

令和元年6月25日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08288

研究課題名(和文) 感音難聴の予防・治療戦略を指向した内耳薬理学研究

研究課題名(英文) Inner ear pharmacological studies on strategies for prevention and therapeutics of sensorineural hearing loss

研究代表者

荻田 喜代一 (Ogita, Kiyokazu)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：90169219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：音響外傷性難聴の発症メカニズムに、蝸牛内の過剰な酸化ストレス、MAPKの活性化が関与することを解明した。また、この難聴がラジカル消去薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、カルパイン阻害薬、p38MAPK阻害薬により抑制されることを見出した。慢性騒音暴露誘発性難聴の発症には、シクロオキシゲナーゼおよび活性化マクロファージによる内毛細胞と蝸牛神経の間のシナプスの減少が関与することが明らかとなった。また、このモデルの予防薬として、ファイトケミカルであるクルクミン、クロロゲン酸が有効であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究は、認知症のリスクファクターの一つである難聴の発症メカニズムの解明およびその予防・治療法の開発に関する研究である。本研究の遂行は、高齢者の「生活の質」を向上させるばかりでなく、認知障害の予防に有効であることから社会的な意義が大きいと考えられる。また、これまで難聴に関する薬学分野の研究はほとんど行われておらず、その学術的域もおおきいものである。

研究成果の概要(英文)：We found that intense noise-induced hearing loss is caused by excess oxidative stress and MAPK activation in the cochlea. The hearing loss was prevented by radical scavengers, nitric oxide synthase inhibitors, and calpain inhibitors. In addition, we found that chronic noise exposure-induced hearing loss is caused by activation of cyclooxygenases and macrophages and prevented by phytochemicals including curcumin and chlorogenic acid.

研究分野：薬理学

キーワード：難聴 内耳 酸化ストレス ファイトケミカル カルパイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難聴の有病率は20%を超えており、WHOの世界疾病調査においても日常生活に支障を来す障害の最上位にあげられている。難聴はその障害部位の違いから伝音難聴と感音難聴に分類される。外耳・中耳の障害に起因する伝音難聴は、多くの場合で薬物療法、外科的療法が奏功し、予後もよい。一方、内耳蝸牛の障害に起因する感音難聴に対する予防・治療法は確立されておらず、経験的に、副腎ステロイド性薬の短期的大量投与(ステロイドパルス療法)が臨床的に広く用いられているが、十分な治療を提供できていないのが現状である。

感音難聴には、薬剤性難聴(アミノグリコシド系抗菌薬やループ利尿薬など)、強大音響の急性曝露(事故や災害等)による音響外傷性難聴、日常的騒音の慢性曝露(音楽プレーヤーや工場・交通騒音等)による騒音性難聴、根本発症原因の不明なメニエール病・症候群、老人性難聴及び突発性難聴などが知られる。また、騒音性難聴や老年性難聴は徐々に進行することから、自覚できず、人工内耳や補聴器に頼らざるを得ない状況となることが多い。これらのことから、多くの若年者や高齢者の難聴によるQOLの著しい低下が大きな問題となっている。

近年、ES細胞やiPS細胞などによる音に対する感覚細胞である有毛細胞の再生医療研究が行われているが、蝸牛が非常に微細かつ複雑な構造体であることから、その応用には相当な期間を要することが予想される。したがって、薬物やサプリメント等による感音難聴の予防・治療戦略の構築は要求度が高く、当該研究のような「内耳薬理学の研究」の社会的貢献度は高いと考えられる。

2. 研究の目的

当該研究の目的は、各種感音難聴モデル動物の作製、感音難聴の発症メカニズムの解明、感音難聴の予防薬及び治療薬のリード化合物の探索、薬理学研究分野の中に「内耳薬理学研究」分野の確立を通して、最終的には感音難聴の薬物治療戦略の確立を目指すことである。

