

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02672

研究課題名(和文) Nox3由来ROSによる難聴(加齢、騒音、薬剤、突発性)の発症機序解明とその先へ

研究課題名(英文) Elucidation of acquired SNHL mechanism caused from Nox3-derived ROS and beyond

研究代表者

上山 健彦 (Ueyama, Takehiko)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：80346254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：1. 独自開発したNox3発現細胞がtdTomatoで標識されるマウスを用い、蝸牛コルチ器でのNox3発現を発見、Nox3発現細胞として内・外有毛細胞と支持細胞を特定した。2. Nox3発現細胞数が、加齢、聴毒性で有名なシスプラチンや騒音により誘導される事、Nox3が発現誘導された外有毛細胞は、アポトーシスに陥り難聴の原因となる事を見出した。3. 開発したNox3-KOマウスを用いた加齢、シスプラチン及び騒音感音難聴のモデルにおいて、Nox3のKOが聴覚温存に繋がる事を明らかにした。4. Nox3のプロモーター活性を発光により測定できる安定細胞株を確立、ヒト聴力に関する臨床研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Nox3由来のROSの抑制や消去により、後天性感音難聴の発症を抑制することが出来ることを明らかにした。本研究は、世界初の後天性感音難聴の治療薬の開発に発展していく可能性を秘めている。また、感音難聴の治療薬・法の開発により、難聴患者の医学的側面のみならず、難聴が誘発する認知症により生じる社会全体としての介護負担の改善、難聴(特に言語発達段階の難聴や高齢者の難聴)により生じる社会としての労働力や生産性の低下を改善できる可能性があり、活力のある日本社会の再生・持続に一翼を担えると考えている。

研究成果の概要(英文)：1. Our engineered mice, in which Nox3 expressing cells are labeled with tdTomato fluorescence, were employed to uncover Nox3 expression in the cochlea, identifying inner and outer hair cells as well as supporting cells as Nox3-expressing cells. 2. It was observed that the number of Nox3-expressing cells, induced by aging, as well as a famous ototoxic agent (cisplatin) and noise, lead to apoptosis in outer hair cells with induced Nox3 expression, thus elucidating its role in causing hearing impairment. 3. Employing Nox3-KO mice engineered in this study, it was elucidated that deletion of Nox3 in models of aging, cisplatin-induced ototoxicity, and noise-induced hearing loss leads to auditory preservation. 4. Stable cell lines capable of measuring Nox3 promoter activity through luminescence were established, initiating clinical research pertaining to human auditory function.

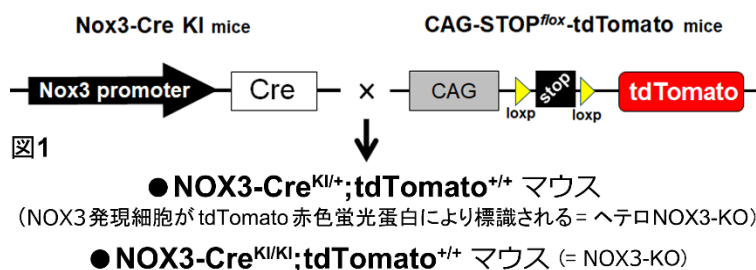
研究分野：薬理学、神経科学、生化学

キーワード：後天性感音難聴 活性酸素 ROS

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性酸素産生酵素である NADPH oxidase 3 (Nox3) は、内耳特異的に発現し、耳石形成による平衡覚維持に必須の役割に加え、難聴発生に関与するとの報告もあるが、内耳での Nox3 の発現部位や細胞は不明である。難聴は、65 歳以上の約 1/3 (75~79 歳では約 7 割) が加齢 (老人) 性難聴に罹患しており、感覚神経障害中最頻の疾患である (世界人口の約 5% が何らかの聴覚障害を抱えている) が、根本的薬物治療法がない難病である。2019 年には WHO より、「12~35 歳の若者の約半数 (11 億人) がスマートフォン等による大音量の過剰な暴露によって、騒音性難聴のリスクに晒されている」、「難聴が高齢者の社会的孤立や認知症発症の要因であり、【難聴管理】は認知症予防 12 項目の 1 つ」との提言をするに至り、難聴対策は本邦のみならず人類にとっての喫緊の課題となっている。このような科学・社会的状況を踏まえ、申請者は、内耳、更には、全身での Nox3 発現細胞や機能を探るため、tdTomato 赤色蛍光を指標に Nox3 発現細胞を特定できるマウス (Nox3-Cre^{KI};tdTomato^{+/+}: 図 1) を、幾度の失敗を乗り越え、漸く完成した。



