

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890231

研究課題名(和文)小胞体ストレスと加齢性難聴(病態別検討)

研究課題名(英文)ER stress and presbycusis

研究代表者

大石 直樹(Oishi, Naoki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10348740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性難聴の病態を、有毛細胞が障害される感覚細胞障害型と、らせん神経節細胞死による神経障害型モデルに分け解析した。それぞれのモデル動物に対して、小胞体ストレスをブロックする薬剤TUDCAを長期投与した。その結果、感覚細胞障害型モデルではTUDCAの治療効果は認められなかった。一方、神経障害型モデルでは、TUDCA投与により難聴の進行が統計学的に有意に抑制される傾向を認めた。小胞体ストレスの予防が加齢性難聴の進行を抑制させる可能性について、意義のある結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We tried to treat presbycusis by giving an ER stress-blocker, TUDCA, to different two types of mice. Presbycusis in one type of mice is promoted by progressive loss of auditory hair cells, which was not able to be attenuated by administration of TUDCA. On the other hand, presbycusis in the other type of mice which is promoted partly by loss of spiral ganglion cells was statistically significantly prevented by long-term continuous administration of TUDCA. The results were suggestive of future possibility of attenuating presbycusis by reducing ER stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳生化学 加齢性難聴 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

WHO の世界疾病調査では難聴は高有病率三大疾病の一つであり (Global Burden of Disease 2004)、その中で加齢性難聴は難聴を来す主要な原因疾患である。加齢性難聴の発症機序は、これまで主として酸化ストレスとそれに伴うミトコンドリア障害が原因であるとする仮説 (Neurobiol Aging, 2007) が支持されているが、酸化ストレスを軽減させる抗酸化剤の投与は加齢性難聴に対する治療効果がなく (Neurobiol Aging, 2012)、他の病態生理の解明が渴望されていた。

小胞体ストレスは、異常たんぱくが小胞体に蓄積することで細胞死を引き起こす、生体にとって致命的ストレスの一種である。小胞体ストレスによる異常たんぱく質の細胞内蓄積が、生体の加齢性変化を加速させることが示唆されている (Ageing Research Reviews, 2010)。臨床における小胞体ストレスと難聴との関連では、小胞体の膜たんぱく質が先天的に異常を来す Wolfram syndrome の患者に進行性難聴が生じることから、小胞体ストレスが難聴を起こし得ることが示唆されている。

研究代表者は、他の難聴モデル (薬剤性難聴、音響性難聴) において小胞体ストレスが蝸牛の病態生理に關与することを明らかにしてきた。さらには、小胞体ストレスを特異的に惹起する薬剤の蝸牛内直接投与が有毛細胞死を引き起こすことが近年示された (J Pharmacol Sci, 2012)。

これらの知見の蓄積から、加齢性難聴の病態生理に小胞体ストレスが關与する可能性が十分に考えられた。加齢性難聴は、ヒト側頭骨病理組織に応じて4病型に分類されている (Schuknecht)。そのため、加齢性難聴の発症には複数の病態が關与していることが容易に想像でき、動物モデルにおいても複数の加齢性難聴モデルを用いた解析が望ましいと考えた。

2. 研究の目的

加齢性難聴の病態生理における小胞体ストレスの關与について、加齢性難聴の病態別に検討することを目的とした。加齢性難聴は、ヒト側頭骨病理組織に応じて4病型に分類されている (Schuknecht)。本研究では、2つの病型、すなわち感覚細胞型難聴 (sensory presbycusis; 蝸牛コルチ器の有毛細胞死による加齢性難聴) と神経障害型難聴 (neural presbycusis; 蝸牛ラセン神経節細胞死による加齢性難聴) に着目した。

3. 研究の方法

(1) 感覚細胞障害型 (sensory presbycusis) モデルにおける小胞体ストレス

DBA/2j マウスは、第8週齢という早期から進行性難聴を来す加齢性難聴モデルマウスであり、有毛細胞特異的なたんぱく質カドヘリンの発現に欠損があるために、sensory

presbycusis のよいモデルとして用いられている (Brain Research, 2008)。

内因性胆汁酸 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) は、小胞体ストレスを軽減させることが知られており、マウスに対する長期投与の安全性が確立している (Neuroscience, 2001)。そして研究代表者は、TUDCA が薬剤性難聴を軽減させることを示すことで (Oishi et al, 2012 ARO Meeting)、マウス蝸牛における小胞体ストレスを軽減させる治療法としての TUDCA の使用法を確立した。そのため、DBA/2j マウスに対して TUDCA を長期間投与することによって、sensory presbycusis (加齢性の有毛細胞死) における小胞体ストレスの關与の有無を証明することができると考えた。

