

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16826

研究課題名(和文)酸化ストレス内耳障害の病態と予防法解明のためのNrf2の局在および動態の解析

研究課題名(英文)Activation of the NRF2 pathway attenuates progression of age-related hearing loss

研究代表者

本蔵 陽平 (Honkura, Yohei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20810146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体の抗酸化の中心を担う転写因子Nrf2に着目した加齢性難聴の予防法の解明を目的に本研究を行った。12ヶ月齢のNrf2活性化型の遺伝子改変マウスと野生型マウスを比較検討した。聴性脳幹反応の解析によりNrf2の活性化により低音域から中音域で加齢性難聴が予防できることを明らかにした。この結果を裏付けるように組織学的解析でも、Nrf2の活性化により、蝸牛頂回転と中回転のラセン神経節、ラセン靭帯、外有毛細胞の加齢性変性が有意に抑制されていた。さらに、免疫組織化学的検討によりNrf2の活性化により酸化ストレスが減弱が示された。この結果から、Nrf2の活性化が加齢性難聴の予防に有効であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性難聴は高齢化社会の進展に伴い患者数の増加が懸念されている疾病である。さらに、難聴と認知機能の低下の関連がWHOより報告され、健康長寿社会実現のための加齢性難聴対策の重要性が広く認識されるようになってきた。これまでに加齢性難聴の有効な予防法は解明されていない。本研究では、生体の抗酸化能の中心を担う転写因子Nrf2に着目し、Nrf2の活性化が加齢性難聴の進行を予防することをマウス実験で明らかにした。この結果は、Nrf2が加齢性難聴予防の臨床的ターゲットになることを示唆しており、今後の臨床応用に向けた研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although no prevention or treatments have been established for Age-related hearing loss (AHL), recent studies have suggested that suppression of oxidative stress leads to inhibition of AHL progression. NRF2 is a master transcription factor that regulates various antioxidant proteins and cytoprotection factors. We used one transgenic mice, in which NRF2 is activated. We compared 12-month-old mice. Histological analysis showed that cochlear degeneration was ameliorated in the transgenic mice. Auditory brainstem response thresholds in the transgenic mice were significantly lower than those in the wild type mice. Immunohistochemical analysis suggested that oxidative stress accumulation was attenuated in the cochlea of the transgenic mice. Thus, we concluded that NRF2 pathway activation protects the cochlea from oxidative damage during aging. Nrf2 activation drugs are expected to be effective in the prevention of AHL.

研究分野：酸化ストレスに伴う難聴の予防法の解明

キーワード：難聴 内耳 酸化ストレス Nrf2

1. 研究開始当初の背景

世界中で65歳以上人口の3分の1程度が難聴患者であると報告されており、高齢化社会に伴い難聴患者数はさらに増加することが予想される。また、携帯音楽プレーヤーなどの普及による不適切な音楽鑑賞が原因となり11億人もの若者で難聴発症のリスクが高まっているとの報告もある。さらに、難聴が認知機能低下に深く関連することがWHOより報告され、難聴対策の重要性が広く認識されるようになってきている。しかしながら、これまでに難聴の有効な予防法は解明されていない。加齢性難聴や騒音性難聴の主要因は酸化ストレスによる内耳障害であるとされており、酸化ストレスに伴う内耳障害の有効な予防法や治療法を解明することは、健康長寿社会の実現のために大きく貢献できると考える。

本研究者は酸化ストレス防御において中心的役割を果たす転写因子Nrf2に着目し研究を続けてきた。Nrf2は非ストレス環境下では細胞質においてKeap1-Cullin3ユビキチンE3リガーゼ複合体によりユビキチン化されプロテアソーム経

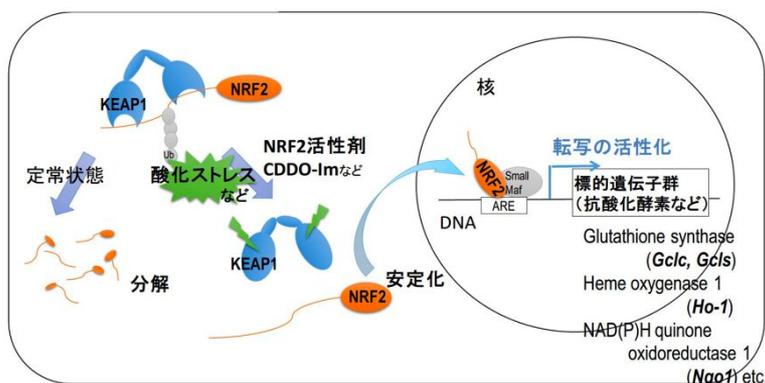


図1. Keap1-Nrf2酸化ストレス防御機構

路で直ちに分解されているものの、酸化ストレス環境下ではKeap1が不活性化し、安定化したNrf2は核に移行して標的遺伝子群の発現を誘導する。このようにNrf2は、生体における重要な酸化ストレス応答性の抗酸化防御機構を担っている(図1)。

