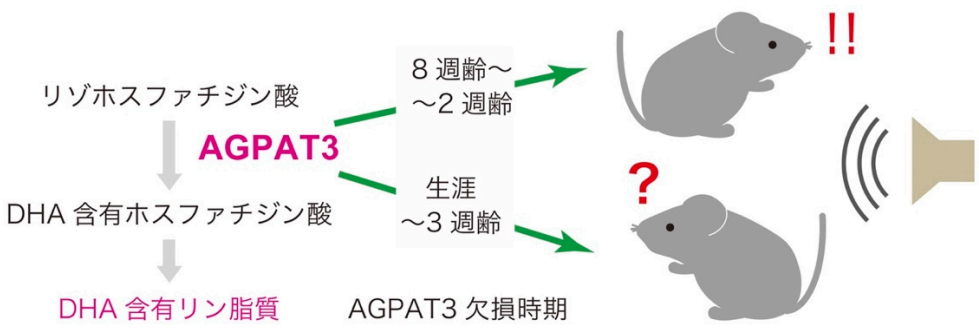
167　DHAリン脂質操作マウスを用いた難聴発症機序の解明	柳田　圭介

【目的】本研究はドコサヘキサエン酸（DHA）が聴覚の発達や恒常性に果たす役割およびその分子メカニズムを明らかにし、DHA 介入による難聴の予防・治療戦略の可能性に迫ることを目的とした。難聴は様々な原因で生ずる。特に先天的な難聴や加齢性難聴など多くのタイプの難聴においてその発症メカニズムは不明な点が多く、予防法・治療法は確立されていない。DHA は食事からの摂取が必要な必須脂肪酸であり、主に生体膜中のリン脂質に存在する。DHA の中枢神経系における重要性についてはこれまで国内外で精力的に研究が進められてきたのに対し、聴覚領域においてはその重要性はほとんど注目されてこなかった。近年、DHA を含むω3 脂肪酸の高用量摂取により加齢性難聴が予防できる可能性を示唆する疫学調査が報告され、DHA 介入が難治性難聴の予防・治療戦略となりうる可能性が高まってきている。しかしながら、DHA の過不足が実際に聴覚の発達や恒常性に影響するのか、さらにその分子メカニズムについては全くわかっていないのが現状である。本研究では、DHA 含有リン脂質生合成酵素である AGPAT3 に注目し、時期特異的に DHA 含有リン脂質を操作できるマウスを活用し、聴覚の発達や維持への DHA の関与、およびそのメカニズムを明らかにすることを試みた。

【方法】まず DHA 含有リン脂質欠乏の聴覚機能への影響を検討すべく、DHA 含有リン脂質生合成酵素 AGPAT3 の欠損マウスを用い、その聴覚性驚愕反射および聴性脳幹反射を検討した。次にタモキシフェン投与により特定の時期より *AGPAT3* 発現を欠失および回復させるマウスを樹立し、聴覚の発達や維持に DHA 含有リン脂質が必要となる時期の絞り込みを行った。また、複数の Cre 系統を用いることで *AGPAT3* 欠損マウスにおいて難聴表現型の原因となる責任細胞について検討を行った。最後に免疫染色により、*AGPAT3* 欠損マウス内耳に解剖学的異常がないか検索を行った。

【結果】聴覚性驚愕反射および聴性脳幹反射の検討の結果、*AGPAT3* 欠損マウスが難聴の表現型を呈することがわかった。成獣後に *AGPAT3* を欠損させた場合、当該マウスにおいて聴覚性驚愕反射に異常は認められなかったため、成獣後の DHA 含有リン脂質生合成は正常聴覚の維持に必須ではないことが示唆された。さらに、2 週齢より *AGPAT3* 発現を回復させた欠損マウスにおいては正常な聴覚性驚愕反射反応が認められたものの、3 週齢より *AGPAT3* 発現を回復させた欠損マウスにおいては通常の *AGPAT3* 欠損マウスと同様に聴覚性驚愕反射反応が認められなかった。従って、通常飼育時の正常聴覚の発達あるいは維持には少なくとも生後 2 週齢から *AGPAT3* の発現が必要であることがわかった。また複数の Cre 系統を用いた検討により、*AGPAT3* 欠損マウスで認められる難聴の責任細胞として支持細胞、骨組織、血管内皮細胞などが否定された。*AGPAT3* 欠損マウス内耳組織の免疫染色の結果、有毛細胞や支持細胞、聴毛の分布や数、構造等の明らかな異常は観察されなかったため、当該マウスにおいては構造的変容によらない聴覚受容や伝導の異常により難聴となる可能性が考えられた。

DHA 含有リン脂質生合成酵素 AGPAT3 の遺伝子改変マウスにおける難聴表現型



167. DHA リン脂質操作マウスを用いた難聴発症機序の解明

柳田　圭介

*国立国際医療研究センター 脂質シグナリングプロジェクト

Key words：ドコサヘキサエン酸（DHA），リン脂質，聴覚，内耳

緒　言

本研究はドコサヘキサエン酸（DHA）が聴覚の発達や恒常性に重要であるその分子メカニズムを明らかにし、DHA 介入による難聴の予防・治療戦略の可能性に迫ることを目的とした。

先天的または後天的な聴覚障害である難聴は様々な原因で生ずる。急性難聴など早期の薬物治療などで改善するものもある一方、特に高齢化社会の進行に伴い患者数の増加が予想される加齢性難聴など多くのタイプの難聴においてその発症メカニズムに不明な点が多く、予防法・治療法は確立されていない。DHA は食事からの摂取が必要な必須脂肪酸であり、主に生体膜中のリン脂質に存在する。DHA の中枢神経系における重要性についてはこれまで国内外で精力的に研究が進められてきたのに対し、聴覚領域においてはその重要性はほとんど注目されてこなかった。一方、近年 DHA を含むω3 脂肪酸の高用量摂取が加齢性難聴を予防する可能性を示す疫学調査が報告され［1］、DHA 介入が難治性難聴の予防・治療戦略となりうる可能性が高まってきている。しかしながら、DHA の過不足が実際に聴覚の発達や恒常性に影響するのか、さらにその分子メカニズムについては全くわかっていないのが現状である。

本研究では、DHA 含有リン脂質生合成酵素である AGPAT3 に注目し、時期特異的に DHA 含有リン脂質を操作できるマウスを活用し、聴覚の発達や維持への DHA の関与、およびそのメカニズムを明らかにすることを試みた。まず *AGPAT3* の欠損マウスの聴覚性驚愕反射および聴覚性脳幹反射を検討し、当該マウスにおける難聴表現型を見出した。次に特定の時期より *AGPAT3* 発現を欠失および回復させるマウスを樹立し、聴覚獲得または維持に DHA 含有リン脂質が必要となる時期の絞り込みを行った。成獣後に *AGPAT3* を欠損させた場合、当該マウスにおいて聴覚性驚愕反射に異常は認められず、成獣後の DHA 含有リン脂質生合成は聴覚の維持に必須ではないことが示唆された。2 週齢より *AGPAT3* 発現を回復させた欠損マウスにおいては正常な聴覚性驚愕反射反応が認められたが、3 週齢から回復させたマウスにおいては驚愕反射反応が認められなかった。従って聴覚の維持には遅くても生後 2 週齢から *AGPAT3* 発現が必要であることがわかった。複数の Cre 系統を用いた検討により、*AGPAT3* 欠損マウスで認められる難聴の責任細胞として支持細胞、骨組織、血管内皮細胞などが否定され、有毛細胞や蝸牛神経が責任細胞である可能性が考えられた。*AGPAT3* 欠損マウス内耳組織の免疫染色の結果、有毛細胞や支持細胞、聴毛の分布や数、構造等の明らかな異常は観察されなかったため、当該マウスにおいては構造的変容によらない聴覚受容や伝導の異常により難聴となる可能性が考えられた。

方法および結果

1. DHA 含有リン脂質欠乏マウスモデルである *Agpat3* 欠損マウスの聴覚評価

DHA 含有リン脂質生合成酵素である *AGPAT3* の欠損マウス（*Agpat3* 欠損マウス）［2］を用い、聴覚における DHA の必要性を検討した。まず 8 週齢の野生型および *Agpat3* 欠損雄マウスにおいて聴覚刺激により生ずる聴覚性驚愕反射を小動物用驚愕反応測定装置（San Diego Instruments 社）を用いて検討した。その結果、同腹子の野生型雄マウスにおいては 120 dB の音刺激による強い体動を認めたものの、*Agpat3* 欠損マウスにおいては

*現在の所属：国立国際医療研究センター 脂質生命科学研究部

全く体動が認められなかった（図 1 a）。*Agpat3* 欠損マウスにおける当該表現型が聴覚あるいは反射反応の異常によるかを明らかにするため、当該マウスにおいて聴覚性脳幹反射を調べた。その結果、*Agpat3* 欠損マウスにおいては 8～32 Hz のいずれの周波数の音においても閾値が上昇しており、つまり難聴の表現型が確認された（図 1b）。

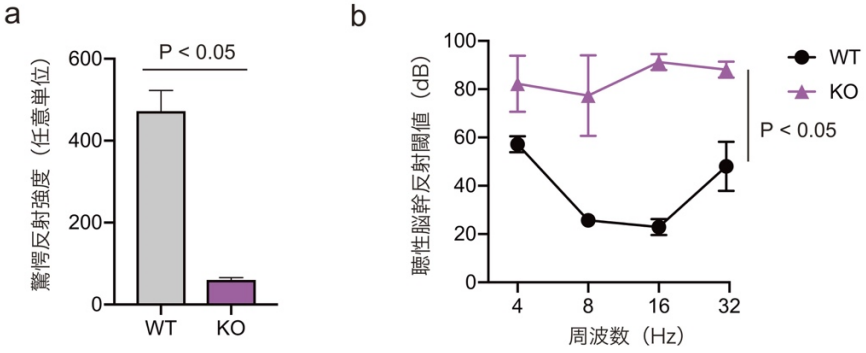


図 1. *Agpat3* 欠損マウスの聴覚評価

a）120 dB の音刺激による聴覚性驚愕反射測定の結果を示す。野生型マウス（WT）と比較して *Agpat3* 欠損マウス（KO）において著明な驚愕反射反応の低下が認められた。N＝3、Welch's *t*-test。

b）聴性脳幹反射測定の結果を示す。いずれの周波数域の音においても、KO において脳幹反射閾値の上昇が認められた。N＝3、Two-way ANOVA。

2. 時期特異的 *Agpat3* 欠損マウスでの聴覚性驚愕反射の検討

次に *Agpat3* 発現を必要とする時期の特定を試みた。まず時期特異的に *Agpat3* を欠損させるべく、*Agpat3 -flox* マウスとタモキシフェン投与により全身性に Cre を発現する *Rosa-CreERT2* マウスを交配することで、タモキシフェン誘導型の *Agpat3* 欠損マウスを樹立した（図 2a）。当該雄マウスにおいて 8 週齢よりタモキシフェンを投与し、投与から 4 週間後に上記と同様に聴覚性驚愕反射を検討した。コントロールとしては、*Rosa-CreERT2* アリルを持たない同腹子の *Agpat3 -flox* 雄マウスに同様にタモキシフェンを投与したマウスを用いた。その結果、タモキシフェン誘導型 *Agpat3* 欠損マウスにおいてコントロールと同程度の体動反応（120 db の音刺激による）が観察された（図 2b）。従って、成獣後の DHA 含有リン脂質生合成は聴覚の維持に必須ではないことが示唆された。

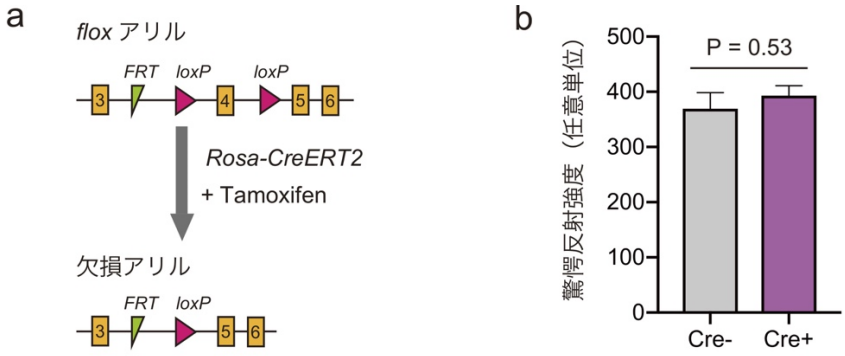


図 2. 時期特異的 *Agpat3* 欠損マウスの聴覚評価

a）時期特異的 *Agpat3* 欠損マウスモデルの模式図を示す。当該アリルにおいて、*Agpat3* 遺伝子の第 4 エクソンが *loxP* 配列により挟まれている。*Rosa-CreERT2* の存在下でタモキシフェンを投与することで第 4 エクソンが欠失し欠損アリルとなる。

b）時期特異的 *Agpat3* 欠損マウスにおける聴覚性驚愕反射測定の結果を示す。タモキシフェン投与は 8 週齢時より開始し、4 週間後に実験に供した。*Rosa-CreERT2* を保有する時期特異的 *Agpat3* 欠損マウス（Cre＋）において、これを保有しないコントロールマウス（Cre－）と遜色ない驚愕反射反応が認められた。N＝3、Welch's *t*-test。

3. 時期特異的 *Agpat3* 回復マウスでの聴覚性驚愕反射の検討

続いて時期特異的に *Agpat3* の発現を回復させる動物モデルを樹立した。これまで使用してきた *Agpat3* 欠損アリルはスプライスアクセプターを活用した遺伝子トラップ法によるものである。この遺伝子トラップ配列は *FRT* 配列により挟まれているため、フリッパーゼ（FLP）により除去することで *Agpat3-flox* アリルになる。そこで、*Agpat3* 欠損マウスとタモキシフェン投与により全身性に FLP を発現する *Rosa-FlpoERT2* マウスを交配することで、タモキシフェン誘導型の *Agpat3* 回復マウスを樹立した（図 3a）。当該雄マウスにおいて 2 週齢および 3 週齢よりタモキシフェンを投与し、投与開始から 8 週間後となる 10 週齢および 11 週齢時に上記と同様に聴覚性驚愕反射を検討した。コントロールとしては、*FlpoERT2* -アリルを持たない同腹子の *Agpat3* 欠損マウスに同様にタモキシフェンを投与したマウスを用いた。その結果、2 週齢よりタモキシフェンを投与された *Agpat3* 回復マウスにおいては、コントロールである *Agpat3* 欠損マウスと比較して音刺激への反射反応が確認された（図 3b）。一方、3 週齢よりタモキシフェンを投与された *Agpat3* 回復マウスにおいては、音刺激への反射反応はほとんど観察されなかった（図 3b）。以上の結果から、通常飼育時の正常聴覚の維持には少なくとも生後 2 週齢から *Agpat3* が発現している必要があることがわかった。

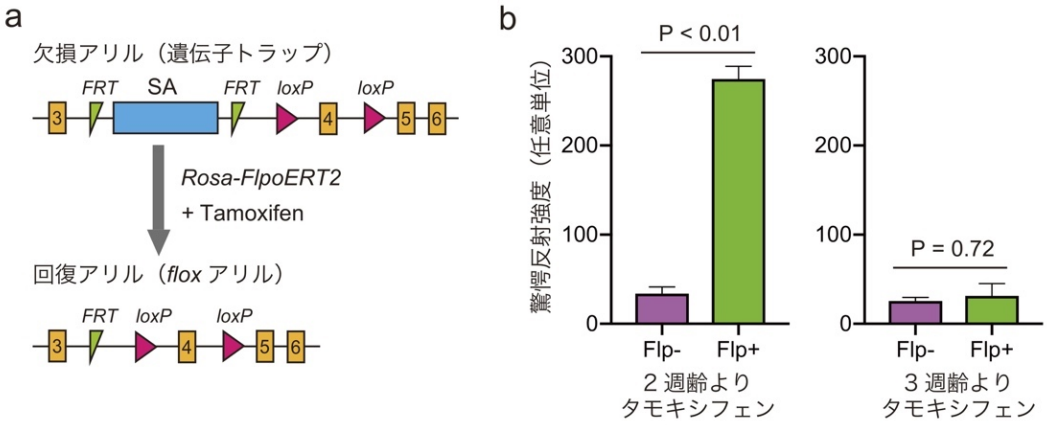


図 3. 時期特異的 *Agpat3* 回復マウスの聴覚評価

a）時期特異的 *Agpat3* 回復マウスモデルの模式図を示す。当該アリルは遺伝子トラップ形式をとっており、*Agpat3* 遺伝子の第 3 イントロンに FRT 配列に挟まれたスプライスアクセプター（SA、青）が挿入されることで遺伝子発現の欠損が担保されている。*Rosa-FlpoERT2* の存在下でタモキシ　フェンを投与することで SA が欠失し *flox* アリルへと変換することで *Agpat3* 遺伝子発現が回復する。

b）時期特異的 *Agpat3* 回復マウスにおける聴覚性驚愕反射測定の結果を示す。2 週齢時よりタモキシフェンを投与した場合、*Rosa-FlpoERT2* を保有する時期特異的 *Agpat3* 回復マウス（Flp＋）に おいて、これを保有しないコントロールマウス（Flp－、*Agpat3* 欠損マウス）と比べて著明な驚愕反射反応が認められた（左）。一方、3 週齢時よりタモキシフェンを投与した場合、*Rosa-FlpoERT2* を保有する時期特異的 *Agpat3* 回復マウス（Flp＋）において、正常な驚愕反射反応が認められなかった（右）。N＝3、Welch's *t*-test。

4. 細胞種特異的 *Agpat3* 欠損マウスでの聴覚性驚愕反射の検討

引き続き、*Agpat3* 欠損マウスの難聴の原因となる責任細胞について検討を加えた。代表的なコルチ器の構成細胞である有毛細胞と支持細胞の比較をするデータベース上［3］、*Agpat3* は支持細胞により高発現であった。そこで、アストロサイト特異的 Cre 系統として知られ、支持細胞においても Cre を発現する［4］*Gfap-Cre* マウスと *Agpat3-flox* マウスを交配することで支持細胞 *Agpat3* 欠損マウスを作製した。当該マウスで同様に聴覚性驚愕反射を検討したところ、正常な反射反応が検出された。また、肝臓で AGPAT3 により生合成される DHA 含有リン脂質が他臓器にも影響することが見出されているため［2］、肝臓特異的な Cre 系統である *Afp-Cre* 系統との交配で作製した肝臓特異的 *Agpat3* 欠損マウスについても同様の実験を行ったが、やはり正常な反射反応が確認された。所属研究室で保有する骨芽細胞特異的 Cre 系統である *Col1a1-Cre* 系統、血管内皮細胞特異的 Cre 系統である *Tek-Cre* 系統との交配で作製した骨芽細胞特異的または血管内皮細胞特異的 *Agpat3* 欠損マウスにおいても聴覚性驚愕反射反応は正常であったため、耳小骨等の骨系あるいは血管系に由来する AGPAT3 の必要性についても否定的であった。以上より、感覚細胞である有毛細胞、あるいはそこから信号を伝える蝸牛神経が *Agpat3* 欠損マウスの難聴責任細胞である可能性が考えられた。

5. *Agpat3* 欠損マウスの内耳構造評価

Agpat3 欠損マウスで生じる難聴の原因について、当該マウスにおける内耳の解剖学的変化や変容を疑い、内耳組織の免疫染色を行った。具体的には有毛細胞を抗 Myo7A 抗体、支持細胞を抗 Sox2 抗体、聴毛をファロイジンで染色し、その脱落や構造等を検討した。しかしながら *Agpat3* 欠損マウスにおいてこれらの分布や数、構造等の明らかな異常は観察されなかった。このことから、*Agpat3* 欠損マウスにおいては構造的変容によらない聴覚受容や伝導の異常により難聴となる可能性が考えられた。

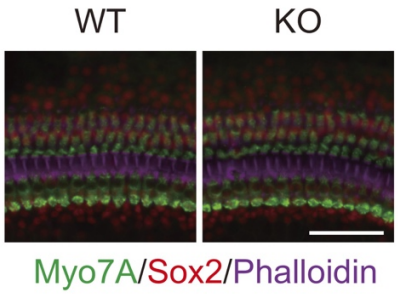


図 4. 野生型および *Agpat3* 欠損マウスの内耳有毛細胞および支持細胞の染色像
野生型（WT）および *Agpat3* 欠損マウス（KO）由来内耳の surface presentation を用いた、Myo7A（緑、有毛細胞マーカー）、Sox2（赤、支持細胞マーカー）、ファロイジン（マゼンタ、聴毛）の免疫染色像を示す。スケールバー：20 μm。

考　察

難聴予防における ω3 脂肪酸摂取の有効性を示唆する疫学調査も近年報告され、DHA 介入が難治性難聴の予防・治療戦略となりうる可能性が高まってきている。しかしながら、遺伝子改変マウス等を用いた DHA の聴覚機能への影響の検討はこれまでされてこなかった。DHA 含有リン脂質生合成酵素 *AGPAT3* の遺伝子改変マウスを用いた本研究は、DHA の聴覚への関与をはじめて直接的に証明するものであり、意義深いものと考えている。

タモキシフェン誘導型 *Agpat3* 欠損マウスの実験結果より、通常飼育時においては成獣後の DHA 含有リン脂質生合成は聴覚恒常性に必須ではないことが示唆された。しかしながら、本結果の解釈には注意が必要である。遺伝子レベルでの欠損は確認できているものの、実際に内耳の有毛細胞や聴神経等で DHA 含有リン脂質量に変化が生じているかについては、これらの細胞数が著しく少ないために検証できていないのが現状である。この問題点については、現在レポーターマウスの導入およびセルソーティングによる希少細胞のリピドミクス解析の検討を進めている。興味深いことに、成獣後からの *Agpat3* 欠損によっても DHA 含有リン脂質量が増減しない現象を一部の組織において観察しており（未発表）、内耳においても同様のことが起こっている可能性もある。一方、内耳への障害後の回復や再生の際には新たな DHA 含有リン脂質の生合成が必要になるかもしれない。これは、DHA 介入による難治性難聴の予防・治療戦略に向けて極めて重要な点だと考えられ、薬剤や音刺激による聴覚障害モデルにて検討していきたい。

Agpat3 回復マウスの実験結果より、正常聴覚のためには少なくとも生後 2 週齢から *Agpat3* が発現している必要があること、さらに 3 週齢より回復しても難聴表現型がレスキューされないことがわかった。本結果により、*Agpat3* 発現の必要な時期をこの狭いウィンドウに絞り込めたことは、AGPAT3 および DHA 含有リン脂質が聴覚機能に必要となるそのメカニズムに迫る上で大きな進展だと考える。マウスにおいて、聴覚機能開始時期は生後 10 日前後であるとされており、それ以前に有毛細胞や支持細胞の分化および蝸牛神経の有毛細胞への接続も完了しているとされている。従って、AGPAT3 および DHA 含有リン脂質は聴覚機能開始後の有毛細胞の機能維持に関わることが想定される。しかしながら、欠損マウスにおいて有毛細胞の明確な解剖学的異常が認められなかったことから、聴覚機能開始と過興奮等による有毛細胞の脱落等は考え難い。一方で聴覚機能開始後も生後 30 日以降まで有毛細胞と蝸牛神経の間のシナプスノードの成熟や refinement が起こることも近年明らかになってきており、このようなアクティブなシナプス再構成ステップに関わる可能性も考えられる。今回、聴性脳幹反射は成獣でのみ施行したが、生後の最初の聴覚開始時期の機能比較、新たな Cre 系統の導入による責任細胞の同定、および電子顕微鏡観察やシナプス形成観察等のより詳細な組織学的解析により、DHA 含有リン脂質が聴覚機能獲得・維持のいかなるステップに関わるのかを明らかにしていきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科感覚運動機能講座耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野の山岨達也先生、鴨頭輝先生である。

文　献

1） Gopinath B, Flood VM, Rochtchina E, McMahon CM, Mitchell P. Consumption of omega-3 fatty acids and fish and risk of age-related hearing loss. Am J Clin Nutr. 2010 Aug;92(2):416-21. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20534742 DOI: 10.3945/ajcn.2010.29370

2） Hishikawa D, Yanagida K, Nagata K, Kanatani A, Iizuka Y, Hamano F, Yasuda M, Okamura T, Shindou H, Shimizu T. Hepatic levels of DHA-containing phospholipids instruct SREBP1-mediated synthesis and systemic delivery of polyunsaturated fatty acids. iScience. 2020 Aug 22; 23(9):101495. PMID: 32891885 DOI: 10.1016/j.isci.2020.101495

3） Elkon R, Milon B, Morrison L, Shah M., Vijayakumar S, Racherla M, Leitch CC, Silipino L, Hadi S, Weiss-Gayet M, Barras E, Schmid CD, Ait-Lounis A, Barnes A, Song Y, Eisenman DJ, Eliyahu E, Frolenkov GI, Strome SE, Durand B, Zaghloul NA, Jones SM, Reith W, Hertzano R. RFX transcription factors are essential for hearing in mice. Nat Commun. 2015 Oct 15;6:8549. PMID: 26469318 DOI: 10.1038/ncomms9549

4） Hartman BH, Reh TA, Bermingham-McDonogh O. Notch signaling specifies prosensory domains via lateral induction in the developing mammalian inner ear. Proc Natl Aca Sci U S A. 2010 Sep 7;107(36): 15792-7. Epub 2010 Aug 23. PMID: 20798046 DOI: 10.1073/pnas.1002827107