2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の独自作製マウスを用い、内耳 (蝸牛、前庭、半規管) における Nox3 発現細胞 (即ち、reactive oxygen species (ROS) 産生源) を明らかにし、更に、其々の発現部位での Nox3 の役割を解明し、世界初の難聴治療薬・法開発に繋げようというものである。

3. 研究の方法

A. Nox3-Cre^{KI};tdTomato^{+/+}マウスを用いた蝸牛での Nox3 発現細胞の特定

Nox3 発現細胞が tdTomato 赤色蛍光で標識される前述マウス (図 1) を用い、蛍光実体顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡下で、耳石形成に必須の Nox3 由来 ROS 発生源細胞と難聴の発症に関与する蝸牛内での Nox3 発現細胞を特定する。

B. 加齢(老人)性難聴における Nox3 の役割解明

野生型と Nox3-knockout (KO) マウスの聴力 (聴性脳幹反応 [ABR] により) と蝸牛コルチ器内の tdTomato 陽性細胞数を、経時的 (1, 2, 4, 6, 12 か月齢) に計測することで、Nox3 発現程度と難聴との相関を明らかにする。

C. シスプラチン(CDDP)による難聴の発症機序解明

蝸牛コルチ器内の tdTomato 陽性細胞数が、ROS を介した聴毒性で有名な抗癌剤シスプラチン (CDDP) 投与によりどう変化するかを、2 か月齢 Nox3-KO) マウス用いて調べる。

D. 騒音性難聴における Nox3 の役割解明

2 か月齢の野生型と Nox3-KO マウスに音響暴露 (110 dB, 2 時間) 負荷を行い、1 週間後に

ABRで聴力測定後、蝸牛コルチ器における tdTomato 陽性細胞数を計測、Nox3 発現と騒音性難聴の相関について解析する。

E. Nox3 発現とその制御機構の解明（プロモーター解析）

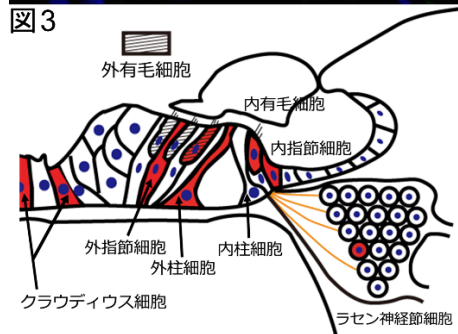
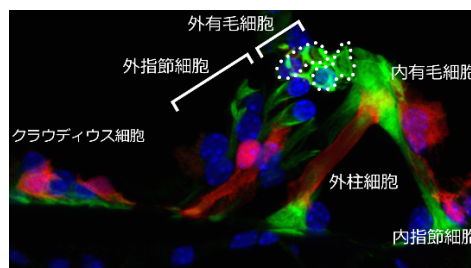
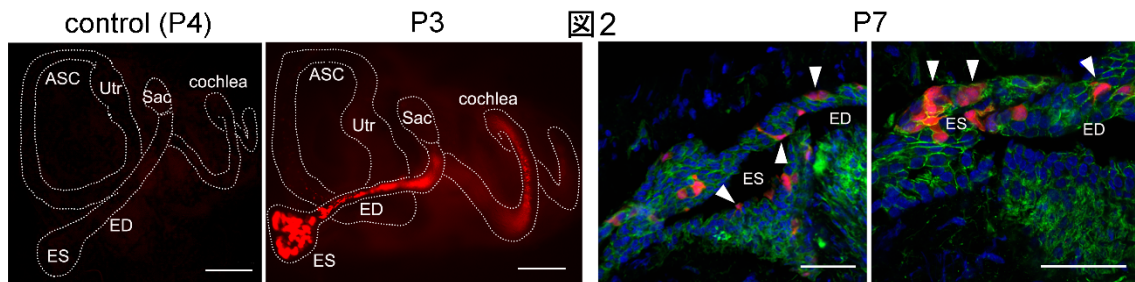
Nox3(マウスとヒト)の翻訳開始部位から上流 10 kb を Dual-Luciferase reporter assay system のプラスミドにクローニングし、CDDP によるプロモーター活性の上昇により、Nox3 の転写制御に必要な最小ユニットを見出す。更に、このユニットを発現する安定細胞株を作製する。

F. ヒトにおける 聴覚【左右差】の臨床研究での検証（年代別）

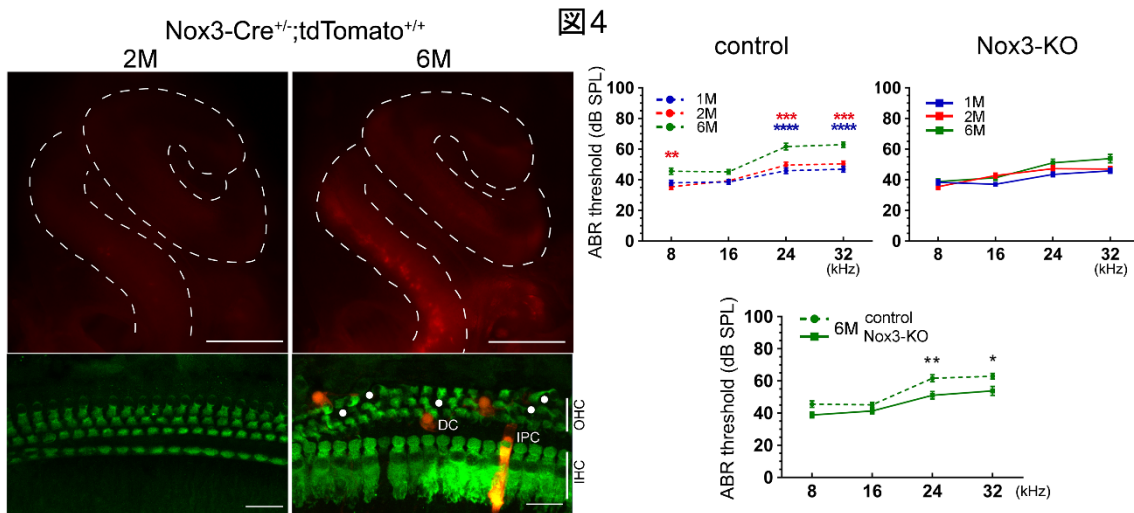
青年（18-39 歳）、壮年（40-50 歳）、中高年（51-64 歳）、高齢者（65 歳以上）の 4 群分け、左右の聴力をオージオグラムで測定し、ヒトでの 聴覚【左右差】の存在を明らかにする臨床研究を行う。