これまでに申請者は、ヒトにおいて騒音性難聴の発症とNrf2欠乏とに関連があること(図2)、さらにマウスでNrf2を活性化すると騒音性難聴を予防できること(図3)を報告した。

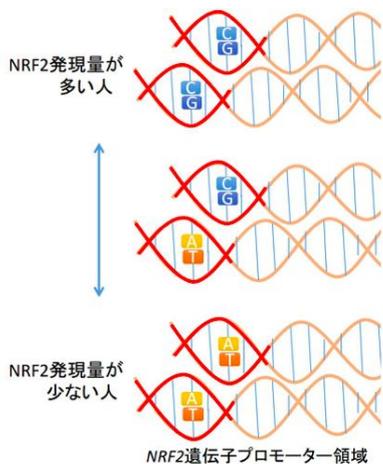


図2. Nrf2の一塩基多型と騒音性難聴の解析

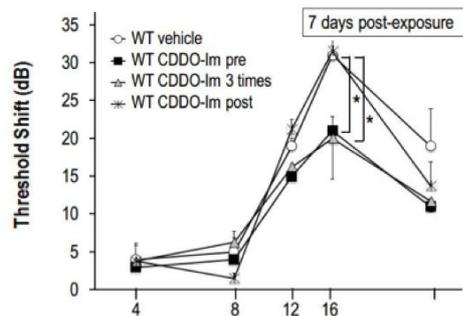


図3. Nrf2活性化での騒音性難聴の予防効果

一方、Nrf2の内耳における動態の詳細は解明されておらず、さらに加齢性難聴とNrf2との関連についても解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではまず、酸化ストレスによる内耳障害の病態解明と、Nrf2の内耳における詳細な機能を解明することを目的として、加齢性難聴に着目して研究を行った。

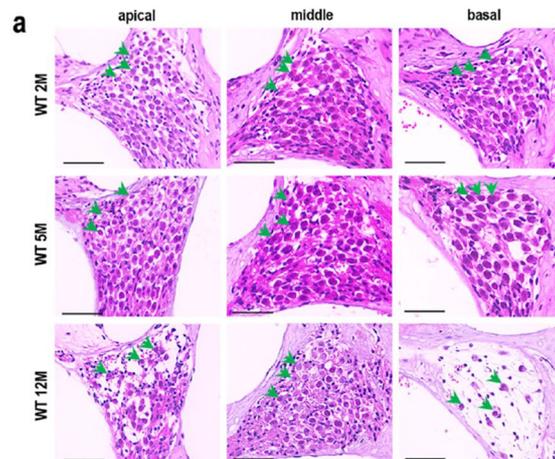
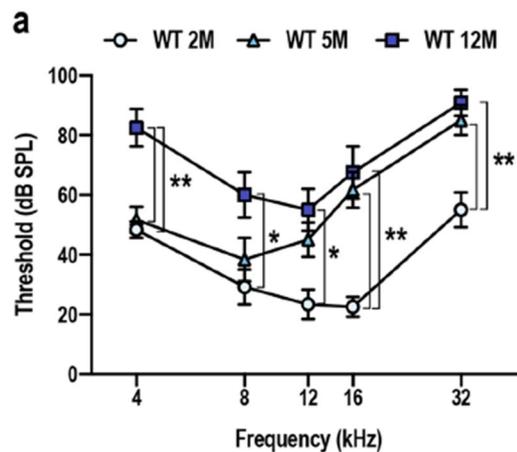
3. 研究の方法

12ヶ月齢時点で加齢性難聴が認められる C57BL/6 系統のマウスを用いて研究を行った。Nrf2 活性化型マウスとして、Keap1 ノックダウンマウス (*Keap1^{FA/FA}* マウス) を用いた。この遺伝子改変マウスは Nrf2 の抑制因子である Keap1 がノックダウンされており、結果として全身性の Nrf2 の活性化を示す。この *Keap1^{FA/FA}* マウスと野生型マウスを比較検討した。聴性脳幹反応 (ABR) での聴力評価に加えて、組織学的に検討した。とくに Nrf2 の内耳での動態を検討するため、蝸牛の各回転に分けて検討した。

