

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02949

研究課題名(和文) PGC-1 /Nrf2経路に着目した運動による難聴予防機序の解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Development of the prevention system of hearing loss by exercise focusing on the PGC-1alpha/Nrf2 passway.

研究代表者

香取 幸夫 (KATORI, Yukio)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20261620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは難聴の原因になることが知られている。本研究では、抗酸化能を増強した(Nrf2経路を活性化した)Keap-1ノックダウンマウスを長期飼育し、その聴力と内耳の組織を検討した。抗酸化能を増強したマウスでは、12ヶ月後の内耳の細胞の変性が少なく、正常例で見られる加齢性難聴の変化を、低音部から中音域で予防できることを明らかにした。一方で、酸化ストレスに脆弱な遺伝子変異マウス(Nrf2欠損)を用い、運動が加齢性難聴の予防に働くかどうかを検討した。現時点で運動負荷の条件設定が難しく、有意差のある結果は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会となった本邦では、75歳以上で男女ともに6割以上が難聴になると報告されており(内田ら、日老医誌 2012)、コミュニケーション能力や精神機能の低下を防ぐために、難聴の予防や治療が重要な課題になっている。本研究では、抗酸化能を増強したKeap1ノックダウンマウスを用いた実験で、正常マウスに比べて12ヶ月後の聴力低下ならびに内耳組織の変性が少ないことを明らかにした。この成果は、加齢性難聴を予防するうえで、抗酸化能の強化を励行する基礎的な根拠になると考えられる。一方、目的の一つであった、難聴予防における運動の効果は検証できておらず、今後の継続的な研究課題と考えている。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is known to cause hearing loss. In this study, we raised Keap-1 knockdown mice with enhanced antioxidant capacity (activated the Nrf2 pathway) for a year and examined their hearing and cochlea tissue. In mice with enhanced antioxidation, it was found that there was less cell degeneration of the inner ear after 12 months, and that changes in age-related hearing loss seen in normal cases could be prevented from the low to mid-frequency range. On the other hand, we used mutated mice (Nrf2 deficiency) that are vulnerable to oxidative stress to investigate whether exercise works to prevent age-related hearing loss. At present, it is difficult to set the exercise load conditions, and no significant difference has been obtained.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：加齢性難聴 酸化ストレス Nrf2経路 マウス 運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴の予防は超高齢化社会を迎えるこれからの時代において、高齢者がコミュニケーションを保ち充実して生活するために、また認知症やうつ病の発症を予防するために、非常に重要な課題と考えられている。加齢性難聴に対して現在までに確立された予防法はないが、日米など各国の Cohort 研究の結果では 80 歳を超える高齢者でもある一定の割合で正常の聴力が保たれることから、予防する何らかの因子があることが示唆される。

申請者のグループはこれまで転写因子 Nrf2 の内耳での機能に着目して研究を行い、ヒトにおける騒音性難聴の発症と Nrf2 の欠乏とに関連があること、さらにマウスで Nrf2 を活性化すると騒音性難聴を予防できることを報告してきた。Nrf2 の活性化により酸化ストレス障害を軽減することは、他臓器でも複数報告されており、内耳保護においても臨床的治療法開発のターゲットになると考えられる。中高年で出現する疾患で代表的な疾病として高血圧、心筋梗塞、糖尿病といったいわゆる成人病の一群があり、これらに対して運動が疾病予防に有効なことが多数報告されており、すでに一般社会の知識として普及している。この運動療法に関して、PGC1 と Nrf2 の活性化が中心的役割を担っている可能性が指摘されている。一方、運動療法による難聴予防の機序については未解明の状態である。

そのような背景のなか、難聴の予防に関して Nrf2 の活性化による抗酸化能増強の効果、さらには、PGC-1 /Nrf2 経路を介した運動療法の効果をマウスモデルで検討することを想起した。

2. 研究の目的

- ・マウス内耳における PGC1 /Nrf2 経路の発現部位と機能を明らかにする。
- ・Nrf2 経路による抗酸化能の強化、ならびに PGC1 /Nrf2 経路を活性化する運動による加齢性難聴の予防効果を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス内耳における PGC-1 の局在を免疫組織化学法で検討した。
- (2) 正常および Nrf2 の発現を抑えたマウスを用い、騒音暴露による難聴の程度に差が生じるかどうかを聴性脳幹反応 (ABR) で検討する。Nrf2 活性化薬により、難聴の程度が軽減されるかどうかを ABR で検討した。
- (3) Nrf2 の活性化の生じる Keap1 knockdown マウスと野生型マウスを長期飼育し、加齢性難聴の出現状況を生後 2 カ月、5 カ月、12 カ月の時点で ABR で検討した。それぞれの動物の内耳組織の形態を光顕切片で観察し、酸化ストレスを標識する免疫組織化学を行った。
- (4) 正常および Nrf2 の発現を抑えた 6~11 週齢のマウスに運動負荷 (トレッドミル) を与え、運動負荷の有無による聴力の変化の有無を ABR で測定することを試みた。

4. 研究成果

- (1) PGC1 の内耳における局在

EDTA 脱灰後のマウス蝸牛ホルマリン固定パラフィン切片を用い、抗 PGC1 抗体を用いた免疫組織化学を行った。蝸牛のラセン神経節細胞ならびに外側壁のラセン靭帯付近の線維細胞に陽性所見を得た。これらの細胞はミトコンドリアの機能低下を伴う病態により障害を起こすことが知られており、整合性のある結果と考えられる。しかし現在の条件では免疫染色の再現性に乏しく、さらに他の試料処理法で検討を必要としている。

(2) 酸化ストレス脆弱な Nrf2 欠損マウスは、騒音暴露後の聴力回復が減弱した。

酸化ストレスに対して脆弱性のある Nrf2 欠損マウスと野生型マウスにそれぞれ、96dB、2 時間の騒音暴露を行い、曝露後 4 時間後と 7 日後の聴力を ABR で測定した。この騒音暴露の条件において、Nrf2 欠損マウスでは曝露後 4 時間後の聴力閾値の上昇が野生型との間に差がなかった一方で、曝露 7 日後の聴力は 12, 16kHz で野生型に比べて有意に聴力閾値が高かった。野生型で認められる一過性の閾値上昇の後の聴力回復が、Nrf2 欠損マウスでは 12, 16kHz で有意に減弱していた。抗酸化能が騒音負荷の後の聴力回復に重要であることが示唆された。

(3) 抗酸化能を高めた Keap1 ノックダウンマウスは、高齢 (12 か月齢) で難聴予防効果を示した。

Keap1 ノックダウンマウスは Nrf2 が活性化することで抗酸化能が高い。このマウスを 12 カ月齢の聴力を ABR で測定したところ、野生型に比して 4kHz ~ 16kHz の低 ~ 中音域において聴力閾値上昇 (すなわち加齢性難聴の所見) が抑えられていた (図 1)。

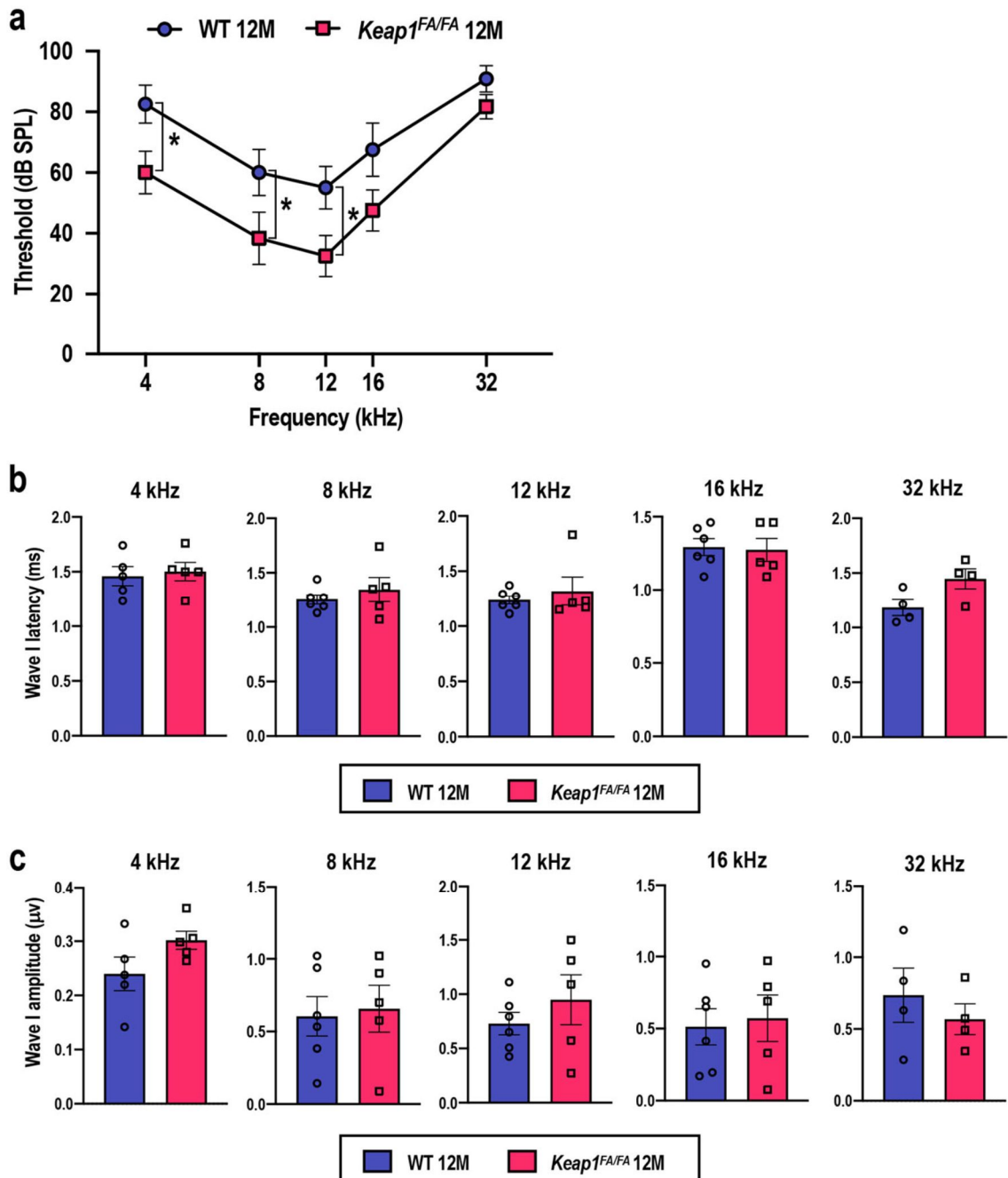


図 1 12 カ月齢における野生型 (WT) と Keap1 ノックダウンマウスの ABR 結果 (各 6 匹)。

a 閾値 . b. 波潜時 . c. 波振幅

内耳蝸牛組織の所見では、Keap1 ノックダウンマウスは野生型に比して蝸牛の頂回転と中回転において、ラセン神経節細胞や有毛細胞の変性が野生型に比して抑えられていた(図2)。

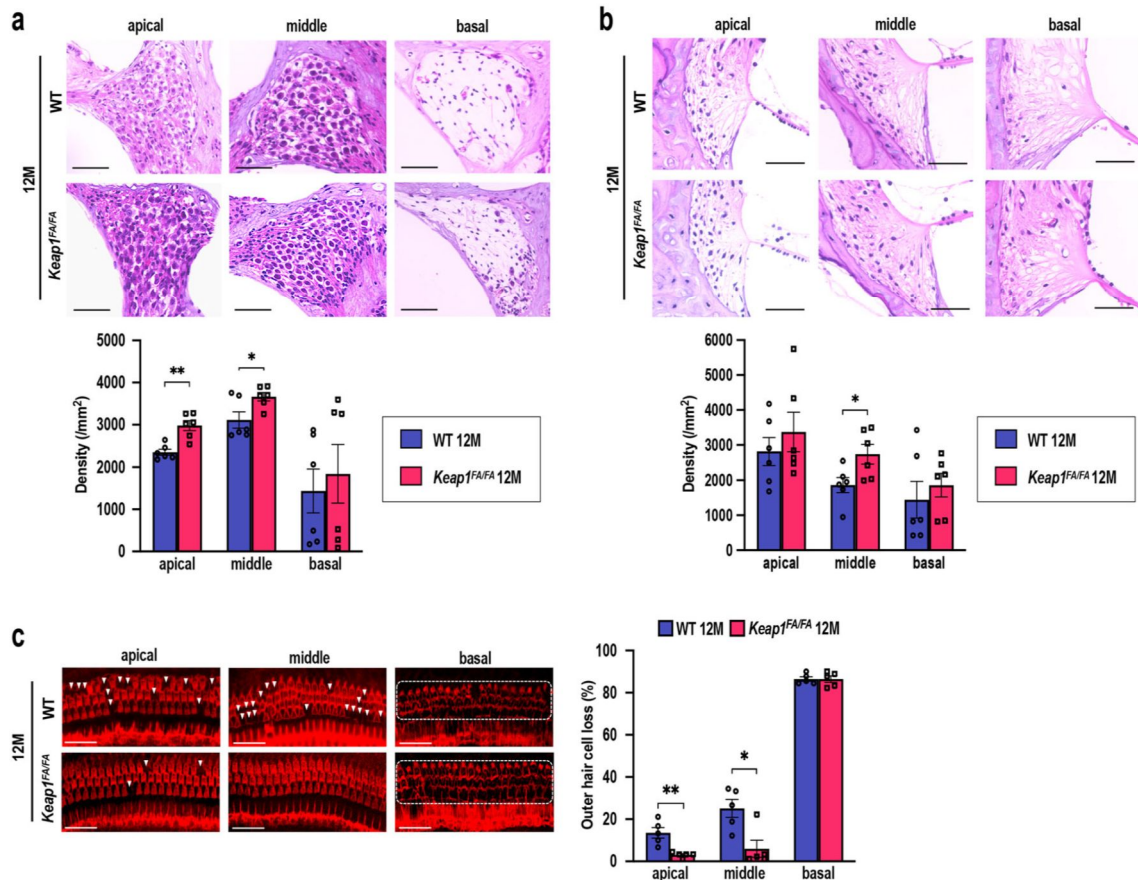


図2 12カ月齢における野生型(WT)とKeap1 ノックダウンマウスの内耳組織所見

a. ラセン神経節. b. ラセン靭帯(蝸牛外側壁下方). c. 有毛細胞(コルチ器上皮帳面)

さらに酸化ストレスを標識する脂質過酸化マーカー(4-HNE)に対する免疫組織化学ではKeap1 ノックダウンマウスにおいて蝸牛の頂回転と中回転において、野生型に比して反応が抑制されていた(図3)

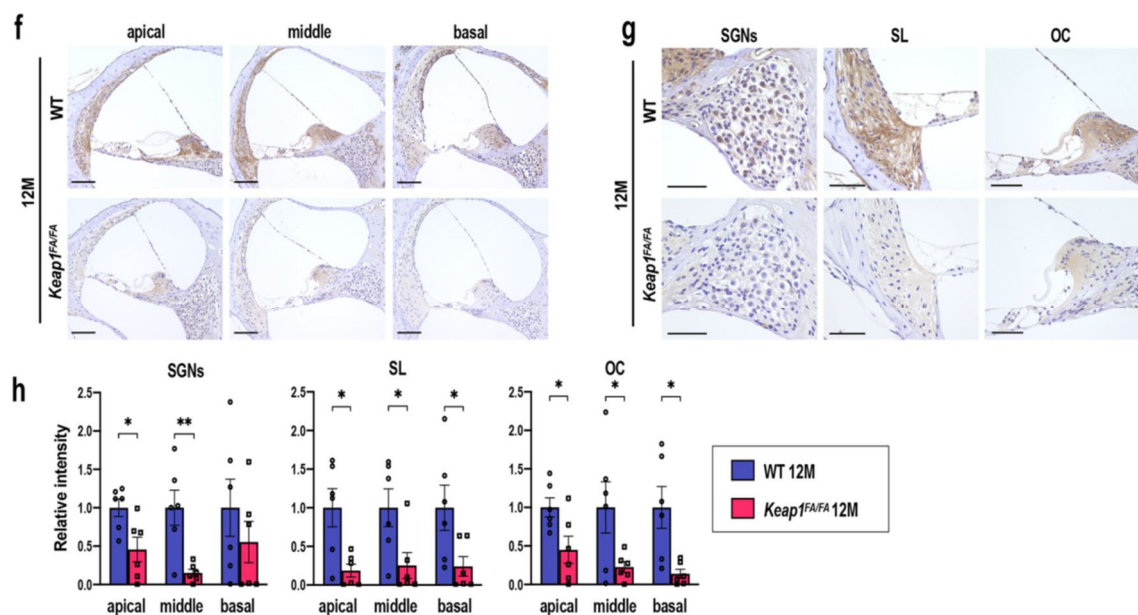


図3 12カ月齢における野生型(WT)とKeap1 ノックダウンマウスにおける脂質過酸化マーカー(4-HNE)の免疫組織化学所見。

(図1~3は、Oishi T, et al. Aging Mech Dis. 2020 に掲載)

(4) 正常および Nrf2 の発現を抑えたマウスに対する運動負荷実験

トレッドミルを用いて6～11週齢のマウスに運動負荷をかける実験を計画しているが、とくに Nrf2 の発現を抑えたマウスにおいて運動に対する耐性が少なく、至適な運動負荷量を決定出来ていない。引き続き運動負荷の方法を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Oishi Tetsuya, Matsumaru Daisuke, Ota Nao, Kitamura Hiroshi, Zhang Tianxiang, Honkura Yohei, Katori Yukio, Motohashi Hozumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Activation of the NRF2 pathway in Keap1-knockdown mice attenuates progression of age-related hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Aging and Mechanisms of Disease	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41514-020-00053-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Honkura Y, Suzuki J, Sakayori N, Inada H, Kawase T, Katori Y, Osumi N	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Effects of enriched endogenous omega-3 fatty acids on age-related hearing loss in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC research notes	6. 最初と最後の頁 768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-019-4809-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jun Suzuki, Hitoshi Inada, Chul Han, Mi-Jung Kim, Ryuichi Kimura, Yusuke Takata, Yohei Honkura, Yuji Owada, Tetsuaki Kawase, Yukio Katori, Shinichi Someya, Noriko Osumi	4. 巻 158
2. 論文標題 "Passenger gene" problem in transgenic C57BL/6 mice used in hearing research.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 6-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.10.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yohei Honkura, Shogo Hayashi, Ji Hyun Kim, Gen Murakami, Hiroshi Abe, Jose Francisco Rodriguez-Vazquez, Yukio Katori	4. 巻 133
2. 論文標題 Development and growth of auricular cartilage and muscles: A study using human fetuses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of pediatric otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 109973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijporl.2020.109973.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Rodriguez-Vazquez JF, Yamamoto M, Kim JH, Jin ZW, Katori Y, Murakami G.	4. 巻 237(1)
2. 論文標題 The incudopetrosal joint of the human middle ear: a transient morphology in fetuses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Anat.	6. 最初と最後の頁 176-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13181.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 本蔵陽平	4. 巻 266
2. 論文標題 老化と聴力障害 酸化ストレスによる内耳障害予防に対する転写因子NRF2の役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 588-591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本蔵 陽平
2. 発表標題 騒音性難聴の発症とその予防に対する、転写因子NRF2の機能の解明
3. 学会等名 第29回日本耳科学会ネクストジェネレーションセッション
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 淳
2. 発表標題 “ Hidden hearing loss ” の治療法開発にむけて
3. 学会等名 第29回日本耳科学会ネクストジェネレーションセッション
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本蔵陽平、大石哲也、川瀬哲明、香取幸夫
2. 発表標題 転写因子NRF2の抗酸化能による加齢性難聴の予防効果の解明
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本蔵陽平
2. 発表標題 抗酸化作用およびミトコンドリア機能に着目した難聴予防法の検討
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永富 良一 (NAGATOMI RYOUICHI) (20208028)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	本蔵 陽平 (HONKURA YOHEI) (20810146)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	池田 怜吉 (IKEDA RYOUKICHI) (30645742)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川瀬 哲明 (KAWASE TETSUAKI) (50169728)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	鈴木 淳 (SUZUKI JUN) (80735895)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関