

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592479

研究課題名(和文) 神経堤細胞の制御遺伝子を標的にした加齢性難聴発症の予防・治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a preventive drug for age-related deafness targeting neural crest-related genes

研究代表者

曽根 三千彦 (SONE, MICHHIKO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30273238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ワーデンベルグ症候群など先天性難聴を伴う患者は、聴覚系に必須の色素細胞を先天的に欠損している為、予防・治療方法の確立は難しいとされてきた。本研究の結果により、先天的に色素細胞を欠損している遺伝子改変マウスの先天性難聴の症状を、ラセン神経節に発現する神経堤細胞制御分子EdnrBを標的に改善できる事が分かった。先天的に色素細胞を欠損している先天性難聴患者であっても、ラセン神経節のEDNRBを標的に予防・治療できる可能性が期待される。一方、EdnrBをラセン神経節に強制発現させたトランスジェニックマウスの加齢性難聴に対する耐性を検討したが、遺伝子背景の影響を受ける事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Preventive/cure methods for Waardenburg-Shah syndrome with congenital hearing loss has not developed yet due to congenital loss of intermediate cells (melanocytes) in inner ears. The congenital hearing loss involving neurodegeneration of spiral ganglion neurons (SGNs) in EdnrB(-/-)-mice were significantly restored by introducing an EdnrB transgene under control of the dopamine beta-hydroxylase promoter (DBH-EdnrB-Tg). The results of this study suggest EdnrB expressed in SGNs can be a novel target for a drug development of hearing losses. Meanwhile, the preventive effect of DBH-EdnrB-Tg expressed in SGNs on age-related deafness has been affected by genetic backgrounds. Further study will be needed to investigate the effect of DBH-EdnrB-Tg on age-related deafness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：加齢性難聴 内耳 ラセン神経節

## 1. 研究開始当初の背景

感音性難聴には、生まれた時より発症する先天性難聴、あるいは加齢性難聴、騒音性難聴などが含まれ、それらの発症の原因として、遺伝的要因あるいは騒音等の環境ストレスが関わっていると考えられているが、未だ不明な点が多い。ポータブルミュージックプレイヤーなどの普及に伴い、若者に限らず多くの人が大音量の環境に曝される機会が確実に増えている。このような環境ストレスは加齢性難聴の誘発し、その患者数は2015年には世界で数億人に達すると推計されている(Lancet 2007)。しかしながら、加齢性難聴の有効な予防方法はなく、加齢性難聴を治療することは現在のところ不可能である。このような状況から、加齢性難聴の症状を緩和させる、あるいはその進行を遅らせる抜本的な予防・治療方法の開発は急務である。一方、神経堤細胞の制御遺伝子、エンドセリン受容体B(EDNRB)はメラニン異常及び先天性難聴を伴うワーデンブルグ症候群の原因遺伝子の一つとして、内耳・血管条の中間細胞(色素細胞)の発達に関与している事が知られている。動物実験レベルでは、*Ednrb* 欠損マウス[*Ednrb*-KO(-/-)]は、色素異常及び先天性難聴であるワーデンブルグ症候群のモデル動物として報告されており、このマウスは巨大結腸症を発症し、生後約1か月で死亡する。また、*Ednrb*-KO(-/-)マウスの難聴の主な原因は血管条の色素細胞の欠損による内リンパ電位の乱れであると報告されている(Matsushima et al., Mamm Genome 2002)。我々の予備的検討によると、野生型マウスの内耳を用いた免疫組織染色により *Ednrb* タンパク質は血管条だけでなくラセン神経節にも発現している事が示唆されている。しかしながら、ラセン神経節に発現している *Ednrb* の役割は分かっていない。

