

令和元年6月12日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11202

研究課題名(和文)細胞性免疫操作による老人性難聴予防

研究課題名(英文)Prevention of age-related hearing loss by alteration of cellular immunity

研究代表者

岩井 大(IWAI, Hiroshi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：人口高齢化による老人性難聴罹患人口の増加にもかかわらず、本難聴の予防法はいまだ確立されていない。申請者はこれまでCD4+T細胞のうち、制御性T細胞(Treg)とIL-1受容体2型発現細胞(T1R2)が老人性難聴進行とともに増加することを明らかにしている。そこで、老化促進・早期難聴モデルマウスであるSAMP1に、TregとT1R2とが除かれたCD4+T細胞分画(nTnI)を定期的に同系接種した。その結果、nTnI接種は、1. 難聴進行を予防し、2. 蝸牛への細胞浸潤はないが螺旋神経節萎縮を抑制し、3. 血中酸化ストレス(nitric oxide, NO)上昇を予防することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの抗加齢研究は長い観察期間を要し速やかな成果を得にくい。今回、老化促進・早期難聴モデルマウスであるSAMP1を用いて実験を行った。このマウスはヒトと同じく加齢性の胸腺萎縮・細胞性免疫能低下・難聴(蝸牛の機能低下と萎縮)を示すため、全身免疫機構と聴覚とを検討する格好のモデルである。今回の研究結果から、nTnI(老化・難聴に関与するTreg・T1R2が除去されたCD4+T細胞分画)の定期的な接種(全身細胞性免疫機能の若返り)にて、難聴を予防できることが明らかとなった。したがって、臨床においても同様の処置にて、老人性難聴、さらには広く老化予防(抗加齢療法)に発展できる可能性を考える。

研究成果の概要(英文)：Although age-related hearing loss (AHL) is an infamous disability deteriorating quality of life, we have not established its preventive measure. To overcome this situation, we focused cellular immunity related to development of AHL, especially three CD4+T cell fractions of interleukin 1 receptor type II-positive T cells (T1R2), naturally occurring regulatory T cells (Treg), and non-T1R2 and non-Treg (nTnI) which consists of CD4+T cells deleting both T1R2 and Treg.

Using SAMP1 murine inbred strain, a well-established model of aging with AHL, it was found that inoculation of nTnI fraction prevented not only the development of AHL, but also manifestation of degeneration in spiral ganglion (SG) neurons. Although no infiltration of lymphocytes was detected in SG, it is noted that nTnI successfully suppressed the nitric oxide (NO) level as oxidant stress in serum, indicating the relevance of oxidant stress to play a role in interaction between the systemic immune system and cochlea.

研究分野：内耳免疫、難聴治療、

キーワード：Treg IL-1 細胞性免疫 老人性難聴 酸化ストレス 聴性脳幹反応 螺旋神経節 老化予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口高齢化が進み老人性難聴罹患人口が急増するなか、我々耳鼻咽喉科医はこれを予防する術を知らず、ただ見守ることしかできないでいる。

難聴は臨床的に遺伝性疾患と受け止められ、難聴の進行時期や悪化の程度も遺伝因子に規定されると考えられてきた。一方、免疫学的に清潔な環境下(実験施設)で飼育された動物は、病原微生物による免疫ストレスが少なく免疫機能が保たれ、不潔環境の動物に比し一般に長寿を示す(Hosono et al, Exp Gerontol 1997)。我々の実験でも、清潔環境下マウスで老人性難聴の進行が遅延した(Exp Gerontol 2003)。加齢性免疫機能低下に伴う病原微生物や自己老廃物の処理能力低下により炎症遷延化(加齢性慢性炎症、inflammaging)が生じると、炎症細胞が惹起して活性酸素を誘導し、組織修復不良や細胞萎縮をもたらすとされる(Franceschi and Campisi, 2014; Casciario et al., 2017; Watson et al., 2017)。実際、WBC や炎症性サイトカインが高値の老人では難聴が進むとされ、全身免疫機構と蝸牛障害との関連が報告されている(Verschuur C, et al. 2014)。

我々はこれまで、老化促進、早期老人性難聴のモデルマウスである SAMP1 において、加齢(および難聴、細胞性免疫機能低下)とともに、CD4⁺T 細胞のうち、以下の 2 つの細胞分画が増加することを示した(J Neuroimmunol 2012, Immunity Ageing 2015) :

T1R2 : IL-1R2⁺CD4⁺T 細胞(CD121b⁺CD4⁺)。IL-1 受容体 2 型を発現して IL-1 をブロックするため T 細胞は免疫応答が抑制され、免疫機能障害を示す。

Treg : 制御性 T 細胞、naturally occurring regulatory T 細胞 (CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺、あるいは、FR4⁺hiCD4⁺)。老化した胸腺で多く産生され、全身に散布されて免疫機能を抑制し、組織の萎縮をもたらす。

2. 研究の目的

全身免疫機能を改善して加齢性慢性炎症を除くと加齢徴候としての老人性難聴が予防できることを証明する。すなわち、CD4⁺T 細胞のうち T1R2 と Treg とが除かれた細胞分画(nTnI)を接種することで老人性難聴が予防できることを証明する。

3. 研究の方法

SAMP1 を 7 群に分けたのちアッセイを行った(図 1)。SAMP1 の加齢性蝸牛変化においては、有毛細胞・血管条・螺旋神経節(SG)で同時に進行するとされ(Saitoh et al., 1995)、今回、聴性脳幹反応(ABR)の第 1 波に相当する SG(Hall, 1990)を観察した。

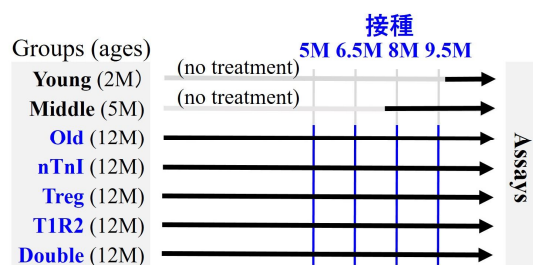


図 1. 実験プロトコール

SAMP1 を 7 群に分け(1 群 10 匹)このうち 5 群には 1.5 カ月毎 4 回、生食や各細胞分画を移入(静脈接種)した。細胞分画としては、8 か月齢 SAMP1 から採った脾リンパ球を各種抗体とフローサイトメトリーにて分離し準備した。ホスト 1 匹にドナー 1 匹分の脾細胞分画を接種した。Double: Treg+T1R2

4. 研究成果

nTnI 群において、難聴進行(図 2)・螺旋神経節萎縮(図 3、4)が予防された。しかし、各群で SG にリンパ球浸潤は認められなかった(図 3)。よって、SG の萎縮の原因として、Treg、T1R2 の体循環からの蝸牛への浸潤による直接的な攻撃は否定的と考えられた。

SG の単位面積当たりの neuron 数(細胞密度)を計測すると、同様の傾向が認められた(図 4)。SG 全身免疫機構と蝸牛との関連性を調べるため、血清酸化ストレスとして nitric oxide(NO)を検索したところ、nTnI 群では NO 濃度が抑制されていた(図 5)。

加齢による免疫機能低下が inflammaging や酸化ストレス産生を惹起し、組織萎縮を促進することが報告されている(Casciario et al., 2017; Franceschi and Campisi, 2014; Watson et al., 2017)。nTnI は naïve T 細胞を含む細胞分画であるが、今回の我々の研究から、nTnI は NO 産生を抑制し、体循環を通して加齢性難聴や SG 萎縮を予防する働きを持つことが示された。

一方、Treg、T1R2、Double の細胞は、加齢性難聴や SG 萎縮を促進はしないが、免疫担当細胞などに NO 産生を促進する作用を持つと考えられる。これらの細胞分画が接種された 3 群では Old 群より血清 NO が高かった。今回の検討は 12 カ月齢までであるが、さらに経過を追えば、これらの群で難聴や萎縮が顕著になったかもしれない。

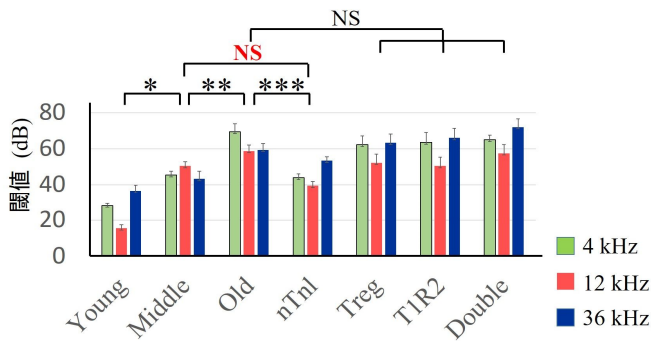


図2 . ABR (純音 4, 12 and 36 kHz)

Young 群(2ヶ月齢)、Middle 群(5ヶ月齢)、Old 群(12ヶ月齢)において、有意に加齢性難聴の進行が認められた ($p < 0.03-0.00000001$)。

一方、nTnI 群は middle と有意差なく5ヶ月齢と同じ聴力を保ち、有意に加齢性難聴が予防された ($p < 0.05-0.00005$)。N = 8-10. mean \pm SEM

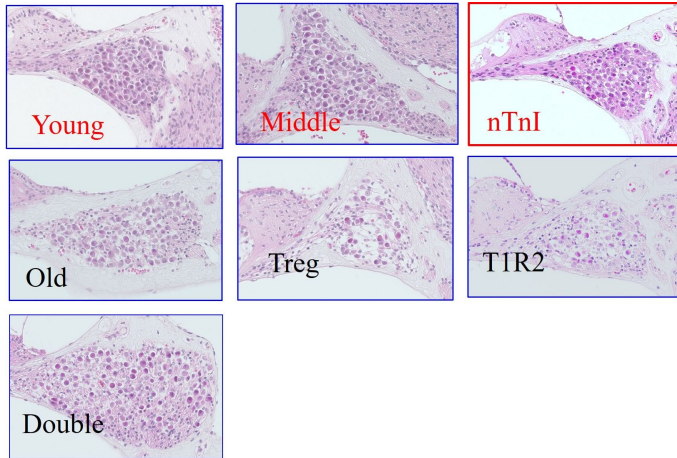


図3 . SG 病理所見

nTnI 群は Young 群・Middle 群と同様、萎縮が認められなかった。

12ヶ月齢の各群で萎縮、すなわち SG neuron 減少と、支持細胞の相対的な増加が認められた。

一方、どの群においても単核細胞(リンパ球)浸潤を認めず、接種されたリンパ球の蝸牛への直接作用は否定的であった。(representative findings, HE 染色 x400)

マウスにおいて胸腺摘出は免疫障害と記憶障害を引き起こすため、免疫機能と中枢機能との関連性が指摘されている。(Song C, 2002)。臨床ではアルツハイマー病が、急性・慢性全身炎症の増強に伴い進行することが示され、免疫障害と中枢認知機能障害との関連が指摘されている。(McGeer, et al. 1994)。WBC が高値の老人では難聴が進むことが示され、inflammaging と蝸牛障害とが関連するとされる (Verschuur C, et al. 2014)。したがって、加齢性免疫低下を防ぐ「免疫若返り」が、inflammaging や難聴を抑制すると考えられ、今回のような nTnI 接種が老人性難聴抑制に有効である可能性を考える。

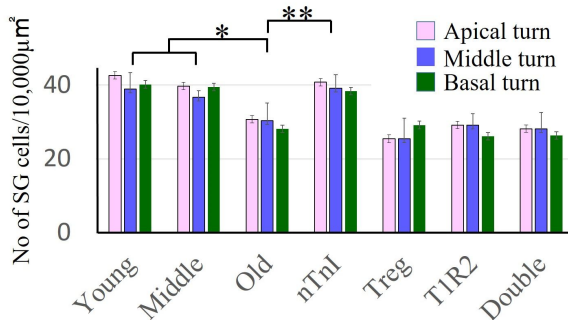


図4 . nTnI 接種の SG 萎縮予防効果

SG の細胞密度において、nTnI 群(12ヶ月齢)は他の12ヶ月齢の群 (Old, Treg, T1R2, Double 群)に比し有意に細胞が保たれた ($p < 0.05-0.005$)。

一方、Young 群(2ヶ月齢)・Middle 群(5ヶ月齢)に比し有意差を認めず、萎縮が予防された。N = 4-6, mean \pm SEM

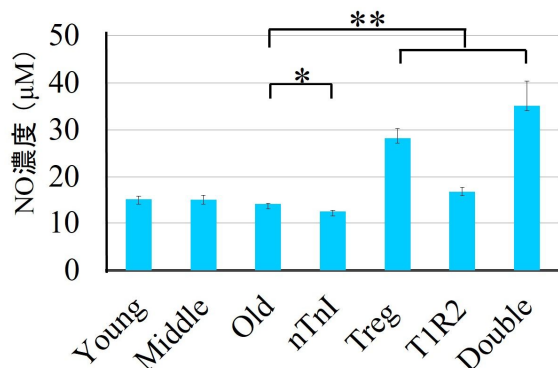


図5 . nTnI 接種の血清 NO 抑制効果

血清 NO 濃度は Young 群、Middle 群、Old 群の間で有意差はなく、持続的な NO の産生が考えられた。

一方、nTnI 群は Old 群より有意に NO 産生が抑えられていた ($p < 0.03$)。Treg 群、T1R2 群、Double 群は Old 群に比し有意に高値を示した ($p < 0.04-0.003$)。N = 8-10. mean \pm SEM

細胞性免疫若返りは、蝸牛の機能障害・萎縮の阻止因子であることが明らかとなった。臨床応用を考えた場合、食物・カロリー摂取制限と同様に、慢性感染性免疫疲弊(結核や誤嚥など)の回避や、口内を含めた身体・生活環境の清潔保持が、難聴、ひいては老化を阻止するために

役立つと思われる(図6)。こうした感染回避の生活習慣は、quality of life を強く求める先進諸国の人々の間では、食物・カロリー摂取制限より実施可能かもしれない。

胸腺は18歳ごろから退縮し、のちにT1R2やTregが増加するが、今後の臨床応用として、若いうちに採取・凍結保存されたnTnIを解凍・増殖させ、難聴発症時期から反復接種すれば、難聴進行を予防できる可能性を考える。今回は難聴に焦点を絞ったが、広く加齢徴候予防に応用できる可能性を考える。人口高齢化の中で難聴を含めた加齢に対する予防法は、今後一層発展すべき分野と考える。

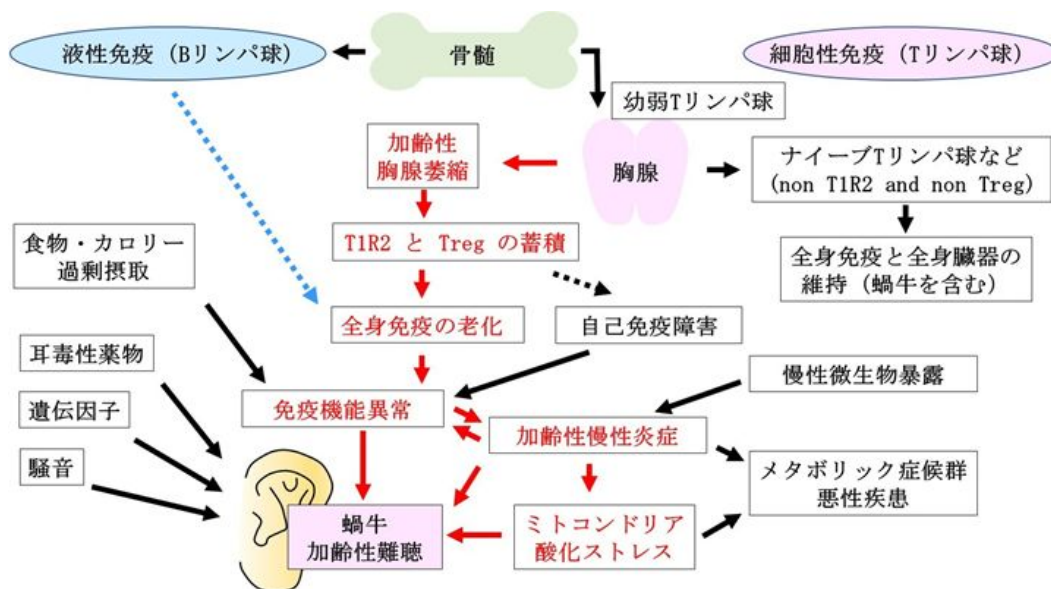


図6. nTnIを含めた細胞性免疫と蝸牛(模式図)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

1. Iwai H, Inaba M, et al. Prevention of hearing loss by alteration of the systemic immune system Adv Aging Res, 査読有, in press.
2. Ishida M, Okano K, Sandoh K, Ebisu Y, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Cytological features of basal cell adenocarcinoma of the salivary glands. Diagn Cytopathol. 査読有, 2019. doi: 10.1002/dc.24178. Epub ahead of print.
3. Ishida M, Okano K, Sandoh K, Ebisu Y, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Cytological features of basal cell adenoma of salivary glands: Analysis of 19 cases emphasizing stromal spindle cells. Diagn Cytopathol. 査読有, 2019. doi: 10.1002/dc.24164. Epub ahead of print.
4. Kobayashi Y, Konno Y, Kanda A, Yamada Y, Yasuba H, Sakata Y, Fukuchi M, Tomoda K, Iwai H, Ueki S. Critical role of CCL4 in eosinophil recruitment into the airway. Clin Exp Allergy. 査読有, 49, 853-860, 2019. doi: 10.1111/cea.13382.
5. Fujisawa T, Tsuta K, Yanagimoto H, Yagi M, Suzuki K, Nishikawa K, Takahashi M, Okada H, Nakano Y, Iwai H. Quantitative immunohistochemical assay with novel digital immunostaining for comparisons of PD-L1 antibodies. Mol Clin Oncol. 査読有, 10, 391-396, 2019. doi: 10.3892/mco.2019.1801
6. Kojima Y, Kawaoka Y, Sawada S, Hayashida S, Okuyama K, Yutori H, Kawakita A, Ishida S, Soutome S, Yanamoto S, Umeda M, Iwai H. Clinical significance of periosteal reaction as a predictive factor for treatment outcome of medication-related osteonecrosis of the jaw. J Bone Miner Metab. 査読有, 0914-8779, 1-7, 2019. doi: 10.1007/s00774-019-00994-1.
7. Ito H, Ishida M, Sando K, Okano K, Ebisu Y, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Metastatic salivary duct carcinoma in cardiac and pleural effusions: A case report with immunocytochemical analysis for androgen receptor and HER2. Mol Clin Oncol. 査読有, 10, 78-82, 2019. doi: 10.3892/mco.2018.1747.
8. Kanda A, Kondo K, Hosaka N, Kobayashi Y, Bui DV, Yun Y, Suzuki K, Sawada S, Asako M, Nakamura A, Tomoda K, Sakata Y, Tsuta K, Dombrowicz D, Kawauchi H, Fujieda S, Iwai H. Eosinophilic Upper Airway Inflammation in a Murine Model Using an Adoptive Transfer System Induces Hyposmia and Epithelial Layer Injury with Convex Lesions. Med Sci (Basel). 査読有, 7, 22, 1-13, 2019. doi: 10.3390/medsci7020022.
9. Okano K, Arimoto T, Ishida M, Sandoh K, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Collagenous crystalloids in pleomorphic adenoma of the parotid gland. Diagn Cytopathol. 査読有

- 有,47,612-613,2019. doi: 10.1002/dc.24149.
10. Kanda A, Kobayashi Y, Asako M, Tomoda K, Kawauchi H, Iwai H. Regulation of Interaction between the Upper and Lower Airways in United Airway Disease. *Med Sci (Basel)*. 査読有,7,27,1-9,2019.doi:10.3390/medsci7020027.Review.
 11. Kobayashi Y, Yasuba H, Asako M, Yamamoto T, Takano H, Tomoda K, Kanda A, Iwai H. HFA-BDP metered-dose inhaler exhaled through the nose improves eosinophilic chronic rhinosinusitis with bronchial asthma: A blinded,placebo-controlled study.*Front Immunol*. 査読有,9,2192,1-8,2018.doi:10.3389/fimmu.2018.02192.
 12. Suzuki K, Shimizu M, Sakagami T, Yagi M, Fujisawa T, Sawada S, Kanda A, Kobayashi Y, Iwai H. A comparison of short-term outcomes of neck dissection for head and neck cancers using Thunderbeat™, LigaSure™ or treatment without an energy-based device: A case controlled study. *Int J Surg*.2018.doi:10.1016/j.ijssu. 査読有,58,60-64,2018.09.009.
 13. Suzuki K, Iwai H, Yagi M, et al. Indications for partial parotidectomy using retrograde dissection of the marginal mandibular branch of the facial nerve for benign tumours of the parotid gland. *Br J Oral Maxillofac Surg* 査読有 ,56,727-731,doi: 10.1016/j.bjoms.2018.08.002.
 14. 岩井 大.全身免疫機能改変による進行性蝸牛障害の予防と治療。マウスモデルによる検討(総説)。耳展。査読無 61,12-23,2018.
 15. Kiyohara T, Nakamaru S, Nagano N, Terai S, Makimura K, Suzuki K, Iwai H, Tanimura H. Two cases of infundibular squamous cell carcinoma on the nose with aggressive clinical behavior: Case report and review of the published work. *J Dermatol*.査読有,45,220-223,2018. doi: 10.1111/1346-8138.14131. Review.
 16. Okazaki H, Kanda A, Kanda S, Shimono T, Yun Y, Kobayashi Y, Wang Z, Ooka H, Suzuki K, Van DB, Tomoda K, Iwai H, Nishiyama T. Cells expressing prominin-1 in neonatal murine inferior colliculus differentiate into neurons and glia. *Mol Neurobiol*.査読有, 55:4998-5005,2018.doi: 10.1007/s12035-017-0701-5.
 17. Konishi M, Suzuki K, Iwai H. Hematogenous renal cell carcinoma metastasis in the postoperative temporal bone. *Case Rep Oncol*. 査読有 ,10,212-216,2017.doi: 10.1159/000460243.
 18. Kojima Y, Yanamoto S, Umeda M, Kawashita Y, Saito I, Hasegawa T, Komori T, Ueda N, Kirita T, Yamada SI, Kurita H, Senga Y, Shibuya Y, Iwai H. Relationship between dental status and development of osteoradionecrosis of the jaw: a multicenter retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*.査読有,124,139-145,2017.doi: 10.1016/j.oooo.2017.04.012.
 19. Suzuki K, Yagi M, Kanda A, Kobayashi Y, Konishi M, Miyasaka C, Tashiro T, Iwai H. Mammary analogue secretory carcinoma presenting as a cervical lymph node metastasis of unknown primary site: a case report. *Case Rep Oncol*.査読有,10,192-198,2017.doi: 10.1159/000457949.
 20. Konishi M, Iwai H, Tomoda K. Reexamination of etiology and surgical outcome in patient with advanced external auditory canal cholesteatoma. *Otol Neurotol*.査読有,37,728-34, 2016.doi:10.1097/MAO.0000000000001079.

[学会発表](計2件)

1. 岩井 大、他.モデルマウスを用いた CD4⁺T リンパ球分画接種による老人性難聴予防.第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会.2019/02/07-9.大阪.
2. Iwai H, Inaba M, et al. Prevention of age-related hearing loss by transfer of CD4-positive T cells deleting IL-1 receptor type 2-positive T cells and regulatory T cells. 55th Inner Ear Biology Workshop 2018/9/6-8.Berlin.

[その他]

ホームページ等

<http://www7.kmu.ac.jp/ent/research/04.html>

http://www.kmu.ac.jp/hirakata/visit/treatment/medical_section/jibinkouka.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:(岩井 大)

ローマ字氏名: IWAI, hiroschi

所属研究機関名: 関西医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10232638

(2)研究協力者

研究協力者氏名:(稲葉 宗夫)

ローマ字氏名: INABA, muneo