

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670042

研究課題名(和文) ストレス性難聴のモデル動物と治療戦略の開発に関する研究

研究課題名(英文) Development of stress-induced hearing loss models and therapeutic strategies

研究代表者

荻田 喜代一(Ogita, Kiyokazu)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：90169219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：音響外傷性難聴動物モデルにおいて、蝸牛外側壁線維細胞のギャップ結合構成蛋白質コネキシンの細胞内局在変化および分解が酸化ストレスを介して惹起されることを見いだした。コネキシンの分解消失が有毛細胞障害に先立って起こる知見は、蝸牛外側壁線維細胞の酸化ストレスによる内耳内イオンバランスの破綻が有毛細胞障害の原因の一つであることを示唆するものである。さらに、カルパインの活性化がコネキシンの細胞内局在変化と分解を誘発することを明らかにした。このように、感音難聴の発症機序の一つに酸化ストレスによるカルパインの活性化が関与することが推察される。

研究成果の概要(英文)：Most of sensorineural hearing impairment has become a social problem, because there is no treatment of sensorineural hearing impairment. Under physiological conditions, maintenance of the potassium ion concentration in the endolymph by gap junction in the cochlear lateral wall is important for hearing. We found using in vivo and in vitro experiments that intense noise exposure produced disruption of gap junction through oxidative stress-induced connexin degradation prior to hair cell damage. Therefore, the collapse of ion balance in the inner ear through degradation of connexin is one of the causes of hair cell damages. In addition, calpain inhibitors prevented noise-induced hearing loss and disruption of gap junction induced by connexin degradation. Taken together, the disruption of gap junction by oxidative stress is involved in one of the pathogenesis of sensorineural hearing impairment and could be a new target of pharmacotherapy for sensorineural hearing impairment.

研究分野：薬理学

キーワード：難聴 酸化ストレス ギャップ結合 コネキシン

### 1. 研究開始当初の背景

外部環境から生体への情報伝達の 90%は視聴覚を中心とする感覚器を介するものであり、その障害が個人にもたらす損失は健常人には想像できないほどのものである。身体面のみでなく精神面においても個人の生活の質を高めるうえで、感覚器の重要性は、現代文明社会、情報社会においてますます大きくなっている。到来しつつある長寿社会にあって豊かな老後生活を送るために、また他の身体障害によって生活範囲の制限を余儀なくされるものにとって、視聴覚は社会復帰のよりどころである場合が多い。Quality of Life(QOL)の重要性を意識するようになった現代社会において、感覚器障害の予防や早期発見・早期治療は最優先に考慮していかねばならない。感音難聴には、アミノグリコシド系抗菌薬やループ利尿薬などによる薬剤性難聴、強大音響曝露による音響外傷性難聴、老人性難聴、突発性難聴などが知られる。中でも、突発性難聴は国内で年間約 25000 人発症と頻度の高い高度の内耳性難聴である。突発性難聴の治療薬として、本邦ではステロイド性薬の短期的大量投与(ステロイドパルス療法)が臨床的に広く用いられているが、十分な治療を提供できていないのが現状である。その原因の一つとして、モデル動物が開発されていないことにより、詳細な感音難聴の病態が解析できないこととなると考えられる。近年、臨床研究による知見で、糖尿病患者の感音難聴発症率が非糖尿病患者の約 2 倍であること(Bainbridge KE et al., Diabetes Care. 2010)や、感音性難聴発症は過剰な心身ストレス負荷が原因の一つであるなどの知見が集積している。

### 2. 研究の目的

新規感音難聴治療薬の開発のためには感音難聴発症モデル動物を作製するとともに、既存の手法を組み合わせた新たな戦略を展開する必要がある。そこで本研究では、感音難聴モデル動物の開発、感音難聴(特にストレス性難聴)の発症メカニズム解明、更に、本難聴の治療薬の探索に着手して、感音難聴の薬物治療戦略を確立することである。

### 3. 研究の方法

5 週齢 ddY 系雄性マウスを用いて強大音響ストレス(8 kHz, 110dB, 1 時間) 水浸拘束ストレス(1 日 3 時間、2 週間) 社会的隔離ストレス(4 週間) 社会的敗北ストレス(1 日 10 分、2 週間)を負荷した。また、膵臓ランゲルハンス島 B 細胞を特異的に破壊する streptozotocin (STZ, 65 mg/kg, i.p.) を 1 日間隔で 3 回投与し、糖尿病を発症させ、高血糖ストレス負荷を与えた。それぞれのストレス負荷一定日数経過後に 4、12、20 kHz の周波数における聴力を聴性脳幹反応を解析することにより測定した。また、音響曝露一定期間後に、頂回転、中回転および基底回転

の 3 領域に分け、ファロイジン染色法によりコルチ器の有毛細胞障害を検出した。音響曝露直後、2、4 時間後の蝸牛外側壁におけるニトロチロシン、4-Hydroxynonenal(4-HNE) 付加タンパク質、p-JNK、p-ERK、p-p38、Connexin26(Cx26)をウエスタンブロットティング法により定量した。また、音響曝露直後の蝸牛外側壁における p-JNK、p-ERK、p-p38 を免疫組織化学法により解析した。

5-6 週齢の Std-ddY 系雄性マウスより調製したらせん靭帯由来培養細胞に 4-HNE (10  $\mu$ M) を 1 時間曝露した。曝露後各経過時間における Cx 発現量およびギャップ結合機能を、それぞれウエスタンブロット法および細胞間色素輸送法を用いて評価した。また、4-HNE 曝露後のカルパインの活性化は  $\alpha$ -fodrin の分解産物(145 kDa)の発現をウエスタンブロット法により定量することにより解析した。音響曝露 3 日前から音響曝露 7 日後までの 10 日間(前後処置群)または音響曝露前 3 日間(前処置群)、音響曝露後 7 日間(後処置群)の 3 群に対して、それぞれクルクミン(100 mg/kg)を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁して 1 日 1 回経口投与した。それぞれの対照群には、0.5%カルボキシメチルセルロース溶液を 1 日 1 回経口投与した。

### 4. 研究成果

音響曝露後少なくとも 7 日まで 4、12、20 kHz の周波数において著明な聴力の低下がみられた。音響曝露 14 日後のファロイジン染色において多数の外有毛細胞障害が観察された。また、音響曝露により蝸牛外側壁らせん靭帯での型および型線維細胞の有意な減少がみられた。音響曝露直後において 4-HNE 付加タンパク質、ニトロチロシン、p-JNK、p-ERK が著明に増加した。また、p-p38 は音響曝露直後から増加傾向を示し、音響曝露 2 時間後において有意な増加が認められた。さらに、音響曝露 2 時間後より Cx26 の著明に減少した。直後のらせん靭帯由来細胞 4-HNE を曝露したところ、曝露 1 時間後には 4-HNE 付加蛋白質の増加および Cx の減少が認められた。さらに、4-HNE 曝露 4.5 時間後では、ギャップ結合機能の低下を示す細胞間色素輸送率の著明な減少が観察された。また、4-HNE 曝露後 10 分では、 $\alpha$ -fodrin 分解産物(145 kDa)の増加からカルパインが活性化していることが判明した。カルパイン阻害薬の PD150606 前処置は 4-HNE 曝露に伴う Cx 減少及びギャップ結合機能低下を顕著に改善した。クルクミン前後処置群では、音響曝露後 7 日目で 4、12、20 kHz において対照群に比べ有意な聴力の回復が認められた。クルクミン前処置群および後処置群では音響曝露後 7 日目で全ての周波数において聴力の回復は認められなかった。さらに、音響曝露後の有毛細胞障害は、クルクミン前後処置群で抑制されたが、他の処置群ではいず

れも抑制されなかった。以上の結果から、強大音響曝露は peroxynitrite 産生および MAPK 経路の活性化を介して蝸牛外側壁らせん靭帯線維細胞障害を引き起こす可能性が推察される。また、酸化ストレス産物 4-HNE は、内耳外側壁らせん靭帯線維細胞のギャップ結合機能を破綻させることおよびその破綻にカルパインが関与することが明らかとなった。したがって、音響外傷性難聴が酸化ストレスによる内耳外側壁らせん靭帯線維細胞のギャップ結合機能の破綻に起因することから、カルパイン阻害薬が音響外傷性難聴の治療に有効である可能性が示唆される。クルクミンは強大音響曝露誘発性有毛細胞障害を抑制することが明らかとなった。このことから、クルクミンが音響外傷性難聴に対する予防治療薬の候補となる可能性が示唆される。

水浸拘束ストレス負荷群では胃内の出血痕を認め、社会的隔離ストレス負荷群および社会的敗北ストレス負荷群はケージ内で飛び跳ねるなどの興奮行動を示した。しかしながら、水浸拘束ストレス負荷、社会的隔離ストレス負荷、社会的敗北ストレス負荷では、いずれも聴力および有毛細胞数に著変が観察されなかった。以上の結果より、全身的傷害性ストレスや心的ストレスでは聴覚障害は惹起されないことが判明した。感音性難聴発症は過剰な心身ストレス負荷が原因の一つであると考えられているがこれらの結果から、少なくともマウスでは心的ストレスが感音難聴の発症に無関係であることが明らかとなった。

STZ 投与群は対照群と比較して投与 1 週間後より著明な血糖値の上昇がみられた。一方、対照群でみられる成長に伴う体重増加が STZ 投与群において有意に抑制された。しかしながら、少なくとも STZ 投与後 15 週までの聴覚障害は顕著ではなかった。また、110 dB の音響曝露後、STZ 投与群の聴力は対照群と同等の障害が残存した。しかしながら、90 dB の音響曝露 1 週間後には対照群は曝露前の聴力まで完全に回復するのに対し、STZ 投与群は完全には回復しなかった。さらに、高濃度グルコース負荷したらせん靭帯由来細胞は、対照群に比べてギャップ結合機能の低下がみられた。以上の結果より、糖尿病の既往による聴覚障害は顕著ではないが、音響曝露に対する脆弱性を示したことから、糖尿病の既往は騒音曝露による内耳障害を増悪させることが推察される。

以上の事実から、感音難聴発症と心的ストレスは少なくともマウスにおいては関係しないと考えられる。一方、強大音響ストレスは低音域から高音域まで広範囲に聴覚障害を惹起させ、酸化ストレスにより誘導されるカルパインの活性化が寄与することが推察される。また、この強大音響ストレスによる聴覚障害に対してクルクミンが新規予防治療

薬として期待される。今後、クルクミンが強大音響ストレスによる内耳内における諸変化に対する効果の検証や治療効果と血中濃度との相関などの詳細な解析が重要となるであろう。

#### 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 2 件)

1. Taro Yamaguchi, Masanori Yoneyama, Eiichi Hinoi, Kiyokazu Ogita (2015) Involvement of calpain in 4-hydroxynonenal-induced disruption of gap junction-mediated intercellular communication among fibrocytes in primary cultures derived from the cochlear spiral ligament. J. Pharmacol. Sci. 129, 127-134.
2. Taro Yamaguchi, Reiko Nagashima, Masanori Yoneyama, Tatsuo Shiba, and Kiyokazu Ogita (2014) Disruption of ion-trafficking system in the cochlear spiral ligament prior to permanent hearing loss induced by exposure to intense noise: possible involvement of 4-hydroxy-2-nonenal as a mediator of oxidative stress. PLOS ONE, 9(7), e102133

[学会発表](計 2 1 件)

1. 土屋侑子、米山雅紀、山口太郎、荻田喜代一、酸化ストレス産物 4-hydroxynonenal は蝸牛外側壁の細胞間コミュニケーションの破綻による聴覚障害を発症する。日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 - 29 日、横浜
2. 松川友美、山口太郎、山田彩加、米山雅紀、荻田喜代一、騒音性難聴に対するクルクミンの予防・治療効果。日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 - 29 日、横浜
3. 藤本頼門、山口太郎、田中仁美、米山雅紀、荻田喜代一、ギャップ結合阻害は内耳前庭機能を障害する。日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 - 29 日、横浜
4. 山口太郎、米山雅紀、荻田喜代一、蝸牛内ギャップ結合の破綻をターゲットとした感音難聴治療薬の可能性。第 89 回日本薬理学会年会、シンポジウム「感覚薬理学の新たなる展開：QOL を高める内耳研究の最前線」。2016 年 3 月 9 - 11 日、横浜
5. 山口太郎、松川友美、山田彩加、米山雅紀、荻田喜代一、新規難聴モデルとしての騒音性難聴モデル動物 - 急性音響外傷モデルとの比較 - 。第 128 回日本薬理

- 学会近畿部会、2015年11月20日、大阪
6. 米山雅紀、土屋侑子、山口太郎、荻田喜代二、難聴発症メカニズムにおける4-hydroxynonenalの関与。第128回日本薬理学会近畿部会、2015年11月20日、大阪
  7. 土屋侑子、米山雅紀、山口太郎、荻田喜代二、4-hydroxynonenalによる難聴モデル動物の開発。生体機能と創薬シンポジウム2015、2015年8月27-28日、千葉
  8. Taro Yamaguchi, Masanori Yoneyama, Kiyokazu Ogita, Disruption of ion-traffic system in the cochlear spiral ligament fibrocytes prior to permanent hearing loss induced by intense noise. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry, August 23-27, 2015, Cairns, Australia.
  9. 山口太郎、藤本頼門、田中仁美、米山雅紀、荻田喜代二、内耳内ギャップ結合の破綻は聴覚障害および平衡感覚障害を起す。第127回日本薬理学会近畿部会、2015年6月26日、岐阜
  10. 山口太郎、田中仁美、米山雅紀、荻田喜代二、ギャップ結合阻害薬は聴覚障害および平衡感覚障害を惹起する。日本薬学会第135年会、2015年3月25-28日、神戸
  11. 藤田かおり、藤本頼門、山口太郎、米山雅紀、荻田喜代二、マウスにおける各種ストレスによる聴覚障害。日本薬学会第135年会、2015年3月25-28日、神戸
  12. 山口太郎、森永裕太、米山雅紀、荻田喜代二、糖尿病は音響外傷性難聴発症のリスクを高める。第88回日本薬理学会年会、2015年3月18-20日、名古屋
  13. Taro Yamaguchi, Masanori Yoneyama, Kiyokazu Ogita, Disruption of ion-traffic system in the cochlear spiral ligament prior to noise-induced hearing loss. 51st Inner Ear Biology Workshop (IEB 2014), November 1-4, 2014, Kyoto, Japan.
  14. Masanori Yoneyama, Taro Yamaguchi, Nobuyuki Kuramoto, Kiyokazu Ogita, Acoustic overstimulation activates 5'-AMP-activated protein kinase through a temporary decrease in ATP level in the cochlear spiral ligament prior to noise-induced hearing loss. 51st Inner Ear Biology Workshop (IEB 2014), November 1-4, 2014, Kyoto, Japan.
  15. 山口太郎、米山雅紀、吾郷由希夫、松田敏夫、馬場明道、荻田喜代二、音響外傷性聴覚障害におけるNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchangerの関与。日本薬学会第134年会、2014年3月27-30日、熊本
  16. 山口太郎、十名洋介、山本典生、中川隆之、伊藤壽一、米山雅紀、荻田喜代二、Slc26a4<sup>-/-</sup>マウスの内耳におけるアクアポリンの発現変動。第87回日本薬理学会年会、2014年3月19-21日、仙台
  17. 荻田喜代二、山口太郎、米山雅紀、松田敏夫、馬場明道、音響外傷性難聴に対するNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger 1阻害剤の効果。第87回日本薬理学会年会、2014年3月19-21日、仙台
  18. 山口太郎、十名洋介、山本典生、中川隆之、伊藤壽一、米山雅紀、荻田喜代二、内リンパ水腫モデルslc26a4<sup>-/-</sup>マウスにおける内耳アクアポリンの発現増加。第63回日本薬学会近畿支部会、2013年10月12日、京都
  19. 山口太郎、米山雅紀、荻田喜代二、糖尿病の既往は音響曝露による内耳障害を増悪させる。生体機能と創薬シンポジウム2013、2013年8月29-30日、福岡
  20. 山口太郎、米山雅紀、荻田喜代二、酸化ストレス誘発性内耳外側壁ギャップ結合の破綻へのカルパインの関与。第123回日本薬理学会近畿部会、2013年7月12日、名古屋
  21. Taro Yamaguchi, Masanori Yoneyama, Kiyokazu Ogita, Involvement of calpain in dysfunction of gap junction in the cochlear spiral ligament fibrocytes following oxidative stress. Neuro2013, 2013年6月20-23日、京都
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
荻田 喜代一(OGITA KIYOKAZU)  
摂南大学・薬学部・教授  
研究者番号：90169219
  - (2)研究分担者  
米山 雅紀(YONEYAMA MASANORI)  
摂南大学・薬学部・准教授  
研究者番号：00411710