

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09341

研究課題名(和文) 低酸素・低体温刺激による生体内在性聴覚/嗅覚障害予防機構の活性化

研究課題名(英文) Hypoxia and hypothermia-induced activation of endogenous prevention of auditory/olfactory impairments

研究代表者

吉川 弥生 (Kikkawa, Yayoi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：00452350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低酸素ストレスが前庭有毛細胞および嗅上皮に与える影響を解析した。前庭有毛細胞の実験では、ICRマウスの感覚上皮にさまざまな濃度のGMとDFXを投与して内耳障害と低酸素負荷を再現した。その結果ある一定濃度のDFX下では有毛細胞障害が軽減することが確認され、低酸素ストレスが感覚毛障害に対して保護的に働く可能性が示唆された。一方、嗅上皮に関してはより詳細な実験を行った。メチマゾールによる嗅上皮の障害後、睡眠剥奪状態を誘導して組織の解析を行った。その結果、嗅上皮組織には変化は生じなかったがNQO1陽性細胞の数が減少し、組織の回復に遅れが生じることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上の結果より、低酸素ストレスが前庭有毛細胞に対して保護的な効果を持ちつつ、嗅上皮組織には負の影響を与えることが明らかになった。さらなる研究が必要ではあるが、これらの知見は将来的には内耳および嗅覚障害の治療法や予防法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the impact of hypoxic stress on vestibular hair cells and the olfactory epithelium. To investigate the effects on vestibular hair cells, we conducted experiments replicating inner ear injury and hypoxia by administering varying concentrations of gentamycin and DFX (desferrioxamine mesylate salt) to the sensory epithelium of ICR mice. Our findings confirmed that a specific concentration of DFX mitigated hair cell damage, suggesting a potential protective role of hypoxic stress against sensory hair cell impairment. Conversely, we conducted more detailed experiments on the olfactory epithelium. After inducing damage to the olfactory epithelium using methimazole, we induced sleep deprivation and performed histological analysis. Although no observable changes occurred in the olfactory epithelium, we observed a significant decrease in the number of NADPH quinone oxido-reductase 1 (NQO1)-positive cells, resulting in a delay in tissue recovery.

研究分野：内耳

キーワード：内耳 嗅覚 神経保護 低酸素

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内でエネルギー代謝を担当しており、各細胞に数百個存在し、特に筋肉や脳などの代謝の活発な部位では細胞質の 40% を占めることもある。内耳組織障害では、ミトコンドリア障害や酸化ストレスによる細胞障害、細胞死誘導が共通のメカニズムとなっている。老人性難聴を引き起こす一因として、ミトコンドリアにおける酸化ストレス障害の増加が一因として関与することが知られてきた。

また、ミトコンドリア遺伝子異常に起因する疾患では症状として難聴が多く見られる。ミトコンドリア脳筋症などの疾患では進行性の感音難聴が合併することが一般的である。さらに突発性難聴や騒音難聴など、ミトコンドリア・活性酸素系の関与が指摘される疾患は数多い。

従来の突発性難聴の治療には高圧酸素療法が一般的に行われてきたが、その有効性は十分に証明されたものではなかった。抗酸化物質であるコエンザイム Q10 やタウリン、水素水などによる治療も検討されてきたが、ミトコンドリア病患者を対象とした臨床試験では限定的な効果しか得られなかった。また、内在性の抗酸化力を増加させるための加圧トレーニングによる治療も一部の指標では改善が見られたが、聴力への効果ははっきりとは示されていない。

そうした中で、逆に注目されているのが低酸素療法である。この治療法は初めはミトコンドリア病患者には適さないとされていたが、米国から報告された研究では、重篤なミトコンドリア病のモデルマウスを低酸素環境で飼育すると、通常群と比較して生存率が向上し、体重や運動能も改善することが示された。体内酸素濃度を下げる低酸素療法は逆説的とも言えるが、この治療が体内の有害活性酸素の発生を防ぎ炎症反応を沈静化し細胞保護遺伝子の発現を促すことを考えれば合理的ともとらえられ、かつ画期的な治療法として確立できる可能性がある。さらには、心筋梗塞のモデルでも低酸素環境は心筋保護効果をもたらすことが報告されている (Li 2017, *Prog Neurobiol* など)。

