

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20188

研究課題名(和文) カロリー制限に着目した声のアンチエイジングに関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular biological research into anti-aging of voice using calorie restriction

研究代表者

山内 彰人 (Yamauchi, Akihito)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・耳鼻咽喉科医師

研究者番号：90612507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、声の老化に対するアンチエイジングの基礎研究として、カロリー制限がラットの声帯にもたらす組織変化を免疫組織学的に評価し、その分子生物学的機構の解明をRT-PCRを用いて検討した。カロリー制限群では声帯粘膜固有層のヒアルロン酸の増加、III型コラーゲンの減少、酸化ストレスの減少、Sirt-1の増加が見られた。また、声帯障害による癒痕性変化の抑制が認められた。RT-PCRでは、カロリー制限群でヒアルロン酸分解の抑制、コラーゲン合成の抑制を示す遺伝子変化が見られた。また、Sirt-1の有意な増加を認めて、斯様な組織学的に変化に対するSirt-1の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed at the investigation of effects of short-term calorie restriction on the vocal fold lamina propria of young male rats as a basic research for anti-aging approaches toward age-related voice problems (presbyphonia). Histological and immunohistological study revealed that rats with calorie restriction showed increased hyaluronic acid and sirt1, decreased collagen type III and oxydative stress, and ameliorated vocal fold scarring in response to the vocal fold injury. RT-PCR showed that calorie restricted rats demonstrated suppressed breakdown of hyaluronic acid, suppressed collagen production, and elevated sirt1.

研究分野：音声

キーワード：音声 老化 アンチエイジング カロリー制限 粘膜固有層 声帯癒痕 長寿遺伝子

1. 研究開始当初の背景

声の老化による音声障害(老人性喉頭)は、世界規模の高齢化により急速に増大している。声の老化によるコミュニケーション障害は、QOL 低下、社会的活動性の低下を招き、社会的損失を生む。しかし、声の老化に関する研究は世界的にも遅れており、病態・治療・予防に関する知見は限られている。

申請者らの過去の研究では、健常高齢者と老人性喉頭の症例を比較検討し、老人性喉頭の症例にその生理学的特徴や老化促進因子の候補が特定された。また、唯一の確立されたアンチエイジング法であるカロリー制限(CR)をラットに負荷したところ、声帯粘膜固有層の容量増加や、声帯障害に対するコラーゲンの蓄積の抑制を認め、CRは声帯粘膜固有層に好影響を及ぼす可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、ラットに対するCRの研究を更に発展させ、CRがラットの声帯にもたらす組織変化を免疫組織学的に詳細に評価し、その分子生物学的機構の解明をRT-PCRを用いて検討した。

3. 研究の方法

8週齢の雄のSprague Dawleyラット(N=48)を各12匹の4群に分け、それぞれに栄養負荷(カロリーを35%制限するCRを1か月負荷した群、同じCRを3か月負荷した群、通常の餌を1か月負荷した群、通常の餌を3か月負荷した群)を課した。CRに際しては、カロリーのみを制限し、ビタミン、ミネラルなどの他の栄養素は制限しない、特殊な餌を用いた。

また、CRが障害応答に及ぼす変化を評価するため、全てのラットに対し、栄養負荷から1週間経過した時点で左声帯の粘膜固有層と筋層に物理的障害を加えて、声帯癒痕を形成させた。右声帯には処置を行わず健常側とし、同一個体内で障害側(左)と健常側(右)を設けた。

栄養負荷終了後に喉頭を採取し、各群の半数(各群6匹ずつ)に対しては組織学的評価を、残りの半数(各群6匹ずつ)に対してはRT-PCRを行った。

組織学的評価として、5 μ m厚の喉頭のパラフィン切片を前額断で作成し、HE染色、Alcian Blue染色、Elastica von Gieson染色を施行した。

