

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10751

研究課題名(和文)メタボリック症候群における難聴と血管障害の関係について

研究課題名(英文)The relationship between hearing loss and vascular disorders in metabolic syndrome patients

研究代表者

山下 裕司(YAMASHITA, Hiroshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00210419

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)：これまでの研究から、高血糖に伴う難聴者の内耳には血管障害などの形態変化が生じることが知られているが、その原因は明らかにされていない。本研究ではメタボリック症候群モデル動物の内耳を用いた分子生物学的解析を行った。その結果、炎症性サイトカインの発現増加、脂質代謝関連蛋白質、成長因子の発現低下が認められた。さらに、実験動物の内耳組織を高血糖状態で培養することで、糖尿病と内耳組織変化の関係を検討できる実験モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that the morphological changes such as vascular disorder in the inner ear of patients with hearing loss. However, the cause has not been clarified. In this study, molecular biological analysis using the inner ear of metabolic syndrome model animals was performed. As a result, increased expression of inflammatory cytokines, lipid metabolism-related proteins, and decreased expression of growth factors were observed. In addition, we constructed an experimental model that can investigate the relationship between diabetes and inner ear tissue change by culturing the inner ear tissues of experimental animals in hyperglycemic state.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病に代表されるメタボリック症候群患者では、全身の組織が糖化ストレスに曝露されることより、様々な健康障害が生じるとされている。わが国における発症頻度は16-25%とその対象は非常に多い。動脈硬化に代表される血管性病変を通じて、重篤な疾患の原因となるだけでなく、老化を促進することが知られている。内耳においては、糖尿病患者には感音難聴の発症率が高いことが過去の疫学研究で明らかにされている (Miller JJ, et al.1983, Tay HL, et al. 1995)。

これまでの研究から、高血糖に伴う難聴者の内耳では感覚細胞障害、らせん神経節細胞障害、血管条の萎縮といった形態の変化が原因であることが知られている (Kakarlapudi V, et al.2003)。しかし、これらの組織的变化を生じる原因は明らかにされていない。我々はメタボリック症候群モデルマウス TSOD を解析することで、このマウスに加齢に伴う難聴が出現することを明らかにした。さらに、組織学的には内耳の微細血管の狭小化が生じ、その後に感覚細胞や神経節細胞が障害されることを、報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、高血糖状態における内耳での変化を、解明することを目的とした。

そのためにはメタボリック症候群モデルマウス TSOD と対象動物の内耳における遺伝子発現について、網羅的に解析する。さらに、内耳組織を高血糖状態で培養することで生じる変化について検討する。

3. 研究の方法

(1)内耳における遺伝子発現

TSOD (メタボリック症候群モデルマウス)、TSNO (TSOD のコントロール動物)の側頭骨を、深麻酔下に摘出した。氷上で解剖を行い、内耳組織を摘出し、mRNA を抽出、 -80°C で保存した。左右2個で1検体としてRNeasy® Plus Universal Mini Kit を用いて mRNA を抽出した。逆転写で cDNA を作成し、Affimetrix GeneChip®を用いて mRNA の遺伝子発現を検討した。

(2)高血糖状態における培養組織の変化

メタボリック症候群モデル動物の内耳について、in vitro モデルを作成する目的で、高糖濃度培地を用いた内耳器官培養系の確立を目指す。具体的には、卵形囊培養は過去に報告した方法 (Sugahara et al, 2006) で CO2 インキュベーター内で行うが、培地を変更することで、メタボリック症候群に類似した環境を、網膜神経節細胞の培養で行われている方法 (Shanab AY et al, 2012) を参考に作成する。高糖濃度培地 (通常培地に

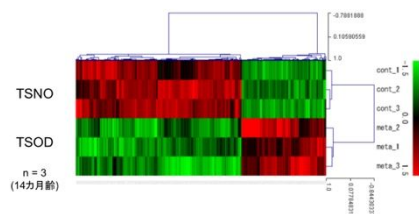
D-glucose (45 mM) 等を追加) したもので内耳組織を培養、24 時間後に固定、免疫組織化学 (抗カルモデュリン抗体) を行い、有毛細胞の残存率を評価した。高糖濃度の程度を変えることで、有毛細胞障害の程度を検討し、内耳高糖濃度培養系を作成した。

4. 研究成果

(1)内耳における遺伝子発現

TSOD マウスと TSNO マウスの2群間において内耳の遺伝子発現の比較統計解析を行った。解析対象となる遺伝子数は28944 であるが、 $P < 0.01$ の条件を通過し、発現比 $> 1.5 (= \text{Log}_2 \text{ ratio} > 0.585)$ および発現比 $< 0.66 (= \text{Log}_2 \text{ ratio} < 0.585)$ の条件を通過する遺伝子数は521 であった。遺伝子の階層型クラスタリングを Pearson 相関係数に基づき実施し、Z-scale 化後の発現値を反映した HeatMap 画像を作成した。TSOD マウスにおいて176 遺伝子は発現が上昇しており、345 遺伝子は減少していた。(図1)

図1:内耳の発現変動遺伝子の網羅解析



$P < 0.01$ かつ糖尿病群/Control群における発現比 > 1.5 および発現比 < 0.66 の条件でTSODマウスでは176の遺伝子の発現増加、345の遺伝子の発現低下を認めた。

この中より代表的なものを抽出して検討してみると、IGF-1, FGF-7, FGF-12 等の栄養

図2:内耳の発現変動遺伝子の網羅解析

Transcript_ID	Gene Symbol	Gene ID	Ratio (TSOD vs TSNO)	FC	p-value	Gene
Trophic Factors						
10485559	Igf1	NM 010512	0.71	-1.4	0.0113962	insulin-like growth factor 1
10427125	Igf2	NM 008344	0.67	-1.5	0.00098331	insulin-like growth factor binding protein 6
10309020	Tgfb2	NM 009367	0.77	-1.3	0.00427265	transforming growth factor, beta 2
10468436	Fgf2	NM 010207	0.76	-1.32	0.033036	fibroblast growth factor receptor 2
10379822	Fgf1	NM 010206	0.75	-1.24	0.0358332	fibroblast growth factor receptor 1
10422201	Ctgf	NM 010217	0.71	-1.41	0.0150606	connective tissue growth factor
10475643	Fgf7	NM 009006	0.7	-1.44	0.00638332	fibroblast growth factor 7
10438801	Fgf12	NM 183064	0.62	-1.6	0.047323	fibroblast growth factor 12
Cytokines						
10467588	Illa	NM 010554	1.33	1.33	0.0235061	interleukin 1 alpha
10583529	Icam4	NM 023892	1.46	1.46	0.0215396	intercellular adhesion molecule 4
Lipid metabolism						
10585699	Fabp5	NM 010624	2.04	2.04	0.0482949	fatty acid binding protein 5, epididymal
10588614	Fabp3	NM 010174	0.76	-1.31	0.019617	fatty acid binding protein 3, muscle and heart

因子と呼ばれる分子やその受容体の発現が減少していた。IL-1等の炎症性サイトカインの発現は増加していた。非常に多くの遺伝子発現が変化していることから、これらの分子を詳細に検討することで、今後、糖尿病患者に多い難聴の原因解明に繋がる可能性があると考えた。

(2)高血糖状態における培養組織の変化

様々な濃度のブドウ糖を添加した培地にお

いて、マウス内耳組織（摘出卵形嚢）を培養した。組織学的に有毛細胞の生存について検討したが、24時間の培養期間では大きな変化が認められなかった。今回の研究期間内では十分条件設定ができなかったが、培養期間を延長することで、有用な研究モデルにできる可能性があると考えた。

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)

Yosuke Takemoto, Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Hirotaka Hara, Hiroshi Yamashita. Protective effect of an astaxanthin nanoemulsion against neomycin-induced hair-cell damage in zebrafish. *Auris Nasus Larynx*.45 : 20-25, 2018.
DOI: 10.1016/j.anl.2017.02.001 (査読有)

Shinpei Nagato, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Yosuke Takemoto, Makoto Hashimoto, Hironori Fujii, Hiroshi Yamashita. Oral administration of geranylgeranylacetone to protect vestibular hair cells. *Auris Nasus Larynx*.45 : 412-416, 2018.
DOI: 10.1016/j.anl.2017.07.006 (査読有)

菅原一真, 山下裕司. 生活習慣と耳鼻咽喉科疾患 血糖異常. *JOHNS*.33(8) : 963-966, 2017. (査読無)

菅原一真, 山下裕司. 抗加齢医学の観点から見た老人性難聴. *ENTONI*.(211) : 44-48, 2017. (査読無)

Junko Tsuda, Kazuma Sugahara, Takeshi Hori, Eiju Kanagawa, Eiichi Takaki, Mitsuaki Fujimoto, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Oto-Laryngologica*.136 : 1097-1106, 2016.
DOI: 10.1080/00016489.2016.1195012 (査読有)

Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Eiju Kanagawa, Yosuke Takemoto, Makoto Hashimoto, Hiroshi Yamashita. Quercetin protects against hair cell loss in the zebrafish lateral line and guinea pig cochlea. *Hearing Research*.342 : 80-85, 2016.
DOI: 10.1016/j.heares.2016.10.001 (査読有)

山下裕司, 菅原一真. 感覚器の老化と抗加齢医学. *日本耳鼻咽喉科学会会報*.119(6) : 840-845, 2016. (査読無)

〔学会発表〕(計 8 件)

Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Yosuke Takemoto, Shunsuke Tarumoto, Hiroshi Yamashita : Expression of advanced glycation end-product in the cochlea of metabolic syndrome model mice. 41st ARO Annual MidWinter Meeting. San Diego (USA) 2018.2.10

菅原一真, 津田潤子, 広瀬敬信, 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウス内耳における終末糖化産物の生成 第27回日本耳科学会総会・学術講演会 横浜 2017.11.22

菅原一真, 津田潤子, 橋本 誠, 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウスの内耳における終末糖化産物の生成について 第62回日本聴覚医学会総会・学術講演会 福岡 2017.10.19

Hiroshi Yamashita : The Otoprotection Against the Metabolic Syndrome Related to Aging.12th Oto-neurotology symposium. Seoul (Korea) 2017.9.8 (特別講演)

菅原一真, 津田潤子, 堀 健志, 広瀬敬信, 原 浩貴, 山下裕司 : メタボリック症候群モデル動物におけるAGE産生と難聴について 第17回日本抗加齢医学会総会 東京 2017.6.2

Kazuma Sugahara, Junko Tsuda, Takeshi Hori, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Hiroshi Yamashita : Effect of pyridoxamine on the hearing function in the mouse model of metabolic syndrome. 40th ARO Annual MidWinter Meeting. Baltimore (USA) 2017.2.11

菅原一真, 津田潤子, 広瀬敬信, 竹本洋介, 樽本俊介, 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウスにおける難聴予防の試み 第26回日本耳科学会総会・学術講演会 長野 2016.10.6 (全国学会・シンポジスト)

Kazuma Sugahara, Junko Tsuda, Takeshi Hori, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Hirotaka Hara, Hiroshi Yamashita : Age related hearing loss in the mouse model of metabolic syndrome. The 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Tokyo 2016.3.28

〔図書〕(計 3 件)

菅原一真, 山下裕司. 機能性表示食品
DATA BOOK【第3版】. メディカルレビュー
社.307(238-243), 2017.12.

山下裕司, 野村恭也. 第1部 聴覚検査の
予備知識 耳の構造と機能. 聴覚検査の実
際. 南山堂 .232(2-10), 2017.2.

菅原一真, 山下裕司. 第1章 「機能性」
って? 「機能性表示食品」って?
耳鼻咽喉科領域. ドクターが教えるあなた
のカラダとサプリメント. メディカルレビ
ュー社. 179(46-51), 2016.9.

〔産業財産権〕
なし

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 裕司 (YAMASHITA, Hiroshi)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00210419

(2) 研究分担者

菅原 一真 (SUGAHARA, Kazuma)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 20346555

廣瀬 敬信 (HIROSE, Yoshinobu)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80555714

下郡 博明 (SHIMOGOORI, Hiroaki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70226273

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし