

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591979

研究課題名(和文)

遺伝子改変動物を用いた加齢性難聴および騒音性難聴の病態解明と治療への応用

研究課題名(英文)

Investigation of pathology of age-related hearing loss and noise-induced hearing loss and application for treatment using gene modification animals

研究代表者

寺西 正明 (TERANISHI MASAOKI)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20335037

研究成果の概要(和文)：

C57BL/6マウスは加齢による感音難聴の動物モデルとして広く使用されている。加齢による難聴の進行とともに、核酸の酸化ストレスマーカーの発現増強を認め、酸化ストレスが増加していると考えられる。蝸牛全体のタンパクを抽出し、質量分析でプロテオミクス解析を行うと、ミトコンドリア関連タンパクや抗酸化酵素の発現低下を認めた。内耳の器官培養を用いて、成長因子投与後のシグナル伝達を、免疫組織染色により評価する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：

The C57BL/6 mouse is used as animal models of the sensorineural deafness by the aging widely. We show the expression of oxidative stress marker reinforcement of the nucleic acid with aging, and oxidative stress is considered to increase. Proteomics analysis revealed the decrease of mitochondria-related proteins and antioxidant enzymes. Using organ culture of the inner ear, we established a method to evaluate signal transduction after the growth factors administration by immunohistochemistry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛、加齢、シグナル伝達、培養

## 1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では高齢者人口の増加とともに加齢による難聴は重大な問題になってきた。加齢による難聴は高齢者の生活の質を大いに低下させ、加齢による難聴の大部分は感音難聴による。従って加齢による感音難聴の予

防は急務の重要な課題である。国内最大規模の長期縦断疫学調査の結果では、騒音曝露の既往が、加齢による感音難聴の増悪因子になることが判明した(Int J Audiol. 2005, Uchida Y et al)。また動物実験では、若齢のマウスに騒音曝露の負荷を行うと、その後の

加齢による感音難聴が増悪し、蝸牛の神経変性が進むことが報告されている (J Neurosci. 2006, Kujava SG et al)。また騒音暴露は加齢による難聴の増悪因子でありその対策も重要と考えられた。C57BL/6 マウスを含め、加齢性難聴感受性遺伝子座 Ah1 をもつマウス系統は、騒音性難聴にも感受性があり、加齢性難聴と騒音性難聴の発症には、共通の遺伝子の関与も示唆され、加齢性難聴と騒音性難聴において、その発症要因は大いに関連がある。

## 2. 研究の目的

加齢性難聴と騒音性難聴など内耳性難聴の病態解明と治療法・予防法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

加齢性難聴のマウスモデルを用い、細胞障害のストレスマーカーを免疫組織学的に評価、蝸牛全体のタンパクについて網羅的解析を行う。また内耳の器官培養により、栄養因子投与後のシグナル伝達の変化を免疫組織学的に評価した。

聴覚機能の評価には、聴性脳幹反応検査を周波数別に閾値を検討することにより、聴力測定した。

## 4. 研究成果

正常細胞における酸素消費量のうち約 95%は正常に代謝され H<sub>2</sub>O が産生されるが、約 2%~5%は副産物として活性酸素 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>) を生じる。活性酸素は SOD, CAT (catalase), GPx (glutathione peroxidase), VitE, VitC などの抗酸化物質で消去され、バランスを保っている。活性酸素の細胞毒性 (酸化ストレス) は脂質への障害は脂質過酸化、DNA の酸化に代表される。加齢とともに核酸の酸化ストレスマーカーである 8-OH (ヒドロキシグアノシン) や、脂質過酸化のマーカーである MDA (マロンデアルデヒド) の発現増強を認め、酸化ストレスが増加していると考えられる。NO は蝸牛において神経伝達や血流の調節また病的な状態での細胞毒性の誘導など重要な役割を果たしていると考えられている。NO は NO 合成酵素 (NOS) により産生される。NOS はカルモジュリン依存性酵素で細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加が活性化の引き金となる構成型 NOS (NOS I, III) と、カルモジュリンがもともと酵素に強固に結合しており細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加を必要としない誘導型 NOS (NOS II) に分類される。NOS により産生された NO は可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化しサイクリック GMP (cGMP) の産生増加を介し細胞内で様々な機能を発揮する。誘導型 NOS (NOS II) は構成型 NOS と比べ、100 倍から 1000 倍も大量の NO を産生

する。産生された NO は O<sub>2</sub><sup>-</sup> と反応し、強いラジカルであるペロキシニトレート (ONOO<sup>-</sup>) を産生する。NOS II やその下流の sGC や cGMP の発現増強も認めるとともにペロキシニトレートのマーカーであるニトロチロシンの発現増強も認めた。蝸牛全体のタンパクを抽出し、質量分析でプロテオミクス解析を行うと、発現の低下しているタンパクは、Gene Ontology により分子機能、生物学的プロセス、細胞内構成要素から機能分類を行うと、細胞内の代謝に関するものが多く、ミトコンドリア関連タンパクや抗酸化酵素の発現低下を認めた。内耳の器官培養を用いて、成長因子投与後のシグナル伝達を、免疫組織染色により評価する方法を確立した。in vitro の系で成長因子 (VEGF) の刺激下で、ERK1/2 のリン酸化が起こる経路を確認した。

## 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 14 件)

1. Suzuki H, Teranishi M, Naganawa S, Nakata S, Sone M, Nakashima T. Contrast-enhanced MRI of the inner ear after intratympanic injection of meglumine gadopentetate or gadodiamide hydrate. Acta Otolaryngol 査読有 131 130-135, 2011.

2. Furuta T, Teranishi M, Uchida Y, Nishio N, Kato K, Otake H, Yoshida T, Tagaya M, Suzuki H, Sugiura M, Sone M, Hiramatsu M, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nakashima T. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden sensorineural hearing loss and Meniere's disease. Int J Immunogenet 査読有 in press, 2011.

3. Tagaya M, Yamazaki M, Teranishi M, Naganawa S, Yoshida T, Otake H, Nakata S, Sone M, Nakashima T. Endolymphatic hydrops and blood-labyrinth barrier in Meniere's disease. Acta Otolaryngol, 査読有 in press, 2011.

4. Yamamoto M, Teranishi M, Naganawa S, Otake H, Sugiura M, Iwata T, Yoshida T, Katayama N, Nakata S, Sone M, Nakashima T. Relationship between the Degree of Endolymphatic Hydrops and Electrocochleography. Audiol Neurootol 査読有 15, 254-260, 2010.

4. Katayama N, Yamamoto M, Teranishi M, Naganawa S, Nakata S, Sone M, Nakashima

T. Relationship between endolymphatic hydrops and vestibular-evoked myogenic potential. Acta Otolaryngol 査読有 130, 917-923, 2010.

5. Tagaya M, Teranishi M, Naganawa S, Iwata T, Yoshida T, Otake H, Nakata S, Sone M, Nakashima T. 3 Tesla magnetic resonance imaging obtained 4 hours after intravenous gadolinium injection in patients with sudden deafness. Acta Otolaryngol 査読有 130 665-669, 2010.

6. Nakashima T, Naganawa S, Teranishi M, Tagaya M, Nakata S, Sone M, Otake H, Kato K, Iwata T, Nishio N. Endolymphatic hydrops revealed by intravenous gadolinium injection in patients with Meniere's disease. Acta Otolaryngol 査読有 130, 338-343, 2010.

7. Sone M, Naganawa S, Teranishi M, Nakata S, Katayama N, Nakashima T. Changes in endolymphatic hydrops in a patient with Meniere's disease observed using magnetic resonance imaging. Auris Nasus Larynx 査読有 37, 220-222, 2010.

8. Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Teranishi M, Kawachi H. Round window surgery. Otol Neurotol 査読有 31, 5490550, 2010.

9. Nakata S, Mizuno T, Naganawa S, Sugiura M, Yoshida T, Teranishi M, Sone M, Nakashima T. 3D-FLAIR MRI in facial nerve paralysis with and without audio-vestibular disorder. Acta Otolaryngol 査読有 130, 632-636, 2010

10. Teranishi, M., Yoshida, T., Katayama, N., Hayashi, H., Otake, H., Nakata, S., Sone, M., Schachern, P.A., Paparella, M.M., Nakashima, T. 3D computerized model of endolymphatic hydrops from specimens of temporal bone. Acta Otolaryngol Suppl 査読有 560 43-47, 2009.

11. 寺西正明、中島 務  
メニエール病における画像検査所見  
JOHNS 査読無 25 831-835, 2009.

12. Kasai, S., Teranishi, M., Katayama, N., Sugiura, M., Nakata, S., Sone, M., Naganawa, S., Nakashima, T. Endolymphatic space imaging in patients with delayed endolymphatic hydrops.

Acta Otolaryngol 査読有 129 1169-1174, 2009.