3. 研究の方法

聴力は聴覚刺激由来の脳波である聴性脳幹反応を解析することにより4、12、20 kHzの周波数(低音域～高音域)の聴覚閾値(最小可聴値)として測定した。音響曝露は騒音発生装置(RION社)を用いて行った。騒音曝露は、騒音(8 kHz octave bands noise、90 dB)を反復的(1日1時間、5日間)に曝露した。候補薬の摂取経路は経口投与を基本とするが、候補薬によっては摂餌による摂取経路での検討も考える。音受容器細胞である蝸牛有毛細胞障害の検出にはF-アクチンを選択的に染色するファロイジン染色法およびミオシン7a(有毛細胞マーカータンパク質)に対する免疫組織化学法を用いて解析する。また、騒音曝露後継時的にmyosinVIIa(有毛細胞マーカー)、CtBP2(シナプス前部マーカー)およびGluA2(シナプス後部マーカー)について免疫染色を行い、聴覚求心経路の初段階である内有毛細胞-蝸牛神経間シナプス数を解析した。統計学的処理は医療統計解析ソフトGraphPad Prism6を用い、適切に行った。

4. 研究成果

(1) 難聴モデル動物の作製と病態の解析

まず、マウスに、90 dBの騒音を1時間曝露し、曝露直後(day 0)および曝露1、2、7日後における聴覚閾値(12、20 kHz)を聴性脳幹反応(ABR)により測定した。その結果、騒音曝露により一過的な聴覚障害が認められた。次に、マウスに、90 dBの騒音を1日1回、1時間曝露し、これを5日間反復した。それぞれの曝露1日後に聴覚閾値(12、20 kHz)を測定した。その結果、曝露回数依存的、周波数依存的・曝露回数依存的な聴覚障害が認められた。また、20 kHzにおける聴覚障害は、少なくとも最終曝露4週間後まで持続した。この聴覚障害の原因を解明する目的で、感音難聴の主な障害部位である有毛細胞、らせん神経節細胞、外側壁における細胞数に影響を解析したところ、これら細胞数に変化は認められなかった。そこで次に音の伝達効率に着目し、マウスに、90 dBを曝露し、曝露3時間後のc-fos及びArcの発現についてq-RT-PCR法により解析した。その結果、90 dBを曝露することによってc-fosおよびArcの発現が有意に増加した。これに対し、反復騒音曝露群では90 dB曝露によるc-fosおよびArcの発現増加が減弱した。そこで、マウスに、90 dBの騒音を1日1回、1時間曝露し、これを5日間反復した。騒音曝露1、5日後における内有毛細胞-らせん神経節細胞間のシナプス数の変動について、免疫組織化学法により解析した。蝸牛コルチ器はからに分類し、それぞれの領域についてシナプス数(CtBP2およびGluA2の共局在の数)を評価した。その結果、騒音曝露はおよびの領域におけるシナプス数に影響を及ぼさなかったが、およびの領域において、曝露1、5日後のシナプス数を有意に減少させた。

(2) 難聴予防・治療薬の探索

本手法により得られた動物に対して、植物由来の抗酸化能を有するファイトケミカルの内耳保護効果を解析した。本研究には、代表的なファイトケミカルであるカテキン(30、300 mg/kg)、クロロゲン酸(2、10 mg/kg)、クルクミン(10、100 mg/kg)を用いた。カテキン投与は、高濃度用量を用いても反復騒音曝露による聴覚障害を軽減できなかった。しかし、クロロゲン酸(10 mg/kg)およびクルクミン(100 mg/kg)投与は、騒音反復曝露による聴力の悪化を有意に軽減させた。また、クロロゲン酸においては、騒音曝露1日後では、内有毛細胞-蝸牛神経

間シナプス数が曝露前と比較して有意に減少したが、クロロゲン酸投与は騒音曝露誘発性のシナプス数の減少をほぼ完全に抑制した。それぞれの成分は全てポリフェノールであり抗酸化作用をいずれも有する。しかしながら成分によって、効果の程度には大きな差異が生じることが明らかとなった。目下検討中ではあるが、腸管吸収の程度が大きく効果の際に影響を与えるのではないかと考えている。

これらの研究成果より、ファイトケミカルの経口投与は、騒音曝露による不可逆的な聴覚障害に対して内耳保護効果を有することが示唆された。また、本条件下で作製した騒音反復曝露による聴力低下メカニズムに、内有毛細胞 - 蝸牛神経間シナプスの減少が少なくとも一部は関与することが推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Nishiyama N, Yamaguchi T, Yoneyama M, Onaka Y, Ogita K: Disruption of gap junction-mediated intercellular communication in the spiral ligament causes hearing and outer hair cell loss in the cochlea of mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), 73-80, 2019
- 2) Yamaguchi T, Ogita K, Yoneyama M, Onaka Y: Stress is irrelevant to the onset and exacerbation of sensorineural hearing loss: Evaluation using various types of stress models in mice. *Global Drugs and Therapeutics*, 2 doi: 10.15761/GDT.1000S1003, 2017.
- 3) Yamaguchi T, Yoneyama M, Onaka Y, Imaizumi A, Ogita K: Preventive effect of curcumin and its highly bioavailable preparation on hearing loss induced by single or repeated exposure to noise: A comparative and mechanistic study. *Journal of Pharmacological Sciences*, 134(4): 225-233, 2017.
- 4) Yamaguchi T, Yoneyama M, Ogita K: Calpain inhibitor alleviates permanent hearing loss induced by intense noise by preventing disruption of gap junction-mediated intercellular communication in the cochlear spiral ligament. *European Journal of Pharmacology*, 803: 187-194, 2017.

〔学会発表〕(計 26 件)

- 1) 谷千咲、山口太郎、橋本優美、三羽尚子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一：反復騒音曝露による内有毛細胞—聴神経間シナプスの減少における蝸牛内マクロファージの関与、日本薬学会第 139 年会、2018 年度
- 2) 昌原杏子、山口太郎、橋本優美、三羽尚子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一：反復騒音曝露誘発性聴覚障害に対するレスベラトロールの内耳保護効果、日本薬学会第 139 年会、2018 年度
- 3) 今在家優衣、山口太郎、原田里佳子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一：強大音響曝露に伴う蝸牛構成細胞の脱落における p38 MAPK の関与、日本薬学会第 139 年会、2018 年度
- 4) 反復騒音曝露誘発性聴覚障害に対するコンドロイチン硫酸の効果、日本薬学会第 139 年会、2018 年度
- 5) 西山徳人、山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀、荻田喜代一：らせん靭帯でのギャップ結合細胞間コミュニケーションの破綻は蝸牛外有毛細胞脱落を引き起こす。第 92 回日本薬理学会年会、2018 年度
- 6) 山口太郎、橋本優美、三羽尚子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一：感音難聴発症における蝸牛内マクロファージの関与の可能性、第 92 回日本薬理学会年会、2018 年度
- 7) 山口太郎、橋本優美、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一：騒音曝露誘発性聴覚障害における内有毛細胞 - らせん神経節細胞間シナプスの減少には cyclooxygenase-2 およびミクログリア様マクロファージが関与する、生体機能と創薬シンポジウム 2018、2018 年度
- 8) Taro Yamaguchi, Naoko Mitsuba, Masanori Yoneyama, Yusuke Onaka, Kiyokazu Ogita (2018) Preventive effect of chlorogenic acid on permanent hearing loss induced by repeated exposure to noise. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018 年度.

(他 18 件)

〔図書〕(計 0件)

〔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

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：米山 雅紀

ローマ字氏名：Masanori Yoneyama

所属研究機関名：摂南大学薬学部

部局名：薬理学研究室

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00411710

研究分担者氏名：山口 太郎

ローマ字氏名：Taro Yamaguchi

所属研究機関名：摂南大学薬学部

部局名：薬理学研究室

職名：講師

研究者番号(8桁)：30710701

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。