

平成22年3月30日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790117  
 研究課題名(和文) 環境ストレスに対する内耳機能保護因子の解析と加齢性難聴の予防・治療薬の開発  
 研究課題名(英文) Analysis of environmental stress induced deafness

研究代表者  
 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

## 研究成果の概要(和文)：

加齢性・騒音性難聴の患者数は2015年には世界中でおよそ7億人と推計されているが、聴力などを司る神経生理機能の低下に対する抜本的な予防・治療法は、人工内耳等を埋め込む外科的手術以外には、まだ確立されていない。本研究では、聴覚機能低下を予防する化合物をマウスレベルで模索する事を目標とした。飲水投与で低分子化合物を5ヶ月齢の野生型C57BL/6マウスに投与し、騒音前後の聴力レベルを比較したところ、低分子化合物投与群は、12 kHzの騒音が惹起する騒音性難聴に対し、有意に抵抗性を示した。さらに、低分子化合物の内服によって加齢性難聴の進行も予防できることが分かった。今後、その作用機序について解析を進める予定である。

## 研究成果の概要(英文)：

About 30% of the 120 million people worldwide who suffer from congenital (early-onset) hearing loss are syndromic, and the remaining 70% are non-syndromic. At present, however, no effective therapies for deafness have been established except for cochlear implantation. This study demonstrated that oral administration of small molecule to C57BL/6 mice for one month significantly showed preventive effects on age-related/noise-induced deafness. This study is further trying to elucidate a mechanism for preventive effects on hearing losses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境ストレス、騒音性難聴、加齢性難聴、内耳

## 1. 研究開始当初の背景

工場などの事業所で発生する騒音が内耳性難聴を引き起こす事は古くから知られており、産業労働衛生上深刻な問題となっている。それに対する有効な予防方法としては、騒音発生の軽減や耳栓などを用いた遮音といった方法は知られているが、騒音性難聴を治療することは現在のところ不可能であり、その発症機序の解析は治療法を確立する上で大変重要である。聴神経生理機能の低下は、聴力などの低下のみならず、コミュニケーション能力全般の著しい低下を招き、全ての年齢層において生活の質（QOL）に多大な影響を及ぼす。2015年には世界中でおよそ7億人の患者が推計されているが（Lancet 2007）、聴力などを司る神経生理機能を改善する試みは、マウスレベルで内耳の骨包組織にドリルで穴を開け、ウイルスベクターを直接投与する遺伝子治療が世界の最前線で検討されているのが現状で（Nature Med 2006）、これらの投与方法では患者のリスクが極めて大きい為、未だ臨床応用されておらず、聴力などを司る神経生理機能の低下に対する抜本的な予防・治療法は確立されていない。

## 2. 研究の目的

環境ストレスに対する内耳保護因子の解析、及び抗酸化剤などを用いた感音性/加齢性難聴の予防・治療薬の開発を目的に解析を進める。

## 3. 研究の方法

(1) 神経系の細胞株 TGW 細胞をヒ素

( $\text{NaAsO}_2$ ) 存在下で培養し、チロシンキナ

ーゼ活性を検出する特異抗体を用いて、ウェスタンブロット解析を行った。

(2) 低分子化合物を5ヶ月齢の野生型 C57BL/6 マウスに飲水投与した後、聴力レベルを4-40 kHzの Tone 音に対する聴性脳幹反応で測定した。内耳形態解析は以下の手順で行った。ブアン固定液を用いて灌流固定した後、内耳を採取した。更にブアン固定液で浸潤固定した後、パラフィンブロックを作製した。パラフィン切片を用いて HE 染色あるいは免疫染色を行った。

(3) マウス胎児を浸潤固定した後、凍結ブロックを作製し、連続切片を作製した。チロシンキナーゼのリン酸化レベルを検出する抗体を CanGet Signal solution (TOYOBO) で希釈し、連続切片を免疫染色した。

## 4. 研究成果

(1) 加齢性・騒音性難聴は酸化ストレスとの関連が指摘されている。本研究より、酸化ストレスを惹起するヒ素曝露がチロシンキナーゼを介するシグナル伝達系への影響と新規レドックス経路を細胞レベルで明らかにした（J Cell Biochem 2009）。

(2) 低分子化合物を5ヶ月齢の野生型 C57BL/6 マウスに飲水投与し、1ヶ月間摂取させたところ、内耳コルチ器・蓋膜の構成分子の発現増強がみられた。音信号は内耳で電気信号に変換され、その電気信号が最終的に大脳の聴覚野に約100分の1秒の速度で伝達されるが、内耳コルチ器・蓋膜は音信号を電気信号に変換する最初のステップに必須の部位である。そこで、低分子化合物投与マウスに騒音を暴露させ、騒音前後の聴力レベル

を比較したところ、低分子化合物投与群は、12kHz の音域の加齢性・騒音性難聴に対し、有意に抵抗性を示した（特願2009-185334）。

（3）尿管芽形成に重要な中腎管発生初期の細胞の再構成へのチロシンキナーゼの活性の寄与について、個体レベルの解析例は報告されていない。米国コロンビア大学、名古屋大学との共同研究により、中腎管発生初期の細胞におけるチロシンキナーゼ活性を免疫組織学的に検出し、中腎管周辺において部位特異的な活性勾配が存在する事を明らかにした（Dev Cell, 2009）。この活性勾配が中腎管発生初期の細胞の再構成に寄与することが示唆された。内耳の聴覚神経系の発達にもチロシンキナーゼの関与が予想されることから、今回確立された高感度の活性検出技術は、その解析を進める上で大変重要な意義を持つ。

## 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3件）

- ① Kato M, Takeda K, Hossain K, Thang ND, Yu Kaneko Y, Mayuko Kumasaka YM, Yamanoshita O, Uemura N, Takahashi M, Ohgami N, Kawamoto Y. “A redox-linked novel pathway for arsenic-mediated RET tyrosine kinase activation.” (2010) *J Cell Biochem* (in press). 査読有り
- ② 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.” (2009) *Dev Cell*. 17, 199-209. 査読有り

- ③ 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.” (2009) *J Dermatol Sci*. 55, 68-70. 査読有り

〔学会発表〕（計3件）

- ① 大神信孝、伊田みちる、藤井紀子、加藤昌志「騒音性・加齢性難聴を発症したマウス内耳におけるD型アミノ酸含有タンパク質の免疫組織学的検出」  
第130回日本薬学会年会 岡山大学津島キャンパス 2010年3月29日
- ② Nobutaka Ohgami, Michiru Ida, Noriko Fujii, and Masashi Kato  
“Immunological detection of D-b-aspartic acid-containing proteins in mouse inner ears with age-related hearing loss” 第2回「タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会」京都大学原子炉実験所（大阪府）  
2009年11月12日
- ③ Nobutaka Ohgami “Biochemical analysis of the Niemann-Pick C1 protein.”  
Biomedical research seminar in Dept. of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University (Taichung, Taiwan)  
2009年12月22日

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

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  
権利者：(学校法人) 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

○取得状況（計 0 件）

〔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

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

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し