

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791606

研究課題名（和文） 老人性難聴モデルにおける凝集体形成の研究と分子シャペロンに着目した治療戦略の確立

研究課題名（英文） Study about the role of aggregations in age related hearing loss model from the view of molecular chaperon

研究代表者

御厨 剛史 (MIKURIYA TAKEFUMI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00467797

研究成果の概要（和文）：

若年マウス内耳蝸牛のらせん神経節細胞において凝集体形成を認めた。加齢ストレスでこの凝集体は増加した。早期進行性難聴モデルマウスでは障害の部位に応じて凝集体の形成を強く認めた。このマウスに熱ショック応答誘導剤を投与し難聴の進行を抑制できたが、凝集体形成が促進されていた。以上から内耳凝集体は内耳保護に関連していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We showed that the relation between formation of aggregation and HSP upregulation and demonstrate the possibility that increase of aggregation may a protective role in spiral ganglion cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：凝集体、老人性難聴、内耳保護、熱ショック応答

1. 研究開始当初の背景

老人性難聴は、これからの超高齢化社会においてQOLを著しく損なう頻度の高い感覚器疾患である。これまで内耳の老化メカニズムの解明、治療法の確立のための研究は他の領域と同様に様々に行われてきてはいるが、いまだ確立された段階のものはない。これまで本研究者はあらゆる細胞が有する根幹的なストレス応答「熱ショック応答」に着目して

内耳保護研究を行ってきた。熱ショック応答は熱ショック蛋白質（HSP）を誘導する応答である。その主な働きである細胞の品質管理（分子シャペロン機能）は強力で、有名な難治性神経筋変性進行性疾患であるALS：筋萎縮性側索硬化症（Kieran et al., Nature Medicine. 2004）やハンチントン病（Fujimoto, et al., Journal of Biological Chemistry 2005）に対しての保護効果が報告

されるなど、患者にとっては治療への道が開くきっかけのひとつである。

老人性難聴も神経変性疾患の一面をもつと考えられるが、本研究者は老人性難聴モデルマウスを用いた研究で、対照の聴力正常マウスでは内耳 HSP が減弱しないのに、モデルマウスでは HSP が低下し、熱ショック応答誘導剤を投与することで HSP が誘導され難聴と神経細胞死を抑制したことを発見した (Mikuriya, et al., Brain Research, 2008)。しかしこの報告では、HSP の機能のうちのどの部分が保護的に働いたかは明らかにできていなかった。本研究者の進行中の研究で、老人性難聴モデルマウスの内耳らせん神経節細胞に凝集体が形成されていることを発見した。凝集体は、異常な蛋白質の集まりで、その形成段階で細胞毒性を発揮する。この毒性を軽減、分解時に HSP のシャペロン機能が大いに働くので、凝集体とともに HSP が強く染色されることが知られている (Parsell, et al., Nature, 1994)。この凝集体は、先述の ALS や、ハンチントン病、他にはアルツハイマー病などさまざまな進行性変性疾患の病因として有名であるが、内耳疾患と凝集体の関連の報告は皆無である。もし、老人性難聴モデルでの凝集体形成が老人性難聴の主病因の一つであれば、他の神経変性疾患と同様の分子シャペロンを利用した治療戦略が内耳にも適応できると考えられる。

2. 研究の目的

内耳の老化における凝集体の毒性とその役割を解明する。凝集体に対する治療戦略として分子シャペロンに着目し、老人性難聴の治療を目指す。

3. 研究の方法

若年齢のマウスに凝集体が存在するかどうか、加齢で凝集体が内耳に増加するかどうか、老人性難聴モデルの中で早期発症と遅発性のもので違いがあるかどうかを検討した。また早期発症モデルマウスに熱ショック応答誘導剤を投与し、障害の抑制と凝集体の形成の程度に関連を検討し、蝸牛での凝集体の役割を検討した。

実験マウス：C57BL/6 (遅発性老人性難聴モデル)、DBA/2j (早期発症モデル) を用いた。

聴力測定には聴性脳幹反応を施行した。ネブタール深麻酔下に行い 2k, 4k, 8kHz の周波数を測定し閾値を検出した。

内耳 HSP 発現の評価には western blotting 法を行った。1 次抗体には Hsp110, Hsp90,

Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp27, Hsfl, β -actin に対する抗体を用い半定量を行った。

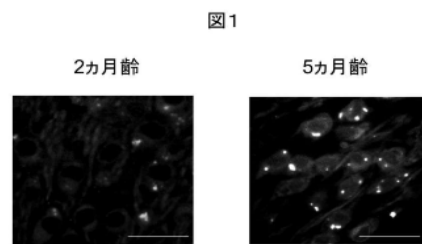
免疫蛍光組織化学を行うため、深麻酔下に断頭したマウスの全蝸牛を取り出し、whole mount 法で染色を行った。1 次抗体には Hsp70 の抗体を用い、蛍光染色した。

凝集体の定量・局在の評価には Hsp70 の 1 次抗体で免疫組織化学を行い検討した。凝集体は蛍光顕微鏡で観察し高輝度の点を凝集体とした。細胞 1 個あたりの凝集体数をカウントし、単位面積あたりの平均凝集体数を算出した。

熱ショック応答の誘導には熱ショック応答誘導剤であるグラニルグラニルアセトン (GGA) を用いた。この薬剤を 0.5% 濃度 (約 600mg/kg/日に相当) 含有した餌または 0% 濃度の餌を 4 週齢から自由摂取させた。

4. 研究成果

早期進行性老人性難聴モデルである DBA/2j マウスは、C57BL/6 (遅発性老人性難聴モデル) と比較し 4 週齢から難聴の進行を認め 20 週齢の段階では中～高音域は無反応に近い状態になった。C57BL/6 は加齢と共に Hsp70 と凝集体がらせん神経節細胞質に増加した。一方 DBA/2j は 20 週齢で著明ならせん神経節細胞の消失を認め Hsp70 は増加していなかった。凝集体は残存する神経節細胞すべてに認め、細胞 1 個あたりの凝集体数は C57BL/6 と比較し増加した (図 1)。

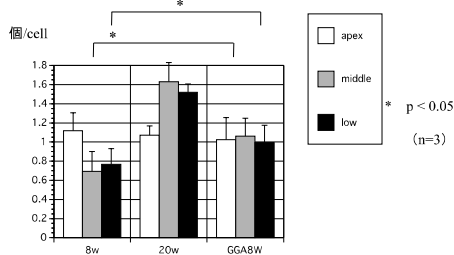


DBA/2J のらせん神経節の Hsp70 の免疫染色。高輝度の点が凝集体である。Bar = 25 μ m

内耳の加齢において Hsp70 発現が増加、凝集体が増加、障害の強い DBA/2j では Hsp70 発現が少なく凝集体形成が多いことがわかった。この DBA/2j に GGA を投与したところ、難聴の進行の抑制を認めた。8 週齢のらせん神経節細胞には対照の DBA/2j と比較し、蝸牛の middle、low の回転 (障害の強い部位)

において Hsp70 と凝集体の増加を認めた (図 2)。

図2:DBA/2j らせん神経節 凝集体平均数



GGA 投与による熱ショック応答誘導は過去に報告したモルモット音響障害モデルに対する保護効果と同様、マウスの加齢性進行性難聴モデルに対しても保護効果をもつことがわかった。GGA 投与群での 8 週齢時の凝集体が増加したことで、聴力の保護効果を併せて考えると、らせん神経節における凝集体形成は保護の方向で働いている可能性が示唆された。Hsp70 は凝集体形成を調節しているが、GGA 投与により誘導された Hsp70 などが凝集体形成を通じて保護する可能性が示唆された。神経変性疾患では凝集体はキーワードであるが、内耳の神経保護機構にも凝集体が関連している可能性と、新たな内耳障害の治療戦略の一つになる可能性を本研究で示したと考えた。

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 3 件)

① Tetsuya Nakamoto, Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Tomoko Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Ryosuke Takii, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita. Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. *Auris Nasus Larynx*, 査読有り, 39, 2012, 270-274

② 金川英寿、菅原一真、豊田英樹、御厨剛史、下郡博明、山下裕司. モルモット内毛細胞のシナプス評価法の確立. *頭頸部自律神経*, 査読無し, 26, 2012, 81-83

③ 御厨剛史. 熱ショック蛋白質誘導剤 (ゲラニルゲラニルアセトン) を用いた老人性難聴モデルマウスの難聴進行の抑制. *山口医学*, 査読無し, 59, 2010, 153-160

[学会発表] (計 7 件)

① Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Eijyu Kanagawa, Syuuhei Yoshida, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita. Relation between formation of aggregations and upregulation of heat shock protein in animal models. 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, 2012. 2. 25, San Diego, USA

② 御厨剛史, 菅原一真, 金川英寿, 津田潤子, 下郡博明, 山下裕司: 熱ショック応答と蝸牛内凝集体形成についての関連についての検討 第 56 回 日本聴覚医学会総会・学術講演会 2011. 10. 27 福岡 アクロス福岡

③ Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Eijyu Kanagawa, Syuuhei Yoshida, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita. Incase of Aggregations after noise injury in guinea pig. 34th association for reseach in otolaryngology, 2011. 2. 19, Baltimore, USA

④ 御厨剛史, 菅原一真, 金川英寿, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司: 音響ストレス下での蝸牛内凝集体形成についての検討 第 55 回 日本聴覚医学会総会・学術講演会 2010. 11. 11 奈良 奈良県新公会堂

⑤ 御厨剛史: 熱ショック蛋白質誘導剤 (ゲ

ラニルゲラニルアセトン) を用いた老人性難聴モデルマウスの難聴進行の抑制 第 114 回 山口大学医学会学術講演会 2010. 7. 17 宇部 山口大学

⑥ 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 山下裕司. 進行性難聴モデルの蝸牛内凝集体についての検討, 第 4 回 聴覚アンチエイジング研究会 2010. 7. 2 東京 慶應義塾大学病院

⑦ 御厨剛史, 菅原一真, 下郡博明, 山下裕司. 内耳熱ショック蛋白質と凝集体についての検討 第 111 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2010. 5. 20 仙台 仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御厨 剛史 (MIKURIYA TAKEFUMI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 00467797