これらの研究から、内耳の感覚障害にも低酸素療法は良い影響を及ぼす可能性があると考えられた。ミトコンドリアの酸化ストレスを軽減し、エネルギー代謝の正常化を促すことで、感覚器系の機能改善につながる可能性が期待できる。ただし、低酸素刺激による分子生物学的メカニズムはまだ完全には解明されておらず、研究途上の分野となっている。

2. 研究の目的

このような状況から、我々は低酸素刺激が内耳や嗅覚系などの感覚系器官にどのような影響を及ぼすかにつき研究を行うこととした。我々は蝸牛骨透明化や蛍光色素の開発、高速共焦点顕微鏡を組み合わせることで蝸牛有毛細胞におけるミトコンドリアの立体的実時間的観察手法の開発に

成功しており、本研究ではこの手法を用いて低酸素環境がどのように蝸牛や嗅神経に影響を及ぼすかを明らかにしていくこととした。具体的な研究手法としては、蝸牛や嗅神経を対象にした実験系で、低酸素環境下でのミトコンドリアの観察や酸化ストレスの評価を行い、その影響を明らかにする。また高速共焦点顕微鏡などの先端的な技術を駆使して、ミトコンドリアの機能やストレス応答メカニズムについての詳細な解析を進める。

このような研究を通じて、低酸素療法が内耳の感覚障害に対して有望な治療法となる可能性があることが示せれば、将来的には臨床応用への展開も期待できると考えられた。

3. 研究の方法

まず平成 31 年(2018 年度)に蝸牛組織・細胞の低酸素環境下での培養法の確立を目指した。P3 蝸牛組織の体外培養を確立し、アミノグリコシド系薬剤であるゲンタマイシンを使った薬剤性障害も惹起できた。ゲンタマイシンを蝸牛培養液に添加して 6、12、24 時間経過時の内・外有毛細胞の障害を調べた。嗅覚系においては、C57BL/6 マウスを自発運動群、20%カロリー制限群、コントロール群に分けて、10 か月後の蝸牛、嗅上皮、嗅球での免疫組織学的所見を各群で比較検討した。平成 31(令和元、2019)年度には thy1-Brainbow3.2 マウスの導入を試みた。

2020 年(令和 2 年)には酸化ストレス(タンパク制限)の嗅覚・蝸牛に対する影響(10 ヶ月実験)を論文化し発表した。具体的には、8 週齢の C57BL/6 マウスを通常食で 2 ヶ月維持したのち、カロリーは同一(353.6~353.8kcal/100g)のコントロール食群と 30%タンパク制限食群(PR 群)とに分け、10 ヶ月経過後の蝸牛、嗅上皮、嗅球での免疫組織学的所見、幹細胞・遺伝子分布を比較検討した。

当初の計画では、2021 年(令和 3 年度)が本研究の最終年度であったが、新型コロナウイルス感染症拡大の影響により動物実験が制限されたため、2022 年度まで研究期間の延長を申請した。しかし連携研究者によって細胞実験を行うことができたため、低酸素ストレスが内耳障害に与える影響について検討を行った。方法:ICR マウスの生後 3-5 日齢 30 匹より卵形嚢(Utricule)及び球形嚢(Sacculle)を摘出し、耳石を除去して感覚上皮を摘出した。これをグルコースとペニシリン G 加無血清改変イーグル培地(DMEM)で 1 週間器官培養した。低酸素負荷を再現する薬剤として鉄のキレート剤である DFX(Desferrioxamine mesylate salt)を使用し、内耳障害を与える薬剤としてゲンタマイシン(GM)を使用した。DFX 1 日投与後に GM を 1 日投与し、その後通常培養液で培養した。対照群として通常培養液でも 1 週間培養を行った。培養終了後に器官を 4%PFA(パラホルムアルデヒド)で固定し、透過処理したのちファロイジン 488 で染色した。2022 年には動物実験を再開し、C57BL/6J マウスを用いて、メチマゾールによる嗅上皮の障害と睡眠剥奪状態を誘導した後組織の解析を行い、嗅上皮組織の状態に変化が生じるかどうかを解析し

た。

4 . 研究成果

2018年の蝸牛組織・細胞の低酸素環境下での培養実験では、ネクロプトーシス(制御されたネクローシス)が神経細胞で特に12時間後に起こっていることが確認され、MLKLというキナーゼが関与していることも示された。また嗅覚系においては、自発運動やカロリー制限が嗅細胞数や成熟嗅細胞数の減少、細胞死の亢進を引き起こすことを明らかにした。

2019年(平成31年・令和元年度)にはthy1-Brainbow3.2マウスの導入に取り組んだが、成長速度やCreの導入率に課題があった。嗅覚系の動物実験においては、カロリー制限が嗅細胞数や成熟嗅細胞数の減少、炎症性サイトカインの発現の上昇をもたらすことが明らかになった。

2020年には酸化ストレス(タンパク制限)が蝸牛や嗅上皮に与える影響について研究し、タンパク制限が内耳有毛細胞の減少を抑制する効果があることを明らかにした。嗅覚系においてはタンパク制限が嗅細胞数や成熟嗅細胞数の減少を引き起こし、NADPH quinone oxido-reductase 1 (NQO1)の増加や細胞死の誘導も観察された。

2021年・2022年の追加実験では低酸素ストレスが内耳障害に及ぼす影響について細胞実験を行った。感覚毛数を測定したところ、GMのみとDFX(10uM)+GMの群には有意差が見られ(P<0.05)、感覚毛の残存が多く見られた。また、GMのみとDFX(1uM)+GMの群では有意差は見られなかった(P>0.05)。DFX(100uM)+GMの群ではGMのみと比較して感覚毛数は多かったが、DFX(10uM)+GMの群より少ないことが判明した。以上より、DFXは前庭有毛細胞に対して濃度依存性に障害を与えるものの低酸素ストレスは前庭有毛細胞の感覚毛障害に対して保護的に働く可能性があることが確認できた。

これに対して低酸素ストレスは嗅上皮組織に負の影響を与えることが明らかになった。C57BL/6Jマウスの嗅上皮をメチマゾールで障害した後に睡眠剥奪状態においてから組織を解析したところ、実験群と対照群のマウスで嗅上皮組織の状態には変化を生じないが、実験群では嗅上皮背内側核NADPH quinone oxido-reductase 1 (NQO1)陽性細胞の数が有意に減少し、2週間後の組織障害の回復に遅れが生じることが確認できた。

以上の研究により、低酸素ストレスが内耳および嗅上皮に与える影響について、有益な知見が得られた。これらの結果は、将来的には内耳や嗅覚障害の治療法の向上につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tuerdi Ayinuer, Kikuta Shu, Kinoshita Makoto, Kamogashira Teru, Kondo Kenji, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Zone-specific damage of the olfactory epithelium under protein restriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79249-3	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 Kamogashira Teru, Fujimoto Chisato, Kinoshita Makoto, Kikkawa Yayoi, Yamasoba Tatsuya, Iwasaki Shinichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Prediction of Vestibular Dysfunction by Applying Machine Learning Algorithms to Postural Instability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2020.00007	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 Kondo Kenji, Kikuta Shu, Ueha Rumi, Suzukawa Keigo, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Age-Related Olfactory Dysfunction: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnagi.2020.00208	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 Iwamura Hitoshi, Kondo Kenji, Kikuta Shu, Nishijima Hironobu, Kagoya Ryoji, Suzukawa Keigo, Ando Mizuo, Fujimoto Chisato, Toma-Hirano Makiko, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 378
2. 論文標題 Caloric restriction reduces basal cell proliferation and results in the deterioration of neuroepithelial regeneration following olfactotoxic mucosal damage in mouse olfactory mucosa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 175 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-019-03047-1	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 -

1. 著者名 Kinoshita Makoto, Fujimoto Chisato, Iwasaki Shinichi, Kashio Akinori, Kikkawa Yayoi S., Kondo Kenji, Okano Hideyuki, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Alteration of Musashi1 Intra-cellular Distribution During Regeneration Following Gentamicin-Induced Hair Cell Loss in the Guinea Pig Crista Ampullaris	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00481	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 Azuma Sanami, Kikuta Shu, Yoshida Masafumi, Ando Mizuo, Kondo Kenji, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 139
2. 論文標題 High CT attenuation values relative to the brainstem may predict squamous cell carcinoma arising from inverted papilloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 1030 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2019.1659515	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 -

1. 著者名 Ichijo Kentaro, Kinoshita Makoto, Fujimoto Chisato, Uranaka Tsukasa, Kikkawa Yayoi S., Sugasawa Keiko, Yamasoba Tatsuya, Iwasaki Shinichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Acute bilateral vestibulopathy with simultaneous involvement of both superior and inferior vestibular nerves	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 30324-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.07.007	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 -

1. 著者名 Tuerdi Ayinuer, Kikuta Shu, Kinoshita Makoto, Kamogashira Teru, Kondo Kenji, Iwasaki Shinichi, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Dorsal-zone-specific reduction of sensory neuron density in the olfactory epithelium following long-term exercise or caloric restriction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35607-w	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 Ueha Rumi, Shichino Shigeyuki, Ueha Satoshi, Kondo Kenji, Kikuta Shu, Nishijima Hironobu, Matsushima Kouji, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2018.00086	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 Nishijima Hironobu, Kondo Kenji, Yamamoto Takahisa, Nomura Tsutomu, Kikuta Shu, Shimizu Yuya, Mizushima Yu, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Influence of the location of nasal polyps on olfactory airflow and olfaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Forum of Allergy & Rhinology	6. 最初と最後の頁 695 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/alr.22089	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 Ueha Rumi, Ueha Satoshi, Kondo Kenji, Kikuta Shu, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Cigarette Smoke-Induced Cell Death Causes Persistent Olfactory Dysfunction in Aged Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2018.00183	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 Kiyama Yuji, Kikkawa Yayoi S., Kinoshita Makoto, Matsumoto Yu, Kondo Kenji, Fujimoto Chisato, Iwasaki Shinichi, Yamasoba Tatsuya, Manabe Toshiya	4. 巻 98
2. 論文標題 The adhesion molecule cadherin 11 is essential for acquisition of normal hearing ability through middle ear development in the mouse	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1364 ~ 1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0083-y	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 -

1. 著者名 Fujimoto Chisato, Kawahara Takuya, Kinoshita Makoto, Kikkawa Yayoi S., Sugasawa Keiko, Yagi Masato, Yamasoba Tatsuya, Iwasaki Shinichi, Murofushi Toshihisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Aging Is a Risk Factor for Utricular Dysfunction in Idiopathic Benign Paroxysmal Positional Vertigo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.01049	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉川弥生, 藤本千里, 菅澤恵子, 木下淳, 鴨頭輝, 一條研太郎, 岡峰子, 西敏子, 山岨達也, 岩崎真一
2. 発表標題 重心動揺検査で閉眼総軌跡長180cm以上を示す患者の背景因子別の分析
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川弥生, 岩崎真一, 木下淳, 一條研太郎, 菅澤恵子, 江上直也, 藤本千里, 鈴木さやか, 鴨頭輝, 山岨達也
2. 発表標題 下肢振動覚障害がラバー負荷重心動揺検査に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川弥生, 岩崎真一, 菅澤恵子, 西敏子, 竹内成夫, 藤本千里, 木下淳, 山岨達也
2. 発表標題 高齢者における振動覚異常とラバー重心動揺計測値の関係
3. 学会等名 第78回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	菊田 周 (Kikuta Shu) (00555865)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

	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
研究 協力者	田浦 晶子 (Taura Akiko)	藍野大学・医療保健学部・教授 (34441)	

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