

機関番号：33910

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390168

研究課題名 (和文) 騒音性難聴の発症機構の解析と予防・治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of preventive therapy of noise-induced hearing loss through clarifying its mechanism

研究代表者

加藤 昌志 (KATO MASASHI)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：10281073

研究成果の概要 (和文)：

神経成長やメラノサイトを制御する c-RET 分子の機能低下がヒトに先天性難聴を誘発することを報告した。さらに、c-Ret 分子機能の低下した遺伝子改変マウスを用い、c-RET が内耳のらせん神経節依存的に難聴を誘発する可能性を示した。また、c-Ret が、加齢性難聴や騒音性難聴にもかかわっているかどうかを動物レベルで検討した。一方、ヒト (若年者) を対象として、騒音が聴力に与える影響を疫学的に解析した。

研究成果の概要 (英文)：

We found that congenital syndromic hearing loss was induced by the loss of function of c-RET, a regulator of growth of neuron and melanocytes, in humans. We then showed that c-Ret-mediated congenital hearing loss was caused of degeneration of spiral ganglion neurons in inner ear in mice. We also examined whether c-Ret is correlated with age-related and noise-induced hearing loss. Moreover, we performed epidemiological study to investigate the correlation between noise and hearing loss in young adults.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境ストレス、労働衛生学、難聴、色素細胞、分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

聴覚は五感のうちでも最も重要な感覚の一つである。現在までに、鼓膜等の中耳の障害による伝音難聴に対する予防・治療技術は手術療法を含めてほぼ完成されている。しかし、内耳障害によって発症する感音難聴の発症機構や病態には未だ不明な点が多く、原因となる遺伝子も大部分が不明である。そのため、有効な予防・治療の方法はほとんどないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 先天性難聴

先天性難聴を制御する分子をヒトで探索する。さらに、標的とする分子の遺伝子改変マウスを用いて、発症機構や病態を解明する。

(2) 加齢性難聴

加齢性難聴の発症にかかわる分子について遺伝子改変マウスを用いて探索するとともに、分子を介した発症機構や病態を解析する。

(3) 騒音性難聴

騒音性難聴の発症にかかわる分子を、遺伝子改変マウスを用いて探索するとともに、分子標的治療による予防・治療法の開発をめざす。また、ヒト (young adult) を対象に、MP3 プレーヤーの使用頻度や時間 (騒音) と聴力の関係を調べる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変動物用いた研究

①形態学的解析

本研究では、c-Ret 分子の自己リン酸化部位に変異を挿入することにより、c-Ret 機能が恒常的に低下したノックインマウス (c-Ret-KI-マウス)、ヒトの活性型 RET が導入された RET トランスジェニックマウス (RET-Tg-マウス)、RET-Tg-マウスとの交配により Ret 機能が回復した c-Ret-KI-マウス (c-Ret-KI:RET-Tg-マウス)、野生型マウスの4種類を用いた。還流固定後、内耳を摘出し、凍結切片およびパラフィン切片にて、光学顕微鏡レベルで HE 染色・免疫組織染色等を施行するとともに、透過電顕 (TEM) および走査電顕 (SEM) を施行した。

②生理学的解析

上記4種類のマウスを対象とし、聴性脳幹反応 (ABR)、耳音響放射 (DPOAE)、内リンパ電位 (EP) を施行し、マウスの聴力、有毛細胞機能、血管条機能について、電気生理学的手法を用いて解析した。

(2) ヒトを対象とした研究

①遺伝子解析

巨大結腸症患者について、原因遺伝子を調べ、c-RET の変異によって発症している患者を選別した。さらに、ABR を用いて、聴覚レベルを測定した。

②疫学解析

日常生活において、MP3 プレーヤーの使用時間が51名の若年者 (男性: 21-23歳) の聴覚に与える影響について、多変量解析を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 先天性難聴

①ヒトを対象とした解析

表 S1 に示したように、c-RET 遺伝子依存的に発症した巨大結腸症と先天性難聴の関係を調べた。12例の患者のうち、重症例の男児3例に先天性難聴の合併を見つけた。以上のように、本研究では、世界で初めて、c-RET 遺伝子依存性の巨大結腸症患者が、先天性難聴を合併する可能性を示した (Ohgami N, Kato M et al. PNAS, 2010)。

【表 S1】

Case No.	Gender	Familial (F) or sporadic (S)	Range of aganglionosis	Hearing loss		Exon	Codon	Nucleotide change	Homozygous or heterozygous	Effect on coding sequence
				Right	Left					
1	M	S	Stomach to anorectum	+	+	17	969	CGG → TGG	Homozygous	Misense
2	F	S	Stomach to anorectum	-	-	10	588	GGC → GAC	Heterozygous	Misense
3	M	F	Stomach to anorectum	+	+	1	13	37 deletion C	Heterozygous	Frameshift and stop at codon 22
4	M	S	Lig. of Treitz to anorectum	+	+	17	969	CGG → TGG	Heterozygous	Misense
5	F	S	Lig. of Treitz to anorectum	-	-	3	144	432 deletion C	Heterozygous	Frameshift and stop at codon 244
6	M	S	Jejunum to anorectum	-	-	15	897	CGA → CAA	Heterozygous	Misense
7	F	S	Jejunum to anorectum	-	-	2	30	TAC → TGC	Heterozygous	Misense
8	F	F	Ileum to anorectum	-	-	1	13	37 deletion C	Heterozygous	Frameshift and stop at codon 22
9	F	F	Ileum to anorectum	-	-	1	13	37 deletion C	Heterozygous	Frameshift and stop at codon 22
10	F	S	Ileum (distal) to anorectum	-	-	17	942	TGG → TGC	Heterozygous	Misense
11	M	S	Ileum (distal) to anorectum	-	-	12	734	GAA → AAA	Heterozygous	Misense
12	F	S	Ileum (distal) to anorectum	-	-	7	489	GAC → AAC	Heterozygous	Misense

Three patients with bilateral auditory system abnormalities were found in 12 patients who had intestinal aganglionosis with a c-RET mutation but no *GNF*, *NTN*, *SOX10*, *EDNRB*, and *EF-3* mutations. All the patients with deafness, who had been previously reported to have congenital hearing losses without detection of their causal genes (1), were boys with total intestinal aganglionosis. F, female; Lig, Ligamentum; M, male.

②遺伝子改変マウスを対象とした解析

c-RET 依存性におこる先天性難聴の発症機構を、c-RET 分子機能の低下した遺伝子改変マウス (c-Ret-KI-マウス) を用いて調べた (Ohgami N, Kato M et al. PNAS, 2010)。

【図 1】

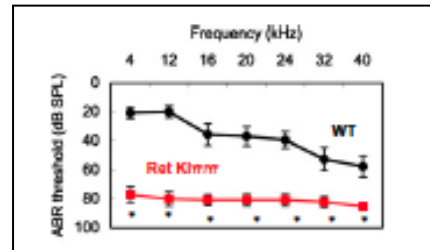


図 1 に示すように、ホモ型 c-Ret-KI-マウスでは、ヒトと同じように先天性難聴が発症することがわかった (図 1)。

【図 2】

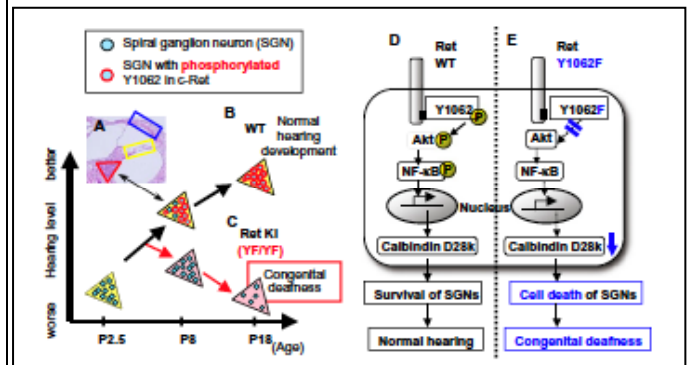


図 2 に示すように、NF κ B は、既知の聴覚制御遺伝子であり、Calbindin D28K 分子を介して内耳のらせん神経節の維持に関与している。本研究では、c-RET 活性低下が、Akt を介して NF κ B の活性を低下させることにより、内耳のらせん神経節の変性を誘導し、先天性難聴を誘発する可能性を示した。このように、本研究では、c-RET 遺伝子を介した先天性難聴の発症機構を一部解明した。

【図 3】

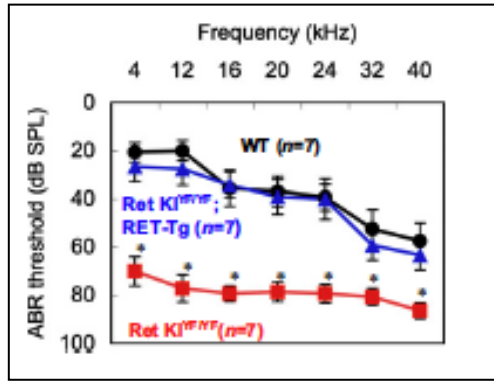


図 3 に示すように、c-Ret-KI-マウスの先天性難聴は、活性型 RET が導入された RET-トランスジェニックマウス (RET-Tg-マウス) との交配により新規に作製された c-Ret-KI;RET-Tg-マウスでは、野生型マウスとほぼ同じレベルまで聴覚が回復した。このように、本研究では、予防・治療法が、ほとんど確立されていない先天性難聴に対して、c-RET 分子を標的とした新規の予防・治療法を提案した。

(2) 加齢性難聴

遺伝子改変マウスを対象とした解析
 代表者らは、ホモ型 c-Ret-KI-マウスが先天性難聴を発症することを示したのみならず、ヘテロ型 c-Ret-KI-マウスでは、加齢性難聴が促進されることを示した (Ohgami N, Kato M et al. *Neurobiol Aging*, 2011)。さらに、本マウスでは、c-Ret 分子のヘテロ型機能低下が、加齢性に内耳のらせん神経節の変性を加速することにより、難聴を発症することを世界で初めて報告した。一方、以前、NF κ B 分子機能低下が、内耳のらせん神経節の変性を誘発し、加齢性難聴を誘発することを動物レベルで報告されている。本研究では、c-Ret 分子が NF κ B 分子の上流にある可能性を提示し、聴覚における両分子の潜在的関係を示した。さらに、c-Ret 分子標的治療により、加齢性難聴の進行を遅らせることができることを動物レベルで証明した。今後、ヒトにおいても、c-RET 機能低下が加齢性難聴に関与していることを証明できれば、c-RET 分子標的治療により、加齢性難聴の予知・予防に道を開くことができる。

(3) 騒音性難聴

①ヒトを対象とした解析

図 4 に示すように、1-12 kHz の全て音域について、1 週間に 10 時間以上 MP3 プレーヤーを使用するヒトは、使用しないヒトと比較して聴力の平均値は若干低下していた (Ohgami N, Kato M et al. *Toxicol Ind Health*, 2011)。しかし、統計学的に有意差はなかった。これらの

結果は、MP3 プレーヤーの使用時間だけでなく、音域 (Hz) や音圧 (dB) を測定したり、検体数を増やすことにより統計学的有意差の有るような差になる可能性もあると考えられる。

【図 4】

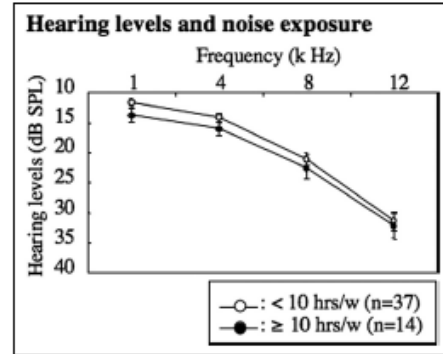


図 5 に示すように、12 kHz の聴力の平均値が、喫煙者は非喫煙者比較して有意に低下していた ($p < 0.05$)。この結果は、短期間の限られた喫煙でも、特に高音域の聴力を低下させる可能性があることを示している。

【図 5】

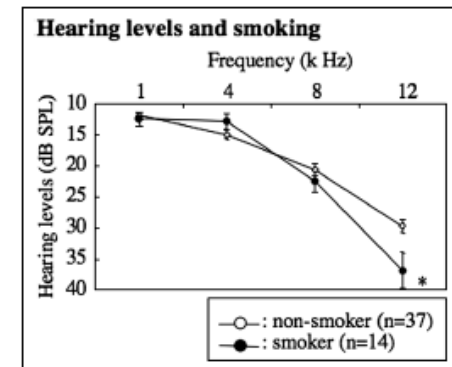


図 4-5 に示した結果を踏まえ、交絡因子 (MP3 プレーヤーの使用時間、喫煙、飲酒、睡眠時間) を考慮して、多変量解析を施行した。表 2 に示すように、MP3 プレーヤーの使用時間と 12 kHz の聴力低下に相関関係は認められなかった。しかし、喫煙により、若年者で高音域の聴力が低下する明らかになった。

【表 S2】

Hearing levels (n = 51)	12 kHz
Adjusted odds ratios (95% CI)	OR (95% CI)
Noise exposure	1.180 (0.285–4.888)
Smoking	4.096 (1.027–16.340) ^b
Drinking	3.533 (0.911–13.698)
Sleeping time	0.881 (0.214–3.630)

Abbreviations: CI: confidence interval; OR: odds ratio.
^a Models were adjusted for noise exposure, smoking, drinking and sleeping time, which have been previously reported to affect hearing level (Nakamura et al., 2001; Nomura et al., 2005; Franssen et al., 2008; Baur et al., 2009).
^b $p < .05$

現在までに、日常生活が、若年者の聴覚に影響を与えることを示した疫学研究は、世界的にみてもほとんどない。本研究では、軽度の喫煙でも、若年者の聴覚に影響する可能性を示した (Ohgami N, Kato M et al. *Toxicol Ind Health*, 2011)。

②遺伝子改変マウスを対象とした解析
古くから、騒音性難聴の予防法として、耳栓や音源を遮蔽する方法等がある。しかし、一旦発症した騒音性難聴に対しては、ほとんど治療法がないのが現状である。本研究では、騒音性難聴を促進する遺伝子および抑制する遺伝子の探索を、遺伝子改変マウスを用いて行うとともに、騒音性難聴制御分子を対象とした分子標的療法に結びつけるべく研究を推進している (現在、特許申請中)。

以上のように、本研究では、色素細胞制御分子として c-RET 分子を標的として研究を行い、聴覚機能等の多くの新機能を発見した。

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 22 件)

- ① Ohgami N, Ida-Etoh M, Sakashita N, Sone M, Nakashima N, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M. Partial impairment of c-Ret at tyrosine 1062 accelerates age-related hearing loss in mice. *Neurobiol Aging* (in press), 2011. 査読有
- ② Ohgami N, Kondo T, Kato M. Effects of light smoking on extra-high-frequency auditory thresholds in young adults. *Toxicol Ind Health* 27(2):143-7, 2011. 査読有
- ③ Kato M, Kumasaka MY, Takeda K, Hossain K, Iida M, Goto Y, Ohgami N. L-cysteine as a regulator for arsenic-mediated cancer-promoting and anti-cancer effects. *Toxicol In Vitro* 25(3):623-9, 2011. 査読有
- ④ Ohgami N, Ida M, Shimotake T, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M: c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(29):13051-6, 2010. 査読有
- ⑤ Kato M, Takeda K, Hossain K, Thang D, Nguyen, Kaneko Y, Kumasaka M, Yamanoshita O, Uemura N, Takahashi M, Ohgami N, Kawamoto Y. A redox-linked novel pathway for arsenic-mediated RET tyrosine kinase

activation. *J Cell Biochem* 110:399-407, 2010. 査読有

- ⑥ Helfrich I, Scheffrahn I, Bartling S, Weis J, von Felbert V, Middleton M, Kato M, Ergün S and Schadendorf D: Resistance to anti-angiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* 207(3): 491-503, 2010. 査読有
- ⑦ Zhao F, Falk C, Osen W, Kato M, Schadendorf D, Umansky V: Activation of p38 MAPK Drives Dendritic Cells to Become Tolerogenic in *Ret* Transgenic Mice Spontaneously Developing Melanoma. *Clin Cancer Res* 15(13):4382-90, 2009. 査読有
- ⑧ Chi X, Michos O, Shakya R, Riccio P, Enomoto H, Licht JD, Asai N, Takahashi M, Ohgami N, Kato M, Mendelsohn C, Costantini F: Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis. *Dev Cell* 17(2):199-209, 2009. 査読有
- ⑨ Kimpfler S, Ring S, Falk C, Osen W, Kato M, Mahnke K, Schadendorf D, Umansky V: Skin Melanoma Development in *Ret* Transgenic Mice Despite the Depletion of CD25+FoxP3+ Regulatory T-Cells in Lymphoid Organs. *J Immunol* 183(10): 6330-7, 2009. 査読有
- ⑩ Yajima I, Kumasaka M, Thang ND, Yanagishita T, Ohgami N, Kallenberg D, Naito Y, Yoshikawa T, Sakashita N, Kato M: Zinc finger protein 28 as a novel melanoma-related molecule. *J Dermatol Sci* 55(1):68-70 2009. 査読有
- ⑪ Umansky V, Abschuetz O, Osen W, Ramacher M, Zhao F, Kato M, Schadendorf D: Melanoma Specific Memory T Cells Are Functionally Active in *Ret* Transgenic Mice Without Macroscopical Tumors. *Cancer Res* 68(22):9451-8, 2008. 査読有

他11編

[学会発表] (計 15 件)

- ①学会名：第 81 回日本衛生学会総会
発表年月日：2011 年 3 月 26-28 日
場所：東京都
発表様式：一般演題
発表者：大神信孝、下竹孝志、時々輪真由美、浅井直也、高橋雅英、加藤昌志
演題名：新規先天性難聴遺伝子の解析
- ②学会名：第 81 回日本衛生学会総会
発表年月日：2011 年 3 月 26-28 日
場所：東京都

発表様式：一般演題

発表者：堀創二郎、大神信孝、大沼章子、加藤昌志

演題名：飲水投与した塩化バリウムが生体内の元素レベルに与える影響

③学会名：第59回東海小児がん研究会

発表年月日：2011年2月5日

場所：名古屋市

発表様式：特別講演

発表者：加藤昌志

演題名：遺伝子が原因でおこる病気と環境により誘導される病気：臨床医学的考察

④国際セミナー名：JSPS AA Science Platform Program: The 1st International Symposium of Environmental Health Sciences in Chubu University, JAPAN.

発表年月日：July 28-29, 2010

場所：Kasugai, Aichi, Japan.

発表様式：Special lecture

発表者：Masashi Kato

演題名：Pollution of inorganic substrates in Asian countries

⑤学会名：第80回日本衛生学会総会

発表年月日：2010年5月9-11日

場所：仙台市

発表様式：一般演題

発表者：大神信孝、伊藤聖奈、山口碧、堀創二郎、加藤昌志

演題名：低周波音が協調運動に与える影響

⑥国際シンポジウム名：Leadership for Environment and Development: Participatory Curriculum Development Network between the NGO and University (Symposium and Expert Meeting)

発表年月日：2009.9.17-19

場所：Kasugai, Aichi, JAPAN.

発表様式：Oral presentation (Panelist)

発表者：Masashi Kato

演題名：Volunteer Activities in Chubu University for Provision of Safe Drinking Water in Developing Countries

⑦シンポジウム名：中部大学国際ESDセンター主催 第3回キャンパス・エコミュージアムプロジェクト

発表年月日：2009年07月11日

場所：愛知県春日井市

発表様式：特別講演

発表者：加藤昌志

演題名：環境汚染が私たちの生存を脅かす

〔図書〕(計1件)

①加藤昌志、高橋雅英：モデル動物利用マニュアル(分担執筆：第1部疾患モデルの作成と利用、第2章がん、第2節多臓器発癌モデル、第7項Ret)、株式会社 エル・アイ・シー、印

刷中

〔産業財産権〕

○出願状況(計6件)

①名称：薬剤評価方法

発明者：加藤昌志、飯田真智子、熊坂真由子、矢嶋伊知朗、田口暢彦

権利者：中部大学・ホーユー株式会社

種類：特許

番号：特願2010-145179

出願年月日：2010年6月25日

国内外の別：国内出願

②名称：白毛の予防・治療剤、非治療的な美容方法、エンドセリンレセプターB遺伝子発現促進剤及びMITF-M遺伝子発現促進剤

発明者：加藤昌志、飯田真智子、上村規行、田口暢彦

権利者：中部大学・ホーユー株式会社

種類：特許

番号：特願2010-145178

出願年月日：2010年6月25日

国内外の別：国内出願

③名称：発癌毒性の評価方法及び発癌予防・治療剤

発明者：加藤昌志

権利者：中部大学

種類：特許

番号：特願2009-241197

出願年月日：2009年10月20日

国内外の別：国内出願

④名称：デノボ癌を自然発症するモデル動物及びその用途

発明者：加藤昌志、熊坂真由子

権利者：中部大学

種類：特許

番号：特願2009-199142

出願年月日：平成21年8月31日

国内外の別：国内出願

⑤名称：難聴又は耳鳴りの予防・治療剤

発明者：加藤昌志、大神信孝、伊田みちる、田口暢彦

権利者：中部大学

種類：特許

番号：特願2009-185334

出願年月日：平成21年8月8日

国内外の別：国内出願

⑥名称：難聴モデル動物及びその用途

発明者：加藤昌志、大神信孝、高橋雅英、浅井直也、時々輪真由美

権利者：中部大学、名古屋大学(共同出願)

種類：特許
番号：特願 2009-053481
出願年月日：平成 21 年 3 月 6 日
国内外の別：国内出願

○取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.mac.com/chubu5011/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 昌志 (KATO MASASHI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：10281073

(2) 研究分担者

大神 信孝 (OHGAMI NOBUTAKA)
中部大学・生命健康科学部・講師
研究者番号：80424919

(3) 連携研究者

なし