

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462552

研究課題名(和文) 加齢性難聴発症の病態解明 脳血管障害との関係についての研究

研究課題名(英文) Investigation of pathogenesis of age-related hearing loss- the relationship between the hearing loss and the cerebrovascular disorder

研究代表者

森田 由香 (Morita, Yuka)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：60547602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性難聴は加齢により発症し徐々に進行する難聴で、人類でもっとも多い慢性疾患のひとつである。加齢に伴い脳血管障害も増加するが、これらの関係が明らかになれば、血管障害の予防が、難聴の予防、進行の抑制する可能性が考えられる。さらに高次機能である認知症との関係が明らかになれば、超高齢化社会の日本において果たす役割は大きい。今回の検討で、モデルマウスとヒト疫学研究から、加齢性難聴と脳血管障害に明らかな関係は認められなかった。さらにアルツハイマー病の危険因子とされるApoE4の存在も聴力には影響はなかった。しかし、認知機能の低下については強い相関をみとめ、今後の解析の糸口になったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Age-related deafness is a hearing loss that develops with age and gradually progresses, some reports say 40% of people over 65 years old were developed the deafness. The relationship between age-related hearing loss and cerebrovascular disorder is not clear yet. If these relationships are proved, it may be helpful in establishing how to prevent hearing loss. In this study, model mouse and human epidemiological studies showed no clear relation to age-related hearing loss and cerebrovascular disorder. Furthermore, the presence of ApoE4 gene, which is regarded as a risk factor for Alzheimer's disease, also had no effect on hearing loss. However, we found a strong correlation with regard to the decline in cognitive function, which is considered to be a clue to future analysis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：加齢性難聴 脳血管障害 認知機能障害

1. 研究開始当初の背景

日本では近年、高齢化がすすみ、65歳以上の人口が22.5%と超高齢化社会となっている。加齢性難聴は加齢により発症し徐々に進行する難聴で、65歳以上の40%にもものぼるとの報告もあり、人類でもっとも多い慢性疾患のひとつである。にもかかわらず、治療、予防方法もなく、発症した後は必要に応じて補聴器装用などで対応しているのが現状である。一方、加齢に伴い脳血管障害も増加するが、難聴発症、増悪に関係するかは明らかではない。これらの関係が明らかとなれば、血管障害の予防がひいては加齢性難聴の発症、進行予防となる可能性がある。そこで、本研究では、加齢性難聴と脳血管障害の関係について検討することとした。

近年、分子遺伝学の発達により、体質レベルでの疾患の解明が可能となり、加齢性難聴でも関与する遺伝子が解明されつつある。マウスを用いたポジショナルクローニング法により、加齢性難聴に影響する遺伝子座は、Ahl (age-related hearing loss)として現在まで9遺伝子座 (Ahl ~ Ahl9) が同定されている。その中で、Ahl3は我々のグループが2004年に同定し、報告した(Nemoto, Morita et al. 2004)。さらに、同遺伝子座は騒音性難聴にも影響することを報告した(Morita et al. 2007)。また、我々のグループは以前から転写因子をコードするBcl11bの遺伝子解析を継続して行ってきた。Bcl11bは様々な組織で発現し細胞分化に関係するが、内耳では外有毛細胞に発現をみとめ、Bcl11bヘテロマウス(B6 background)では、加齢性難聴が加速することを報告した (Okumura, Miyasaka, Morita et al. 2011)。以上の経験から脳小血

管病のモデルマウスであるHtrA1KOマウス(B6 background)の聴力解析を計画した。この解析に用いたC57BL/6J(B6)系統は2か月齢では正常聴力を保つが、6か月齢から徐々に難聴をきたし、10か月齢では高度難聴をきたす。HTRA1遺伝子は脳小血管病の原因遺伝子として同定され、プロテアーゼ活性をもち、細胞間のシグナル伝達的一种であるTGF- β シグナルを抑制する。病理学的には、血管内皮細胞の増殖、平滑筋細胞層の消失、内弾性板の断裂などを呈する。内耳でも加齢に伴い本遺伝子により何らかの異常をきたしている可能性が考えられる。加齢に伴う脳血管障害については、HtrA1KOマウスを用いて解析が進められているが、これに伴う難聴に関する検討は行われていない。また、他の系統でも加齢性難聴マウスと脳血管障害についての検討もいまだない。そこで本研究でこの検討をすすめたいと考えた。

また新潟大学では、加齢性疾患をテーマとして診療科を超えた横断的研究をProject in SADO for total health (PROST)と称して立ち上げ、2008年より本県の離島である佐渡市を対象に疫学研究をすすめている。「寝たきりゼロを目指した多面的オミックス疫学研究：佐渡島をフィールドにした統合的医療データベースの確立と解析」として臓器関連センターを設置、島内唯一の総合病院受診者から参加者を募り、患者基礎情報、検査データ、ゲノム用検体を収集し、プロジェクトを遂行中である。このプロジェクトでは、加齢に伴う日常生活活動度(ADL)の低下に対する危険因子をゲノムや横断的、縦断的医療情報など多面的に明らかにすることを目的としている。本プロジェクトで蓄積されたヒ

トサンプル・情報を利用し、脳虚血性変化と加齢性難聴の関係も検討する。さらに脳 MRI における白質病変の容積や認知症スケールと聴力検査の結果を総合し、ヒトにおける脳血管障害と加齢性難聴の関連を見出し、最終的にはゲノムレベルでの解析を目指す。

加齢に伴う血管障害、認知症発症による社会的影響は大きい、まだ根本的な対策はなされていない。加齢に伴う難聴と脳血管障害の関係が明らかになり、さらに、加齢性難聴と認知症の関係が明らかになれば、難聴の予防もしくは早期に補聴器装用によって、その後の認知症を予防できる可能性がある。本研究では、脳小血管病のモデルマウスである HtrA1KO マウスにおいて、聴力変化をコントロールである B6 マウスと比較し、さらに内耳形態や、内耳での HtrA、TGF- β 、BMP-2、BMP-4 などの分子シグナル解析を行うことにより、加齢性難聴発症と脳血管障害との関連を検討する。この検討は、PROST で計画しているヒトでの疫学研究と並行して行う。最終的には、加齢性難聴の病態の一端を解明し、現在まで有効な治療方法がない加齢性難聴の予防や治療方法の開発につなげたい。

2 . 研究の目的

本研究では、加齢に伴い発症する難聴と脳血管障害との関係を明らかにし、難聴と認知機能障害などの高次機能障害との関係を検証し、難聴の危険因子を知り、その予防方法を構築することにある。

加齢性難聴に対して適切な予防ができ、また発症の後に適切な介入を行うことで、その後の認知機能低下を含む高次機能障害を阻止できれば、社会的意義は非常に大きい。

3 . 研究の方法

1) モデルマウスの解析

いままで継続的に加齢性難聴の解析を行ってきた B6 マウスが background である HtrA1KO マウスを用いる。まず聴力評価を行なう。若年期 (2 か月齢) と老年期 (10 か月齢) において、いままでと同様の手技で ABR 法により聴力を測定する。これまでの結果からも 2 か月齢では正常聴力、10 か月齢では加齢性難聴を発症し、さらにコントロールと比較して悪化していることが予想された。聴力を確認したのち、マウスを深麻酔下に灌流固定し内耳骨包を摘出し、脱灰処理後に凍結切片標本を作製する。抗体は rabbit polyclonal HtrA 抗体、rabbit polyclonal TGF β 抗体、goat polyclonal BMP-2 抗体、goat polyclonal BMP-4 抗体(いずれも SANTA CRUZ 社製)を用いる。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害目的に、過酸化水素水に 20 分間侵漬する。二次抗体を得た動物と同種の 5% 正常血清を 60 分間浸透させ、background staining の除去をはかる。前述の抗体を一次抗体とし、適宜希釈し、湿温中で 4 一晚反応させる。ビオチン化二次抗体を反応させた後、アビチン-ビオチン複合体を 30 分室温にて反応させる (酵素抗体法 ABC 法)。洗浄後、DAB(diaminobenzidine tetrahydrochloride)反応を用い、特異反応による着色が十分認められたら洗浄し反応を止める。脱水、透徹、封入後、発現、分布を光学顕微鏡下に観察する。さらに凍結切片作成に並行してヘマトキシリンエオジン染色による形態的な変化も観察する。

2) ヒト疫学研究

本疫学調査は新潟大学で診療科を超えた

疫学調査であり、高齢化の著しい離島を対象に現在まで 3300 例以上の各種データを蓄積してきた。島唯一の総合病院とオンラインで情報を収集、利用することができる環境にある。その中で、純音聴力検査を施行した例は 793 例となり、各周波数(125、250、500、1000、2000、4000、8000Hz)の聴力閾値から加齢性難聴発症、非発症の分類を行った。聴力像と年齢から十分分類は可能であるが、必要な場合は診療録も確認した。一方、頭部 MRI 検査を施行した例から、白質病変の容積はコンピュータソフト

MRIcro(<http://www.mccauslandcenter.sc.edu/mri/micro/micro/>)を、脳白質や灰白質、側脳室の容積は SPM8

(<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8/>)を用いて解析した。そして、聴力検査と白質病変の大きさとの関係を統計学的手法にて解析した。またアルツハイマー病の危険因子である ApoE4 遺伝子の解析も併せて行っており、本遺伝子の難聴への影響も検討した。認知機能の評価として MMSE(mini mental state examination)の結果が得られた例では、MMSE の程度と難聴の程度の関係もあわせて解析した。

4 . 研究成果

1) 脳血管障害モデルマウスの聴力解析

脳小血管病のモデルマウスである HtrA1KO マウスを用いて、2 か月と 8 か月で ABR を用いた聴力測定を行った。コントロール (n=4) と比較して、KO マウス(n=2) では 8,16,32 kHz のいずれの周波数においても閾値の上昇はみられなかった。個体数を増やす予定であったが、マウスの供給、管理が困難となり、モデルマウスによる検討は中断

となった。

2) ヒト疫学研究

佐渡プロジェクトに関して、研究期間中に 3300 例が登録され、そのうち純音聴力検査を施行した例は 793 例となった。加齢性難聴発症、促進因子を調査するため、70 歳未満と 70 歳以上の 2 郡にわけて各周波数の閾値を脳梗塞既往の有無でそれぞれ検討した。その結果、70 歳未満、70 歳以上いずれの群でも脳梗塞既往あり群において、高音域で聴力閾値が上昇する傾向がみられたが、有意差はなかった(図 1、2)。一方 MMSE のデータが得られた 474 例に関して、同様に検討したところ、70 歳未満ではいずれの周波数においても、また 70 歳以上では 500、2000、4000、8000Hz において、認知機能低下例 (MMSE < 23) で有意に聴力閾値が上昇していた (** $p < 0.001$) (図 3、4)。

図 1

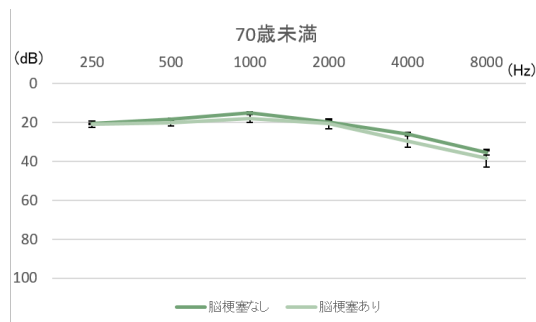


図 2

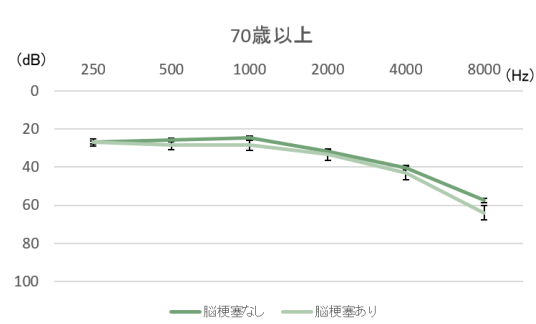


図 3

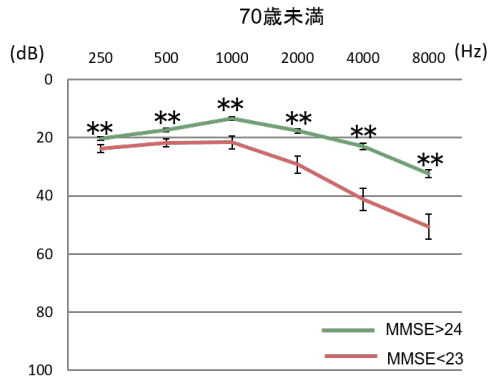
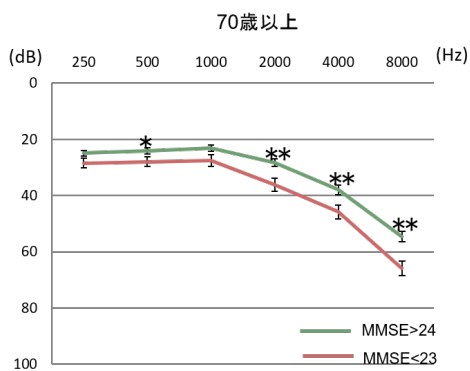