4. 研究成果

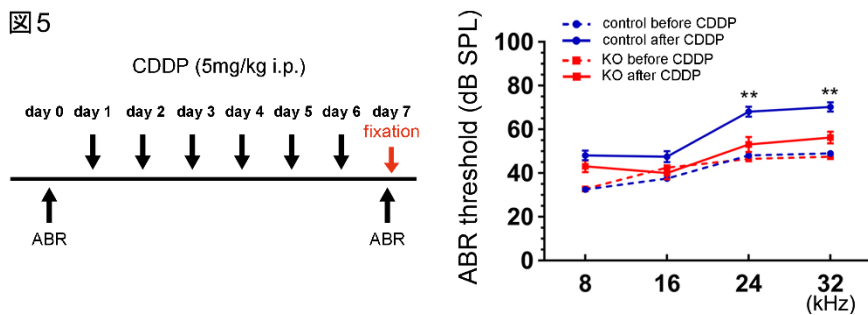
A. Nox3 発現細胞が tdTomato 赤色蛍光で標識される独自開発マウス（図 1）を用い、耳石形成に必須の Nox3 由来 ROS 発生源細胞として、内リンパ嚢・内リンパ管の管腔に面した上皮細胞を特定した（図 2）。驚くべきことに、Nox3 が一次聴覚感受器官である蝸牛コルチ器に発現することを発見し、Nox3 発現細胞として、**内・外有毛細胞**とその周囲に存在し有毛細胞を機能・構造的に支える種々の支持細胞（**内・外指節細胞**、**外柱細胞**、**クラウディウス細胞**）を特定した（図 3）。



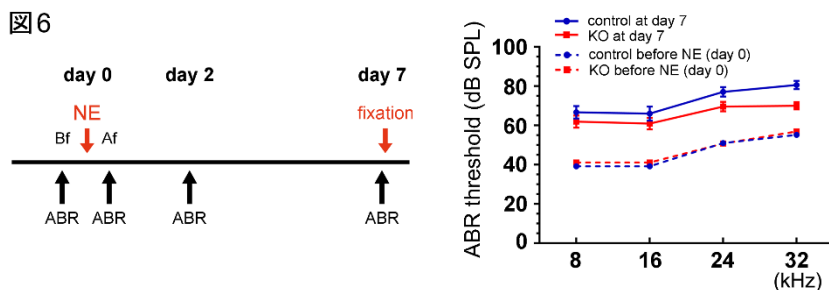
B. Nox3 発現 (tdTomato 陽性) 細胞数が、加齢と共に上昇する事を発見した。Nox3-KO マウスでは、野生型に比し加齢性難聴に成り難い (6 か月齢以上) ことを明らかにした (図 4)。



C. Nox3 の発現は、ROS を介した聴毒性で有名な抗癌剤 CDDP により顕著に上昇し、2 か月齢 Nox3-KO マウスでは、野生型に比し CDDP による難聴を発症し難いとの結果を得た (図 5)。更に、6 か月齢マウスを用いた実験で、加齢によりコルチ器に存在する Nox3 発現細胞数が増加するので、CDDP による野生型と Nox3-KO マウス間の聴力増悪程度差が縮小するとの結果を得た。



D. 2 か月齢マウスを用いた騒音障害モデルにおいても Nox3 発現が上昇し、Nox3-KO マウスでは、野生型に比し騒音性難聴を発症し難いことが解った (図 6)。



以上の結果より、

- 1) CDDP、加齢、騒音性難聴における Nox3 関与の程度は、CDDP 難聴 ≧ 加齢性難聴 > 騒音性難聴であることが解った。
- 2) Nox3-Cre^{KI/KI};tdTomato^{+/+} (= Nox3-KO) と Nox3-Cre^{KI/+};tdTomato^{+/+} (= ヘテロ Nox3-KO: 活性酸素産生能は野生型とほぼ同等) を用いた実験により、ROS の感受性は外有毛細胞が最も

高く、Nox3 の発現・発現誘導により、直ちに細胞死に至ることが解った（一方で、内毛細胞や支持細胞は ROS に対しある程度抵抗性があることが解った）。このことは、ROS による難聴の標的は、外毛細胞であることが明らかとなった。

E. Nox3 のプロモーター（マウスとヒト）解析を行った。Nox3 の翻訳開始部位から上流 2.5 kb, 1.0 kb, 0.5 kb をクローニングしたプラスミドを一過性に発現させ、聴毒性のある CDDP 処置を行い Dual-Luciferase reporter assay system を用い解析したところ、2.5 kb, 1.0 kb, 0.5 kb 間ではプロモーター活性に差がない事を突きとめた。この結果に基づき、2.5 kb の領域を安定発現する細胞株を樹立した。

F. 青年（18-39 歳）、壮年（40-50 歳）、中高年（51-64 歳）、高齢者（65 歳以上）の 4 群分け、左右の聴力をオーディオグラムで測定し、ヒトでの聴覚【左右差】の存在を明らかにする臨床研究を開始した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kim Bong Jik, Miyoshi Takushi, Chaudhry Taimur, Friedman Thomas B., Choi Byung Yoon, Ueyama Takehiko	4. 巻 101
2. 論文標題 Late onset hearing loss case associated with a heterozygous truncating variant of <sc><i>DIAPH1</i></sc>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 466 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.14115	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 Niki Yoko, Adachi Naoko, Fukata Masaki, Fukata Yuko, Oku Shinichiro, Makino-Okamura Chieko, Takeuchi Seiji, Wakamatsu Kazumasa, Ito Shosuke, Declercq Lieve, Yarosh Daniel B., Mammone Tomas, Nishigori Chikako, Saito Naoaki, Ueyama Takehiko	4. 巻 143
2. 論文標題 S-Palmitoylation of Tyrosinase at Cysteine500 Regulates Melanogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 327.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2022.08.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mohri Hiroaki, Ninoyu Yuzuru, Sakaguchi Hirofumi, Hirano Shigeru, Saito Naoaki, Ueyama Takehiko	4. 巻 41
2. 論文標題 Nox3-Derived Superoxide in Cochleae Induces Sensorineural Hearing Loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4716 ~ 4731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2672-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirakawa Haruki, Taguchi Kei, Murakawa Seiya, Asano Masaya, Noguchi Soma, Kikkawa Satoshi, Harada Kana, Adachi Naoko, Ueyama Takehiko, Hide Izumi, Tanaka Shigeru, Sakai Norio	4. 巻 148
2. 論文標題 Effects of flurbiprofen on the functional regulation of serotonin transporter and its misfolded mutant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 187 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.11.006	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 -

1. 著者名 Nakamura Takashi, Sakaguchi Hirofumi, Mohri Hiroaki, Ninoyu Yuzuru, Goto Akihiro, Yamaguchi Taro, Hishikawa Yoshitaka, Matsuda Michiyuki, Saito Naoaki, Ueyama Takehiko	4. 巻 101
2. 論文標題 Dispensable role of Rac1 and Rac3 after cochlear hair cell specification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 843 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00109-023-02317-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurasawa Shunkou, Mohri Hiroaki, Tabuchi Keiji, Ueyama Takehiko	4. 巻 186
2. 論文標題 Loss of synaptic ribbons is an early cause in ROS-induced acquired sensorineural hearing loss	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 106280 ~ 106280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2023.106280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaizuka Takeshi, Suzuki Takehiro, Kishi Noriyuki, Tamada Kota, Kilimann Manfred W., Ueyama Takehiko, Watanabe Masahiko, Shimogori Tomomi, Okano Hideyuki, Dohmae Naoshi, Takumi Toru	4. 巻 15
2. 論文標題 Remodeling of the postsynaptic proteome in male mice and marmosets during synapse development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2496-2496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-46529-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 Acquired hearing loss induced by ROS and challenges for therapy development based on its mechanism
3. 学会等名 日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 Sensorineural hearing loss: challenges for therapy development based on its mechanisms
3. 学会等名 第8回ニューロサイエンスネットワークシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上山健彦
2. 発表標題 アクチン細胞骨格異常が関与する感音難聴の発症機序～Rho-family small GTPasesに注目
3. 学会等名 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 毛利宏明、上山健彦
2. 発表標題 NOX由来ROSによる後天性感音難聴の発症機序（標的）と治療法開発戦略
3. 学会等名 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔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	坂口 博史 (Sakaguchi Hirofumi) (00515223)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・研究員 (14501)	

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	足立 直子 (Adachi Naoko) (70604510)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教 (14501)	
研究 分 担 者	中村 高志 (Nakamura Takashi) (80724179)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (24303)	

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			
韓国	Seoul National University			
米国	NIDCD, NIH			
ドイツ	Max Planck Institute			