様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　４ 月　９ 日現在

機関番号：１７４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１６９２８

研究課題名（和文）NAD中間代謝産物を用いた加齢性難聴の発症防止に関する研究

研究課題名（英文）Prevention of age-related hearing loss using NAD metabolites

研究代表者
山田　卓生（Yamada, Takao）

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：９０５７３５９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：飼料至適濃度の決定については過去の文献と同様の結果であり、過去の文献の濃度のNMN、NRを使用した。次に、1か月齢の加齢性難聴マウスモデル（C57BL/6 マウス）を用いて、通常食群または通常食群＋NMNまたはNR含有の飼料投与群で6か月間検討を行ったが、難聴の出現が明瞭に出らず、有意差のある結果が得られなかったため、高脂肪食群、低脂肪食群、高脂肪食+NMNまたは NR含有の飼料投与群を設定し、同様の実験を行った。この結果ABRでは高脂肪食群で難聴進行を呈し、NMNまたはNR含有の飼料投与群では難聴進行の抑制効果を認めた。それ以後の実験は進まなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
Sirtuins、NADを介する反応経路は加齢性難聴の発症、病態形成にも関与している可能性があることがわかった。加齢に伴い、蝸牛内においてもNADの減少、Sirtuinsの活性低下が起るが、NMNもしくはNRの投与により、これら反応経路の再活性化が起り、その結果として加齢に伴う難聴の発症が防止できる可能性があると考えられた。このことにより、加齢性難聴の発症予防について薬剤開発の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Age-related hearing loss was prevented in the High fat diet(HFD) fed with NMN or NR-group compared to in the HFD group.

研究分野：加齢性難聴

キーワード：加齢性難聴　NAD中間代謝産物

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## １．研究開始当初の背景

加齢性難聴は加齢に伴い進行する両側性の感音難聴である。コミュニケーション障害をきたすだけでなく、近年の研究により高齢者の認知機能低下にも悪影響を及ぼすことが明らかとなってきている。我が国における急速な人口の高齢化を考慮すると、加齢性難聴は今後ますます深刻な社会問題となってくると考えられるが、その発症メカニズムについても未だ明らかでなく、治療についても確立した方法がないのが現状である。

脱アセチル化酵素である Sirtuins の活性化は、脂質、糖代謝を改善させることが知られている。また、細胞老化、細胞周期が進むとその発現が減少することが知られており、老化において極めて重要な役割を担っていると考えられている。この Sirtuins の活性化は、Sirtuins の補酵素である NAD に依存していることが知られており、細胞内の NAD を上昇させると Sirtuins は活性化されることが知られている（右図参照）。また、摂取カロリーの制限により細胞内 NAD の増加と Sirtuins (SIRT1、3)の活性化が起こることが報告されている。NAD 中間代謝物質である NMN(Nicotinamide mononucleotide)あるいは NR(nicotinamide riboside)の投与も同様に NAD の量を上昇させ（右図参照）、様々な加齢性変化を改善させることが、近年、肝臓、眼、心臓、筋肉、肝臓、中枢神経など様々な臓器において報告されている（Yoshino J, Cell Metab. 2011）（Gomes AP, Cell 2013）（Stein LR, EMBO J. 2014）。*哺乳類においてはこれまでに７種類の Sirtuins が見つかっており、SIRT1～７と命名されている。

一方、内耳における Sirtuins、NAD を介する経路に関する研究は極めて少ない。これまでに、加齢性難聴マウスモデルにおける Sirtuins の変化を検討して研究としては、Xiong H らは高齢 C57BL/6 マウスの蝸牛において Sirtuins (SIRT1)の発現が有意に低下している(Hao Xiong, Exp. Gerontol. 2014）ことを、そして Takumida らは、高齢 CBA/J マウスにおいて Sirtuins (SIRT1、3、5)が低下している（takumida M, Acta oto-laryngologica, 2016）を報告した論文が存在する。また、加齢性難聴モデルマウスに対して摂取カロリー制限を行うことにより加齢性難聴の発症が抑制され、この抑制には Sirtuins (SIRT3)の活性化が必須であることが報告されている（Someya, Cell, 2010）。しかし、NAD 中間代謝物質投与を行った加齢性難聴に関する研究はこれまでに報告はない。唯一存在する難聴に関した報告としては、騒音性難聴モデルに対して NR を投与により SIRT3 の活性化が起り、難聴及びラセン神経節細胞の変性が抑制されたとする報告（Brown KD, et al., Cell Metab. 2014）のみである。

## ２．研究の目的

Sirtuins、NAD を介する反応経路は加齢性難聴の発症、病態形成にも関与している可能性がある。すなわち、加齢に伴い、蝸牛内においても NAD の減少、Sirtuins の活性低下が起るが、NMN もしくは NR の投与により、これら反応経路の再活性化が起り、その結果として加齢に伴う難聴の発症が防止できる可能性があると考えられる。本研究はこのことを明らかにすることを目的としている。

## ３．研究の方法

研究１　マウス飼料における NMN、NR の含有量の決定
以下のパイロットスタディーを行い、研究２に用いる飼料中の NMN、NR 含有量を決定する。
1.加齢性難聴モデルマウス(C57BL/6 マウス)を用いて研究を行った。１ヶ月齢（難聴出現前であることが知られている）のマウスに対して、様々な濃度で NMN(Sigma 社）または NR(Sigma 社）を含有する飼料を１か月投与した。その後、蝸牛における Sirtuins (SIRT1)の発現量を測定した。

研究２　NMN、NR による加齢性難聴の発症予防
加齢性難聴発症前マウスに対して、NMN または NR 含有飼料を６か月間投与し、これにより加齢性難聴の発症が防止されるかどうかについて検討した。
2.　NMN、NR の投与：１ヶ月齢の加齢性難聴モデルマウスに対して、研究１で決定した NMN または NR 含有マウス飼料を６か月間投与した。コントロールには、これらを含有しない飼料を投与した。
3.　聴力評価：NMN または NR 投与前、投与終了後（３か月ごと）に評価を行った。聴覚については聴性脳幹反応検査（ABR）を用いた。
4.　形態学的評価：最終機能評価後にマウスを安楽死させ、蝸牛を摘出、脱灰、凍結切片を作成後、ラセン神経節細胞のマーカーである抗 TUJ1 抗体を用いて免疫染色を行い、ラセン神経節細胞数のカウントを回転別に行う。また、有毛細胞についても、実体顕微鏡下にコルチ器を採取、ローダミン・ファロイジン染色を行ったあと、回転別に内・外有毛細胞数についてカウントを行う。研究１と同様の方法で、蝸牛における Sirtuins (SIRT1)の発現量を測定した。

## ４．研究成果

研究１の至適濃度の決定については過去の文献と同様の結果であり、過去の文献の濃度の NMN、

NR を使用した。次に研究 2 を行った。1 か月齢の加齢性難聴マウスモデル（C57BL/6 マウス）を用いて、通常食群または通常食群＋NMN または NR 含有の飼料投与群で 6 か月間検討を行ったが、難聴の出現が明瞭に出らず、有意差のある結果が得られなかったため、高脂肪食群、低脂肪食群、高脂肪食+NMN または NR 含有の飼料投与群を設定し、同様の実験を行った。この結果 ABR では高脂肪食群で難聴進行を呈し、NMN または NR 含有の飼料投与群では難聴進行の抑制効果を認めた。それ以後の実験は進まなかった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
| --- | --- | --- | --- |