図 4



また、頭部 MRI 検査を施行した 237 例について、脳容積に対する白質病変率との関係を検討したが、70 歳未満、70 歳以上の群ともに有意な相関はみられなかった。(図 5、6)

図 5

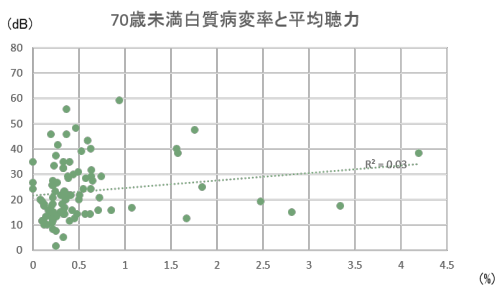
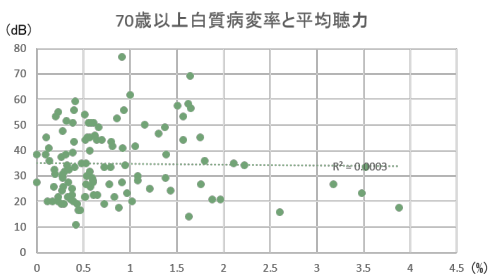
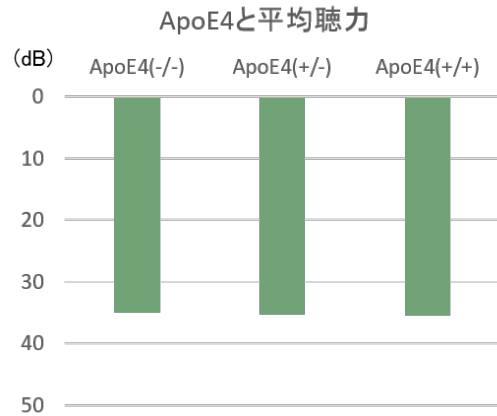


図 6



最後に、アルツハイマー病の危険因子であるとされる ApoE4 遺伝子に関してデータが得られた 332 例について、ApoE4(+/+), ApoE4(+/-)、ApoE4(-/-)の 3 群にわけて平均聴力を比較した。その結果、平均聴力はそれぞれ 35.4、35.2、35.0 dB と有意な差はみられなかった(図 7)。

図 7



以上より、今回の検討では、加齢性難聴と脳血管障害に明らかな関係は認められなかった。またアルツハイマー病の危険因子とされる ApoE 4 の存在も聴力には影響はなかった。認知機能の低下については強い相関をみとめ、今後の解析の糸口になったと考えられる。

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)

[学会発表](計 4 件)

1. 森田由香、宮尾益道、高橋 姿、加齢性難聴と脳血管障害との関係について - 佐渡 PROST データから、第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、平成 26 年 5 月 14 日～5 月 17 日、福岡市

2. Yuka Morita, Masumichi Miyao, Sugata Takahashi, Relationship between prevalence of presbycusis and risk factors, The 7th Instructional Workshop of European

Academy of Otolaryngology and Neuro-Otolaryngology, 2014
年 9 月 13 日～9 月 16 日、シエナ、イタリア
3 . 森田由香、宮尾益道、山本 裕、高橋 姿、
認知障害と加齢性難聴との関係について -
疫学調査プロジェクト(PROST)データから、
第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講
演会、平成 27 年 5 月 20 日～5 月 23 日、
東京国際フォーラム、東京都

4 . Yuka Morita, Kuniyuki Takahashi,
Shinsuke Ohshima, Tatsuya Yamagishi,
Yamato Kubota, Shuji Izumi, Arata Horii,
Risk factors of age-related hearing loss
- The epidemiological study in Sado Island,
18th Japan-Korea Joint Meeting, 2018 年 4
月 7 日～8 日、光州、韓国

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森田 由香 (Morita Yuka)

新潟大学医歯学総合研究科・耳鼻咽喉科・頭
頸部外科・講師

研究者番号：60547602