

博士論文

Mitochondrial function in oxidative stress-induced premature senescence model of the cochlear cell line.

(蝸牛細胞株での酸化ストレスによる老化モデルにおける
ミトコンドリア機能)

鴨頭輝

要旨

HEI-OC1 蝸牛細胞培養株において早期老化モデルにおけるミトコンドリア機能の評価を試みた。H₂O₂ への曝露により、早期老化現象が生じることが判明した。ミトコンドリア画像の骨格化図の枝と接合点の特性値は有意に減少し、ミトコンドリア膜電位は H₂O₂ 濃度依存性に低下した。ミトコンドリアの予備呼吸能も障害されたが、ベースラインからの ATP 生成比率は予備呼吸能の障害変化に比べ小さかった。また、ミトコンドリア膜電位の脱共役剤に対する脆弱性は上昇した。以上の結果から、蝸牛細胞における早期老化の過程においてミトコンドリア機能が低下し、ミトコンドリアの融合と分離の平衡状態の破綻によりミトコンドリアネットワークが崩壊することが示唆された。

キーワード

ミトコンドリア機能, 早期老化, 蝸牛細胞

序文

加齢性難聴は高齢化社会における重要な課題の一つである [1-3]。最近の研究において聴力低下によって認知能力やコミュニケーション能力が加速的に低下することが示されている [4]。

加齢性難聴は、蝸牛の有毛細胞・らせん神経節細胞・血管条細胞の障害と機能不全により生じ [5]、騒音への曝露により起こる神経の変性も影響する [6]。しかし、この加齢性難聴の分子的過程については未だに不明な点が多い。

ミトコンドリアは、細胞の代謝・老化・細胞死等の細胞の機能の多くを制御している。ミトコンドリアの恒常性の安定性は細胞の生死を左右する。近年の研究により、ミトコンドリアの機能不全がほ乳類の老化における様々な臓器の障害に関わっていることがわかってきた [7]。老化におけるミトコンドリアの機能不全は、フリーラジカルの生成によってミトコンドリア DNA が障害されそれが蓄積することで起こると考えられている [8,9]。老化やストレスにおいて、ミトコンドリアの酸化・還元バランスの破綻やミトコンドリア DNA の変異によって蝸牛が障害を受けることが最近の研究で示され [5,10]、加齢性難聴における酸化ストレスとミトコンドリア機能不全の関連性も指摘されている [11]。しかし、加齢性難聴におけるミトコンドリアの形態や生理学的機能に関しては不明な点が多い。

老化や代謝関連疾患においては、ミトコンドリア機能の制御不全が細胞恒常性に悪影響を及ぼし、代謝障害、腫瘍、神経の変性につながるとされている [12]。ミトコンドリアの形態は非常に動的で、それぞれがばらばらに分離した構造から網状のネットワーク構造まで様々に変化し、この過程ではミトコンドリアの融合と分離が生じている [13]。ミトコンドリアの動的平衡状態や細胞内局在は、ミトコンドリアや細胞の機能とも深く関連する [14-16]。ミトコンドリアの融合と分離の過程の障害により、ミトコンドリアネットワークの恒常性が保たれなくなり細胞の老化につながると考えられている [17,18]。しかし、加齢性難聴におけるミ

トコンドリアの動的平衡状態に関してはこれまで研究がなされていない。

細胞のエネルギーの観点からみると、ほ乳類の老化におけるミトコンドリアの機能障害では、一般的に ATP 生成能力の低下・膜電位の低下・ミトコンドリア呼吸鎖能の低下が見られる [19,20]。有毛細胞を含めた蝸牛の細胞では、ミトコンドリアによる ATP 生成にエネルギーを高度に依存している [21]。しかし、有毛細胞を含め蝸牛の細胞における老化と細胞エネルギーの関連性は不明な点が多い。これらのことから、本研究では、加齢性難聴における細胞エネルギーとミトコンドリアネットワークの役割を探ることとした。

ミトコンドリアの評価には、細胞レベルでの酸素消費速度や膜電位計測等の動的な評価が欠かせない [22]。しかし、蝸牛有毛細胞は個体あたり数千個程度であり、さらに、非常に硬い骨に囲まれて存在するため、蝸牛有毛細胞を損傷なく個体より取り出して評価する方法は、現在の技術には存在しない。そこで、本研究においては、細胞株におけるミトコンドリア機能評価方法を、マウス等の個体におけるミトコンドリア機能評価に応用することを念頭に置き、まず、樹立された蝸牛細胞株においてミトコンドリア機能評価を行うこととした。

哺乳動物の蝸牛細胞を元として樹立された培養株は多数存在する [23]。本研究では、pubmed において最も論文数が多く、薬剤感受性評価に関する報告論文数も最も多い Immortomouse (Charles River Laboratories) の蝸牛細胞の培養株である HEI-OC1 (House Ear Institute-Organ of Corti 1) [24] を使用した。この細胞株は不死化されており、通常の老化が生じないため、早期老化のモデルとして提唱されている H_2O_2 (過酸化水素) への短時間曝露 [25] を使用した。

本研究では、HEI-OC1 蝸牛細胞培養株において、早期老化の過程でミトコンドリアの代謝やミトコンドリアネットワークにどのような変化が現れるかを調べた。

方法

細胞培養

HEI-OC1 細胞株は蝸牛より分離された上皮細胞の不死化細胞で, Professor F. Kalinec (UCLA, Los Angeles, CA, USA) より供与された。培地は high-glucose Dulbecco's modified medium (Life Technologies, Inc., NY, USA), 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Inc., NY, USA), 0.06% w/v ペニシリン (ナカライテスク, 京都, 日本) を使用した。培養は 10% CO₂, 33°C で行い, 後述の細胞生存率解析及び細胞倍加速度解析でも同様の環境を使用した。この条件は, “permissive condition” [24] と呼ばれている。3日から4日毎に継代を行った。HBSS 緩衝液に溶解した 0.05 g/L トリプシン, 0.53 mM EDTA(ナカライテスク, 京都, 日本) で剥離し, 培地 10mL と T-75 フラスコにて継代を行った。培養密度は上限 80–90%の範囲にて行った。

細胞生存率解析と細胞倍加速度解析

HEI-OC1 細胞株を 12 穴プレートに 4×10^4 cells/well の濃度で播種し, 4 群に分け, 複数の濃度 (0 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM) の H₂O₂(ナカライテスク, 京都, 日本) を追加した培地で各群をそれぞれ 1 時間培養した。1 時間後に H₂O₂ を含まない培地に置換した。対照群の細胞は, はじめから H₂O₂ を含まない培地で培養した。

細胞生存率解析では, 細胞を Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) で洗浄し, 0.05w/v% トリプシン, 0.53 mM EDTA 1 分間で剥離後, DPBS に懸濁した。その後 0.4% トリパンブルーで 1:1 に希釈し, TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad, USA) で細胞数及び細胞生存率を計測した。細胞倍加速度解析の方法に関しては, 既報 [25, 26] と同じ方法を用いた。

ミトコンドリア膜電位及び形態の解析

ミトコンドリア膜電位は, JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide) (Biotium, USA) を用いて計測した。この蛍光色素は, ミトコンドリア内膜に特異的に集積し, 膜電位が高い時には複合体となって赤い蛍光を発し, 膜電位が低い時には単量体となって緑の蛍光を発する [27]。ミトコンドリア形態解析では, TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) (Biotium, USA) も用いた。

プレートリーダーでのミトコンドリア膜電位解析では, HEI-OC1 を ibiTreat micro-Plate 24 well (ibidi, Germany) で培養し, H_2O_2 (0 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM) に 1 時間曝露した。その後 H_2O_2 を含まない通常の培地に戻した後, JC-1 (200 nM) を添加した培地で 15 分間 permissive condition 下で培養した後, 通常の培地に戻して permissive condition 下でプレートリーダーでの計測・解析を行った。

蛍光比の解析では, 温度及び CO_2 濃度の管理可能な Infinite M200 PRO plate-reader (TECAN, USA) を使用した。緑の蛍光は 485/9 nm 励起 535/20 nm 蛍光, 赤の蛍光は 535/9 nm 励起 590/20 nm 蛍光の条件で計測した。計測条件は multiple reads per well (circle, 4 \times 4) を使用した。

共焦点顕微鏡での解析では, HEI-OC1 細胞株を glass-bottom dish (Greiner, Germany) で培養し, プレートリーダーでの解析と同じ条件で H_2O_2 に曝露した。ミトコンドリアは JC-1 (2.5 μ M), TMRE (200 nM), MitoTracker Orange CMTMRos (500 nM) で 20 分間染色し, 通常の培地に戻した。画像は A1R(ニコン, 日本) で撮影した。60 \times (NA 1.4) 油浸レンズを使用し, JC-1 の撮影では 487.5 nm 半導体レーザーと 561.4 nm 半導体レーザーを用いた。TMRE または MitoTracker Orange の撮影では 561.4 nm 半導体レーザーを用いた。それぞれの蛍光は 405/488/561 nm ダイクロイックミラーと 525/50 nm または 595/50 nm バンドパスフィルタを用いて撮影した。画像解析では, NIS-Elements (ニコン, 日本), ImageJ, Fiji,

Skeletonize3D, AnalyzeSkeleton [28–30] を使用した。

構造化照明顕微鏡での解析

SIM(structured illumination microscope, 構造化照明顕微鏡)での解析は, 共焦点顕微鏡での撮影と同様の条件で HEI-OC1 細胞株を TMRE にて染色し, Ti-E(ニコン, 日本), 100 × NA1.49 CFI Apo TIRF 対物レンズ, 電子増倍型 CCD カメラ (iXon Em-CCD, Andor) を用いて撮影し, 解析を行った。

酸素消費速度及び細胞外酸性化速度の計測

OCR(酸素消費速度) 及び ECAR(細胞外酸性化速度) は, XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA) にて計測し, Seahorse XF24 マニュアルに準じて解析を行った。

HEI-OC1 細胞株を専用の 24 穴プレートにて一晩培養し, H_2O_2 (0 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM) に 1 時間曝露し, さらに一晩培養した。その後, 細胞を XF assay medium (DMEM, NaHCO_3 なし, 2 mM Glutamax; Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) に 25 mM D-グルコース (大塚製薬, 徳島, 日本) と 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク, 京都, 日本) を追加した培地 675 μL で 2 回洗浄した。細胞を空气中, 33 °C で 1 時間培養した後, OCR 及び ECAR を XF24 Extracellular Flux Analyzer で測定した。測定は下記の順に薬剤を添加して行った。(1) 薬剤非添加時のベースライン速度 (2) 2.5 μM オリゴマイシンを添加し ATP 合成酵素及び OXPHOS を停止した際の速度 (3) 1.25 μM FCCP を添加し脱共役下での最大速度 (4) 0.625 μM アンチマイシン A を添加し complex III を阻害した際の速度 (5) 0.625 μM ロテノン を添加し, complex I を阻害した際の速度 (図 1)。細胞密度及びそれぞれの薬剤の最適濃度の決定は, Seahorse XF24 マニュアルに準じて行った (図 2)。

ミトコンドリア膜透過性遷移の解析

ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP: mitochondrial permeability transition pore) の機能を, FCCP 投与による TMRE の蛍光強度の減衰の計測により解析した。HEI-OC1 細胞株は共焦点顕微鏡での解析と同様の方法で準備し, 培地 200 μL にて置換した。5% CO_2 , 33°C の条件下で細胞の TMRE の蛍光画像を 1 分あたり 1 枚撮像し, 同時に 1 分あたり 50 μL の速度で 1.375 μM または 2.75 μM FCCP を投入した。計算上の培地中の FCCP の濃度を図 3A に示す。解析対象の各細胞を対象領域 (ROI) として選択し, 強度平均を図にした。FCCP を投入しない場合は, 撮像中に蛍光の強度は変化しなかった (図 3B, C)。

mPTP の阻害剤投与時の解析では, 1 μM CyA (cyclosporine A) (Sigma; USA) を 20 分間曝露した後に同様の解析を行った。

透過型電子顕微鏡での解析

透過型電子顕微鏡での観察では, 以下の方法で標本を用意した。HEI-OC1 細胞株をトリプシンで剥離し, 2% グルタルアルデヒド, 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で 1 時間固定し, 1% 四酸化オスミウム, 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) にて 2 時間固定した。0.5% 酢酸ウラニル水溶液で染色し, 4°C アルコールで脱水し, 100% エポンアラライト樹脂で置換した。薄切 (70nm) はダイヤモンドナイフにて行い, EM グリッドに載せ, Reynolds のクエン酸鉛染色液にて染色し, 洗浄, 乾燥し, H-7000 (日立, 東京, 日本) にて観察した。

統計解析

統計解析は R 3.2.4 (R Core Team; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016) を用いて行い, 一元配置分散分析, スチューデントの t 検定を行った。P<0.05 を有意とした。値は平均 ± 標準偏差で表示した。

結果

H₂O₂ 曝露により HEI-OC1 細胞株で早期老化が生じる

過去の研究では、H₂O₂ の曝露により、細胞の早期老化が濃度依存性に起こるとされている [25,31]。HEI-OC1 細胞株を、3 種類の異なる濃度の H₂O₂ で曝露し、細胞増殖速度と細胞生存率を評価し、蝸牛細胞において酸化ストレスが早期老化を生じさせるかを調べた。HEI-OC1 細胞株を 3 種類の濃度の H₂O₂ に 1 時間曝露し、通常の培地に戻した後、permissive condition で 2 日間培養した。H₂O₂ 1 時間曝露群では、2 日後の細胞倍加速度が濃度依存性に有意に低下したが (図 4A)、この 3 つの濃度の H₂O₂ 1 時間曝露では、細胞生存率に変化は見られなかった (図 4B)。これらの結果から、上記の条件 (100 μM, 300 μM, 1 mM H₂O₂ 1 時間曝露, permissive condition で 2 日間培養) により、細胞増殖を低下させることが確認された。

H₂O₂ 曝露により HEI-OC1 細胞株においてミトコンドリア微細構造の変化が生じる

共焦点顕微鏡及び SIM での解析では、H₂O₂ 曝露 (1 mM, 1 時間) の 1 日後、HEI-OC1 細胞株のミトコンドリアの構造に変化が見られた (図 5)。対照群の細胞では、ミトコンドリアの分裂と融合のバランスが動的に保たれ、ミトコンドリアは糸状の構造を持つが (図 5A, C)、H₂O₂ 曝露した細胞では、分離した球状のミトコンドリアや過度に融合し巨大化したミトコンドリアが見られた (図 5B, D)。

透過型電子顕微鏡において H₂O₂ 曝露下 (1 mM, 1 時間) でのミトコンドリアの構造変化を評価したところ、対照群の細胞では正常の状態のミトコンドリア (M) と小胞体 (ER) が見られた (図 6A, C, E) のに対し、H₂O₂ 曝露 (1 mM, 1 時間) 群では、1 日後には障害されたミ

トコンドリアや凝集した細胞小器官を取り込んだオートファゴソームが観察された (図 6B)。また, 障害されたミトコンドリアと小胞体の近くにオートファゴソームを認め, 円状の二重膜構造を認めた (図 6D)。その他, 過度に融合したミトコンドリアや分離した球状のミトコンドリアの融合などの異常が観察された (図 6F)。

H₂O₂ 曝露により HEI-OC1 細胞株においてミトコンドリアのネットワークは減弱する

ミトコンドリアの形態変化及び動的変化によりミトコンドリアのネットワークに変化が生じることが知られているため [13,18], 分離及び融合の変化を静止画像を用いて解析した。ミトコンドリアの分離と融合の仕組みとして, 1) 端同士, 2) 側面同士, 3) 端と側面, の数種類の組み合わせがある。この組み合わせにより, ネットワークの節 (node) が形作られる (図 7A)。そして, この分離及び融合の仕組みにより, 糸状構造と網目構造が形作られる。ネットワーク構造の中には他のどの部分とも接続しない構造が存在し, 単に寄り集まっただけのクラスタとなっている。対照群では, 糸状の構造が認められた (図 7B)。それに対し H₂O₂ 曝露群では, ミトコンドリアは粒状に分かれクラスタとなり, ミトコンドリアのネットワークは断片化していた (図 7B)。数値的な評価としては, ミトコンドリア画像の骨格化図における 1) 枝の数, 2) 分岐点の数, 3) 分岐までの長さは, H₂O₂ 曝露群で有意に減少した (図 7C, D, E, F)。

H₂O₂ 曝露により HEI-OC1 細胞株においてミトコンドリア膜電位は減少する

JC-1 ミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素による解析を行ったところ、H₂O₂ 曝露によってミトコンドリアの脱分極が生じることが示された。図 8A, B において、緑の蛍光部分はミトコンドリア膜電位の低い部分で、赤の蛍光部分はミトコンドリア膜電位の高い部分である。対照群の細胞のミトコンドリアでは赤の蛍光が多く見られた (図 8A) のに対し、H₂O₂ 曝露群の細胞では小さなクラスタに分離したミトコンドリアが緑の蛍光を持ち、これに対して過度に融合した部分は赤の蛍光を呈していた (図 8B)。

ミトコンドリア膜電位の状態として赤／緑の蛍光比を数値的に評価したところ、H₂O₂ の 1 時間曝露により赤／緑の蛍光比は濃度依存性に減少していた (図 8C)。ただし、H₂O₂ 曝露群においても分極したミトコンドリアは完全には消失しなかった (図 8B)。

H₂O₂ 曝露により HEI-OC1 細胞株において、最大酸素消費速度は半分程度に減少するが、ATP 生成への寄与は小さい

ミトコンドリア機能の評価として、ミトコンドリア脱共役剤である FCCP 投与時の最大呼吸速度とオリゴマイシン投与時の呼吸速度を計測した。ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤と FCCP の投与により、酸素消費速度が変化する (図 1)。この方法を用いて対照群と H₂O₂ 曝露群を比較したところ、H₂O₂ 曝露により濃度依存性に酸素消費速度が減少し (図 9A, B), FCCP 投与時の呼吸速度の変化率は、H₂O₂ 曝露群により濃度依存性に減少した (図 9B)。アンチマイシン A 及びロテノン投与時の呼吸速度の変化は、対照群と H₂O₂ 曝露群とで有意差がなかった (図 9D, E)。オリゴマイシン投与後の ATP 生成に関する酸素消費速度は、H₂O₂ 曝露後 24 時間時点で群間にわずかに有意差を認めたものの (図 9C), H₂O₂ 曝露後 48 時間時

