

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18286

研究課題名（和文）細胞老化に焦点を当てた、老人性難聴の治療法の開拓

研究課題名（英文）Treatment of presbycusis focused on cellular senescence

研究代表者

土橋 奈々（TSUCHIHASHI, NANA）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20826333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：老人性難聴の病態に老化細胞が関与している可能性から、老化促進マウス（SAMP8）とその対照マウス（SAMR）を用いてABRを用いた経時的な聴力測定と、内耳における老化細胞の検出を行った。予想に反し、老化細胞は8週齢という早期の段階でらせん神経節細胞に蓄積していることが明らかとなり、6月齢でもらせん神経節細胞での有意な発現を認め、有毛細胞や血管上には明らかな経時的な蓄積を認めなかった。老化細胞に選択的細胞死を誘導する活性をもつセノリティック薬を投与したが、この度の検討では明らかな聴力改善は得られなかった。このことは、細胞老化が聴覚に及ぼす影響を改めて見直す必要性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老人性難聴は1500万人を越す罹患者を持ち、聴力低下に加え社会的影響も甚大な疾患であるが、病態解明や根本的治療法の開発は進んでいない。一方、酸化ストレスなどで誘導される老化細胞の蓄積が加齢性疾患の発症に強く関与することが明らかとなってきた。本研究では老人性難聴における細胞老化の意義について検討した。当初老人性難聴の進行に老化細胞の経時的蓄積が関わると推測したが、実験の結果、老化細胞は若年マウスのらせん神経節細胞に発現著明であり、細胞老化がむしろストレスによる組織の変性を防ぎ、組織の修復を促進する方向に働くのではと考えられた。今後の研究で内耳の細胞老化の機能、聴覚に与える影響の解明が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Since senescent cells may be involved in the pathogenesis of senile deafness, we measured hearing over time using ABR and detected senescent cells in the inner ear using senescence-accelerated mice (SAMP8) and their control mice (SAMR). Contrary to expectations, senescent cells were found to accumulate in spiral ganglion cells as early as 8 weeks of age, with significant expression in spiral ganglion cells even at 6 months of age and evident accumulation over time in hair cells or on stria vascularis. Senolytic drugs with activity to induce selective cell death in senescent cells were administered to SAMP8, but no clear improvement in hearing was obtained in this study. This suggests the need to reevaluate the effects of cellular senescence on hearing.

研究分野：耳科学

キーワード：細胞老化 老人性難聴 セノリティック薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

老人性難聴は1500万人を超す罹患者を持ち、聴力低下そのものに加え、社会的影響も甚大な疾患である。酸化ストレスの蓄積がその原因と推測されるも、病態解明はなかなか進まず、確立された根本的治療法はない。近年の研究から、老化細胞の蓄積が加齢性疾患の発症に強く関与することが明らかとなってきた。本研究では、細胞老化の観点から老人性難聴の病態解明、治療に繋げることを目的とし、内耳老化モデルマウスや老化細胞除去マウスを用いて、老化細胞除去の聴力に与える影響を明らかにするとともに、より効果的な難聴予防・治療のために老化細胞の分泌機能に着目した解析を行う。

### 2. 研究の目的

研究の目的は、細胞老化の老人性難聴の病態への関与を明らかにすること、また、老化細胞の除去によって老人性難聴の予防や改善につながる治療法を開拓することである。

酸化ストレスが老人性難聴の重要なリスクファクターの一つであると言われており、老化細胞が増加したマウスに、抗酸化酵素の投与を行うと難聴の進行を妨げる可能性を示唆する報告があるが、細胞老化の聴覚に対する直接の因果関係を示すには至っていない。

また、近年、国内外において老化細胞を除去するセノリティック薬などの開発により、動脈硬化などの加齢性疾患で、老化細胞の除去による症状や所見の改善といった成果が認められている。しかし老人性難聴の病態の首座である内耳障害についてはいまだ細胞老化の意義が明らかとなっておらず、本研究にて内耳老化細胞の機能や老化細胞除去による効果を検討し、難聴の改善や予防に繋げたい。

### 3. 研究の方法

#### 《 老化促進マウス (SAMP8) における加齢による内耳細胞老化と難聴進行の確認》

SAMP8では6か月齢にラセン神経節細胞、外有毛細胞、内有毛細胞に老化細胞の蓄積が認められ、抗酸化物質の投与で難聴の進行が妨げられたという報告があるが、聴力回復と細胞老化との直接的な関連は分かっていない。SAMP8マウスを用い、ABR (Auditory brain response) 測定 (試験側耳介後部と頭部正中の皮下に針電極 (径 0.3-0.35mm を使用) を刺入した上で、経外耳道的に音刺激を加え、聴性脳幹反応を計測し聴力閾値を測定) を行い経時的な聴力の変化を評価する。また、ABR測定に合わせて内耳骨胞を摘出し、老人性難聴で機能低下しやすい内耳の細胞 (ラセン神経節細胞、外有毛細胞、内有毛細胞、血管条細胞) における老化細胞の蓄積を確認する。老化細胞の検出には SA-β-gal 染色を用い、老化関連遺伝子である p21、p16、BubR1 などの検出をおこない、正常細胞から老化細胞へ移行したことを確実に評価する。

#### 《 SAMP8 におけるセノリティック薬を用いた内耳老化細胞除去》

近年、老化細胞に選択的細胞死を誘導する活性をもつセノリティック薬の研究が多く行われ、セノリティック活性をもつ薬剤が複数報告されている。その中でも、ダサチニブ (キナーゼ阻害剤) とケルセチンの併用、ABT-263/737 (抗アポトーシス Bcl-2 ファミリータンパク阻害剤) に、実験動物における抗老化効果が認められている。これらセノリティック薬を投与し、聴力改善がみられるかを ABR で検討し、老化細胞が除去されているかを SA-β-gal 染色で確認する。これにより、細胞老化と加齢性難聴の進行との直接の因果関係があることを示す。

#### 《 老化細胞除去マウスを用いた聴力改善の検討》

Campisi らにより老化細胞を薬剤投与により除去できる機能を得たトランスジェニックマウスである P16-3MR マウスが開発されている。このマウスの譲渡を受け、加齢に伴う難聴の評価のため、まず ABR 閾値を測定する。ABR 閾値が有意に上昇した月齢で、内耳骨胞を摘出し、SA-β-gal 染色を用い、老化細胞が出現しているかを検討する。老化細胞除去薬剤を用いた後に、ABR を用いて聴力改善の程度を評価するとともに、蝸牛内の老化細胞が適切に除去されているかを SA-β-gal 染色で確認する。SASP の内耳老化細胞への影響の検討《老化細胞自体が炎症性サイトカインなどの分泌能 (SASP: senescence associated secretory phenotype) を持ち、SASP が過度に作用することで慢性炎症などの有害事象を起こすことが知られている。SASP は生体にとって恒常性維持などの有益な役割を担うが、慢性炎症、発がんなどの副作用も指摘されている。SASP 誘導に関わる、p53-mTOR 経路や cGAS-STING 経路などのシグナル伝達経路解析を行い、内耳老化細胞における SASP 因子が難聴発症や増悪のどのプロセスに寄与しているのか、詳細なメカニズムの解明を目指す。

### 4. 研究成果

#### 《 老化促進マウス (SAMP8) における加齢による内耳細胞老化と難聴進行の確認》

老化促進マウス (SAMP8/Tas1c) またそのコントロールの SAMR1/Tas1c マウスの聴力を経時的に

測定し比較した。8週齢のオスの SAMP8/TaSlc と SAMP 系対照動物である SAMR1/TaSlc に対して麻酔薬(塩酸メドミジン(0.3 mg/g)+ミダゾラム(4 mg/kg)+酒石酸ブトルファノール(5 mg/kg))を腹腔内投与して鎮静・苦痛を取り除いた状態で、ABR 測定を施行した。老化促進マウス SAMP8/TaSlc とコントロールの SAMR1/TaSlc マウスでは、生後6か月時点で聴力低下に差があることが明らかとなった。並行して同じく早期の聴力低下で知られる SAMP1/SkuSlc でも聴力を測定したが、SAMR1/TaSlc との有差は得られなかった。

8週齢、6月齢で内耳骨髄を摘出し、標本固定し、老人性難聴で機能低下しやすい内耳の細胞(ラセン神経節細胞、外有毛細胞、内有毛細胞、血管条細胞)において老化細胞が経時的な蓄積するかを検討した。老化細胞の検出には SA-β-gal 染色を用い、免疫染色にて老化関連遺伝子である p21、p16、BubR1 の検出をおこなったが、先行論文と異なり、8週齢の時点ですでにラセン神経節細胞に明らかな SA-β-gal 陽性細胞の蓄積が確認され、それは6月齢でも不変であった。p21、p16、BubR1 は8週齢ではラセン神経節細胞、外有毛細胞、内有毛細胞、血管条細胞を含めコルチ器内で明らかな陽性は検出されず、6月齢でも不変であった。

#### 《 SAMP8 マウスにおけるセノリティック薬を用いた内耳老化細胞除去》

オスの6月齢の SAMP8/TaSlc マウスに、薬剤投与群ではダサチニブ(20mg/kg)+ケルセチン(200 mg/kg)、コントロール群には同量の水(薬剤投与群における薬剤希釈のための DMSO を含む)を連日経口投与した。薬剤投与群では2日目より著明な活動低下と10%程度の体重減少を認め、投与量を調整し、ダサチニブを半量(10mg/kg)とすると投与群に体重減少はみられなかったため、この量で聴力改善がみられるかを ABR にて評価したところ、1か月後コントロール群と有意な聴力の差を認めなかった。

本研究で行う予定であった老化細胞除去マウスを用いた聴力改善の検討については、以上の結果から細胞老化が老化に伴う難聴の進行に寄与している可能性が低いと考えられたため、実験の施行に至らなかった。

本研究の結果から、少なくとも当研究では細胞老化と加齢性難聴の進行との直接の因果関係があることは見いだせなかった。若年であってラセン神経節細胞に老化細胞が見られたことは、細胞老化が聴覚に及ぼす影響を改めて見直す必要性を示唆している。一般的には老化細胞は加齢とともに増加し各臓器において加齢性疾患の発症の原因となることが知られており、老化細胞の除去で疾患の改善が認められるという報告が多くあるが、有糸分裂後の細胞での細胞老化が組織や機能に及ぼす影響はいまだ未解明である。有糸分裂後の細胞が大部分を占める組織では、細胞の完全性の維持が進化的に有利であり、有糸分裂後の細胞老化はストレスによる組織の変性を防ぎ、組織の修復を促進する方向に働くという報告があり(Przemyslaw et al, Trends Cell Biol.2018) ラセン神経節細胞の早期の細胞老化は組織の恒常性維持に寄与している可能性がある。今後のさらなる研究で、ラセン神経節細胞を含めた内耳の早期の細胞老化の機能と、細胞老化が聴覚に与える影響を明らかにすることが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------