13. Teranishi M, Naganawa S, Katayama N, Sugiura M, Nakata S, Sone M, Nakashima T. Image evaluation of endolymphatic space in fluctuating hearing loss without vertigo. Eur Arch Otorhinolaryngol 査読有 266 1871-1877, 2009.

14. 中島 務、寺西正明  
【難聴の神経学】突発性難聴  
神経内科 査読無 68 1433-1437, 2008

[学会発表] (計 13 件)

1. 寺西正明, 中島 務  
加齢マウスにおける蝸牛プロテオミクス解析. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2011 年 2 月 12 日 大分,

2. Teranishi M, Suzuki H, Otake H, Nakashima T. Distribution of caveolin 1 in the mouse inner ear. Sixth International Symposium on Meniere's disease and Inner Ear Disorders, Kyoto, November 14-17, 2010.

3. Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Teranishi M. Image evaluation of endolymphatic space in patients with Meniere's disease. Sixth International Symposium on Meniere's disease and Inner Ear Disorders, Kyoto, November 14-17, 2010.

4. Katayama N, Kato M, Fukunaga Y, Uchida Y, Sugiura S, Teranishi M, Sone M, Nakashima T. Posturography and audiometry in patients with diabetes mellitus. Sixth International Symposium on Meniere's disease and Inner Ear Disorders, Kyoto, November 14-17, 2010.

5. 寺西正明, 内田育恵, 大竹宏直, 加藤健, 吉田忠雄, 多賀谷満彦, 杉浦彩子, 中島務  
血管内皮型 NO 合成酵素遺伝子多型と突発性難聴について. 第 20 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 松山, 2010 年 10 月 9 日

6. 西尾直樹、寺西正明、内田育恵、杉浦彩子、安藤富士子、下方浩史、曾根三千彦、大竹宏直、加藤 健、吉田忠雄、多賀谷満彦、日比達也、中島 務  
補体因子 H と突発性難聴の関連について。

第20回 日本耳科学会総会・学術講演会,  
松山, 2010年10月9日

7. 内田育恵, 杉浦彩子, 寺西正明,  
中島 務  
中高年糖尿病教育入院患者における聴力の  
評価. 第20回 日本耳科学会総会・学術講  
演会, 松山, 2010年10月9日

8. 寺西正明, 加藤 健, 大竹宏直, 片山直  
美, 曾根三千彦, 中島 務  
突発性難聴に対するデキサメサゾン鼓室内  
注入療法の効果. 第55回 日本聴覚医学会  
総会・学術講演会, 奈良, 2010年11月  
11日

9. 古田敏章, 杉浦真, 平松真理子,  
寺西正明, 加藤 健, 鈴木秀典, 大竹宏直,  
吉田忠雄, 鈴木宏和, 曾根三千彦, 中島務,  
内田育恵, 杉浦彩子, 安藤富士子, 下方浩  
史, 西尾直樹, 多賀谷満彦  
突発性難聴とメニエール病におけるインタ  
ーロイキン1遺伝子多型の関連. 第143回  
東海地方部会連合講演会, 岐阜, 2010年  
12月12日

10. Teranishi M, Suzuki H, Otake H,  
Nakashima T. Age-related changes of  
markers for  
oxidative stress in the C57BL/6 mouse  
cochlea. XVth Anniversary Symposium in  
Audiological Medicine, Krakow, September  
19-22, 2010.

11. 寺西正明, 中島 務  
C57BL/6 マウス蝸牛における酸化ストレスマ  
ーカーの加齢変化の検討  
第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学  
会2010年2月18日~20日 福井

12. 寺西正明, 中島 務  
C57BL/6 マウス蝸牛における酸化ストレスマ  
ーカーの加齢変化の検討  
第3回聴覚アンチエイジング研究会 20  
09年7月3日 東京

13. Teranishi, M., Yoshida, T., Katayama,  
N., Hayashi, H., Otake, H., Nakata, S.,  
Sone, M., Nakashima, T. 3D-Computer  
model of endolymphatic hydrops. 45th Inner  
Ear Biology Workshop Sep. 21-24, 2008  
Ferrara, Italy

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺西 正明 (TERANISHI MASAOKI)  
名古屋大学大学院医学系研究科講師

研究者番号 : 20335037

### (2) 研究分担者

中島 務 (NAKASHIMA TSUTOMU)  
名古屋大学大学院医学系研究科教授  
研究者番号 : 30180277

### (3) 連携研究者

なし