## 2. 研究の目的

先天性・加齢性難聴予防の新たな標的分子として内耳の聴(ラセン)神経節の *Ednrb* を解析する為に、*Ednrb*-KO(-/-)マウス、*Ednrb*-KO(-/-)マウスにドーパミンβヒドロキシラーゼ(DBH)プロモーター下で *Ednrb* を神経系に強発現させた(*Ednrb*-KO(-/-);*DBH-Ednrb*-Tg)マウス等を用いて、内耳のラセン神経節の *Ednrb* の役割を解析した。また、野生型マウスに抗酸化能を有する化合物を経口投与し、加齢性難聴の予防効果を検討した。

## 3. 研究の方法

*Ednrb*-KO(-/-)マウスや *Ednrb*-KO(-/-);*DBH-Ednrb*-Tg マウスの聴力レベルは聴性脳幹反応(ABR)測定により評価した。H&E染色による蝸牛神経節細胞の細胞数や変性の有無、Tunel染色によるアポトーシスの有

無、*Ednrb* 免疫組織染色による発現の増強、クリューバ・バレラ染色による脱髄の有無を行い、光学顕微鏡レベルで組織学的な評価を行った。また、透過電子顕微鏡、および走査電子顕微鏡解析法(Ohgami, Sone et al., PNAS 2010)により、ナノスケールレベルでラセン神経の形態解析を実施した。(Ohgami, Sone et al., PNAS 2010)。さらに、過去の報告に従い(Brakenhielm FASEB J 2001)、抗酸化化合物を野生型マウス(C57/BL6系統等)に3~6ヶ月間飲水投与し、加齢性難聴に対する効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 内耳・ラセン神経節に発現する *Ednrb* の解析: 野生型マウスの内耳ラセン神経節において、*Ednrb* タンパク質は生後3日では検出出来ないが、生後8日以降に検出出来る事が明らかになった。さらにワーデンブルグ症候群のモデル動物として知られている *Ednrb* 欠損マウス(*Ednrb*-KO(-/-))を用いた解析によると、*Ednrb*-KO(-/-)マウスは、生後3日の時点では野生型マウスと比較してラセン神経節の数に有意な差を示さないが、生後8日以降はラセン神経節の数は減少し、先天性難聴および神経変性を伴う事が分かった( Ida-Eto, Ohgami, Sone et al., JBC 2011)。Tunel染色を実施したが、少なくとも生後3週間の期間では陽性のラセン神経節を検出する事は出来なかった。以上の結果より、野生型マウスのラセン神経節において、*Ednrb* は生後の聴力発達期に発現増加した一方、その欠損マウスではラセン神経節の神経変性を招いた事から、*Ednrb* はラセン神経の発達・維持に重要な役割を担う事が示唆された。

(2) 聴神経に発現する *Ednrb* を標的にした先天性難聴のレスキュー実験: 内耳の色素細胞以外のラセン神経節における *Ednrb* の発現増強により先天性難聴をレスキューする目的で、*Ednrb*-KO(-/-)マウスに *DBH* プロモーター下で神経系に *Ednrb* を発現させたマウス(*Ednrb*-KO(-/-);*DBH-Ednrb*-Tg)を用いて、ABR測定を実施した。その結果、*Ednrb*-KO(-/-)マウスと比較して、*Ednrb*-KO(-/-);*DBH-Ednrb*-Tg マウスの聴力レベルおよびラセン神経節の変性は部分的に改善されている事が分かった( Ida-Eto, Ohgami, Sone et al., JBC 2011)。このことから、聴神経系において *Ednrb* は聴力の獲得に重要な役割を担っている事、更に、その発現を聴神経系で増強することは、先天性難聴の予防・治療の標的分子の一つになると考えられた。ワーデンブルグ症候群など先天性難聴を伴う患者は、聴覚系に必須の色素細胞を先天的に欠損している為、治療方法の確立は不可能だとされてきた。本研究結果より、先天的に色素細胞を欠損している先天性難聴

患者であっても、出生後にラセン神経節の EDNRB を標的に予防・治療できる可能性が期待される。

(3) 聴神経に発現する EdnrB を標的にした加齢性難聴のレスキュー実験: EdnrB をラセン神経節に強制発現したトランスジェニックマウスの加齢性難聴に対する耐性を検討した。加齢性難聴は遺伝子背景が大きく影響する事が報告されている事から (Noben-Trauth et al., Nat Genet 2003) DBH-EdnrB-Tg マウスを C57BL/6J 系統あるいは ICR 系統と各々戻し交配を 10 回以上実施し、DBH-EdnrB-Tg マウスの耐性の有無を各々検討した。その結果、C57BL/6J 系統の遺伝子背景では耐性傾向を示したが、ICR 系統の遺伝子背景では同様の傾向を示さなかった。内耳における両バックグランド間の主な違いは cadherin23 の変異およびメラニン色素の有無であるが、ラセン神経節に発現する EdnrB との関連は不明である。今後、更に例数を増やして、ラセン神経節に強制発現した EdnrB の加齢性難聴に対する耐性を慎重に検討する必要がある。

(4) 抗酸化化合物の飲水投与による加齢性難聴の予防実験: ポリフェノール系の抗酸化物質であるレスベラトロール (Resv) は、線虫などを用いた研究で延命効果を示す事が報告されている (Wood et al., Nature 2004)。また、Resv は EdnrB のリガンドである endothelins の発現制御作用がある事が報告されている (Zou et al., Int J Oncol 1999)。そこで、抗酸化能を持つ Resv を飲水投与し、加齢性難聴の予防実験を実施した。その結果、Resv 投与群 (n=10) は、非投与群 (n=10) と比較して、加齢性難聴に対して有意な予防効果を示さなかった。また、ニッスル染色、透過電子顕微鏡、免疫組織染色等により内耳の形態解析を実施した所、加齢に応じて観察される非投与群のラセン神経節の変性について、Resv 投与群は予防効果を示さなかった。今後は食餌に混合して投与する等、別の投与方法の検討を進めたい。

#### 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 33 件)

(1) Kumasaka MY, Yajima I, Ohgami N, Naito H, Omata Y, Kato M. Commentary to Krishna et al. (2014): Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. *Arch Toxicol*, In press.

- (2) Sone M, Yoshida T, Otake H, Kato K, Teranishi M, Naganawa S, Nakashima T. Evaluation of vascular activity in otosclerosis by laser-Doppler flowmetry: comparison with CT densitometry. *Otol Neurotol* 34, 1559-1563 (2013)
- (3) Uchida Y, Teranishi M, Nishio N, Sugiura S, Hiramatsu M, Kato K, Otake H, Yoshida T, Suzuki H, Sone M, Ando F, Shimokata H, Nakashima T. Endothelin-1 gene polymorphism in sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 123, 59-65 (2013)
- (4) Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T. Establishment of Mouse Model of MYH9 Disorders: Heterozygous R702C Mutation Provokes Macrothrombocytopenia with Leukocyte Inclusion Bodies, Renal Glomerulosclerosis and Hearing Disability. *PLoS One* 8, e71187 (2013)
- (5) Polymorphisms in genes encoding aquaporins 4 and 5 and estrogen receptor in patients with Ménière's disease and sudden sensorineural hearing loss. Nishio N, Teranishi M, Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Sone M, Otake H, Kato K, Yoshida T, Tagaya M, Hibi T, Nakashima T. *Life Sci* 92, 541-546 (2013)
- (6) Polymorphisms in genes involved in oxidative stress response in patients with sudden sensorineural hearing loss and Ménière's disease in a Japanese population. Teranishi M, Uchida Y, Nishio N, Kato K, Otake H, Yoshida T, Suzuki H, Sone M, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nakashima T. *DNA Cell Biol* 31, 1555-1562 (2013)
- (7) Sone M, Yoshida T, Naganawa S, Otake H, Kato K, Sano R, Teranishi M, Nakashima T. Comparison of CT and MRI for evaluation of cholesteatoma with labyrinthine fistulae. *Laryngoscope* 122, 1121-1125 (2012)
- (8) Nishio N, Teranishi M, Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Sone M, Otake H, Kato K, Yoshida T, Tagaya M, Hibi T, Nakashima T. Contribution of complement factor H Y402H polymorphism to sudden sensorineural hearing loss risk and possible

- interaction with diabetes. *Gene* 499, 226-230 (2012)
- (9) Ohgami, N., Tamura, H., Ohgami, K., Iida, M., Yajima, I., Kumasaka, Y.M., Goto, Y., Sone, M., Nakashima, T., Kato, M.: c-Ret-mediated hearing losses. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 5, 23-28 (2012)
- (10) Ohgami, N., Ida-Eto, M., Sakashita, N., Sone, M., Nakashima, T., Tabuchi, K., Hoshino, T., Shimada, A., Tsuzuki, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Jijiwa, M., Asai, N., Hara, A., Takahashi, M., Kato, M.: Partial impairment of c-Ret at tyrosine 1062 accelerates age-related hearing loss in mice. *Neurobiol. Aging*, 33, 626.e25-e34 (2012)
- (11) Tamura, H., Ohgami, N., Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H., Kato, M.: Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. *PLoS ONE*. 7, e39807 (2012)
- (12) Ohgami, N., Iida, M., Yajima, I., Tamura, H., Ohgami, K., Kato, M.: Hearing impairments caused by genetic and environmental factors. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 18, 10-15 (2012)
- (13) Ohgami, N., Hori, S., Ohgami, K., Tamura, H., Tsuzuki, T., Ohnuma, S., Kato, M.: Exposure to low-dose barium by drinking water causes hearing loss in mice. *NeuroToxicology*, 33, 1276-1283 (2012)
- (14) Sone M, Yoshida T, Naganawa S, Otake H, Kato K, Sano R, Teranishi M, Nakashima T. Morphological observation in the stria vascularis in midkine and pleiotrophin knockout mice. *Auris Nasus Larynx* 38, 41-45 (2011)
- (15) Ida-Eto, M. \*, Ohgami, N. \*, Iida, M., Yajima, I., Kumasaka, M.Y., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Sone, M., Nakashima, T., Tsuzuki, T., Komune, S., Yanagisawa, M., Kato, M.: Partial requirement of endothelin receptor B in spiral ganglion neurons for postnatal development of hearing. *J. Biol. Chem.*, 286, 29621-29626. (2011)

\*These authors equally contributed to this work.

[学会発表](計 37 件)

- (1) 寺西正明、内田育恵、加藤健、大竹宏直、吉田忠雄、杉浦彩子、曽根三千彦、中島務: 突発性難聴における酸化ストレス関連の遺伝子多型の検討. 第 58 回日本聴覚医学会総会(松本)(2013年10月17-18日)
- (2) 鈴木宏和、曽根三千彦、吉田忠雄、大竹宏直、加藤健、寺西正明、中島務: 中耳真珠腫診断における拡散強調画像の判定的評価の有用性. 第 23 回日本耳科学学会総会(宮崎)(2013年11月24-26日)
- (3) 大神信孝、飯田真智子、加藤昌志: Partial impairment of c-Ret accelerates age-related hearing loss. 第 36 回日本神経科学大会 / Neuroscience2013(京都)(2013年6月20-23日)
- (4) 大神信孝: 生活環境因子が誘発する神経変性疾患. 第 8 回 Tokushima Young Investigators Conference (徳島大学医学研究科主催) 特別招待講演 2013 年 9 月 11 日.
- (5) Sone M, Nakashima T, Yoshida T, Kato M, Teranishi M, Naganawa S. : New Aspects on Pathophysiology and Imaging in Menieres Disease: Relationships between endolymphatic hydrops and symptoms. The 20<sup>th</sup> International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies World Congress (Seoul, Korea)(June 1-5, 2013)
- (6) 加藤健、曽根三千彦、寺西正明、大竹宏直、吉田忠雄、佐野壘、中島務: 内耳障害を合併する P-ANCA 陽性血管炎患者の 3D-FLAIR MRI 画像. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学学会総会(新潟)(2012年5月10-13日)
- (7) 吉田忠雄、大竹宏直、加藤健、下野真理子、寺西正明、曽根三千彦、中島務. 耳鳴を主訴とする症例の 3 テスラ MRI による内リンパ水腫評価. 第 22 回日本耳科学学会総会(名古屋)(2012年10月4-6日)
- (8) 大神信孝、飯田真智子、矢嶋伊知朗、加藤昌志: Analysis of endothelin

receptor B expressed in spiral ganglion neurons. 第 24 回日本色素細胞学会学術大会 (長浜) (2012 年 11 月 24-25 日)

- (9) 内田育恵, 杉浦彩子, 西尾直樹, 多賀谷満彦, 平松真理子, 吉田忠雄, 大竹宏直, 加藤健, 寺西正明, 曽根三千彦, 中島務 EDN1 遺伝子 Lys198Asn 多型に関する突発性難聴ケースコントロール研究について. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会 (京都) (2011 年 5 月 19-21 日)
- (10) 棚橋汀路, 松田直子, 曽根三千彦. 蝸牛神経核背側核電植の一例の聴覚能の検討. 第 56 回日本聴覚医学会総会 (博多) (2011 年 10 月 27-28 日)
- (11) 加藤健, 大竹宏直, 吉田忠雄, 寺西正明, 曽根三千彦, 朝日清光, 中島務. 内リンパ水腫症例における連続周波数ティンパノメトリーと MRI 画像所見の比較. 第 56 回日本聴覚医学会総会 (博多) (2011 年 10 月 27-28 日)
- (12) 寺西正明, 内田育恵, 西尾直樹, 加藤健, 大竹宏直, 吉田忠雄, 多賀谷満彦, 鈴木宏和, 曽根三千彦, 杉浦彩子, 中島務. 突発性難聴における炎症性サイトカインの遺伝子多型の検討. 第 21 回日本耳科学会総会 (沖縄) (2011 年 11 月 24-26 日)
- (13) 吉田忠雄, 大竹宏直, 加藤健, 寺西正明, 曽根三千彦, 中島務. メニエール病およびその周辺疾患における内リンパ腔 MRI 画像. 第 21 回日本耳科学会総会 (沖縄) (2011 年 11 月 24-26 日)
- (14) 大神信孝: 環境ストレスと関連する聴覚系疾患の解析. 第 84 回日本生化学会大会・シンポジウム「D-アミノ酸の生化学: 飛躍する新領域」(京都) (2011 年 9 月 24 日)
- (15) 大神信孝, 飯田真智子, 田村青鳥, 加藤昌志: Endothelin receptor B in spiral ganglion neurons partially contributes to postnatal development of hearing. 第 35 回日本神経科学大会 / Neuroscience2012 (名古屋) (2011 年 9 月 18-21 日)

[図書] (計 1 件)

- (1) Sone M, Yoshida T, Nakashima T. Cholesteatoma and Ear Surgery-an update. Efficacy of 3D FLAIR MRI findings in evaluating cholesteatoma with labyrinthine fistulae. 107-109.

Kugler Publications. 2013

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 聴覚障害又は小脳性運動失調症の予防・治療剤

発明者: 大神信孝, 加藤昌志

権利者: 中部大学

種類: 特許

番号: 2012-259456

出願年月日: 2012 年 11 月 28 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曽根 三千彦 (SONE MICHHIKO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 30273238

### (2) 研究分担者

大神 信孝 (OHGAMI NOBUTAKA)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号: 80424919

### (3) 連携研究者

無し