変異により12SrRNAの構造が変わってAGが付きやすくなることが示唆されている¹⁵⁾。我々が1555位A→Gサイブリド細胞と変異を持たないサイブリド細胞をAG存在下で培養したところ、1555位A→G細胞ではより低AG濃度での生育阻害、呼吸鎖活性の顕著な低下、ミトコンドリア翻訳活性の低下を認め、AGはミトコンドリアの翻訳系に直接作用し、1555位A→G変異はAG感受性を高めることを明らかにした¹⁶⁾。また^[³⁵S]メチオニンを用いたパルスラベルによるミトコンドリアの翻訳産物解析では1555位A→G細胞においてAG存在下で異常な翻訳産物が産生すること、および大腸菌のリボソーム(1555位変異を有するモデルリボソーム)ではUAGコドンを読み飛ばしやすいたことが判明しており、1555A→G変異の存在下ではAGがミトコンドリアの翻訳精度の低下を引き起こし、異常な翻訳産物を生産させることが示唆されている。

硫酸ストレプトマイシン(SM)は通常前庭障害を優位に生じるが、1555位A→G点変異症例ではSMの少量投与により前庭・半規管機能は保たれたまま、まず感音難聴が出現する^{2,3)}。このことはAG投与で内耳障害が生じる機序が1555位A→G点変異症例と正常例で異なることを意味する。蝸牛の代謝活性は前庭の数～10数倍であり、蝸牛の血管条や感覚上皮ではK⁺、Na⁺、Ca²⁺などのイオン輸送が盛んで、これに要する

ATPが常にミトコンドリアで産生されている。このためミトコンドリア機能の障害は蝸牛により影響を及ぼししやすい。1555A→G点変異ではAGがミトコンドリア機能障害を生じるため、前庭障害をまだ来さない少量の投与量においても蝸牛障害を生じるものと考えられる。

4.3 病態

ミトコンドリア遺伝子異常により生じるため、難聴は母系遺伝(女性からは次の世代に伝わるが、男性からは伝わらない)を示す。稀ではあるが孤発例も存在する。

難聴は主として蝸牛障害により生じ、後迷路障害は稀である^{2,3,6)}。多くは思春期以降に両側に出現し、徐々に進行する。時に急速に悪化することもある。3243位A→G点変異では水平型か高音漸傾型が多く(図7.4.3)⁶⁾、1555位A→G点変異では高音急墜型が多い^{2,3)}。1555位A→G点変異にAGを投与した場合は少量投与で難聴が出現し、投与終了後も難聴が進行する^{2,3)}。なおAGを含む点耳薬を鼓膜穿孔孔に投与した場合も少量投与で難聴が出現し、投与終了後に難聴が進行することがあるが、これは1555A→G点変異とは関係なく、蝸牛窓経由でAGが蝸牛内に蓄積することが原因と思われる¹⁷⁾。一般にミトコンドリア病ではheteroplasmy(変異DNAの割合)と症状発現に相関のあることが知られているが、難聴との関係を調べたものは少ない。我々が3243位A→G点変異症例でheteroplasmyと難聴の関係を調べたところでは、変異DNAの比率が高いほど難聴の発症年齢は若かったが、難聴の進行速度との間に相関は見られなかった⁶⁾。平衡機能は保たれていることが多く、障害される場合も徐々に両側性に生じるためか症状を訴えることは少ない。

4.4 側頭骨病理

ミトコンドリア遺伝子異常の確認された側頭骨病理は少ない。我々は56歳で死亡したMIDDの側頭骨から3243位A→G点変異の同定に初めて成功した。この症例は49歳時には平均右53dB、左43dBの水平型感音難聴を呈していたが、55歳時には聾になっている。側頭骨病理では蝸牛全体に血管条と外有毛細胞の変性が著しく、ラセン神経節も基底回転で特に消失していた(図7.4.4)が、前庭の変性は軽度であった⁸⁾。2003年に報告されたMELASの2症例の側頭骨病理では、血管条とラセン神経節の高度変性が特徴であり、het-

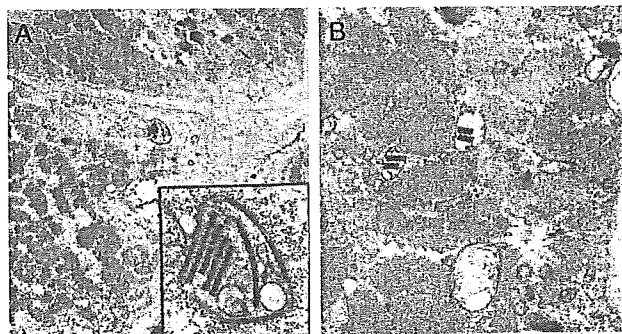


図7.4.2 A1555G点変異症例に見られた筋病変(透過電顕像)⁹⁾ Moth-eaten fiberに見られた封入体を含む拡大したミトコンドリア(A: ×8000、inset: ×40000、B: ×23000)

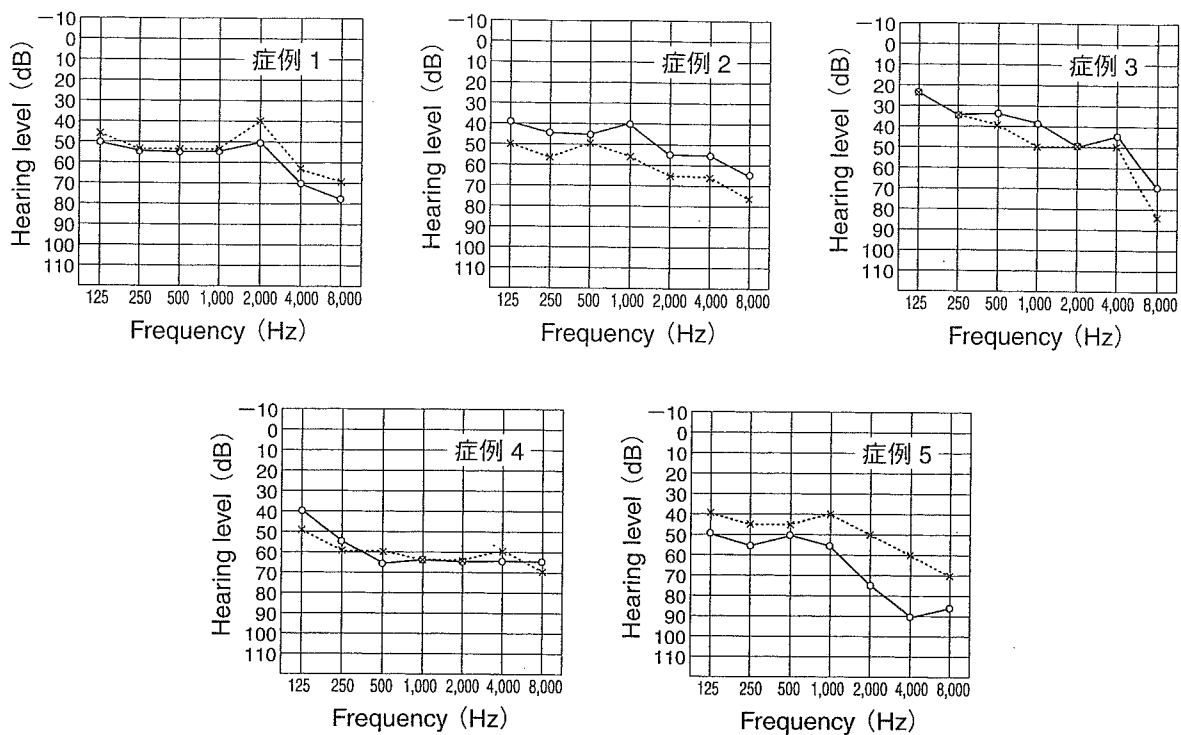


図 7.4.3 3243A → G 点変異症例の聴力像⁶⁾

症例 1 から順に 33 歳女性、38 歳女性、42 歳女性、54 歳女性、61 歳男性であり、難聴の発症はそれぞれ 29 歳、26 歳、33 歳、39 歳、55 歳、heteroplasmy はそれぞれ 29%、30%、26%、7%、8% である。

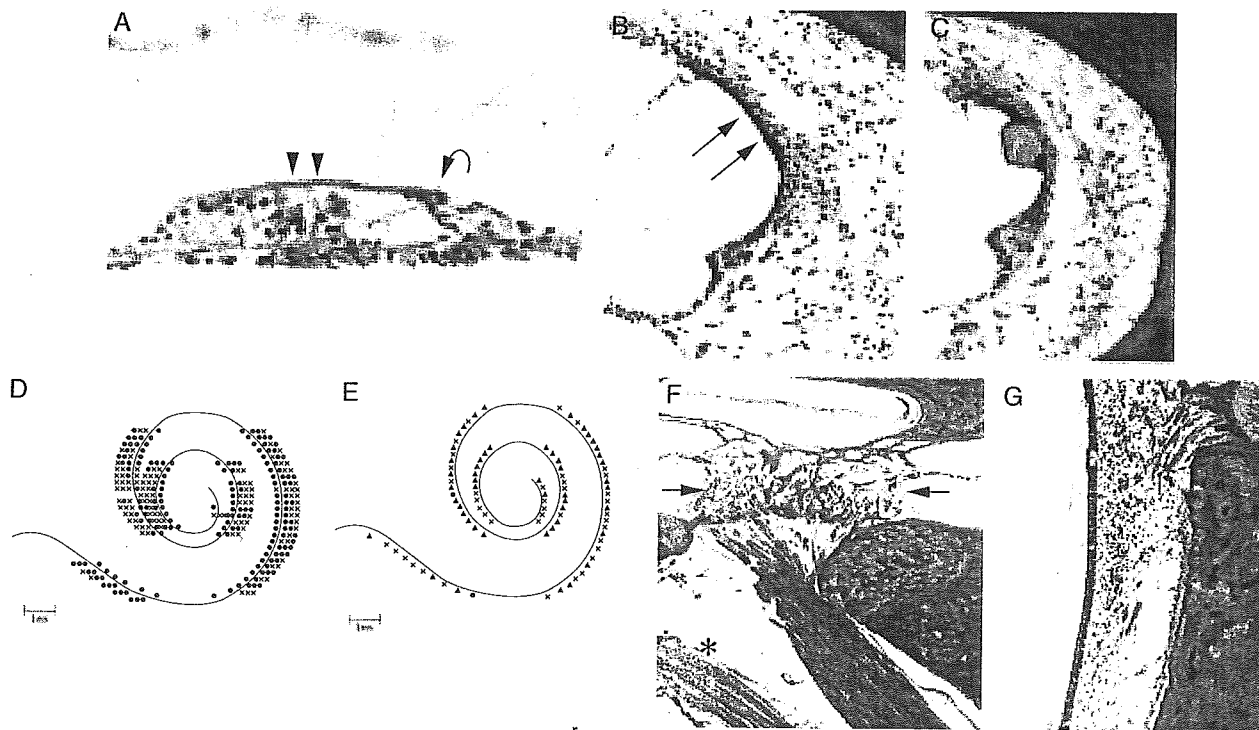


図 7.4.4 糖尿病・難聴の母系遺伝 (MIDD、A3243G 点変異) 症例の側頭骨病理⁶⁾

- A : 内有毛細胞 (矢印) は保たれるが外有毛細胞 (矢頭) は消失している。
- B : 血管条の萎縮。
- C : 血管条の嚢胞状変性。
- D : 蝸牛全体の内外有毛細胞の状態。主に外有毛細胞の障害が見られる (● : 存在、× : 消失)。
- E : 蝸牛全体で血管条の変性が見られる (● : 変性軽度、▲ : 変性中等度、× : 変性高度)。
- F : 基底回転でのらせん神経節の変性。
- G : 球形嚢の感覚上皮はほぼ保たれている。

eroplasmcy 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 heteroplasmcy (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

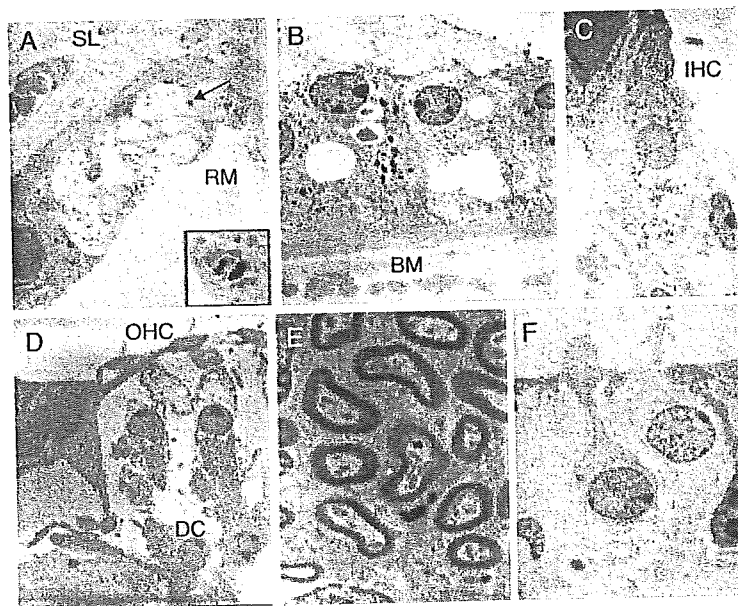


図 7.4.5 0.4% ゲルマニウム食投与モルモットの内耳所見 (透過電顕像)

- 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 : 正常の内毛細胞 (IHC)。
 D : 正常な外毛細胞 (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 月齢老齢群	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月齢老齢群とした。各群の4、8、16kHz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。

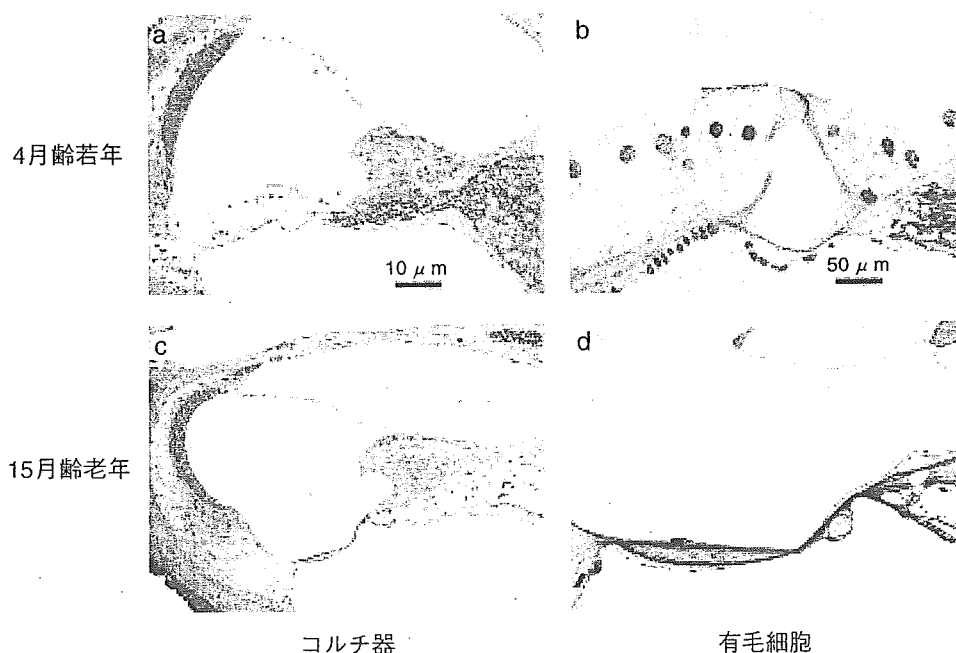


図 7.5.1 老化による蝸牛障害 (口絵 17 参照)

4月齢若年動物(a,b)に明らかな異常はなかったが、15月齢老年動物(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、16kHz 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。

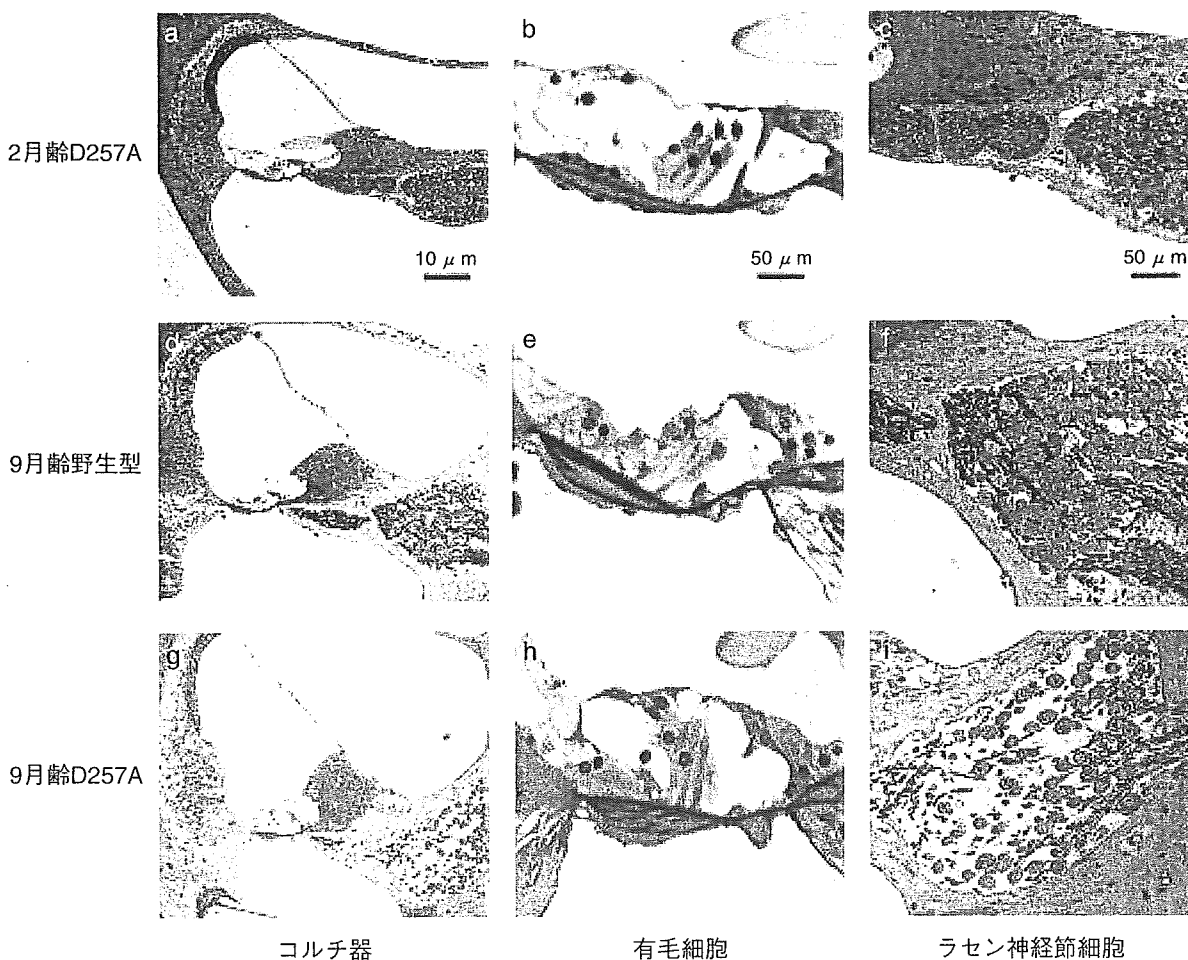


図 7.5.2 ミトコンドリア DNA 変異の蓄積による蝸牛障害 (口絵 18 参照)

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)