

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462557

研究課題名(和文)加齢性難聴におけるIGF1情報伝達系の役割

研究課題名(英文)Roles of IGF1 signaling in age-related hearing impairment

研究代表者

中川 隆之(Nakagawa, Takayuki)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50335270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、加齢性難聴発症におけるIGF-1シグナル伝達経路の役割を解析し、加齢性難聴防止に関連する創薬研究の基盤形成を行うことを目的として以下の研究を行った。加齢性難聴の発症時期、メカニズムが異なる3系統のマウスを用い、それぞれの系統で加齢性難聴発症直前の蝸牛組織変性が進んでいない時期を生理学的、形態学的処方で同定し、その週齢でのIGF-1シグナル伝達経路関連分子の発現の変化を適量のPCRにて解析した。結果、3系統のマウスで目的とする週齢を同定し、3系統のうちC57BL6において、加齢性難聴発症前、発症後IGF-1シグナル伝達経路関連分子の発現変化を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated roles of IGF-1 signaling in the onset of age-related hearing impairment aiming drug development for age-related hearing impairment. We analyzed ages of the onset of age-related hearing impairment in three mouse strains, which have different mechanisms and timing for age-related hearing impairment by means of physiological and morphological assessments. Thereafter, changes in mRNA levels of IGF-1 signaling associated molecules just before the onset of age-related hearing impairment were examined using q-PCR. As results, we determined ages when age-related hearing impairment appear in three strains, and identified changing expression patterns of molecules associated with IGF-1 signaling at the onset of age-related hearing impairment in C57BL6 mice.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 加齢性難聴 インスリン様細胞増殖因子1 感音難聴

## 1. 研究開始当初の背景

### IGF1 とは

IGF1 は主として成長ホルモンの刺激により肝臓で分泌される endocrine として人体のほとんどの細胞に作用するが、autocrine や paracrine として局所因子としても働く。インスリンと同様に糖代謝を中心としてエネルギー代謝系制御を行うが、IGF1 情報伝達系は、特に神経系では発達において非常に重要な働きをすることが知られている [Fernandez & Torres-Alemán, 2012; Bondy & Cheng, 2004]。また、小人症や糖代謝異常に対する治療薬として臨床で使用されている。

### IGF1 と老化

IGF1 は、全身の細胞の発生、成長において不可欠な因子であるが、近年老化、特に寿命との関連性が注目されている [Brown-Borg & Bartke, 2012]。個体レベルおよび細胞レベルでの加齢との関連性が報告されている。さらに、IGF1 はオートファジーやレドックス制御などの老化と関連する情報伝達系とも密接な関係を持つことが明らかにされつつあり [Fei et al., 2013; Renna et al., 2013]、老化現象における重要な因子と位置づけられ、注目されている。

### IGF1 と内耳発生

IGF1 は内耳発生においても重要な役割を果たす。IGF1 欠損マウスは難聴を呈し、組織学的にはラセン神経節低形成と有毛細胞とのシナプス結合欠損が特徴的所見とされている [Murillo-Cuesta et al., 2011]。一方、分担研究者である岡野らは、IGF1 受容体欠損マウスの解析を行い、蝸牛感覚上皮の発達にも IGF1 シグナルが不可欠であることを示している [Okano et al., 2011]。また、多能性幹細胞から内耳有毛細胞への分化誘導においても IGF1 は不可欠な因子であり [Oshima et al., 2010]、IGF1 は内耳発生と密接な関係を有する因子である。

### IGF1 と感音難聴治療

IGF1 は神経系のシナプス可塑性や神経突起伸長作用だけではなく、細胞死の抑制など恒常性維持にも関係することが知られており、特にアルツハイマー病の治療薬としての可能性が注目されている。IGF1 は内耳発生、恒常性維持に必要な因子であることから、感音難聴治療への応用が期待されていたが、IGF1 などの細胞増殖因子を作用させるためには、適切な期間、適切な量を内耳に供給する必要があり、この問題を解決する必要があった。われわれはこの問題を解決する手段として、ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳ドラッグデリバリーシステムを開発し [Endo et al., 2005]、蝸牛に約 1 週間 IGF1 を徐放することに成功した [Lee et al., 2007]。IGF1 のゼラチンハイドロゲルによる徐放は、音響外傷や内耳虚血による感音難聴からの聴力回復を促進することが判明した [Iwai et al., 2006; Lee et al., 2007; Fujiwara et al., 2008]。この結果にもとづき、ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 内耳投与の突発性難聴に対する臨床試験を施行し、安全性と有効性を示す結果が得られ [Nakagawa et al., 2010]、現在、多施設共同研究によるランダム化対照試験を完了し、統計学的解析を施行中の段階にある。並行して、作用メカニズムに関する基礎的研究を進め、IGF1 による蝸牛有毛細胞保護における IGF1 細胞内情報伝達系の活性化とその下流分子を同定することができた [Hayashi et al., 2013]。また、臨床試験における聴力像の解析から、IGF1 による聴力回復が非常にゆっくりとした時間経過で出現し、再生的機序が働いていることが推測された [Nakagawa et al., 2012]。最近、加齢性難聴における最初の組織学的変化であることが示されているラセン神経節細胞と内耳有毛細胞間シナプス変性に着目し [Sergeyenko et al., 2013]、独自に開発した蝸牛スライス培養を用い、IGF1 がラセン神経節細胞と内

有毛細胞間シナプス再生誘導効果を持つことを示唆する所見を認めた。以上の学術的背景から、IGF1 は加齢による蝸牛変性過程においても重要な役割を果たしていることが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、加齢性難聴における IGF1 の役割を解明し、細胞老化に関連する情報伝達系と IGF1 情報伝達系の関係を明確にすることにより、加齢性難聴の予防・治療に関連する知見を蓄積することを目的とする。

具体的には、蝸牛加齢変性に伴う IGF1 およびその受容体関連分子の発現変化、IGF1 情報伝達系変化の加齢性難聴に与える影響、蝸牛における IGF1 情報伝達系とオートファジーなど細胞老化関連情報伝達系との関連性を明らかにすることにより、蝸牛老化機構における IGF1 情報伝達系の役割を解明し、これらの結果にもとづき、候補分子の加齢性難聴防止効果を検証し、加齢性難聴に対する新規治療法開発の基盤を形成する。IGF1 情報伝達系の下流にあるとされている分子として、エネルギー代謝に関連する GSK3、オートファジーに関連する mTORC1、Fxo01、3 の発現変化に着目した。

## 3. 研究の方法

### 1) 加齢性難聴モデルマウス解析

加齢に伴う聴力低下の経過が異なる 3 系統のマウス、CBA/J マウス、C57BL6 マウス、DBA マウスを用いる。これらの系統では、加齢性難聴発症のメカニズムが異なり、発症する時期が極端に異なる。それぞれの系統において、聴性脳幹反応および誘発耳音響反射を用いて、聴覚機能の変化を観察し、加齢に伴う感音難聴発症時期を推定し、組織学的解析を行い、蝸牛において明らかな細胞数の減少、特に有毛細胞減少が起こる前の週齢を特定した。

C57BL6 マウス、DBA マウスでは、加齢に伴う感音難聴発症の直前に相当し、明らかな有毛細胞減少が起こっていない時期、加齢性難聴発症早期、正常聴力が維持されている時期の 3 つのタイミング、CBA/J マウスでは、加齢に伴う感音難聴発症の直前に相当し、明らかな有毛細胞減少が起こっていない時期、正常聴力が維持されている時期の 2 つのタイミングで内耳組織を採取し、IGF1、同受容体、GSK3、mTORC1、Fxo01、3 の mRNA 発現量の変化を定量的 PCR で解析した。内部コントロールとして、36B4 および GAPDH の mRNA 発現量を用いた。内部コントロールに対する相対的 mRNA 発現量を正常聴力期と比較検討した。統計学的解析は、unpaired t-test を用いた。

### 2) 器官培養系を用いた IGF1 機能阻害実験系の確立

生後 1-3 日目のマウス蝸牛器官培養を用い、各種 IGF1 阻害薬の蝸牛組織に対する毒性評価を行った。マウス蝸牛感覚上皮摘出後、24 時間維持培養を行った後に、3 段階の濃度設定で IGF1 阻害薬を添加し、24 時間後の有毛細胞形態、ラセン神経節求心性線維形態および終末におけるシナプス数を評価した。次に、IGF1 のシナプス再生効果を用いて、IGF1 に対する阻害効果を検証した。

## 4. 研究成果

### 1) 加齢性難聴モデルマウス解析

C57BL6 マウス 20 匹を用いた聴性脳幹反応および誘発耳音響放射を用いた機能解析から、C57BL6 マウスでは、25 週齢を超えると聴性脳幹反応閾値上昇および誘発耳音響放射反応低下が認められる個体が認められ始め、32 週齢を過ぎると、統計学的に有意な聴性脳幹反応閾値上昇が認められることが分かった。対照は、12 匹の 6 週齢を用いた。誘発耳音響放射反応では、20 週齢までは 6 週齢と同等の反応が維持されていることが分かった。

これらの結果に基づき、6 週齢、20 週齢、32 週齢の蝸牛の低、中、高音域における内、外有毛細胞数の適量的評価を行った。結果、内、外有毛細胞ともに、20 週齢では6 週齢と同等の有毛細胞数が維持されており、32 週齢では有意の減少が認められることが分かった。ただし、32 週齢においても、高音域の外有毛細胞以外は、80%以上の細胞数は保持されており、高音域の外有毛細胞数のみ 50%程度の減少が認められた。

定量的 PCR 解析では、内耳における igf1 mRNA は、20 週齢では維持されているが、32 週齢では有意に減少しており、内耳局所における IGF1 パラクラインあるいはオートクライン能力が加齢性難聴発症後に低下していることが示唆された。一方、受容体に関しては、20 週齢から低下する傾向が認められた。IGF1 シグナルの下流分子については、年齢と共に低下する傾向が認められた。GSK3、mTORC1、Fxo01、3の間には、減少パターンに違いが認められたので、サンプル数を増やし、下流分子の動きの違いを明確にしたいと考えている。

これらの結果は、先行する加齢と IGF1 の関係に矛盾しないものであり、IGF1 関連分子が加齢性難聴と関与することを支持するものといえる。

DBA マウスでは、極めて早期に難聴が進行する。8 週齢では、すでに感音難聴が発症していることから、3、4、5、6 週齢での聴力変化を聴性脳幹反応および誘発耳音響放射反応で評価した。結果、5-6 週齢では、聴性脳幹反応、誘発耳音響放射とともに明らかな難聴を呈していることが分かった。一方、3、4 週齢間では大きな差異は認められなかった。この結果から、3、4、6 週齢での組織学的解析を行い、定量的 PCR を現在施行中である。

CBA/J マウスでは、64 週齢まで聴性脳幹反応および誘発耳音響放射による機能評価が完了しているが、過去の報告に比較して、聴

覚機能の維持は良好であり、高音域でのみ聴性脳幹反応閾値上昇が認められていた。この時期を加齢性難聴発症前時期と仮定し、蝸牛の組織学的解析を施行した。結果、内、外有毛細胞数はすべての領域で良好に保たれていることが分かった。現在、定量的 PCR 解析を施行中の段階にある。

## 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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

Nakagawa T, Kumakawa K, Usami S, Hato N, Tabuchi K, Takahashi M, Fujiwara K, Sasaki A, Komune S, Sakamoto T, Hiraumi H, Yamamoto N, Tanaka S, Tada H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ito-Ihara T, Ikeda T, Shimizu A, Tabata Y, Ito J. A randomized controlled clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. BMC Med 12:219, 2014.

Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Application of insulin-like growth factor 1 in the treatment of inner ear disorders. Frontiers in Pharmacology 5:208, 2014.

Nakagawa T, Strategies for developing novel therapeutics for sensorineural hearing loss. Frontiers in Pharmacology 5:206, 2014.

Yamahara K, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Insulin-like growth factor 1: A novel treatment for the protection or regeneration of cochlear hair cells. Hear Res ; 330, pp. 2-9, 2015.

Nakagawa T, Yamamoto M, Kumakawa K, Usami S, Hato N, Tabuchi K, Takahashi M, Fujiwara K, Sasaki A, Komune S, Yamamoto N, Hiraumi H, Sakamoto T, Shimizu A, Ito J. Prognostic impact of salvage treatment on hearing recovery in patients with sudden sensorineural hearing loss refractory to systemic corticosteroids: a retrospective observational study. Auris Nasus Larynx 43(5):489-94, 2016.

Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Omori K, Ito J. Activation of IGF1 signaling in the cochlea induces the transcription of its mediators during the protection of cochlear hair cells against aminoglycoside. Otol Neurotol. 38 (2), pp. 278-282, 2016.

Yamahara K, Nakagawa T, Ito J, Kinoshita K, Omori K, Yamamoto N. Netrin 1 mediates protective effects exerted by insulin-like growth

factor 1 on cochlear hair cells. Neuropharmacology 119: 26-39, 2017.

〔学会発表〕(計 12 件)

Nakagawa T. Topical IGF-1 therapy using a gelatin hydrogel: pre-clinical study, clinical trials, and mechanisms. 51st Inner Ear Biology Workshop, Sheffield, UK. 2014.8.30-9.2.

Nakagawa T., Kumakawa K, Usami S, Hato N, Tabuchi K, Takahashi M, Fujiwara K, Sasaki A, Komune S, Sakamoto T, Hiraumi H, Yamamoto N. Tanaka S, Tada H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ito-Ihara T, Ikeda T, Shimizu A, Tabata Y, Ito J. A Randomized Controlled Clinical trial of Topical IGF-1 Therapy via Gelatin Hydrogels for Refractory Sudden Sensorineural Hearing Loss. ARO Baltimore MA USA, 2015.2.21-25.

中川隆之、坂本達則、山本典生、平海晴一、伊藤壽一、佐々木亮、田淵経司、熊川孝三、宇佐美真一、高橋真理子、藤原敬三、羽藤直人、小宗静男 突発性難聴に対するゼラチンハイドロゲルを用いた IGF-1 局所投与の有効性 第 24 回日本耳科学会、新潟、2014. 10.15-18

中川隆之、坂本達則、平海晴一、山本典生、熊川孝三、宇佐美真一、羽藤直人、田淵経司、村上信五、内藤 泰、佐々木亮、小宗静男、伊藤壽一 突発性難聴に対する IGF1 局所投与有効性に関するランダム化対照試験 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会、福岡、2014.5.14-17

中川隆之、坂本達則、平海晴一、山本典生、伊藤壽一 難治性突発性難聴例における 2 次治療の選択を含めた聴力予後関連因子に関する多変量解析 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会 2015/5/20-23 東京

Nakagawa T. Topical IGF-1 therapy as salvage treatment for sudden deafness 30th Politzer Society Meeting 1st World Congress of Otolaryngology (Instruction Course) 2015/7/1-4, Niigata, Japan

中川隆之 組織工学を用いた聴覚再生医療 第 36 回日本炎症・再生医学会 (シンポジウム) 2015/7/21-22 東京

Nakagawa T. Clinical application of IGF-1 for treatment of hearing loss. Ageing, neurodegeneration and hearing loss: an IGF-1 signalling perspective (招待講演) 2015/12/10, Madrid, Spain

Takayuki Nakagawa, Nakarim Asaka, Tomoko Kita, Risa Tona, Norio Yamamoto, Juichi Ito, Koichi Omori Potential of IGF-1 for restoration of synaptic contacts between inner hair cells and spiral ganglion neurons 10<sup>th</sup> International

Tinnitus Research Initiative Conference 2016/3/16-18 Nottingham, UK

Takayuki Nakagawa, Norio Yamamoto, Takayuki Okano, Kohei Yamahara, Juichi Ito, Koichi Omori Topical IGF-1 therapy for sensorineural hearing loss 16th JAPAN KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery 2016/3/29-30 Tokyo, Japan

Takayuki Nakagawa, Kohei Yamahara, Norio Yamamoto, Juichi Ito, Koichi Omori Netrin 1 is a mediator of IGF-1 protective effects on cochlear hair cells 53<sup>rd</sup> Workshop on Inner Ear Biology 2016.9.17-21, Montpellier, France

Takayuki Nakagawa, Kohei Yamahara, Norio Yamamoto, Juichi Ito, Koichi Omori IGF-1 Effects for Hair Cell Protection Against Neomycin is Mediated by Paracrine of Netrin-1 in Supporting Cells 40th Mid-Winter Meeting for Association for Research in Otolaryngology 2017.2.11-15 Baltimore, MD, USA

〔図書〕(計 3 件)

Nakagawa T. Therapeutic targets and possible strategies for regenerative medicine for the inner ear. Regeneration Medicine for the Inner Ear. Ito J. Eds. pp15-22, Springer Japan KK, Tokyo 2014

Nakagawa T. Synaptic contacts between hair cells and primary neurons. Regeneration Medicine for the Inner Ear. Ito J. Eds. pp61-66, Springer Japan KK, Tokyo 2014

Nakagawa T. Afferent dendrite and axon. Regeneration Medicine for the Inner Ear. Ito J. Eds. Pp273-279, Springer Japan KK, Tokyo 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 隆之 (NAKAGAWA, Takayuki)  
京都大学大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 50335270

(2) 研究分担者

山本 典生 (YAMAMOTO, Norio)  
京都大学大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 70378644

(3) 研究分担者

岡野 高之 (OKANO, Takayuki)  
京都大学大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60642931