具体的には、DBA/2j マウス (3週齢、雄) を購入し、4週齢における聴力 (Auditory Brain Response (ABR) にて 8 kHz, 16 kHz, 32 kHz の3周波数) を測定した。その後、TUDCA 投与群、溶媒 (NaHCO₃) 投与群に群分けし、3日に一回の腹腔内投与を行った (Neuroscience, 2001)。

過去の報告では、DBA/2j マウスは8週齢から難聴が進行し、8 kHz では32週齢、16 kHz では24週齢、32 kHz では16週齢にて聴力が完全に失われる (Brain Research, 2008)。したがって、4週齢から32週齢までの28週間、TUDCA の長期投与を継続し、4週間ごとに ABR にて聴力の評価を行うことを計画した。

(2) 神経障害型加齢性難聴 (neural presbycusis) モデルにおける小胞体ストレス

CBA/J マウスは、18か月齢より中～高音域にかけて難聴を生じ始め、その寿命である26か月齢ころまで進行性難聴を来す (Hearing Research, 2008)。高齢になって進行性難聴を来すために、より生理的な加齢性難聴に近いと考えられ、また18か月齢あたりではらせん神経節細胞の有意な消失が有毛細胞死に先行してみられることから、neural presbycusis のモデルとして有用と考えられている。そのため、CBA/J マウスに対して TUDCA を長期間投与することによって、neural presbycusis (加齢性のらせん神経節細胞死) における小胞体ストレスの關与の有無を証明することができると考えた。

具体的には、CBA/J マウス (11週齢、雄) を購入し、12週齢における ABR を上記3周波数において測定した。その後、(1) と同様の方法で TUDCA 投与群、溶媒投与群、生食投与群、無処置群に4群間にわけたマウスに対して、3日に一回の腹腔内投与を行った。そして、ABR による聴力評価を、6 - 8週間に一度行った。

4. 研究成果

(1) 感覚細胞障害型 (sensory presbycusis)

モデルにおける小胞体ストレス

DBA/2j マウスを3週齢で購入し、4週齢でABRによる聴力評価を行った。その結果、すでに4週齢の時点で、3.2 kHzの高音域は高度難聴を呈しており、1.6 kHzの中音域でも中等度の閾値上昇がみられていた。8 kHzの低音域の聴力は保たれていた。

ABR測定後、TUDCAの3日に1回の腹腔内投与を開始した。1ヶ月の投与継続後、8週齢の時点で再度ABR測定を行った。その結果、TUDCA投与群・溶媒(NaHCO₃)のみ投与群・無処置のコントロール群のいずれにおいても、1.6 kHzの中音域でも高度難聴を呈しており、TUDCAによる聴力保護効果はみられなかった。

さらにその後1ヶ月投薬を継続し、12週齢の時点でABR測定を行った。その結果、上記の3群いずれにおいても、3.2 kHzの高音域はscale outとなり、1.6 kHzの中音域は高度難聴、8 kHzの低音域は中等度難聴を呈しており、やはりTUDCAによる聴力保護効果はみられなかった。

当初はより長期の投薬を予定していたが、文献上で報告されているよりもDBA/2jマウスの加齢性聴力低下の速度が早く、またTUDCAによる聴力保護効果がまったくみられなかったことから、12週齢にて投薬を中止とした。

その後、各群のマウスから内耳を摘出し、有毛細胞およびらせん神経節細胞の形態学的評価を行った。その結果、やはり3群間で有意な差を認めることはできず、組織学的にもTUDCA投与の影響はみられなかった。

まとめると、機能的および組織学的に、DBA/2jマウスに対する小胞体ストレスのブロックは内耳保護効果を有していなかった。この結果は、小胞体ストレスと加齢性の有毛細胞死との関連がないことを示唆しているとも解釈できるが、一方でDBA/2jマウスの加齢性変化は通常の生理的な加齢性変化に比べてはるかに速く、生理的な加齢性変化を反映していない可能性が考えられる。早期に加齢性変化を来すモデルマウスは、加齢のメカニズムの解明に有用ではあるが、その結果の解釈には一定の慎重さが求められると考えられた。

(2) 神経障害型加齢性難聴 (neural presbycusis) モデルにおける小胞体ストレス

CBA/Jマウスを11週齢で購入し、12週齢でABRによる聴力評価を行った。12週齢ではすべてのマウスの聴力が8 kHz, 1.6 kHz, 3.2 kHzで保たれており、正常聴力であることを確認した。

その後、上記(1)と同様に、TUDCAの腹腔内投与を3日に1回の頻度で継続した。投薬6週間後(生後18週齢)においては、TUDCA投薬群、溶媒のみ投薬群、生食投与群、無処置のControl群のいずれにおいても聴力障害

の進行はなく、また体重増加も順調であった。

投薬3か月後(生後24週齢)においても、同様にすべて群においていずれも聴力障害の進行はなく、体重も増加していた。

投薬4か月半後(生後31週齢)においても、やはり同様にすべての群において聴力・体重増加ともに異常所見はみられなかった。

投薬6か月半後(生後38週齢)においても、やはり同様にすべての群において聴力・体重増加ともに異常所見はみられなかったが、残念ながらTUDCA投薬群において半数のマウスが、ABR測定後に死亡してしまい、その後の統計学的パワーが劣る形となってしまった。死亡したマウスの内耳を摘出し、組織学的な検索を行ったところ、有毛細胞およびらせん神経節細胞ともに細胞減少はみられず、TUDCAの長期投与による内耳毒性はみられないことの再確認ができた。

投薬8か月半(生後45週齢)においては、TUDCA投与群に比べて、Control群では、中高音域における聴力低下の進行がみられる傾向が確認されたが($p=0.10$ 程度)、統計学的に有意な聴力差ではなかった。

投薬10か月(生後52週齢)においては、TUDCA投与群に比べて、溶媒のみ投与群では、やはり中高音域における聴力低下の進行がみられる傾向が確認されたが($p<0.10$)、統計学的に有意な聴力差ではなかった。

その後さらに継続してTUDCA投与を行い、投薬14か月(生後69週齢)において、TUDCA投与群と溶媒のみ投与群を比較すると、低・中音域において統計学的に有意に($p<0.05$) TUDCA投与群の聴力閾値上昇が抑制されており、また高音域でもTUDCA投与群の聴力閾値上昇が抑制される傾向がみられた($p=0.07$)。また、TUDCA投与群とControl群との比較においても、低・中音域において統計学的に有意に($p<0.05$) TUDCA投与群の聴力閾値上昇が抑制されており、高音域でもTUDCA投与群の聴力閾値上昇が抑制される傾向がみられた($p=0.10$)。

これらの結果から、小胞体ストレスをブロックする薬剤であるTUDCAの長期投与が、生理的な加齢性難聴モデルであるCBA/Jマウスの加齢性難聴の進行を抑制させる可能性が示唆された。

現在までに、加齢性難聴の進行を抑制させる可能性のある方法としてカロリー制限の有効性が示唆されているが、未だかつて薬剤投与による加齢性難聴の抑制の報告はみられず、世界で初めての実験結果が得られた。加齢性難聴は難聴を来す主要な原因であるという事実を考えると、この実験結果は実地臨床に対して極めて大きなインパクトを有すると考えられる。

今後は、実験で用いたマウス群の組織学的な検討が必須であるが、現在、組織学的な観察を行う最適の時期を検討中であり、引き続き投与を継続している。今後、投与終了時にABR測定を行い、かつ有毛細胞数カウン

ト・らせん神経節細胞数カウント、および中枢（脳幹・聴覚野）における神経栄養因子や小胞体ストレス特異的マーカーの染色などを施行することにより、組織学的な裏付けを行い、実験を終了させる予定である。

さらには、将来的にはマウス以外の他の動物種における検討を行うとともに、UDCA は実際に臨床の現場で用いられている薬剤であり、トランスレーショナルリサーチへの応用を検討していきたい。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 1 件)

大石 直樹: Endoplasmic reticulum stress in aminoglycoside ototoxicity、日本耳科学会、2012年10月、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大石 直樹 (Oishi Naoki)

慶應義塾大学医学部・耳鼻咽喉科・専任講師

研究者番号：10348740

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし