

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390393

研究課題名(和文) 老人性難聴の発症に影響する遺伝子群および遺伝外因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of genetic and environmental factors associated with the development of age-related hearing loss

研究代表者

山岨 達也 (YAMASOBA, TATSUYA)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60251302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：数種の遺伝子改変マウスを用いて特に酸化ストレスと老化による蝸牛の変性・老人性難聴の進行について解析した。スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は細胞内に発生したスーパーオキシドアニオン(活性酸素)を分解する酵素である。MnSODのヘテロマウスでは蝸牛内の老化に伴う酸化ストレスは増悪するが、15カ月齢まで血管系、有毛細胞、ラセン神経節細胞の変性や難聴の加速は見られなかった。Glutathione Reductase(GR)は酸化型グルタチオンを還元型にする反応を触媒するが、GRのノックアウトマウスでは蝸牛の発生・発達に影響は無いが、高音域の難聴が増悪することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the association of oxidative stress and age-related hearing loss (AHL) using several transgenic mice in which the oxidative stress is enhanced or suppressed. We first examined whether reduction in manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) accelerated AHL. At 16 months, immunoreactivity of 8-hydroxydeoxyguanosine was significantly greater in Mn-SOD heterozygous knockout (HET) mice compared to WT mice, but that of 4-hydroxynonenal did not differ between them. Age-related ABR threshold shifts and the extent of cochlear degeneration did not differ between WT and HET mice, suggesting that decrease of Mn-SOD by half increases oxidative stress in the cochlea to some extent but does not accelerate AHL. In contrast, glutathione reductase knockout mice exhibited acceleration of ABR threshold shifts at high frequencies, suggesting that oxidization of glutathione is crucial in the development of AHL.

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

キーワード：.老化 蝸牛 ミトコンドリア 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

65歳以上の25-40%、75歳以上の40-66%、85歳以上の80%以上が老人性難聴に罹患すると推定される。聴力障害は高齢者のQOLや社会活動に大きく影響するため、その予防法の確立が急務であるが、老人性難聴の研究は少なく、発症機序には不明な点が多い。

老化の原因にはいくつかの説があるが、酸化ストレス説とミトコンドリア機能障害説の二つが主に考えられている。蝸牛では加齢に伴って酸化ストレスが増加し、内在性 free radical scavenger の superoxide dismutase (SOD) が減少する事、Cu/Zn SOD の欠失マウスで加齢による難聴が加速して進行することが報告されている。我々は C57BL/6 マウスの蝸牛内では酸化ストレスによる DNA damage が増加する事、内在性 free radical scavenger の一つである catalase を過剰発現した mCAT マウスでは老人性難聴が抑えられる事、ミトコンドリア内の free radical に対する scavenger を投与すると C57BL/6 マウスの老人性難聴が予防できる事などを報告している。ミトコンドリアの障害については、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の老化に特徴的な欠失 (common deletion) が老人性難聴の側頭骨で増加する事、ラットでも common deletion が老化蝸牛で増加し、酸化ストレスと相関する事が報告されている。我々は mtDNA の変異が蓄積するマウス (POLG マウス) を作成し、若年齢から蝸牛の apoptosis により難聴を来すことを報告した。またカロリー制限により C57BL/6 マウス蝸牛でのミトコンドリア機能低下が抑制されて老人性難聴が抑えられる事、酸化ストレスによる *Bak* 発現亢進が apoptosis を引き起こして老人性難聴が生じる事を見出している。

しかしながら老人性難聴の発症機序についてはまだ未知の部分が多く、モデル動物などを駆使して解明していく必要がある。

2. 研究の目的

マウスにおける老人性難聴の発症機序を明らかにし、ヒトにおける老人性難聴の予防方法に提唱することを目的とする。特に酸化ストレスとミトコンドリア障害の関係など老人性難聴発症機序の本質について、遺伝子改変マウスを多用して明らかにする。またマウス蝸牛において老人性難聴により発現変化する遺伝子群、カロリー制限や遺伝子修飾で変化する遺伝子群も調べる。また騒音暴露など遺伝外因子による老人性難聴の影響について調べる。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスにおける酸化ストレスとミトコンドリア障害の関係など老人性難聴発症におけるシグナル伝達の詳細な機序を調べた。MnSOD heterogenous knockout mouse (HET)、glutathione reductase KO (GRKO) マウスを用いて検討し、HET マウスでは音響暴露に対する易受傷性の亢進についても検討した。

聴力の測定は ABR により行う。実験開始前に ABR 閾値を測定し、研究室の正常範囲から外れる動物は実験から除く。測定は希釈したケタミン・キシラジンの麻酔下に行い、刺激音はトーンバースト (4, 8, 16kHz) で 5dB おきに測定した。

蝸牛障害の組織判定と免疫染色はパラフィン切片で行い、apoptosis については caspase に対する免疫染色と TUNEL 法を、酸化ストレスについては 8-hydroxy deoxyguanosine、4-hydroxynonenal に対する免疫染色で調べた。

音響外傷はノイズボックス (リオン社製) を用い、覚醒状態でノイズボックス内の金網に入れ、オクターブバンドノイズ に暴露した。

蝸牛の遺伝子解析は既報 (Someya S et al.

PNAS 2009)のようにマウスを頸椎脱臼して蝸牛組織を氷の上で手術用顕微鏡下に素早く摘出し、液体窒素で凍結、-80 冷凍室で保管、total RNAの抽出はTRIZOL法で行った。

また遺伝子改変動物や老化による蝸牛内のミトコンドリア機能の変化を評価する方法の確立を目指し、マウス蝸牛培養および細胞株を用い、Extracellular Flux Analyzer (EFA)による酸素消費速度や細胞外酸性化速度測定を行った。また膜電位感受性色素 tetramethyl rhodamine ethyl ester (TMRE)を用い、共焦点レーザー顕微鏡下で、ミトコンドリア膜電位を蛍光強度測定する実験系の確立を目指した。

4. 研究成果

Glutathione Reductase のノックアウトマウス (GRKO) は2カ月齢では野生型との比較で ABR 閾値の差や組織の差は無く、蝸牛の発生・発達に Glutathione Reductase 欠損の影響は無いことが判明した。カロリー制限による老人性難聴の抑制効果は野生型では15ヶ月まで認められているが、GRKOマウスでは明らかではない。また通常食摂取では高周波数において GRKOマウスで難聴が加速する結果が出ている。このことは Glutathione reductase の老人性難聴抑制における重要な役割を示唆しており、現在 DNA マイクロアレイにより、関係するシグナル系の動きにつき解析中である。

Manganese SODのヘテロマウス (HET) は15ヶ月齢では野生型より蝸牛内の8-hydroxydeoxyguanosineの発現が増加したが、蝸牛内4-hydroxynonenal発現、ABR閾値、血管条、有毛細胞、ラセン神経節の組織変性にHETと野生型マウスの間に明らかな差はなかった。MnSOD半減によって蝸牛内酸化ストレスは軽度上昇するものの老人性難聴は進行しないことが判明した。なお音響暴露ではHET

マウスでABR閾値上昇が得られる傾向にあったが、結果は安定せず、継続中である。このほか、タウリントランスポーター欠損マウス等、いくつかの遺伝子改変動物について老化による難聴進行を計測中である。

蝸牛のミトコンドリア機能測定はpilot studyとしてSCC9細胞株を用い、レチノイン酸投与によるミトコンドリア機能障害の測定がEFAにより正確にできることを確認した。蝸牛培養細胞を用いた解析は全細胞では可能であり、有毛細胞sortingのため、有毛細胞をGFPでマーキングする手法を試み、ほぼ確立できている。また蝸牛培養組織全体を共焦点レーザー顕微鏡下で観察したところ、培養液にゲンタマシンを加えると蝸牛上皮の酸素消費速度が障害されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計15件)

Kinoshita M, Sakamoto T, Kashio A, Shimizu T, Yamasoba T. Age-related hearing loss in Mn-SOD heterozygous knockout mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 査読有、ID325702, 2013, 1-12

DOI: 10.1155/2013/325702

Iwasaki S, Yamasoba T. Dizziness in the elderly: aging of the peripheral vestibular system. *Aging & disease*. 査読有. 2014

Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hearing Research*. 査読有. 303, 2013, 30-38

DOI: 10.1016/j.heares

Kakigi A, Takubo Y, Egami N, Kashio A, Ushio M, Sakamoto T, Yamashita S, Yamasoba T. Evaluation of the internal structure of normal and pathological guinea pig cochleae using optical coherence tomography. *Audiology and Neurotology*. 査読有. 18, 2013, 335-343

DOI: 10.1159/000.54620

Jin Y, Kondo K, Ushio M, Kaga K, Ryan AF, Yamasoba T. Developmental changes in the responsiveness of rat spiral ganglion neurons to neurotrophic

factors in dissociated culture: differential responses for survival, neuritogenesis and neuronal morphology. *Cell Tissue Res.* 査読有 . 351, 2013, 15-27
DOI: 10.107/s00441-012-1526-1
山嵜達也 . 加齢に伴う聴覚障害 . *Audiology Japan.* 査読有 . 57, 2014, 52-62
Matsumoto Y, Nomoto T, Toh K, Cabral H, Murakami M, Christie RJ, Kim HJ, Ogura T, Miyata K, Nishiyama N, Yamasoba T, Kataoka K. Intravital Real-Time Confocal Laser Scanning Microscopy for the In Situ Evaluation of Nanocarriers. *Cancer Targeted Drug Delivery.* 査読有 . 2013, 607-620
Kashio A, Sakamoto T, Kakigi A, Suzuki M, Suzukawa K, Kondo K, Sato Y, Aosh S, Ohta S, Yamasoba T. Topical application of the antiapoptotic TAT-FNK protein prevents aminoglycoside-induced ototoxicity. *Gene Ther.* 査読有 .19, 2012, 1141-1149
DOI: 10.1038/gt.2011.204
Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, Yamasoba T. Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *J Control Release.* 査読有 . 157, 2012, 112-117
DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.026
山嵜達也 .老人性難聴 .*JOHNS.* 査読無 . 28, 2012, 113-119
Yamasoba T, Miller JM, Ulfendal M. Altschuler RA. *Frontier in the treatment of hearing loss.* Springer Handbook of Auditory Research 査読有 . 40(4), 2012, 339-367
DOI: 10.1007/978-1-4419-9523-0_14
山嵜達也 .ミトコンドリア遺伝子異常と内耳障害 .*耳鼻咽喉科臨床* .査読有 .104 , 2011 , 533-540
山嵜達也 .私の処方箋 老人性難聴 . *JOHNS* 査読無 27 , 2011 , 1354-1356
Lin Y, Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Kakigi A, Yamasoba T . Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs *Neurosci Lett* 査読有 .487 ,2011 , 12-6
DOI: 10.1016/j.neulet.2010.09.064
Nakajima T, Yasuda T, Sato Y, Morita T, Yamasoba T . Effects of Exercise and Anti-Aging . *Anti-Aging* . 査読有 . 8 , 2011 , 92-102

[学会発表](計14件)

Matsumoto Y, Kataoka K, Yamasoba T. Intravital Imaging of Drug Delivery

Systems and Auditory Hair Cells. 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery 2013年12月5-7日 台北
柿本章伸、田久保勇也、江上直也、松本有、坂本幸土、山下真司、山嵜達也 . Optical Coherence Tomographyによる蝸牛内部構造のリアルタイム観察 . 第23回日本耳科学会 2013年11月24-26日 宮崎(シーガイアコンベンションセンター)
菅澤恵子、岩崎真一、牛尾宗貴、江上直也、藤本千里、木下淳、山嵜達也 . 当科における最近の高齢者めまい症例について . 第72回日本めまい平衡医学会 2013年11月13-15日 大阪(大阪国際交流センター)
山嵜達也 . 老人性難聴 -疫学、発症機序、予防対策- . 第3回北摂感覚器研究会(招待講演)2013年9月19日 大阪(アンシェルデ・マリアージュ)
山嵜達也 . 耳の老化とアンチエイジング:酸化ストレス、ミトコンドリア . 第22回日本耳科学会(招待講演)2012年10月4-6日 名古屋
木下淳 . 全身性 Mn-SOD ヘテロ欠損マウスにおける蝸牛の加齢性変化 . 第6回聴覚アンチエイジング研究会 2012年7月7日 東京
木下淳 . 全身性 Mn-SOD ヘテロ欠損マウスにおける蝸牛の加齢性変化 . 第12回日本抗加齢医学会 . 2012年6月22-24日 横浜
山嵜達也 . カロリー制限の老人性難聴予防効果 . 第12回日本抗加齢医学会(招待講演)2012年6月22-24日 横浜
山嵜達也 . 老人性難聴の疫学・発症機序・予防戦略 . 第19回 Auris Nasus Larynx 石川(ANLI)学術集会 . 2011年10月22日 石川
山嵜達也 . 老人性難聴:疫学、発症機序、予防戦略 . 第90回日本耳鼻咽喉科学会和歌山県地方部会、和歌山県耳鼻咽喉科医会総会および学術講演会 . 2011年7月3日 和歌山
山嵜達也 . 老人性難聴の発症機序(仮説) . 日本耳鼻咽喉科学会秋田県地方部会 2011年6月12日 秋田
山嵜達也 . 老人性難聴の予防戦略 . 第86回日本耳鼻咽喉科学会島根県地方部会総会・学術講演会 2011年4月3日 島根
Yamasoba T. Molecular mechanisms of age-related hearing loss: Lessons from mice . The 42nd Annual Congress of Korean Otologic Society Meeting . 2011年4月2日 Seoul, Korea
Yamasoba T. Age-related hearing loss in the clinic: Current status in Japan . The 42nd Annual Congress of Korean

Otologic Society Meeting . 2011 年 4
月 2 日 Seoul, Korea

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山嵜 達也 (YAMASOBA, Tatsuya)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 6 0 2 5 1 3 0 2

(2) 研究分担者

岩崎真一 (IWASAKI, Shin-ichi)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 1 0 3 5 9 6 0 6

吉川弥生 (KIKKAWA, Yayoi)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医

研究者番号: 0 0 4 5 2 3 5 0

坂本幸士 (SAKAMOTO, Takashi)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 5 0 3 2 3 5 4 8

榎尾明憲 (KASHIO, Akinori)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 2 0 4 5 1 8 0 9

安井拓也 (YASUI, Takuya)

帝京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 5 0 5 1 1 4 6 6

(3) 連携研究者

Tomas A Prolla

ウィスコンシン大学・医学部・教授

研究者番号: なし

染谷慎一 (SOMEYA, Shin-ichi)

フロリダ大学・老化研究所・准教授

研究者番号: 5 0 5 5 4 4 9 0