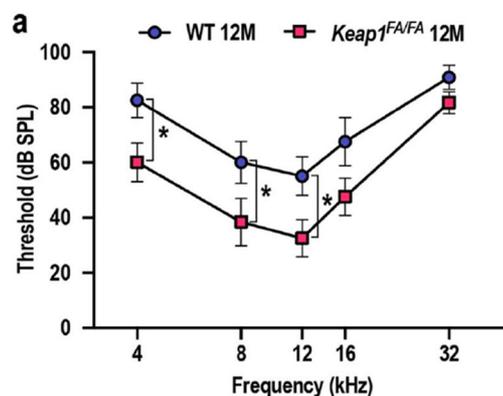
4. 研究成果

まず、2ヶ月齢と5ヶ月齢と12ヶ月齢の比較により、12ヶ月齢の野生型マウスでは、2ヶ月齢の野生型マウスに比べ、加齢性の聴力障害が進行していることを確認した (右図)。組織学的にも蝸牛のラセン神経節で加齢にともなって細胞密度の低下が認められた (右下図)。

次に、Nrf2 活性化マウスと野生型マウスを比較検討した。まず、この Nrf2 活性化マウスにおいて、蝸牛でも確実に Nrf2 が活性化していることを RT-PCR にて確認した。

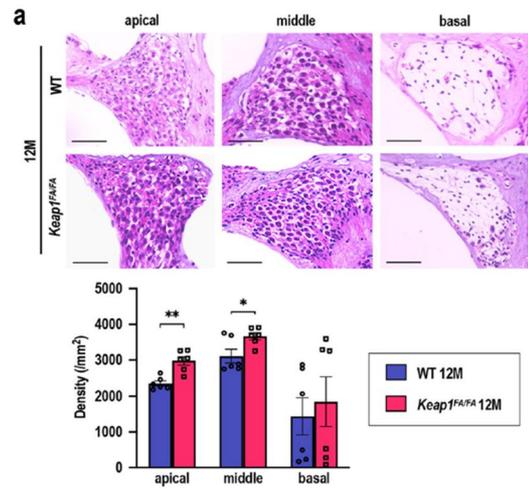


次に12ヶ月齢で、Nrf2 活性化マウスと野生型マウスを比較し、ABR を用いた聴力解析により、Nrf2 活性化により低音域から中音域で加齢性難聴の予防が可能であった (下図)。組織学的な解析では、ABR での周波数帯域に一致して、蝸牛頂回転と中回転のラセン神経節、ラセン靭帯、外有毛細胞の加齢性変性が有意に抑制されていた (次ページ図)。また、免疫組織学的検討により Nrf2 活性化マウスの蝸牛頂回転、中回転で酸化ストレスの蓄積低下が確認された。



以上の結果から、Nrf2 の活性化が加齢性難聴の

予防に有効であることが示された。さらに、Nrf2 活性化は低音域から中音域にかけての難聴予防効果があることが明らかとなった。このことから、加齢性難聴において低音域から中音域の障害は酸化ストレスが要因であるものの、高音域の障害は酸化ストレス以外が要因である可能性が示唆された。これは、加齢性難聴の障害メカニズムを解き明かすためにとても重要な新たな知見と言える。一方、Nrf2 が蝸牛基底回転で十分に機能していないために高音域の難聴を予防できなかった可能性も捨てきれない。本研究では免疫組織化学的な手法を用いて蝸牛内の Nrf2 の局在と動態を明らかにしようと試みたものの、成功しなかった。今後、新たな手法を開発して蝸牛内の Nrf2 の局在と動態を詳細に検討することが望まれる。そして、加齢性難聴をはじめとする酸化ストレスに伴う難聴の臨床的な予防法の確立に発展することを期待する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tetsuya Oishi, Daisuke Matsumaru, Nao Ota, Hiroshi Kitamura, Tianxiang Zhang, Yohei Honkura, Yukio Katori, Hozumi Motohashi	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Activation of the NRF2 pathway in Keap1-knockdown mice attenuates progression of age-related hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NPJ Aging Mech Dis .	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41514-020-00053-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本蔵陽平
2. 発表標題 転写因子NRF2の抗酸化能による加齢性難聴の予防効果の解明
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本蔵陽平
2. 発表標題 騒音性難聴の発症とその予防に対する、転写因子NRF2の機能の解明
3. 学会等名 第29回 日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本蔵陽平
2. 発表標題 抗酸化作用およびミトコンドリア機能に着目した難聴予防法の検討.
3. 学会等名 第18回 日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本藏陽平, 大石哲也, 川瀬哲明, 香取幸夫
2. 発表標題 転写因子NRF2活性化による加齢性難聴予防効果の検討.
3. 学会等名 第28回 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yohei Honkura, Tetsuya Ohishi, Ryokichi Ikeda, Daisuke Yamauchi, Tetsuaki Kawase, Yukio Katori.
2. 発表標題 Evaluation of the role of NRF2 in the progression of age-related and noise-induced hearing losses.
3. 学会等名 55 th Inner Ear Biology Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 赤池孝章, 本橋ほづみ, 内田浩二, 末松 誠 / 編	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 276
3. 書名 実験医学増刊 Vol.36 No.5 レドックス疾患学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------