

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 10 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H03043

研究課題名(和文) マウス加齢性難聴をモデルとした食品成分による老化予防原理の解明

研究課題名(英文) Prevention of aging by food factors modeled on mouse age-related hearing loss

研究代表者

大池 秀明(Oike, Hideaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：30455307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性難聴(耳の老化)の進行や予防に寄与する食生活因子やそのメカニズムを明らかにするため、実験マウスを利用し、ヒトの赤ちゃんの聴力測定にも利用される聴性脳幹反応試験をベースとした研究を実施した。その結果、餌の硬度や栄養成分、摂餌時刻などが長期的な加齢性難聴の進行に影響することが明らかとなった。また、大きな音による一過性の聴覚障害は、ロスマリン酸等の食品成分による軽減が可能であった。さらに、難聴の進行と関連する新規遺伝子も同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は世界有数の高齢化国であり、加齢性疾患への対応が課題となっている。その中でも、QOLを低下させやすい難聴や認知症などの神経系老化に起因する疾患は、根本的な治療法がないことから、機能低下を招く前に予防することが重要である。しかし、これらの疾患の進行や予防の検証には長い年月が必要であり、ヒト試験による知見をベースとした予防食品の開発は進みにくい。そこで、本課題では、動物モデルを利用し、どのような食生活因子が難聴の進行や予防に寄与するのかを明らかとし、また、そのメカニズムの一部を明らかとしたことで、将来の予防食品開発につながる基礎的な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the dietary factors and their mechanisms that contribute to the progression and prevention of age-related hearing loss, we performed a series of experiments using mouse models. It was revealed that the hardness of the diet and the nutritional components influence the progression of long-term age-related hearing loss. In addition, transient hearing loss due to loud noise could be reduced by food components such as rosmarinic acid. We also obtained novel insights into gene expression changes associated with the progression of hearing loss.

研究分野：食品機能学

キーワード：老化 加齢性難聴 マウス 食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴は、動物界に広く共通する老化現象の1つであり、聴覚はヒトの五感の中でも顕著に老化しやすい感覚である。アメリカ国立聴覚・伝達障害研究所 (NIDCD) の調査では、高齢者の半数程度が聴力に問題を抱えていると報告されており[1]、高齢期における QOL 低下の原因として上位に挙げられる。興味深いことに、健全な若者でも、日常生活では利用しない高音域から少しずつ難聴は進行している。例えば、深夜のコンビニや公園でたむろする若者を撃退することで有名になったモスキート音 (17 kHz 程度の超高音) はこれを利用したものであり、通常、20 代程度以下の若者にしか聞こえない。つまり、高音域の聴力測定をすることで、自覚症状が現れる前に、聴覚の老化度 (予防の必要性) を知ることが可能である。

ウィスコンシン大学の研究グループは、マウスを利用して、抗酸化サプリメントによる加齢性難聴予防効果を検討している。カテキンなどのポリフェノール類を含む 16 種類の抗酸化物質について、マウスの食餌に混ぜ、長期摂取試験を行ったところ、CoQ10、 α -リポ酸、N アセチル L シスチンの 3 種類のみが加齢性難聴の進行を遅延させた[2]。これら 3 つの化合物に共通する性質は、ミトコンドリアで機能する抗酸化物質ということである。また、活性酸素除去酵素の 1 つであるカタラーゼをミトコンドリアで過剰発現させたマウスは、やはり、加齢性難聴の進行が抑制された。つまり、ミトコンドリアで産生される活性酸素が加齢性難聴の主要因であり、これを除去することで予防可能であることを示している。さらに、カロリー制限は、様々な老化現象を遅延させ、齧歯類以下では寿命も伸長させることが明らかになっているが、加齢性難聴も遅延させる。長寿遺伝子として知られる Sirtuin ファミリー (NAD⁺依存性脱アセチル化酵素) のミトコンドリア局在型である Sirt3 欠失マウスでは、カロリー制限による加齢性難聴の遅延が起こらず、予防効果に必須な遺伝子であることが明らかになっている[3]。SIRT3 タンパク質の標的は、エネルギー代謝に関連するミトコンドリアタンパク質群であり[4]、代謝制御によってミトコンドリアの活性酸素産生量が低下することで加齢性難聴が抑制される可能性が考えられる。大池は、ウィスコンシン大学で実験手法を習得し、マウス加齢性難聴を 3 ヶ月間で評価する試験系を構築し、加齢性難聴を予防する食品素材を探索した。これまでに、鶏卵、乳酸菌 H61 株など、複数の食品成分や素材の有効性を見出している。

2. 研究の目的

加齢性難聴への対処は補聴器による集音補助が主流であり、根本的な治療法や治療薬、そして予防薬は存在しない。根本治療による改善が望めないことから、予防が重要であるが、現実にヒトでの予防 (とその効果の検証) となると 10 年以上の長い歳月が必要となる。そうすると、薬ではなく日常の食事で予防したいというニーズが増えてくる。そこで、本課題では、数ヶ月の単位で難聴の進行を評価可能なマウス加齢性難聴をモデルとして利用し、食品成分を利用した様々な予防効果を明らかとすることを旨とする。また、遺伝子発現解析等から、その予防標的経路や因子を同定する。加齢性難聴を予防するための複数の標的経路が特定できれば、異なる標的経路に有効な食品成分を組み合わせることにより、相加・相乗効果を期待した食品の設計が可能となる。さらに、同じく神経系である脳 (認知機能) の老化にも適用できる可能性が高く、その検証までを目指す。

3. 研究の方法

(1) 6 ヶ月齢の C57BL/6 マウスの聴力を聴性脳幹反応試験により測定し、8, 16, 32 kHz における聴力閾値を決定。内耳から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR による遺伝子発現解析を実施した。聴力と遺伝子発現の相関解析を行い、聴力の低下と関連する遺伝子を同定した。その一部の遺伝子について、in situ ハイブリダイゼーション法により、内耳組織内における発現局在を解析した。

(2) C57BL/6 マウスに、3 ヶ月齢から 3~6 ヶ月間、餌の形状 (固形、粉末、異なる大きさに破碎した固形) 栄養組成 (普通食、高脂肪食) 給餌時刻 (24 時間、暗期 12 時間) 配置 (ケージ上部、ケージ内部) 等を変えた給餌を行い飼育した。前後に聴性脳幹反応試験による聴力測定を実施し、難聴の進行度を比較した。

(3) C57BL/6 マウスに、3 ヶ月齢から 6 ヶ月齢までの 3 ヶ月間、酢酸トコフェロールを 0.2% 含有した飼料を与え、前後に聴性脳幹反応試験による聴力測定を実施した。

(4) C57BL/6 マウスに、ロスマリン酸を 0.1% 含有した飼料を与え、1 週間後に聴性脳幹反応試験による聴力測定を実施した。大音量 (100~110 dB) のホワイトノイズを 5 分間聞かせ、その後および 1 週間後に、再度、聴力測定を実施した。

(5) C57BL/6 マウスに、大音量のホワイトノイズを 5 分間聞かせるステップを 1 週間ごとに数回繰り返し、その都度、聴性脳幹反応試験による聴力測定を実施した。

(6) 高脂肪食 (カロリーの約 60% が脂質由来) あるいは標準精製飼料を 13 ヶ月間摂取させた SMAP8 マウス (老化促進モデル系統の 1 つ) の肝臓サンプルから RNA を抽出し、リアルタイム PCR による

る遺伝子発現解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 聴力測定の結果、聴力の良い個体群と悪い個体群を選抜し、それらのマウスの内耳から抽出した RNA を利用し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。聴力と相関する 96 個の遺伝子を同定した。類似の先行研究では見つかっていない遺伝子も多数含まれていた。遺伝子の分類解析の結果、細胞内局在としては膜に存在するタンパク質が多く、機能的には輸送体に分類されるものが多かった (表 1)。また、神経機能に関連した遺伝子が多く含まれていた。一部の遺伝子について、内耳組織内での発現部位を解析したところ、実際に神経細胞で特異的に強く発現するものを複数明らかにした。また、ラセン神経に強く発現するものと前庭神経に強く発現するもの、また、両者ともに強く発現するものが存在し、神経の性質による差異があることも明らかとなった。

表 1 難聴進行度と相関の高い96個の遺伝子の細胞内構成分類と機能的分類

Cellular Component	Genes	Biological Process	Genes
membrane	36	transport	15
cytoplasm	27	ion transport	11
plasma membrane	23	metabolic process	9
Nucleus	10	ATP catabolic process	4
cytoskeleton	9	cell cycle	3
intracellular	8	microtubule cytoskeleton organization	3
axon	7	synaptic transmission	3
extracellular region	6	proteolysis	3
dendrite	5	sensory perception of pain	2
synaptic vesicle	4	lipid metabolic process	2
mitochondrion	4	apoptotic process	2
extracellular space	3	GPCR signaling pathway	2
tight junction	2		
nucleosome	2		
early endosome	1		
ER	1		

(2) マウスを固形飼料と粉末飼料で飼育した場合に、加齢性難聴の進行度が異なることを見出した (図 1)。加齢性難聴の進行に影響を与える因子を洗い出すため、固形飼料を数段階に破碎した飼料による影響、および、固形飼料をケージ上部の金網に置いた場合と粉末飼料と同様にケージ内の餌瓶に入れた場合の相違いについて比較検討を行った。その結果、固形粒が残る大きさで砕いた飼料は、固形粒の大きさによらず、固形飼料と同等の結果となった。このことから、餌を齧り取る動作よりも、餌を咀嚼して噛み砕く動作の影響が大きいものと推察された。一方、マウスのケージ上部とケージ内の固形飼料においても、加齢性難聴の進行度が異なる結果が得られた。また、通常固形飼料と高脂肪の固形飼料においても加齢性難聴の進行度に差が出る事が確認された。高脂肪飼料は硬度が低いことから、飼料の硬度が影響した可能性が考えられた。そこで、粉末状の通常飼料と高脂肪飼料についても同様の試験を実施したところ、粉末飼料においても、高脂肪食は加齢性難聴の進行度が遅いことが明らかとなった。さらに、24 時間自由摂食

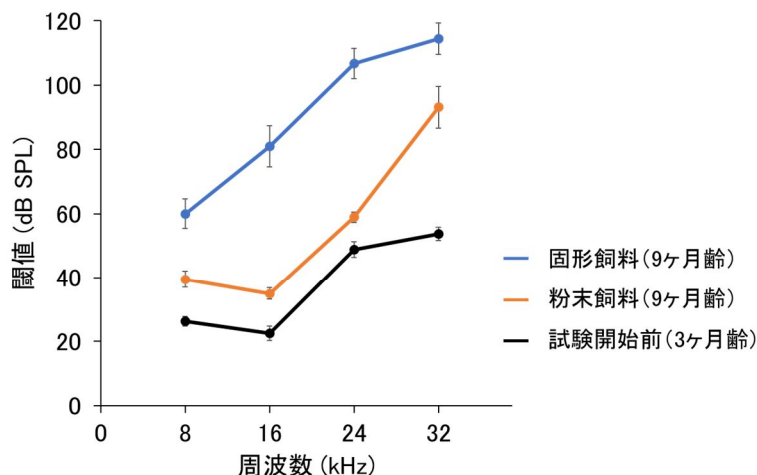


図 1 固形飼料と粉末飼料がC57BL/6Jマウス(N=8)の加齢性難聴の進行に与える影響

と12時間（活動期である暗期）の時間制限給餌において、時間制限給餌群で加齢性難聴の進行が遅延されることを明らかとした。以上の結果から、加齢性難聴の進行には、複数の食餌由来因子が関与しており、少なくとも、餌の硬度、餌の配置、餌の時刻、餌の栄養組成が関与することが明らかとなった。

(3) 一般的に、末梢血流の循環障害は難聴を引き起こす要因の1つであると考えられていることから、C57BL/6Jマウスの加齢性難聴の進行に末梢血流障害が関与するか検討するため、血流改善剤（医薬品）として広く利用されている酢酸トコフェロールの効果を試験した。しかしながら、3ヶ月齢から6ヶ月齢までの3ヶ月間の投与によって難聴進行の予防効果は認められなかったことから（図2）、少なくとも、C57BL/6Jマウスの若齢期における高音域の難聴進行には、末梢血流障害が関与していないことが示唆された。

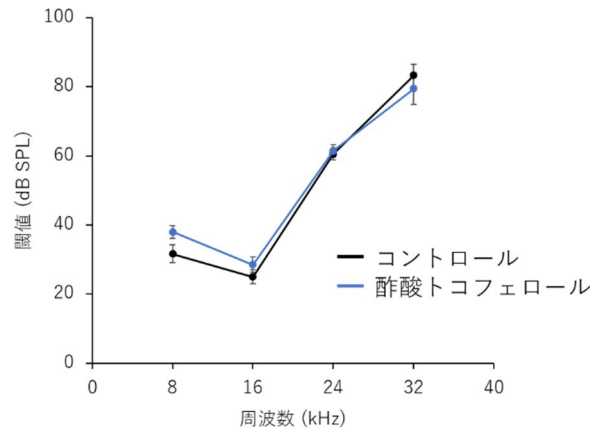


図2 酢酸トコフェロールがC57BL/6Jマウスの加齢性難聴の進行に与える影響 (N=10, 有意差なし)

(4) C57BL/6マウスは、加齢に伴う進行性の難聴速度が早い系統であるが、それでも定量的に進行度を測定するためには3ヶ月程度の期間が必要である。そこで、音響障害による一時的な難聴に着目し、1~2週間で聴覚保護作用を有する食品因子が探索可能な試験系を構築した。具体的には、C57BL/6マウスに大音響のホワイトノイズを短時間聞かせ、その直前、直後、および数日後に聴性脳幹反応試験による聴力測定を実施する試験系である。これにより、音響障害による一時的な聴力低下と、その後の回復について定量的に評価することができる。これを音響暴露前後に試験食を摂取させた群とそうでない群と比較することにより、食品因子による聴覚保護作用を評価可能とした。これまでに、いくつかの抗酸化成分の摂取により、音響障害が緩和されるとの報告があり、本試験系においても、シソ科植物に含まれるポリフェノールであるロスマリン酸による聴覚保護作用が確認された（図3）。

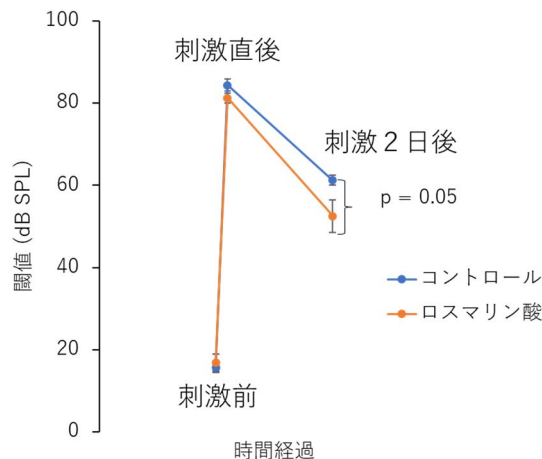


図3 C57BL/6Jマウス (N=8) の一過性音響障害とロスマリン酸摂取による軽減効果

(5) さらに試験系を改良し、音響障害を数週間のうちに複数回繰り返すことで、進行性の難聴が促進される現象を見出した。これは、大音響にさらされる機会が多い職業の人に見られる騒音性

難聴や、ヘッドホン/イヤホンで大音量の音楽を習慣的に聴く人に見られるヘッドホン/イヤホン難聴に類似している。今後、本試験系を利用することで、これらの難聴の予防食品の効果的な探索や、メカニズムの解明が進むことが期待される。

(6) これまでに、ラード主体の高脂肪食が老化促進モデルマウス系統である SAMP8 の加齢性難聴や他の組織における老化現象を遅延させることを明らかにしてきた。ここでは、実際に加齢性難聴の進行や、高齢期の認知機能スコアの改善が確認されている SAMP8 マウスの肝臓サンプルを利用し、遺伝子発現の比較解析を行った。その結果、高脂肪食を摂取させた試験群では、通常食群と比較してミトコンドリア機能や抗酸化機能に関連する遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった(図4)。このことから、高脂肪食は活性酸素によるダメージを軽減する作用があることが示唆された。また、SAMP8 マウスは、高脂肪食の長期摂取にも関わらず、脂質代謝関連遺伝子の発現や、血液生化学検査の値に異常が認められなかったことから、高脂肪食による代謝異常に対して耐性があることが判明した[6]。今後、メタボ予防研究に有用なモデルとなることが期待される。C57BL/6 などの一般的なマウス系統では、高脂肪食の長期摂取は、肥満による脂肪組織の炎症等が引き金となって全身性に活性酸素ダメージが高まり、メタボリックシンドローム様の寿命短縮が観察されるが、SAMP8 マウスではこれが起こらず、通常食よりもむしろ活性酸素ダメージが軽減され、加齢性難聴の進行や認知機能低下などの老化現象の遅延につながるものと考えられた。

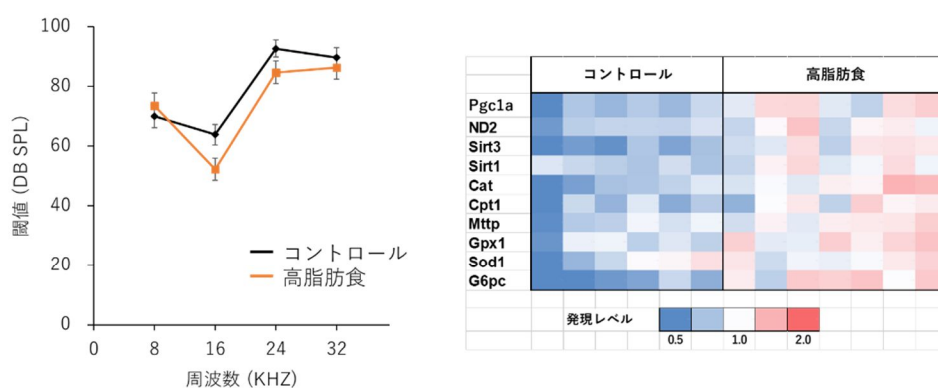


図4 SAMP8マウス (N=12-14) の高脂肪食による加齢性難聴の遅延と肝臓におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現

<引用文献>

[1] <http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/Pages/Age-Related-Hearing-Loss.aspx>
 [2] Someya et al., (2009) Age-related Hearing Loss in C57BL/6J Mice Is Mediated by Bak-dependent Mitochondrial Apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 106(46):19432-7.
 [3] Someya et al., (2010) Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss Under Caloric Restriction. Cell 143(5):802-12.
 [4] Hebert et al., (2013) Calorie Restriction and SIRT3 Trigger Global Reprogramming of the Mitochondrial Protein Acetylome. Mol Cell 49(1):186-99.
 [5] Oike et al., (2016) Dietary Intake of Heat-Killed Lactococcus Lactis H61 Delays Age-Related Hearing Loss in C57BL/6J Mice. Sci Rep 6:23556.
 [6] Oike et al., (2020) Long-Term Feeding of a High-Fat Diet Ameliorated Age-Related Phenotypes in SAMP8 Mice. Nutrients 12(5):E1416.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oike Hideaki, Ogawa Yukino, Azami Kayo	4. 巻 12
2. 論文標題 Long-Term Feeding of a High-Fat Diet Ameliorated Age-Related Phenotypes in SAMP8 Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12051416	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 Oike Hideaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Prevention of Age-Related Hearing Loss by Oral Intake of Heat-Killed Bacteria in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 36～39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5803/jsfm.36.36	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 -
1. 著者名 Oike Hideaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Novel Evaluation Method for Anti-aging Food	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food processing and ingredients	6. 最初と最後の頁 12-15
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 -
1. 著者名 大池秀明	4. 巻 185
2. 論文標題 老化予防食品の探索とエビデンス化 ～まずは耳の老化予防から～	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ソフト・ドリンク技術資料	6. 最初と最後の頁 57-63
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 -

1. 著者名 Hideaki Oike	4. 巻 222
2. 論文標題 Anti-Aging Foods for Super Aging Society	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FFI Journal	6. 最初と最後の頁 299-305
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 -

1. 著者名 Oike Hideaki, Kohyama Kaoru, Mochizuki-Kawai Hiroko, Azami Kayo	4. 巻 149
2. 論文標題 Food hardness influences the progression of age-related hearing loss in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111335 ~ 111335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2021.111335	査読の有無 有
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12件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Oike H
2. 発表標題 Anti-aging foods prevent age-related hearing loss in mice.
3. 学会等名 UJNR 48th Annual Meeting of Food and Agriculture Panel (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oike H, Ogawa Y, Azami K
2. 発表標題 Effects of long-term time-restricted feeding of a high-fat diet on aging in senescence-accelerated mouse.
3. 学会等名 XVI Congress of the European Biological Rhythms Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 高脂肪食の時間制限給餌によるSAMマウスの聴覚老化の遅延
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池秀明、小川雪乃、薊佳代
2. 発表標題 時間栄養学を利用した高脂肪食による老化遅延
3. 学会等名 第6回時間栄養科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 マウスの聴力から探索する老化遅延食品
3. 学会等名 第34回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 SAMマウスの聴覚老化を利用した老化予防食品の評価
3. 学会等名 日本農芸化学2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 食品成分による老化予防効果の評価系と老化予防食品の開発
3. 学会等名 食品開発展（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 難聴予防食品開発の意義と製品化手法
3. 学会等名 サイエンスフォーラムセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池 秀明, 薊 佳代
2. 発表標題 高脂肪食の時間制限給餌によるSAMマウスの聴覚老化の遅延
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 耳の老化と乳酸菌
3. 学会等名 第39回日本食品微生物学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大池 秀明,伊藤 奈々子,桜井 睦,神山 かおる,小堀 真珠子
2. 発表標題 高脂肪食によるマウス加齢性難聴の進行遅延
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大池秀明
2. 発表標題 タマゴによるマウス加齢性難聴の抑制
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第63回大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 難聴又は耳鳴りの予防又は治療用組成物、その評価方法及び難聴モデル動物の作製方法	発明者 大池秀明、富田理、 木元広実	権利者 農研機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-068325	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

https://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nfri/introduction/chart/0203/hideaki_oike.html

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------