点では有意差は無くなり (図 9H), H_2O_2 曝露による ATP 生成への寄与は小さいことが推察された。なお, H_2O_2 の 12 時間連続曝露では細胞死が引き起こされ, 異なる形のミトコンドリア機能障害が見られた。この H_2O_2 12 時間曝露による障害では, ベースラインの酸素消費速度は H_2O_2 曝露群で濃度依存性に低下し, ATP 生成に関する酸素消費速度と最大呼吸速度はいずれも低下した (図 9F)。

HEI-OC1 細胞株において, H_2O_2 曝露によりミトコンドリア膜電位の脆弱性が生じ, ミトコンドリア膜透過性遷移孔の阻害剤によっても保護されない

FCCP の投与により, mPTP が開口しミトコンドリア膜電位が低下する現象を用いて, mPTP の機能評価を行った。 H_2O_2 曝露群においては, FCCP の投与によるミトコンドリア膜電位低下率は対照群に比べ有意に上昇した (図 10B, C, D)。

CyA は mPTP の阻害剤であり, FCCP 投与前に CyA を処理することで FCCP 投与によるミトコンドリア膜電位の低下を阻止できることが予想されたが, HEI-OC1 に対する H_2O_2 曝露ではその効果は限定的であり (図 11A, B, C), ミトコンドリア膜電位の低下開始までの時間は変化せず (図 11D) それ以降は膜電位の低下が見られた。

酸素消費速度に関して, 対照群においては CyA 処理を行ってもベースラインからの最大呼吸速度は変化しなかったが (図 11E), H_2O_2 曝露群では CyA 処理によっても最大呼吸速度は保護されなかった (図 11E)。

考察

本研究では、HEI-OC1 細胞株において早期老化現象を引き起こす H_2O_2 の曝露により、ミトコンドリア機能が障害され最大呼吸速度が減少し、ミトコンドリア膜電位が低下することが示された。形態的には、ミトコンドリアの融合と分離のバランスが、蝸牛細胞の早期老化の過程において重要な役割を果たしていることが示された。本研究の結果から、ミトコンドリアの代謝とミトコンドリアネットワークは、蝸牛細胞の早期老化において互いに重要な関連性があることが示唆された。

本研究では、蝸牛細胞の早期老化のモデルとして、3 種類の濃度の H_2O_2 に 1 時間曝露する方法を用いた。 H_2O_2 は酸化ストレスにより早期老化を引き起こす薬剤として広く使われている [32,33]。HEI-OC1 細胞株の処理の際の条件は、ミトコンドリアの機能の評価を目標として、過去の報告 [25] に基づいて決定した。 H_2O_2 の 1 時間曝露により、曝露しない対照群に比べ細胞増殖率は有意に減少したが、細胞生存率は減少しなかった。 H_2O_2 曝露により、蝸牛細胞のミトコンドリアの形態や膜電位がどのように変化するかを評価し、ミトコンドリアの機能がどのように変化するかを調べたところ、透過型電子顕微鏡による評価では、 H_2O_2 曝露群において障害されたミトコンドリアと凝集した細胞小器官を取り込んだオートファゴソームが観察された。ミトコンドリアの融合と分離は、対照群と H_2O_2 曝露群の両方で観察されたが、SIM の評価では、対照群の細胞において長く伸びた形状のミトコンドリアが多く観察されたのに対し、 H_2O_2 曝露群では球状で短い形状のミトコンドリアが多く観察された。このことから、球状の分離したミトコンドリアは、ミトコンドリアの動的平衡のバランスの変化 (融合 < 分離) により生じたと考えられる。一般的に、ミトコンドリアは、融合と分離を繰り返す動的平衡状態にあると考えられている。融合により、互いにつながった長い形状のミトコンドリアがネットワークを形成し、このネットワークはそれぞれのミトコンドリア間の膜電位の保持に寄与している [34]。ミトコンドリアの分離の現象は、障害されたミトコン

ドリアを新しいミトコンドリアで置換して細胞の状態を保ち、細胞ストレスの強い状態では細胞をアポトーシスから保護する役割があると考えられている。ミトコンドリアの融合と分離の平衡状態が保たれることにより、ストレス下の細胞においてミトコンドリアの機能が保たれると考えられる。

ミトコンドリア画像の骨格化处理により算出された 1) 枝の数, 2) 分岐点の数, 3) 分岐までの長さの値は、対照群に比べて H_2O_2 処理群で有意に減少した。融合と分離の状態は、骨格化处理により算出した値から推定することができる。ミトコンドリアの融合と分離のバランスによりミトコンドリアのネットワーク構造が変化し、融合に傾くと枝状に分かれた網状の構造が形成され、分離に傾くとばらばらの構造となると考えられている [35]。従って、ミトコンドリアの動的平衡状態やオートファジーによる分解処理機能の不全が、蝸牛細胞での早期老化の発現に欠かせない要素となっていると考えられる。ミトコンドリアの機能不全はミトコンドリア融合の抑制に影響され、その結果、ミトコンドリアネットワークは、小型のミトコンドリアやたくさんの小さなクラスタに分離した状態になり [36]、オートファゴソームの形成に寄与する [37]。細胞エネルギーの観点からは、 H_2O_2 曝露により、濃度依存性にミトコンドリア膜電位が減少した。分離して球状になった状態のミトコンドリア (融合 < 分離) では、膜電位が低下していたが、過度に融合したミトコンドリア (融合 > 分離) では、膜電位が保たれた状態であった。これに対し、対照群のミトコンドリアでは、融合と分離が動的平衡状態にありミトコンドリア膜電位が保たれていた。これらのことは、早期老化によるエネルギー状態の変化とミトコンドリアの融合と分離が、少なくとも蝸牛細胞において重要な役割を果たしていることを示しており、ミトコンドリアの融合の破綻によりミトコンドリアが機能不全を起こすという過去の報告 [38, 39] と合致する。蝸牛細胞においても、ミトコンドリアの代謝状態とミトコンドリアネットワークの形成は、機能的に相互依存する [40, 41] といえる。

最大呼吸速度はミトコンドリア脱共役剤投与時の呼吸速度として定義される。ミトコンド

リアの予備呼吸能は、細胞の酸化ストレスやエネルギー不全に関する重要な鍵として近年注目されており [42–44]、酸化ストレスや基質不足等の多種のストレスから細胞を保護する予備能として考えられている [45]。最大呼吸速度は、主に基質補給能に依存すると考えられている [45]。本研究では、 H_2O_2 曝露によりミトコンドリア予備呼吸能が障害されるが、ベースラインの ATP 生成速度は影響されないことが示された。このミトコンドリア呼吸鎖の機能低下は、蝸牛細胞の早期老化の過程で早期 (1 日) に生じた。ミトコンドリアの動的平衡の観点からは、蝸牛細胞において通常より高い代謝状態におけるミトコンドリアの融合が、呼吸能に重要な役割を果たすといえる。

ミトコンドリア膜電位の脱共役剤に対する脆弱性は、 H_2O_2 曝露により悪化した。FCCP の投与により mPTP が開口し、ミトコンドリア膜電位が低下する。CyA は mPTP の阻害剤であり、ミトコンドリア膜電位の低下を保護するが、CyA の投与によっても対照群と比較して H_2O_2 曝露群では膜電位低下までの時間は変わらなかった。ミトコンドリア脱共役剤に対する耐性や脆弱性に関しては、癌細胞 [46]、心筋細胞モデルでの心保護剤や麻酔薬の評価 [47–50]、HeLa 細胞のモデル [51] 等で広く報告されている。ミトコンドリア膜電位の低下は、mPTP の機能に多くを依存し、CyA やシクロスポリン H 等の mPTP の阻害剤によって mPTP の機能の評価ができると考えられる。しかし、他の要素もミトコンドリア膜電位の低下に関わっており、ミトコンドリア膜電位のみでの評価では困難な場合もある。神経細胞のモデルでは、mPTP を構成するサイクロフィリン D の発現亢進による mPTP の活性化によって、アポトーシスやネクロトーシスの誘導とは逆の効果をもたらすという報告 [52] がある。本研究では、 H_2O_2 曝露によってもミトコンドリア膜電位の低下開始の時間は変化せず、CyA の投与によってもそれは延長しなかった。しかし、ミトコンドリア膜電位の低下開始後は、対照群に比べて H_2O_2 曝露群ではミトコンドリア膜電位は有意に低下した。このことから、mPTP 以外にミトコンドリア膜電位を保持する要素があり、 H_2O_2 曝露によってこの要素が障害される可能性が示唆された。

本研究では、蝸牛細胞において、早期老化により予備呼吸能に大幅な機能低下が生じるが、ベースの ATP 生成に関する呼吸の変化は予備呼吸能の変化に比べ小さいことが示された。酸素消費速度の低下としてのミトコンドリア機能低下は、ミトコンドリアの融合と分離の動的平衡の崩れにつながり、ミトコンドリアネットワークが断片化する。本研究は、蝸牛細胞の早期老化において、ミトコンドリアの動的平衡状態とミトコンドリアの呼吸鎖の機能を調べた初の報告となる。

蝸牛細胞株と他の細胞株とのミトコンドリア機能の定性的な比較という観点では、HEI-OC1 はミトコンドリア呼吸鎖阻害剤のうちオリゴマイシンへの感受性がやや低い傾向にあった。予備実験の結果 (図 2) オリゴマイシンの濃度として 2.5 μM を使用したが、他の実験系では 1 μM 近辺を使用している論文が多かった [53–57]。このことから、蝸牛細胞においてミトコンドリア呼吸鎖 complex V の状態が他の組織と異なることが予想された。尚、最大酸素消費速度に関しては、本研究ではベースラインと比較し 200%程度までの上昇で、他の実験系での結果と大きな違いは見られなかった [53–57]。よって、他の組織とのミトコンドリア機能の違いとして、ミトコンドリア呼吸鎖 complex V より前の電子伝達系または水素供給源に関しては、complex V に比べてその機能の差が小さいことが予想された。形態や膜電位に関しては、直接に比較可能な結果の掲載されている論文がなく、比較は困難であったが、定性的には大きな差はないと考えた。

今後、本研究において施行したミトコンドリア機能評価方法を個体での評価実験に応用する方法の探索、細胞株での早期老化モデルと通常の個体における老化との比較、そして、老化にともなう聴力低下の原因との関連についてさらなる研究が必要である。

謝辞

本研究は、主に東京大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学教室にて行いました。研究に従事する機会を与えて下さり、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました、指導教官である、東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 耳鼻咽喉科学分野 山唄達也教授に謹んで深謝いたします。実験手技や研究手法についてご指導、ご助言下さいました、神尾記念病院 林賢先生、本学耳鼻咽喉科学教室の諸先生方にお礼申し上げます。HEI-OC1細胞株は、Federico Kalinec 氏 (UCLA, Los Angeles, CA, USA) から供与されました。構造化照明顕微鏡での撮影と技術指導を頂きました Nikon Imaging Laboratory, 徳永和明氏と小谷岳氏に感謝申し上げます。また、田中治子氏、臼倉絵美氏、露崎敦子氏、福田覚氏の技術支援及び電子顕微鏡での撮影に関して感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Gratton, M. A. & Vazquez, A. E. Age-related hearing loss: current research. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **11**, 367–371 (2003).
- [2] Gates, G. A. & Mills, J. H. Presbycusis. *Lancet* **366**, 1111–1120 (2005).
- [3] Roth, T. N., Hanebuth, D. & Probst, R. Prevalence of age-related hearing loss in europe: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **268**, 1101–1107 (2011).
- [4] Lin, F. R. *et al.* Hearing loss and cognitive decline in older adults. *JAMA Intern Med* **173**, 293–299 (2013).
- [5] Chen, H. & Tang, J. The role of mitochondria in age-related hearing loss. *Biogerontology* **15**, 13–19 (2014).
- [6] Kujawa, S. G. & Liberman, M. C. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.* **29**, 14077–14085 (2009).
- [7] Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
- [8] Kujoth, G. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481–484 (2005).
- [9] Bratic, A. & Larsson, N. G. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957 (2013).
- [10] Yamasoba, T. *et al.* Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial dna mutations in age-related hearing loss. *Hear Res* **226**, 185–193 (2007).

- [11] Fujimoto, C. & Yamasoba, T. Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 582849 (2014).
- [12] Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145–1159 (2012).
- [13] Frazier, A. E., Kiu, C., Stojanovski, D., Hoogenraad, N. J. & Ryan, M. T. Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biol. Chem.* **387**, 1551–1558 (2006).
- [14] Supale, S., Li, N., Brun, T. & Maechler, P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic I2 cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 477–487 (2012).
- [15] Frank, S. *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* **1**, 515–525 (2001).
- [16] Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R. & Bossy-Wetzler, E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 505–518 (2008).
- [17] Gousspillou, G. *et al.* Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell* **13**, 39–48 (2014).
- [18] Scheckhuber, C. Q. *et al.* Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat. Cell Biol.* **9**, 99–105 (2007).
- [19] Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**, 1109–1112 (2011).
- [20] Burstein, M. T. & Titorenko, V. I. A mitochondrially targeted compound delays aging in yeast through a mechanism linking mitochondrial membrane lipid metabolism to mitochondrial redox biology. *Redox Biol* **2**, 305–307 (2014).

- [21] Someya, S. *et al.* Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19432–19437 (2009).
- [22] Leister, D. & Herrmann, J. M. (eds.) *Mitochondria* (Humana Press, 2007).
- [23] Rivolta, M. N. & Holley, M. C. Cell lines in inner ear research. *J. Neurobiol.* **53**, 306–318 (2002).
- [24] Kalinec, G. M., Webster, P., Lim, D. J. & Kalinec, F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol. Neurotol.* **8**, 177–189 (2003).
- [25] Tsuchihashi, N. A. *et al.* Autophagy through 4EBP1 and AMPK regulates oxidative stress-induced premature senescence in auditory cells. *Oncotarget* **6**, 3644–3655 (2015).
- [26] Young, J. J., Patel, A. & Rai, P. Suppression of thioredoxin-1 induces premature senescence in normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 363–368 (2010).
- [27] Reers, M., Smith, T. W. & Chen, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* **30**, 4480–4486 (1991).
- [28] Lee, T., Kashyap, R. L. & Chu, C. Building skeleton models via 3-D medial surface/axis thinning algorithms. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* **56**, 462–478 (1994).

- [29] Arganda-Carreras, I., Fernandez-Gonzalez, R., Munoz-Barrutia, A. & Ortiz-De-Solorzano, C. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc. Res. Tech.* **73**, 1019–1029 (2010).
- [30] Doube, M. *et al.* BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* **47**, 1076–1079 (2010).
- [31] Cao, C. *et al.* SIRT1 confers protection against UVB- and H₂O₂-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3632–3643 (2009).
- [32] Wang, Z., Wei, D. & Xiao, H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. *Methods Mol. Biol.* **1048**, 135–144 (2013).
- [33] Zdanov, S., Remacle, J. & Toussaint, O. Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1067**, 210–216 (2006).
- [34] Shutt, T. E. & McBride, H. M. Staying cool in difficult times: mitochondrial dynamics, quality control and the stress response. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 417–424 (2013).
- [35] Sukhorukov, V. M., Dikov, D., Reichert, A. S. & Meyer-Hermann, M. Emergence of the mitochondrial reticulum from fission and fusion dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002745 (2012).
- [36] Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. & Mihara, K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* **25**, 2966–2977 (2006).

- [37] Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 10190–10195 (2011).
- [38] Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189–200 (2003).
- [39] Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D. C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* **280**, 26185–26192 (2005).
- [40] Otera, H. & Mihara, K. Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *Int J Cell Biol* **2012**, 821676 (2012).
- [41] Zorzano, A., Liesa, M., Sebastian, D., Segales, J. & Palacin, M. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 566–574 (2010).
- [42] Hill, B. G., Dranka, B. P., Zou, L., Chatham, J. C. & Darley-Usmar, V. M. Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem. J.* **424**, 99–107 (2009).
- [43] Dranka, B. P., Hill, B. G. & Darley-Usmar, V. M. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 905–914 (2010).
- [44] Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297–312 (2011).
- [45] Hill, B. G. *et al.* Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.* **393**, 1485–1512 (2012).

- [46] Thomas, K. J. & Jacobson, M. R. Defects in mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 are linked to apoptotic resistance and autophagy in a lung cancer model. *PLoS ONE* **7**, e45319 (2012).
- [47] Maloyan, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* **112**, 3451–3461 (2005).
- [48] Sedlic, F. *et al.* Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca²⁺. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **299**, C506–515 (2010).
- [49] Sepac, A. *et al.* Isoflurane preconditioning elicits competent endogenous mechanisms of protection from oxidative stress in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Anesthesiology* **113**, 906–916 (2010).
- [50] Xie, C., Kauffman, J. & Akar, F. G. Functional crosstalk between the mitochondrial PTP and KATP channels determine arrhythmic vulnerability to oxidative stress. *Front Physiol* **5**, 264 (2014).
- [51] Cereghetti, G. M. *et al.* Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15803–15808 (2008).
- [52] Li, Y., Johnson, N., Capano, M., Edwards, M. & Crompton, M. Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem. J.* **383**, 101–109 (2004).

- [53] Karnewar, S. *et al.* Mitochondria-targeted esculetin alleviates mitochondrial dysfunction by AMPK-mediated nitric oxide and SIRT3 regulation in endothelial cells: potential implications in atherosclerosis. *Sci Rep* **6**, 24108 (2016).
- [54] Chang, J. C. *et al.* Far-infrared radiation protects viability in a cell model of Spinocerebellar Ataxia by preventing polyQ protein accumulation and improving mitochondrial function. *Sci Rep* **6**, 30436 (2016).
- [55] Chen, Q. *et al.* FGF-2 Transcriptionally Down-Regulates the Expression of BNIP3L via PI3K/Akt/FoxO3a Signaling and Inhibits Necrosis and Mitochondrial Dysfunction Induced by High Concentrations of Hydrogen Peroxide in H9c2 Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **40**, 1678–1691 (2016).
- [56] Sheu, S. J., Chao, Y. M., Liu, N. C. & Chan, J. Y. Differential effects of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept on cell viability, phagocytosis and mitochondrial bioenergetics of retinal pigment epithelial cell. *Acta Ophthalmol* **93**, e631–643 (2015).
- [57] Szczesny, B. *et al.* AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide* **41**, 120–130 (2014).

図の説明

図1. 酸素消費速度解析の経過

典型的な酸素消費速度解析の経過。オリゴマイシン, FCCP, アンチマイシン A, ロテノン を順に投入し, 酸素消費速度の変化を連続的に測定した。すべての値は平均 ± 標準偏差で表示した。

図2. 最適細胞数とミトコンドリア呼吸鎖阻害剤の最適濃度の決定

A) 異なる細胞数での酸素消費速度 (1 グループあたり $n = 5$)。酸素消費速度は細胞数の多いグループで速かった。ある程度細胞数が多いと, 酸素消費速度は比例的に増大しなかった。

B) オリゴマイシン, FCCP, アンチマイシン A, ロテノンを順に投入し, 酸素消費速度の変化を連続的に測定した。各濃度は, 0 μM , 0.3 μM , 0.6 μM , 1.25 μM , 2.5 μM (1 グループあたり $n = 4$)。投与時に最大の変化の見られた濃度は, オリゴマイシンでは 2.5 μM , FCCP では 1.25 μM だった。アンチマイシン A とロテノンに関しては, 0.6 μM 以上で変化が見られた。すべての値は平均 ± 標準偏差で表示した。

図3. FCCP 投与時の濃度の変化と, FCCP 非投与時の蛍光変化

A) TMRE 蛍光強度解析の際の FCCP 投与時の計算上の濃度変化。最初に 200 μL の培地を用意し, 1.375 μM または 2.75 μM FCCP を一分毎に 50 μL ずつ投入した。FCCP 非投与時には, B) 対照群 C) H_2O_2 曝露群ともに蛍光強度の変化はなかった。D,E) 対照群と H_2O_2 曝露群とで蛍光強度の変化率に有意差はなかった。すべての値は平均 ± 標準偏差で表示した。

図4. H_2O_2 曝露による細胞倍加速度と細胞生存率

A) 細胞倍加速度。B) 細胞生存率。トリパンブルー染色により測定した。 H_2O_2 (0 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM) を 1 時間曝露, それぞれの濃度に対する結果を図に示した。値は平均 ± 標準偏差で表示した。1 グループあたり $n = 6$ 。* $P < 0.05$ 。

図5. H_2O_2 曝露によるミトコンドリアの形態変化

H_2O_2 曝露により, HEI-OC1 細胞株でミトコンドリアの形態が変化した。細胞は TMRE により染色した。A) 共焦点顕微鏡で撮影した対照群の細胞。ミトコンドリアの形状は糸状である。スケールバー, 10 μm 。B) 共焦点顕微鏡で撮影した H_2O_2 100 μM 1 時間曝露群の細胞。ミトコンドリアの形状は球状である。スケールバー, 10 μm 。C) SIM で撮影した対照群の細胞。スケールバー, 5 μm , 拡大図は原図の 2 倍。D) SIM で撮影した H_2O_2 曝露群の細胞。ミトコンドリアの太さは対照群より太い。スケールバー, 5 μm , 拡大図は原図の 2 倍。

図6. H₂O₂ 曝露によるミトコンドリアの微細構造の変化

透過型電子顕微鏡による HEI-OC1 細胞株の画像。A, C, E) 対照群。 B, D, F) 1 mM H₂O₂ 1 時間曝露後翌日。 AP, オートファゴソーム; ER, 小胞体; GL, ゴルジ体; L, ライソソーム; M, ミトコンドリア。スケールバー, A, B) 200 nm, C, D, E, F) 100nm。

図7. H₂O₂ 曝露によるミトコンドリアの構造変化の数値的解析

H₂O₂ 曝露によるミトコンドリアの構造変化を数値的に解析した。細胞は MitoTracker Orange CMTMRos 500 nM にて染色し、共焦点顕微鏡にて撮影した。A) ミトコンドリアにおける分離と融合の形式。端点同士, 端点と横, 横同士の融合と分離が存在する。B) ImageJ においてバンドパスフィルタ及び Skeletonize プラグインで処理した対照群と H₂O₂ 曝露群の画像。赤はバンドパスフィルタ処理前の画像で, 緑は Skeletonize プラグイン処理後の画像。一部を拡大し, 骨格化画像のネットワークを示した。赤点が端点, 青点が分岐点。C) 枝の数 (Branch) D) 分岐点の数 (Branching point) E) 分岐までの平均長 (Average Branch Length) パラメータの比較。H₂O₂ 曝露により, それぞれのパラメータは減少し, 有意差を認めた (P < 0.05)。すべての値は平均 ± 標準偏差で表示した。F) パラメータの説明。

図8. H₂O₂ 曝露によるミトコンドリア膜電位の変化

細胞は JC-1 2.5 μM にて染色し、共焦点顕微鏡にて撮影した。ミトコンドリア膜電位の高い部分では JC-1 は複合体を形成し赤い蛍光を発し, 低い部分では, JC-1 は単量体となって緑の蛍光を発する。A) 対照群。B) H₂O₂ 曝露 (1 mM, 1 時間) 群, ミトコンドリア膜電位の低下した部分は緑の蛍光を発する。C) プレートリーダーを使用した JC-1 によるミトコンドリア膜電位の解析。H₂O₂ (0 μM, 100 μM, 300 μM, 1 mM) を 1 時間曝露し, 翌日 JC-1 で染色し, 蛍光を測定した。赤の蛍光 (590 nm) と緑の蛍光 (535 nm) とを測定し, 蛍光強度比を計算した。すべての値は平均 ± 標準偏差で表示した。1 グループあたり n = 6。*P < 0.05。(スケールバー, 10 μm)。

図9. H₂O₂ 曝露による酸素消費速度の変化

A) H₂O₂ (0 μM, 100 μM, 300 μM, 1 mM を 1 時間) 曝露の翌日に酸素消費速度を測定した。相対酸素消費速度は, ベースラインの酸素消費速度からの相対値を計算した。ミトコンドリア呼吸鎖複合体の阻害剤と脱共役剤を順に投入し, 酸素消費速度の変化を測定した。B) FCCP, C) オリゴマイシン, D) アンチマイシン A, E) ロテノン投与後の酸素消費速度の変化を AUC (area under curve) を計算して比較した。FCCP 投入時の酸素消費速度の変化は, H₂O₂ 曝露群において, 濃度依存性に減少した (0.1 mM: 108%, 0.3 mM: 69%, 1 mM: 66%, コントロール群: 184%)。すべての値は平均 ± 標準偏差で表示した。1 グループあたり n = 5。*P < 0.05。

F) H_2O_2 (0 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM を 1 時間) 曝露翌々日の相対酸素消費速度。G) FCCP, H) オリゴマイシン, I) アンチマイシン A, J) ロテノン投与後の酸素消費速度の変化を AUC (area under curve) を計算して比較した。FCCP 投入時の酸素消費速度の変化は、 H_2O_2 曝露群において、濃度依存性に減少した。すべての値は平均 \pm 標準偏差で表示した。1 グループあたり $n = 5$ 。* $P < 0.05$ 。

K) H_2O_2 (0 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM を 12 時間) 曝露の後に酸素消費速度を測定した。

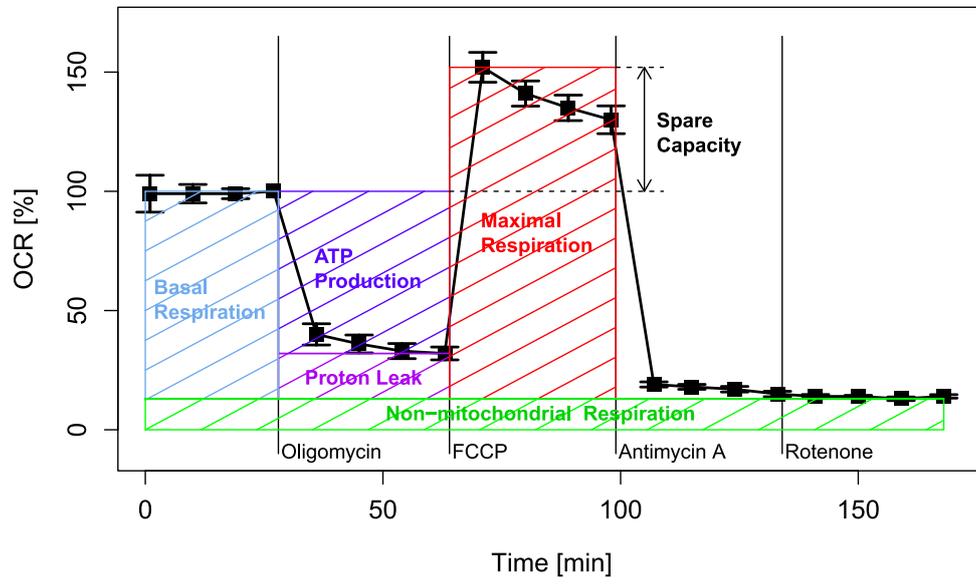
図 10. H_2O_2 曝露によるミトコンドリア膜電位の脆弱性とミトコンドリア膜透過性遷移孔の解析

ミトコンドリアを TMRE 200 nM で染色し、FCCP の投入により膜透過性遷移現象を引き起こし、その際のミトコンドリア膜電位の変化を解析した。共焦点顕微鏡で TMRE の蛍光を継続的に撮像し、撮像中に 1.375 μM FCCP を断続的に投入した。典型的な経時変化では、継続的な蛍光強度の減少が見られた (A)。解析対象の各細胞を画像上で対象領域 (ROI) として選択し、ROI の蛍光強度の平均を描画した (B: 対照群, C: H_2O_2 曝露群)。 H_2O_2 曝露群では、対照群に比べて蛍光強度が早く低下した (D)。相対蛍光強度平均は、対照群に比べて有意に低下した。すべての値は平均 \pm 標準偏差で表示した。* $P < 0.05$ 。

図 11. H_2O_2 曝露によるミトコンドリア膜電位の脆弱性の CyA 投与による変化と酸素消費速度の変化

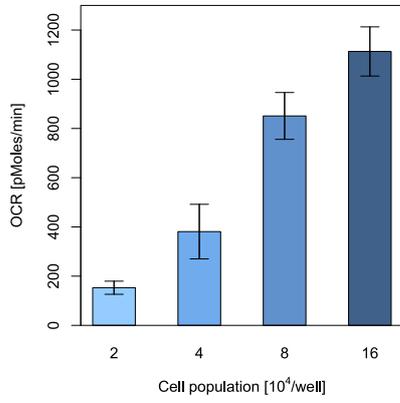
CyA 処理により、FCCP 投与時の蛍光強度の低下までの時間が延長した (A: 対照群, B: CyA 1 μM 20 分間処理群)。 H_2O_2 曝露群では、蛍光強度は対照群に比べて低下した (C)。平均蛍光強度の低下は、対照群と曝露群とで有意差を認めた (D)。CyA 処理群では、ミトコンドリア膜電位の低下開始時間がいずれのグループでも約 600 秒であった。* $P < 0.05$ 。E) H_2O_2 曝露 (300 μM , 1 時間) の翌日、酸素消費速度を計測し、ベースラインの酸素消費速度からの相対値を計算した。CyA 1 μM (ミトコンドリア膜透過性遷移孔阻害剤)、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤、ミトコンドリア脱共役剤を順に投入し、酸素消費速度を計測した。 H_2O_2 曝露群では、FCCP 投与時の酸素消費速度の上昇率は対照群より低下し、この低下は、CyA によって改善しなかった。すべての値は平均 \pm 標準偏差で表示した。1 グループあたり $n = 5$ 。

☒ 1

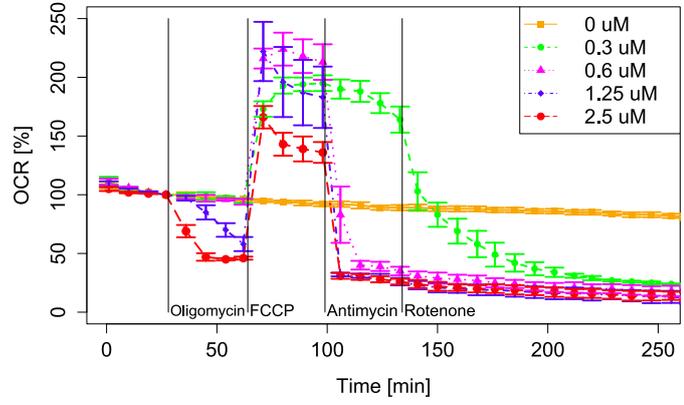


☒ 2

A)

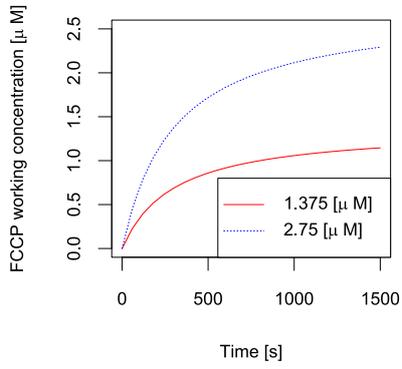


B)

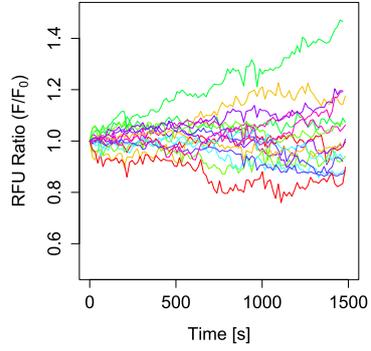


3

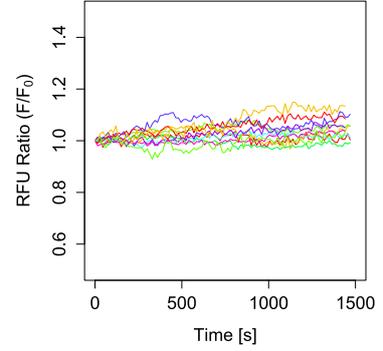
A)



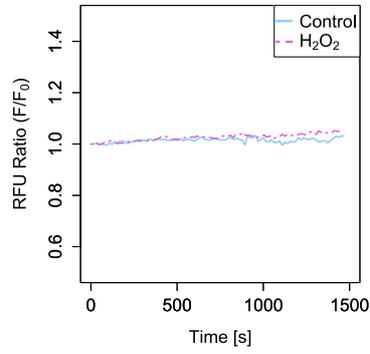
B)



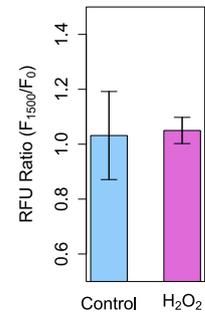
C)



D)

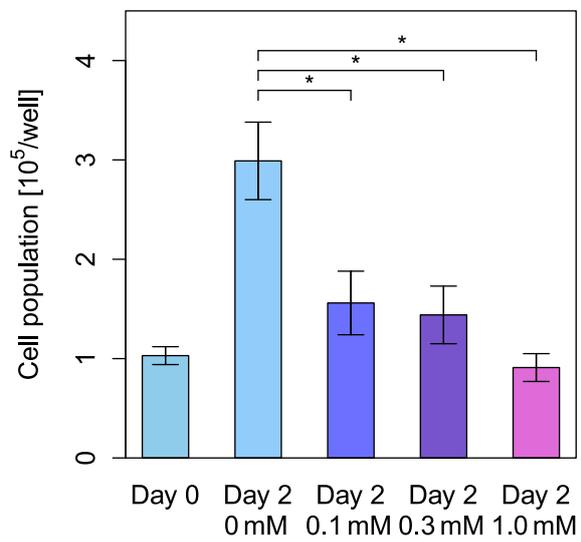


E)



☒ 4

A)



B)

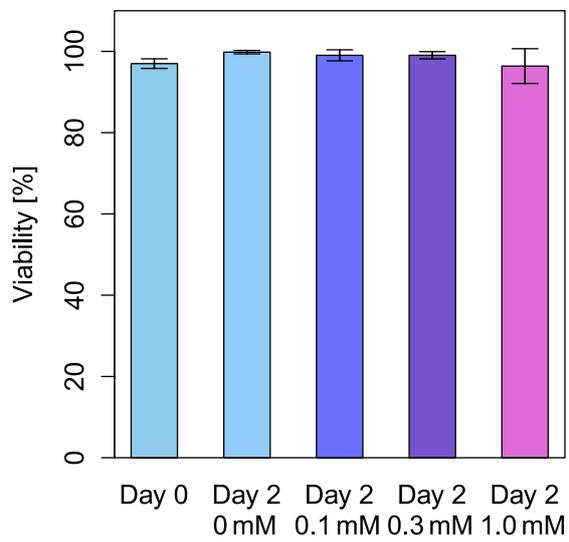
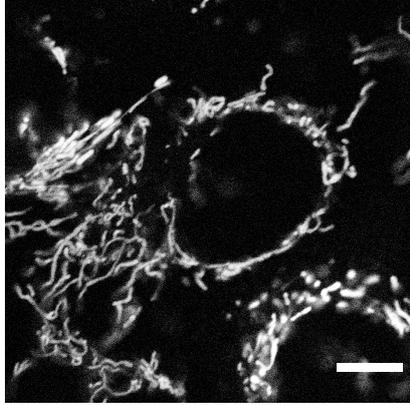
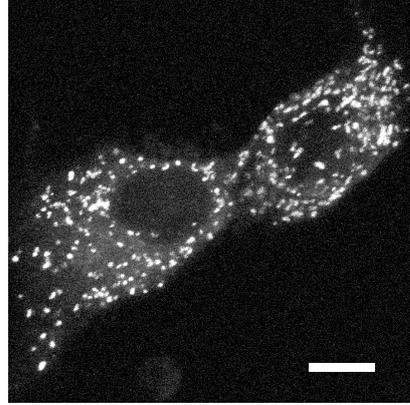


图 5

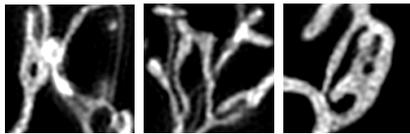
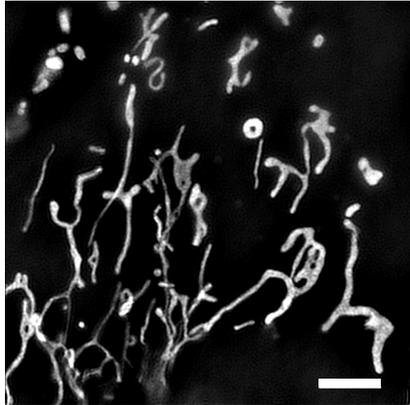
A)



B)



C)



D)

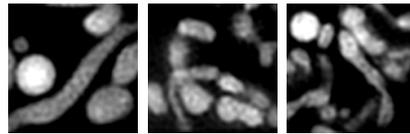
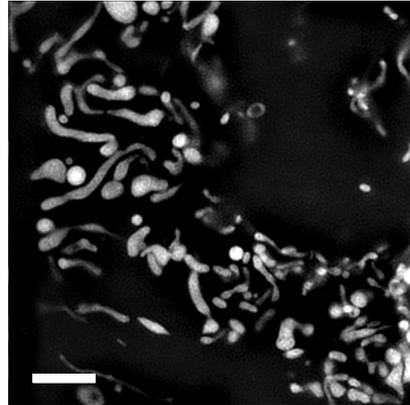
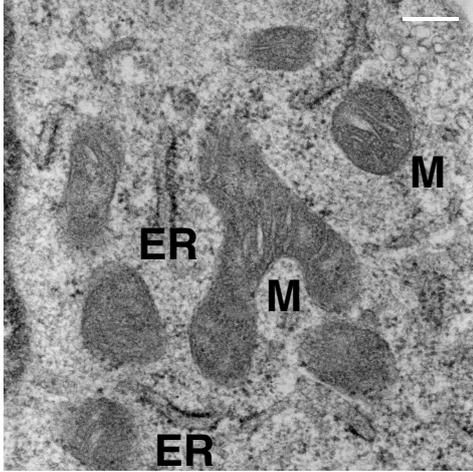
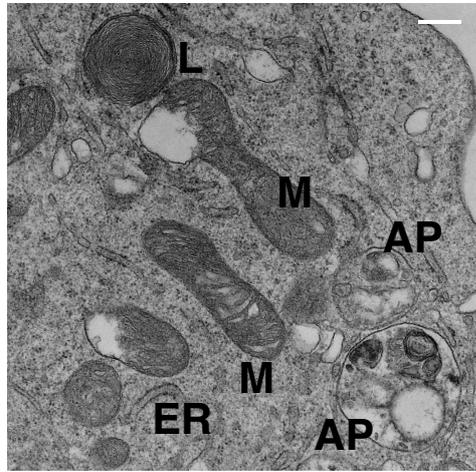


图 6

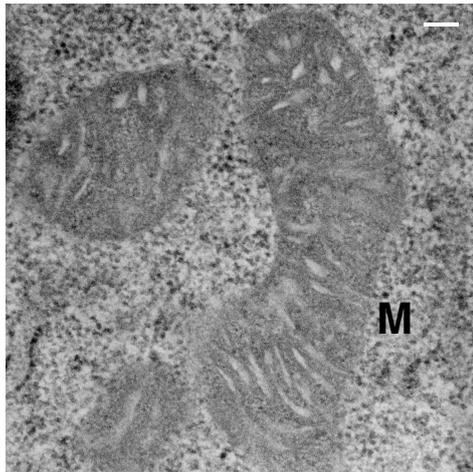
A)



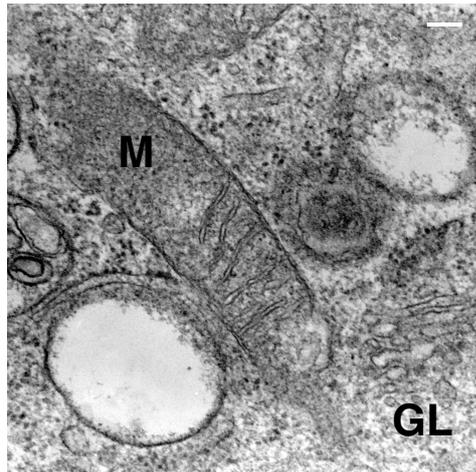
B)



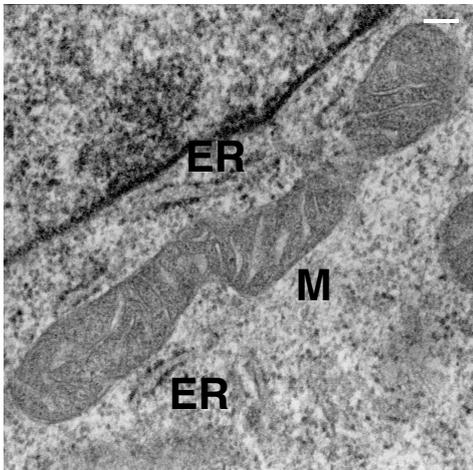
C)



D)



E)



F)

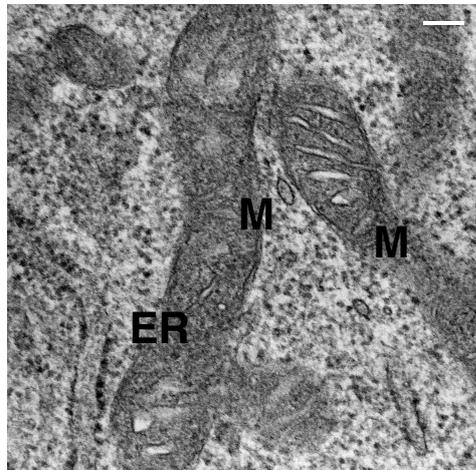
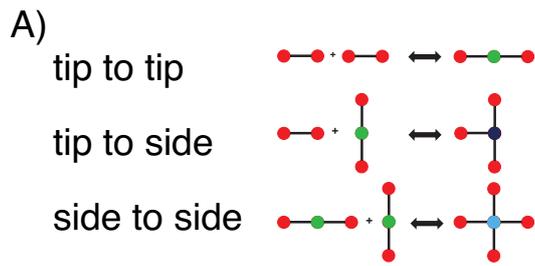
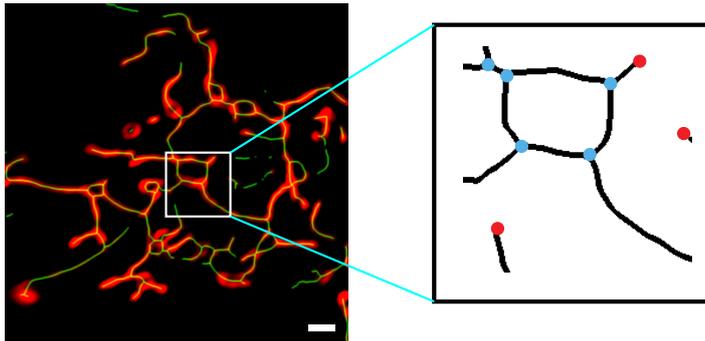


図 7

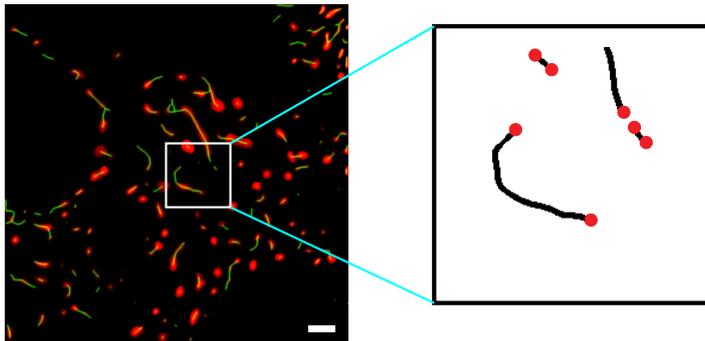


B)

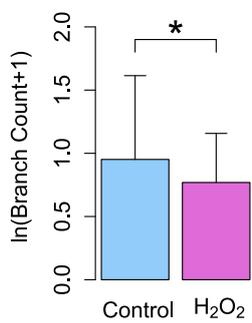
Control cells



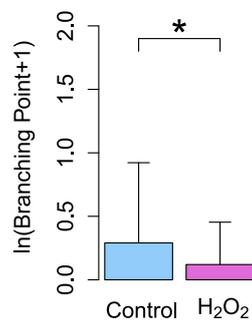
H₂O₂ exposed cells



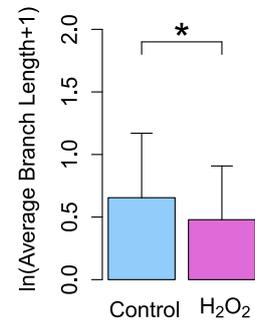
C)



D)



E)

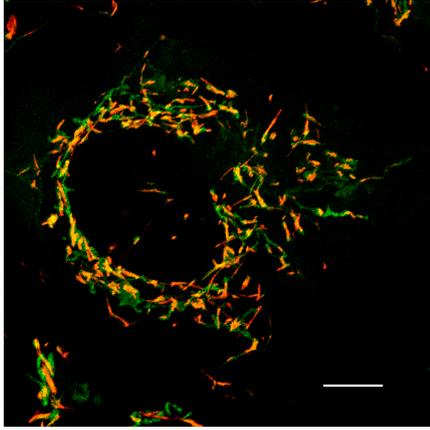


F)

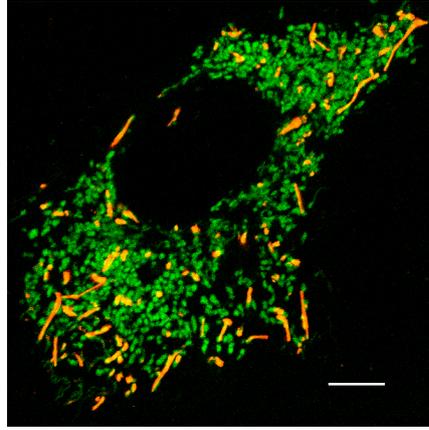
| ネットワークパラメータ | 説明 |
|-----------------------|----------------|
| Branch count | 分岐点に接続する線の数 |
| Branching point | 3つまたはそれ以上の分岐 |
| Average branch length | 分岐までの平均長 (画像内) |

图 8

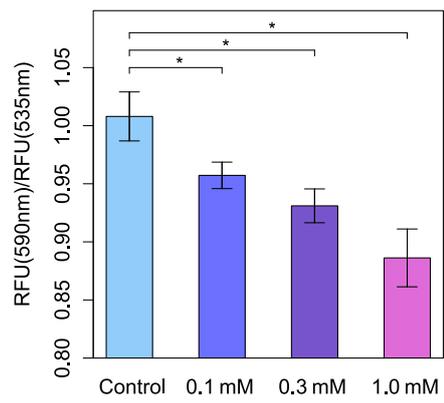
A)



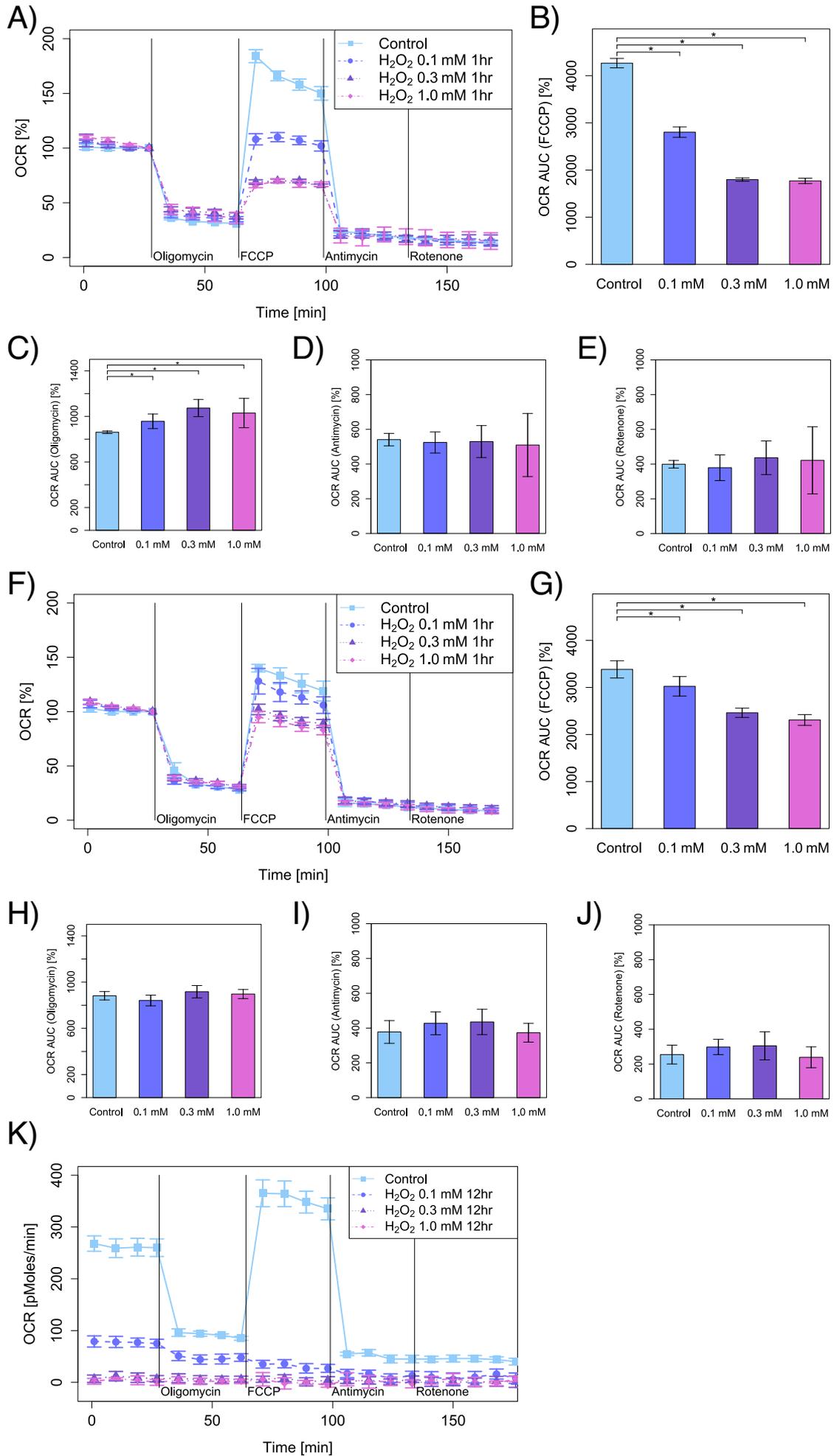
B)



C)

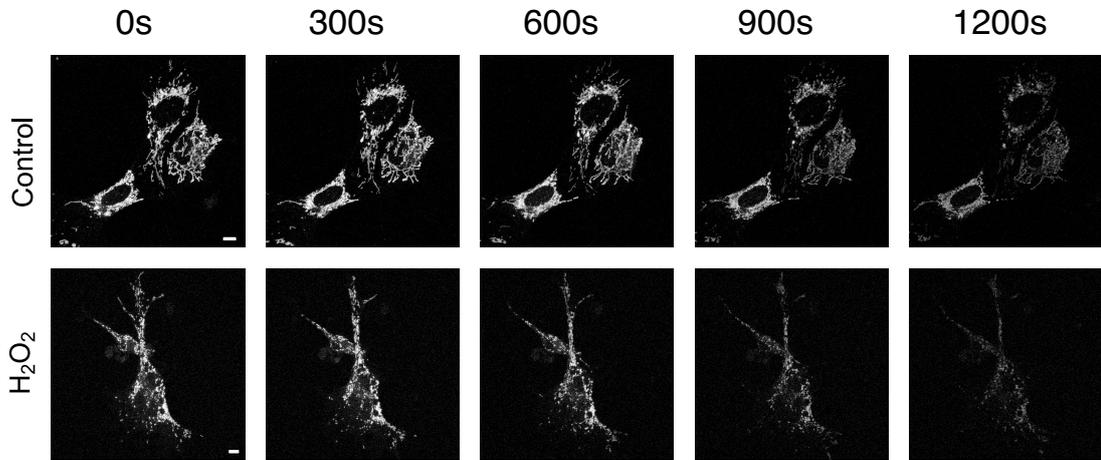


9

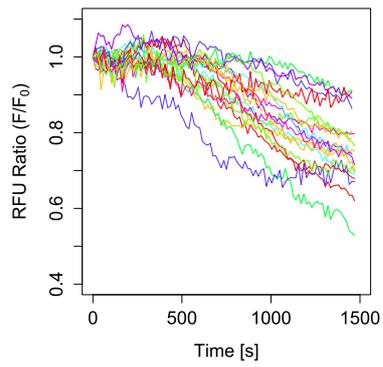


10

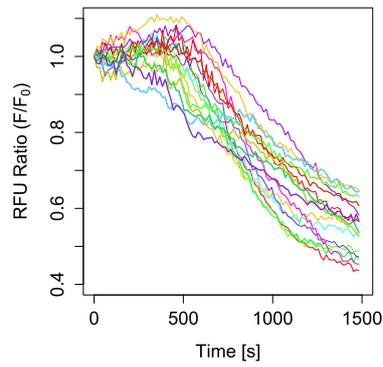
A)



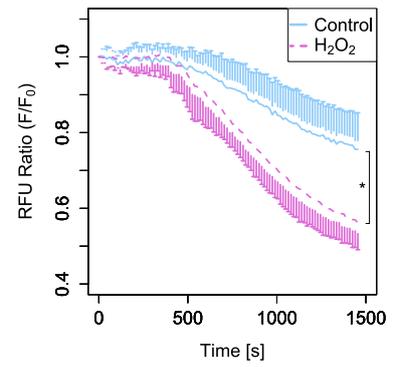
B)



C)



D)



☒ 11