また、免疫組織学的評価として、線維化の指標である型コラーゲンを抗型コラーゲン抗体(ab7778, 1:500, Abcam)で、酸化ストレスを抗4-HNE(4-hydroxy-2-nonenal)抗体(ab46545, 1:150, Abcam)で、長寿遺伝子の発現を抗Sirt-1抗体(sc-15404, 1:100, Santa Cruz biotechnology Inc.)でそれぞれ評価した。発色にはDABを用いた。

組織切片は、形態学的評価を行うと共に、染色面積を定量的に評価した。まず、Alcian blue染色の切片に、消化された青色部分をヒアルロン酸とみなすヒアルロニダーゼ消化法を適応し、Alcian blueの染色面積から声帯粘膜固有層のヒアルロン酸量を評価した。それぞれの免疫染色の切片からは、DAB染色面積を定量評価した。

RT-PCRは、摘出した喉頭から90 μ m厚の前額断の凍結切片を作成し、microdissection法で切り出した声帯の粘膜固有層からmRNAを抽出した。ヒアルロン酸合成の指標の一つであるHAS-1、ヒアルロン酸分解の指標の一つであるHYAL-2、コラーゲン合成の指標であるpro-collagen type I、および長寿遺伝子であるSirt-1の遺伝子発現を評価した。定量評価はハウスキーピング遺伝子のGAPDHを用いたCT法で行った。

4. 研究成果

「組織学的評価」

コントロール群では、1か月負荷と3か月負荷の比較で、有意な組織学的変化は認めなかった。一方、CR群では、継時的に声帯粘膜固有層のヒアルロン酸量が増加し、3か月負荷の時点でコントロール群と有意差を認めた。また、Sirt-1は栄養負荷1か月の時点で、コントロール群と比較しCR群に有意な増加を認めた。型コラーゲンと4-HNEに関しては両群に優位差を認めなかった。

障害応答に対して、コントロール群では、声帯粘膜固有層のヒアルロン酸が有意に減少し、型コラーゲンおよび4-HNEは有意に増加した。Sirt-1は声帯障害による有意な変化は認めなかった。一方のCR群では、声帯障害によってコントロール群と同様の組織変化を認めたが、型コラーゲンおよび4-HNEの増加に優位な抑制効果が見られた。

「RT-PCR」

健常側の粘膜固有層からのRT-PCRでは、CR群・コントロール群ともに、1か月負荷時と3か月負荷時の比較で優位差は認めなかった。

障害応答について、コントロール群では、声

帯障害によってHYAL-2とpro-collagen type 1の有意な増加を認めた。一方のCR群でも同様の増加を認めたが、HYAL-2とpro-collagen type 1の増加に抑制効果を認めた。また、Sirt-1はコントロール群と比較してCR群に優位な増加を認めた。

「総括と考察」

健全な声帯の粘膜固有層では、ヒアルロン酸が豊富で、コラーゲンが過剰とならないレベルに抑えられているが、声帯傷害や老化によって、ヒアルロン酸は減少し、コラーゲン優位にバランスが傾くことが知られている。

本研究では、CR群でヒアルロン酸の増加、III型コラーゲンの減少、酸化ストレスの減少、Sirt-1の増加が見られ、声帯障害による瘢痕性変化の抑制が認められ、CRが声帯の粘膜固有層に好影響を与える可能性が得られた。

RT-PCRから、CRによりヒアルロン酸分解の抑制、コラーゲン合成の抑制が生じて、上述の組織学的変化が生じたと推察された。また、CR群ではRT-PCRにおいてもSirt-1の有意な増加を認めており、斯様な組織学的に変化に対するSirt-1の関与が示唆された。

今後の展望として、まず、文献上、声帯障害後の遺伝子的変化は数日でpeakが過ぎてしまうため、より障害後早期の遺伝子変化の評価が、今後は必要と考えられる。

なお、当初は本研究でCR1年負荷モデルの評価も検討していたが、1か月・3か月モデルの解析を行うと、喉頭に及ぼす影響は複雑で、CRは声帯粘膜固有層には好影響を与え得るが、声帯筋層に対しては萎縮性変化を来し、悪影響を及ぼし得ることが分かった。また、特注の餌のコストが予想以上に高く、長期栄養負荷モデルへと展開することが現実的に困難となった。そのため、今回は長期負荷モデルまでは進まず、短期CR負荷モデルのより詳細な解析に焦点を絞るように途中で方針変更を行った。

しかし、CRはアンチエイジング法であり、採取的には数か月の短期モデルだけではなく、1年以上の長期栄養負荷モデルでの検証が必要と考えられる。その為には、特注の餌を用いず、より安価で妥当な栄養負荷を与えられる栄養負荷戦略の考案が不可欠である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Yamauchi A, Yokonishi H, Imagawa H, Sakakibara KI, Nito T, Tayama N, Yamasoba T. Quantitative analysis of vocal fold vibration in vocal fold paralysis with the use of high-speed digital imaging. J Voice. 30:e13-e22. 2016. 査読あり.

Yamauchi A, Yokonishi H, Imagawa H, Sakakibara KI, Nito T, Tayama N, Yamasoba T. Quantification of vocal fold vibration in various laryngeal disorders using high-speed digital imaging. J Voice. 30:205-214. 2016. 査読あり.

Yamauchi A, Yokonishi H, Imagawa H, Sakakibara KI, Nito T, Tayama N, Yamasoba T. Visualization and estimation of vibratory disturbance in vocal fold scar using high-speed digital imaging. J Voice 30:493-500. 2016. 査読あり.

Yamauchi A, Yokonishi H, Imagawa H, Sakakibara KI, Nito T, Tayama N, Yamasoba T. Characterization of vocal fold vibration in sulcus vocalis using high-speed digital imaging. J Speech Lang Hear Res. 60:24-37. 2017. 査読あり.

〔学会発表〕(計5件)

A Yamauchi. Quantitative analysis of vocal fold vibration in various voice disorders using high-speed digital imaging. The 13th Asia-Oceania Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Congress: 2016.3.13. Taipei.

A Yamauchi. Quantitative analysis of vocal fold vibration in normal and pathological voice using high-speed digital imaging. The 23rd Pacific Voice Conference. 2015.10.03. San Jose.

山内彰人, 上羽瑠美, 藤巻葉子, 近藤健二, 二藤隆春, 山嵜達也. 短期カロリー制限が声帯粘膜固有層に及ぼす影響について. 第16回日本抗加齢医学会: 2016.6.12. 横浜.

山内彰人, 横西久幸, 今川博, 二藤隆春, 榊原健一, 田山二郎, 山嵜達也. 声帯開閉率(OQ: open quotient)と音質の関連における健常者の性差・年齢差. 第61回日本音声言語医学会: 2016.11.03. 横浜.

山内彰人, 横西久幸, 今川博, 二藤隆春, 榊原健一, 田山二郎, 山嵜達也. 高速度デジタル撮像から導出される声帯振動の音響学的特徴: 健常者データについて. 第62回日本音声言語医学会: 2017.10.04. 仙台.

〔図書〕(計4件)

- Yamauchi A, et al. Analysis of HSDI/HSDP with laryngotopography. Normal & Abnormal Vocal Folds Kinematics: HSDP, OCT & NBI®, Volume I. San Francisco: Pacific Voice & Speech Foundation 2015:139-142.
- Yamauchi A, et al. HSDI of the vocal fold vibrations in healthy young & elderly males and females. Normal & Abnormal Vocal Folds Kinematics: HSDP, OCT & NBI®, Volume II. San Francisco: Pacific Voice & Speech Foundation 2016:19-30.
- Yamauchi A, et al. Vibratory phase difference of phonation: HSDI analyzed with laryngotopography. Normal & Abnormal Vocal Folds Kinematics: HSDP, OCT & NBI®, Volume II. San Francisco: Pacific Voice & Speech Foundation 2016:31-40.
- Yamauchi A, Tayama N. Quantitative Analysis of High-Speed Digital Imaging for the Elderly. Aging Voice. Springer Nature 2017:53-65.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山内 彰人(Yamauchi Akihito)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・耳鼻咽喉科医師

研究者番号: 90612507

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし