

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33915

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11727

研究課題名（和文）感音性難聴の予防に関する新規プレバイオティクス効果の探索

研究課題名（英文）Exploring novel prebiotic effects on prevention of sensorineural hearing loss

研究代表者

近藤 貴子（Kondo, Takako）

名古屋女子大学・健康科学部・講師

研究者番号：60737203

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：プレバイオティクスが、生活習慣病や原因不明の難治性疾患の発症制御に関わることが解明されている。本研究では、プレバイオティクス効果をもつフラクトオリゴ糖(FOS)が感音性難聴に有効であるか検討した。難聴モデルマウスにFOSを継続投与し、FOSで変動する腸内細菌叢の構成や腸内細菌産生短鎖脂肪酸の増加を明らかにした。内耳においてはFOSによる短鎖脂肪酸の受容体の上昇を明らかにした。聴力機能に関しては、FOSによる内耳の遺伝子発現変動および聴力閾値への効果を明らかにした。プレバイオティクスが聴力機能維持に有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感音性難聴は、聴覚を司る蝸牛および聴覚中枢の障害である。蝸牛の細胞は再生不可で、障害を受けると聴力の回復は困難である。そのため、発症予防と進行抑制が重要となる。プレバイオティクスは、腸内環境を改善することで有益な効果をもたらす。プレバイオティクスのフラクトオリゴ糖を難聴マウスに摂取させたところ、腸内細菌叢の変動を介し、酸化ストレスが低下し、聴覚機能保護因子が著しく増加した。本研究の長期目標は、「食生活から難聴を予防する」方法の確立である。研究成果は、感音性難聴の罹患者の減少だけでなく、栄養指導の確立、推奨栄養素の特定や機能性食品の開発などに発展し、食を通しての健康維持・促進に大いに役立つ。

研究成果の概要（英文）：It has been elucidated that prebiotics are involved in the onset control of lifestyle-related diseases and intractable diseases. In this study, we investigated whether fructooligosaccharides (FOS), which have prebiotic effects, are effective for sensorineural hearing loss. Continuous administration of FOS to a model for early-onset progressive hearing loss changed the composition of the intestinal microbiota and increased the short-chain fatty acids produced by the intestinal bacteria. Regarding hearing function, we confirmed the effect of FOS on gene expression changes in the inner ear and hearing threshold. These results suggest that prebiotics may be effective in maintaining hearing function.

研究分野：栄養学

キーワード：プレバイオティクス フラクトオリゴ糖 感音性難聴 内耳

1. 研究開始当初の背景

感音性難聴とは加齢性難聴、突発性難聴、騒音性難聴などを含み、聴覚を司る内耳の蝸牛および聴覚中枢の障害である。2018年に世界保健機関は、現状で、全世界の4億7000万人が聴覚障害をもち、スマートフォンやイヤフォンの普及および不適切な使用などにより、今後、約11億人の若者が難聴を罹患するリスクがあると報告した。特に高齢化社会の日本では深刻で、65歳以上の難聴の有病率は30%を超えると推計されており、難聴は年々増加傾向にある。聴力の低下は、会話の困難さや危機感知の低下を伴う「生活の質」の低下だけでなく、うつ病や認知症の原因ともなる。聴覚に関わる蝸牛の有毛細胞や蝸牛神経は再生できないため、一度障害を受けると聴力の回復は非常に困難である。そのため、感音性難聴の発症予防および重症化予防が重要である。しかし、発症や病態の分子機構が不明なため、有効な予防法は確立されていない。

2. 研究の目的

感音性難聴の発症の多くは原因不明であるが、ビタミン・ミネラルの不足、酸化ストレスおよび低栄養などが要因となり、食生活が関与している。食生活と感音性難聴について、カロリー制限、葉酸、リポ酸およびコエンザイム Q10 などの抗酸化物質が、C57BL/6J の内耳細胞の衰退や聴力機能低下を抑制することが報告されている。その他、 β -カロテン、ビタミン C、ビタミン E、マグネシウムを含有したサプリメント(ACEMg)の投与は、遺伝性および加齢性難聴マウスに有効であることが報告されている。ヒト対象の研究においても、ビタミン、ミネラルの不足や食生活は、発症リスクに関与することが報告されている。ただし、食生活と感音性難聴は相関性があるが、単独の栄養素の補強では顕著な発症・進行抑制はみられない。

プレバイオティクスとは、腸内環境を改善することで宿主に有益な効果をもたらす難消化性食品成分である。プレバイオティクスは、エピジェネティック制御に寄与するだけでなく、短鎖脂肪酸の産生、ビタミン合成、ミネラル吸収促進および抗酸化作用などを介し、生活習慣病や原因不明の難治性疾患の発症制御に関与することが解明されており、感音性難聴を予防する可能性が高いと考える。そこで、本研究では、FOS が誘導する腸内細菌叢がどのように聴覚機能に影響するのかを難聴モデルマウスを用いて解析し、「プレバイオティクスは感音性難聴の発症・進行を抑制することができるのか」を明らかにする。

本研究の長期目標は、感音性難聴に対する科学的・栄養学的根拠に基づいた「食生活から難聴を予防する」方法の確立である。プレバイオティクスが聴力機能に有効であることを明らかにすることは、罹患者数の減少だけでなく、感音性難聴に対する栄養指導の確立、推奨栄養素の特定や機能性食品の開発などに発展し、食を通しての健康維持・促進に大いに役立つ。

3. 研究の方法

(1) 標準飼料(AIN93G)と、それに FOS が 10%含有する飼料を早発性進行性難聴モデル(DBA/2J)マウスに12週間投与する。マウスの体重測定、血液検査、食餌摂取量の計量を経時的に実施する。

(2) 糞便のメタゲノム解析による腸内細菌叢の構成解析をする。糞便から抽出したゲノム DNA を次世代シーケンサーでメタゲノム解析(菌叢組成・菌叢比較解析)し、FOS 摂取有無の群間で変動する腸内細菌叢の構成を明らかにする。

(3) 血中酸化ストレスマーカーの定量による抗酸化作用の解析をする。血中の酸化ストレスマーカーを酵素免疫測定法(ELISA)で、総抗酸化能をレドックスアッセイ(TAC)で測定することにより、FOS の DBA/2J に対する抗酸化作用を明らかにする。

(4) 定量 PCR による内耳の遺伝子発現を定量解析する。内耳から RNA を抽出し、定量 PCR により聴覚関連遺伝子や短鎖脂肪酸、葉酸の受容体、カルシウムチャネルや酸化ストレス応答因子の発現を定量し、FOS による発現変動を明らかにする。

(5) 聴性脳幹反応(ABR)検査による聴力の機能解析をする。飼育中のマウス聴力は、8, 16, 32kHz の純音聴力を ± 5 dB 間隔で経時的に測定する。聴力閾値は 8kHz で 70dB、16, 32kHz で 100dB として判定し、FOS の聴力機能への効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 4週齢の DBA/2J に標準飼料(AIN93G)または 10%FOS 含有飼料を自由摂取させ、12週間飼育したところ、FOS 摂取による DBA/2J の食餌摂取量への影響はなかったが、体重は減少した。体重減少は、フラクトオリゴ糖への変換による総エネルギーの低下によるものである。血中グルコースやコレステロールは変動がなかった。しかしながら、盲腸では短鎖脂肪酸量の増加が確認された。

(2) 10%FOS 含有飼料を12週間与えた DBA/2J の糞便では有害菌の減少がみられ、腸内細菌叢の構成は有意に変動した。門レベルでは、FOS 摂取においてファーミクテス門の減少とバクテロイデーテス門の増加を確認した。属レベルの解析では、FOS 摂取マウスにおいて善玉菌であるバクテロイデス属やアッカマンシア属の増加していた(表1)。バクテロイデス属は特に肥満と関連

し、アッカーマンシア属は抗炎症作用があるとされている。一方、悪玉菌に分類されるクロストリジウム属は FOS 摂取マウスで減少した。

表1 Effect of FOS on Profiles of Intestinal Flora in DBA/2J After 8 Weeks Diet

Order ; Family ; Genus	CNT	FOS
Coriobacteriales; Coriobacteriaceae; Enterorhabdus	0.40 ± 0.00	0.12 ± 0.00 ^b
Bacteroidales; Bacteroidaceae; Bacteroides	3.20 ± 0.02	14.66 ± 0.09 ^a
Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus	13.96 ± 0.08	1.64 ± 0.01 ^a
Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium	20.50 ± 0.13	None ^a
Clostridiales; Lachnospiraceae; Lachnospiraceae	4.04 ± 0.02	0.70 ± 0.00 ^a
Clostridiales; Lachnospiraceae; Other	0.44 ± 0.00	0.04 ± 0.00 ^a
Clostridiales; Peptostreptococcaceae; Intestinibacter	0.54 ± 0.00	None ^a
Clostridiales; Peptostreptococcaceae; Romboutsia	1.18 ± 0.01	None ^a
Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminiclostridium	0.24 ± 0.00	None ^a
Clostridiales; Ruminococcaceae; Ruminococcus 2	9.96 ± 0.07	0.76 ± 0.01 ^a
Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae; Clostridium	None	0.48 ± 0.00 ^a
Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio	1.82 ± 0.02	0.04 ± 0.00 ^a
Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; Akkermansia	3.84 ± 0.03	53.22 ± 0.26 ^b

DBA/2J had been fed with control (CNT) or fructooligosaccharide (FOS) for 8 weeks. Values were expressed as mean ± SD (n = 5 per group). ^{a, b} Significant differences between CNT and FOS at ^a p < 0.05, ^b p < 0.01 by student's t-test.

(3) 酸化ストレスマーカーの変動も確認された。脂質過酸化の副産物として形成される酸化ストレスマーカーである 2-チオバルピツール酸反応性物質 (TBARS) は、CNT 摂取マウス (28.4 ± 3.3 nmol/ml) よりも FOS 摂取マウス (21.9 ± 4.5 nmol/ml) の方が、低い血清濃度であることが示された。タンパク質のニトロ化の副産物として形成される 3-ニトロチロシン (3-NT) のレベルは、FOS 摂取マウスの脳幹組織で減少した。ただし、脂質過酸化のアルデヒド生成物である 4-HNE (4-hydroxynonenal) の発現に有意な変化は、確認されなかった。

(4) 定量 PCR による内耳の遺伝子発現を定量解析では、聴覚関連遺伝子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) とその受容体 tyrosine kinase receptor (trkb), Glutamate receptor4 (GluR4)) が FOS 摂取による発現上昇が確認された (図 1A から D)。タンパク質レベルでは、内耳の BDNF 発現の明らかな変化は免疫組織化学的染色では観察されなかったが、脳幹の BDNF、Trkb、および GluR4 発現は、ウェスタンブロットによって FOS 摂取マウスで有意に増加することが確認された。また、短鎖脂肪酸の受容体の発現上昇も確認された。FOS は内耳における FFAR3 の発現を有意に増加させたが、FFAR2 の発現は変化させなかった (図 1E と F)。

短鎖脂肪酸は、遺伝子の転写制御に関与するヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase (Hdac)) を阻害することがわかっている。サーチュイン 3 (Sirt3) は、内耳の酸化的損傷の軽減と加齢に伴う感音性難聴の予防を仲介することが知られている。Hdac1 および Sirt3 は、CNT 摂取マウスと FOS 摂取マウスの間で変化

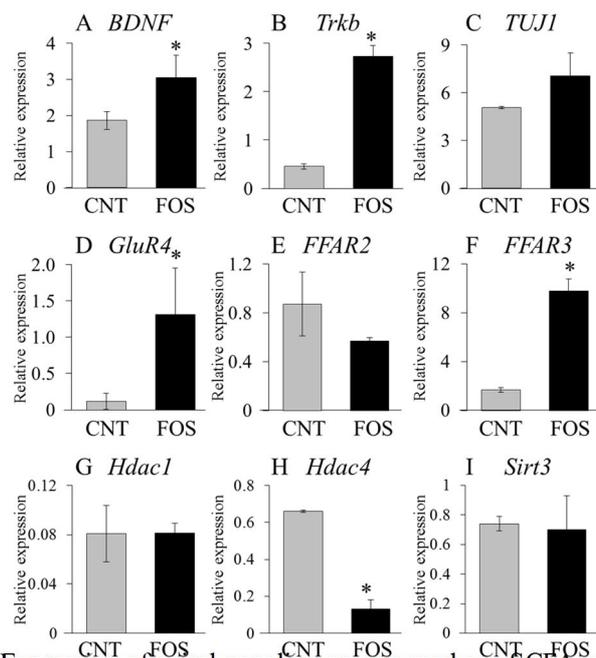


図 1 Expression of spiral ganglion neuron markers, SCFA receptor and histone deacetylase genes in the inner ear. Values are means ± SD. Significant differences between the control and the FOS groups (n=3 per group). * P < 0.05

しなかった(図1GおよびI)。しかし、内耳におけるHdac4の発現はFOSにより有意に減少した(図1H)。これらの結果は、FOSの摂取が転写制御およびSCFA受容体に関する遺伝子発現に影響を与え、DBA/2Jの内耳におけるSGNの生存に関連する遺伝子を誘導することを示した。

(5)聴性脳幹反応(ABR)検査による聴力の機能解析をする。飼育中のマウス聴力は、4,8,16,32kHzの純音聴力を±5dB間隔で経時的に測定した。現在解析中である。

(6)FOS摂取による内耳の蝸牛神経(Spiral Ganglion Neurons(SGN))の生存維持効果を確認するため、神経細胞マーカーであるTUJ1および有毛細胞マーカーであるMyo7aで染色した(図2AとB)。核染色DAPIに対するTUJ1陽性細胞の割合は、蝸牛基底回転ではCNT49.0%、FOS53.1%、蝸牛頂回転ではCNT54.7%、FOS58.0%であった。(図2C)。BDNF遺伝子発現増加の結果と一致して、CNT摂取マウスと比較してFOS摂取マウスではSNGの生存保護が観察された。

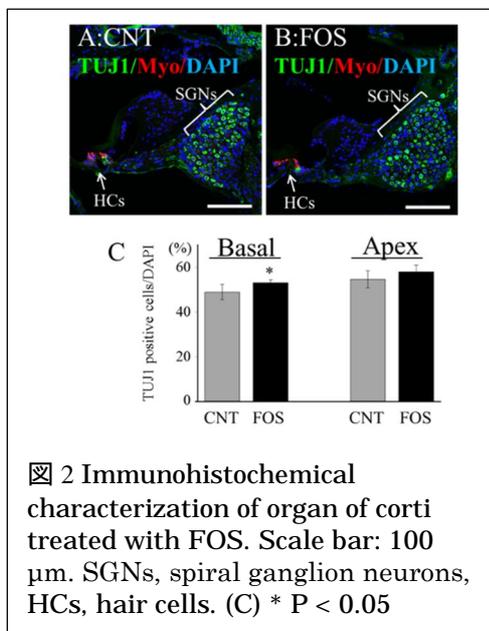


図2 Immunohistochemical characterization of organ of corti treated with FOS. Scale bar: 100 μ m. SGNs, spiral ganglion neurons, HCs, hair cells. (C) * $P < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kondo Takako, Saigo Saori, Ugawa Shinya, Kato Mai, Yoshikawa Yuto, Miyoshi Noriyuki, Tanabe Kenichi	4. 巻 75
2. 論文標題 Prebiotic effect of fructo-oligosaccharides on the inner ear of DBA/2 J mice with early-onset progressive hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108247 ~ 108247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2019.108247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 近藤貴子	4. 巻 3
2. 論文標題 難聴予防に有効な新規プレバイオティクスの探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 32-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya) (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	田辺 賢一 (Tanabe Kenichi) (60585727)	名古屋女子大学・健康科学部・講師 (33915)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	稲垣 彰 (Inagaki Akira) (70405166)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	
研究分担者	三好 規之 (Noriyuki Miyoshi) (70438191)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	

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