

平成21年4月7日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591972
 研究課題名（和文） 各種老化因子制御による加齢性内耳障害の予防・治療に関する基礎的、臨床的研究
 研究課題名（英文） Basic and clinical research for the protection and treatment of age-related inner ear disorders by controlling age-related factors
 研究代表者
 工田 昌也（TAKUMIDA MASAYA）
 広島大学・病院・講師
 研究者番号：00179590

研究成果の概要：

加齢性内耳障害の予防・治療を目的に、基礎的研究では内耳に klotho、SOD、TRP チャネル 28 個が存在し、感覚細胞の興奮伝達、内リンパの恒常性の調節や内耳障害の軽減に働くこと、加齢により SOD、klotho、TRPV5、6 の発現が低下し内耳障害が起こることを明らかにした。また、内リンパ水腫に加えてめまいを生じる動物モデルを開発し、めまい発作の発症機序を解明した。臨床的研究では老人性難聴での抗酸化剤治療の有効性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳、加齢、老人性難聴、抗酸化剤、TRP チャネル、klotho、めまい、マウス

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進む現在、加齢に関する研究は幅広い分野で行われており内耳についても例外ではない。内耳は聴覚、平衡覚を司る器官であり、その障害は臨床的には難聴、めまいを引き起こし、QOL の大きな低下をきたす。実際、聴力は加齢とともに確実に低下し、その始まりは 30 歳代で、50 歳代で急激に進行することが多く、環境騒音が多い地域では障害が早期に始まる事が知られている。老人性難聴の特徴は、(1)言葉の

聞き取り能力が著しく低下し、(2)不快閾値と聴力閾値との幅が狭く、(3)高音漸減傾向（一部の音は強く、一部の音は弱く聞こえる）であり、この結果、会話に苦痛を感じるが多くなる。しかしながら、老人性難聴に対する有効な治療法が確立していないために、社会から孤立しがちであり、高齢者の QOL を大きく阻害している。高齢化社会の到来とともに高齢者の割合が増加し、加齢による難聴が生理学的なものであることから難聴を有する人の割合は年々増加し

ており社会的にもまた医療経済学的にも大きな問題となっている。また、高齢者のめまいが年々増加傾向にあることは既に20年以上前から報告されているが医療機関を訪れる患者以外にめまいを経験している潜在的なめまい患者を含めるとおよそ30%もの高齢者がめまいを訴えていると推測されている。加齢による内耳障害の病態と各種老化因子との関係を明らかにすることは加齢による内耳障害のみならず広く内耳障害機構全体についての疑問点を明らかにする手助けとなる。その上で各種老化因子を制御することが可能となれば現在問題となる老人性難聴やめまいの新しい治療法の開発に結びつくものと確信する。

本研究は現在ともすれば有効な治療法のない、加齢による難聴、めまいの完全な治療を行うために必須のものであり、高齢化社会を迎えるにわたって、高齢者の難聴やめまいの予防や治療を行なうことは高齢者のQOLを改善するのみならず、医療経済の面から考えても非常に重要となる。

2. 研究の目的

内耳障害の原因には加齢のほか感染、騒音、薬剤、代謝性疾患、遺伝性、など様々なものが挙げられるがその病態を細胞レベルでみた場合、主体となるのは内耳感覚細胞の障害であり、その障害機構については原因のいかにかわからず共通する点が数多く認められる。私は、活性酸素、一酸化窒素に代表されるフリーラジカルとアポトーシスの制御因子が内耳感覚細胞の障害に密接に関与している事を明らかにし、フリーラジカルやアポトーシスの制御により内耳障害の予防、治療が可能になることを解明した。一方で、加齢による内耳障害に関して、老人性難聴の原因にもフリーラジカルが大きく関係していることが示唆されており、今回の研究ではこの点の解明と共に、ラジカル産生を制御することによる加齢性内耳障害の予防や治療の可能性の検討を目的とした。

一方、一般的には、加齢による障害の原因についてはフリーラジカルのみで説明できるものではなく、その他の老化因子が複雑に関与していることがすでに明らかになっている。遺伝子レベルでの検討でも、Klotho、Clock、ラミンAといった老化遺伝子、時間遺伝子、早老症原因遺伝子などの変化が加齢に伴う病態に関与することが推察されている。このような考えを念頭におけば内耳についても加齢と共に他臓器と同

様な変化が生じていることが十分考えられ、今回の研究ではこの点の解明も目的とするとともに、1989年にショウジョウバエにおける眼の光受容器異常変異体の原因遺伝子として同定された6回の膜貫通領域を有するCa²⁺透過性の高いチャネルであるtransient receptor potential (TRP)が生体内で化学物質受容、温度受容をはじめとして広くcell sensorとして機能することが明らかになっていることから、内耳でのTRPチャネルの局在とその機能を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新しいメニエール病動物モデルの作製

実験にはプライエル反射正常のCBA/Jマウス、8週齢(体重約20g)を使用した。モデル動物の作製には左耳に大腸菌由来リポポリサッカライド(LPS)1mgを経鼓膜的に1日1回、アルドステロン100 μ g/100g(体重)を腹腔内に1日1回、5日間連日投与した。動物は薬剤の最終投与終了1日後に左耳に1:10,000エピネフリン、または3%ソジウムニトロプルシド(SNP)を経鼓膜的に鼓室内投与し、エピネフリン投与群では2時間後、SNP投与群では1時間後に深麻酔下に断頭、側頭骨を摘出、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、EDTAで脱灰、エタノール系列にて脱水後、水溶性レジン(JB-4[®])にて包埋した。その後、通常の方法で切片を作製し、光学顕微鏡にて形態学的観察を行なった。

(2) マウス内耳でのklotho、SOD、TRPチャネルの局在

実験にはプライエル反射正常のCBA/Jマウス、8週齢(体重約20g)を使用した。動物はネブタールによる深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、断頭、側頭骨を摘出した。試料はEDTAにて脱灰後、4 μ mの厚さで凍結切片を作製、抗klotho抗体、抗SOD抗体、各種抗TRP抗体を用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 老齢動物におけるklotho、TRPV5、TRPV6の変化

実験にはCBA/Jマウス、24月齢(体重約30g)を使用した。動物はネブタールによる深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、断頭、側頭骨を摘出した。試料はEDTAにて脱灰後、4 μ mの厚さで凍結切片を作製、抗klotho抗体、抗TRPV5抗体、抗TRPV6抗体を用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察し若年動物と比較した。

(4) 高齢者の感音難聴に対する抗酸化剤の治療効果

対象には年齢70歳以上で鼓膜正常、聴力に影響を及ぼすような疾患の既往がなく、加齢の他に明らかな原因の認められない感音難聴を有する症例で難聴の治療を希望し、患者からの同意が得られた、男性10例、女性36例、計46例(92耳)、70~89歳(平均77.1歳)を対象とした。抗酸化剤は症例に応じて、レバミピド300mg/日、ビタミンC 600mg/日を中心に原則と8週間以上経口投与した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては広島大学動物実験等規則に従い、同委員会の承認(承認番号A06-149)を受けて行なった。また、臨床研究に関しては、一般的に治療に使用されている薬剤を使用し、研究の目的、予想される結果、利益について患者に十分説明し同意を得た上で行なった。

4. 研究成果

1) 新しいメニエール病動物モデルの作製

内リンパ水腫は内リンパの吸収障害、産生過剰、あるいはその両者によって引き起こされるが、モルモット内リンパ囊、管の閉塞により高率に内リンパ水腫が発生することが報告されて以来、内リンパ囊閉塞モデルは現在、代表的なメニエール病の動物モデルとして広く利用されている。一方、内リンパの分泌過剰による内リンパ水腫として、コレラ毒素の蝸牛内注入やアルドステロン、バズプレッシンの全身投与により内リンパ水腫が発生することもよく知られている。これらの動物モデルの特徴として、内リンパ水腫、聴力障害は程度の差はあれ、すべてのモデルで出現するものの、メニエール病の第一の特徴であるめまい発作は殆ど出現しないということがあげられる。

今回開発したモデルは内リンパ水腫の作製に、内リンパの分泌過剰と吸収障害の両者を用いており、蝸牛に軽度から中等度の内リンパ水腫の発現を認め、エピネフリンの投与によりエピネフリン投与側への偏倚傾向、薬剤投与耳と反対側に向かう眼振を有する一過性の平衡機能異常が生じるもので、メニエール病の病態をより忠実に再現している。今回このモデルでめまい発作の発現機序を検討した結果、エピネフリン投与後に、蝸牛では内リンパ腔容積の減少、前庭では一過性内リンパ水腫の形成が生じることが明らかとなった。

このような変化は SNP 投与群では認められなかった。正常動物では内耳血流はエピネフリン投与で減少し、SNP 投与で増加するが、内耳血流低下に際しては、内リンパ圧や量の相対的低下が生じ、それを代償するために内リンパ囊の狭小化、stainable substance の出現が起こり、内耳血流増加の際には内リンパ圧や量が相対的に増加し、それを代償するために内リンパ腔が拡大するといった代償機構が働いている。しかし、今回のモデル動物ではこの代償がうまく働かず、内耳血流が低下したときに前庭器で一過性の内リンパ腔の拡大が起こり平衡障害が生じることが推察された。これまでの研究からは、内リンパ水腫が存在するのみではめまい発作は生じないと考えられており、側頭骨病理所見でも必ずしもすべてのメニエール病患者で内リンパ水腫が認められるわけではなく、反対に内リンパ水腫が生じているにもかかわらずメニエール病の症状がないものも報告されている。実際、メニエール病患者が常にめまいを起こしているわけではなくストレスなどを契機として発作性にめまいを生じる。

以上のことからメニエール病の病態を考えると炎症、免疫反応、内リンパ囊形成不全など、様々な原因での内リンパ囊での内リンパ液吸収不全や、ストレスによる内リンパの過剰産生などで内リンパ水腫が形成される。この状態のみではめまい発作は生じないものの、内リンパ圧の急激な変化、内耳血流の障害、膜迷路の破裂、透過性の亢進などの新たなストレスが加わることによりめまい発作を引き起こすというメカニズムが推察された。

(2) マウス内耳での klotho、SOD、TRPチャネルの局在

今回の研究によりマウス内耳では老化遺伝子である klotho 蛋白が主として水分輸送上皮である血管条、前庭暗細胞とともに感覚細胞に存在し、内リンパの恒常性の維持や感覚細胞障害の軽減に働いていることが明らかとなった。

また、フリーラジカルの消去に働く SOD は内耳の広範な部位に存在しており、フリーラジカルによる内耳障害の抑制に働いていると考えられた。

内耳でのTRPチャネルの発現に関して、今回の研究から内耳には殆ど全てのTRPチャネルが発現しており、それぞれ様々な機能に関連していることが推察された。その主な役割として、TRPVについては主としてTRPV1-3が感覚細胞の興奮伝達機構に関与し、TRPV4(TRPV2)が内耳での水、イオンの

恒常性の維持や感覚細胞での浸透圧受容に関わること、TRPV5,6は内耳でのCa²⁺の再吸収に関与し、TRPMについてはTRPM3,6,7が水分や内リンパの恒常性の維持に、TRPM2,3,4,6,7,8が感覚細胞の受容機構に、TRPM2,7が細胞障害に関与し、TRPM8、TRPA1は特に感覚細胞からの神経伝達に関与すると考えられた。また、TRPCについてはTRPC3が外有毛細胞の運動性に関与することも報告されており、TRPC1-7の殆どがほぼ似た分布形式をとることから内耳での感覚細胞の興奮伝達に関与することが推察された。TRPMLについてはTRPML3の異常が難聴や前庭機能障害を引き起こすこと、TRPML1、TRPML2の分布がTRPML3と同一であることから、主としてTRPML3が感覚細胞の発生、興奮伝達、内耳での水、イオンの恒常性の維持にTRPML1、TRPML2と共同して働くと考えられた。TRPPに関してはTRPP3が内耳での内リンパの恒常性の維持に関与していると思われた。

さらに今回の結果から内耳では感覚細胞を始めとして様々な領域で複数のTRPチャネルが発現しており、例えば温度感受性チャネルとしてのTRPV1-4、TRPM8、TRPA1などは神経節細胞には全てが発現し、細胞容積の変化を感受するTRPV4、TRPM3、TRPP3などは血管条に共存している。すなわち類似した機能を持つTRPチャネルが複数存在していることは内耳での機能を複数で担っていることを示し、ひとつが欠損したとしても大きな機能障害が生じないようにしているという機構の存在が示唆された。今後は各チャネルのknockoutマウスの研究と共に複数のチャネルのknockoutマウスを用いた研究が必要と考えられた。

(3) 老齢動物におけるklotho、TRPV5、TRPV6の変化

老齢動物ではフリーラジカルの増加が認められ、それが加齢による内耳障害に大きく関わっていることが確認された。一方、フリーラジカルを消去するSODの発現の低下がコルチ器、前庭器感覚細胞、血管条、暗細胞、蝸牛神経節、前庭神経節で認められた。さらに、血管条、暗細胞、感覚細胞で認められたklothoの発現が老齢動物では低下しており、TRPV5、TRPV6の内耳での発現の低下も認められた。これらのことより、加齢によるSOD、klotho蛋白の発現の低下が酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させ感覚細胞障害を引き起こすと共に内リンパの恒常性の破綻を引き起こすと考えられた。さらにklotho

の低下はTRPV5、TRPV6の発現の低下を誘導し内耳でのCa²⁺代謝の障害を引き起こし感覚細胞興奮伝達の障害や難聴、めまいを起こすと考えられた。

(4) 高齢者の感音難聴に対する抗酸化剤の治療効果

今回、老人性難聴に対して抗酸化剤を投与し、その治療効果を検討した結果、良好な成績を上げることができた。抗酸化剤の投与期間は8~52週、平均12.9週であり、抗酸化剤投与前後の聴力レベルを各周波数別に比較し、10dB以上の改善があったものを改善、10~-10dBを不変、10dB以上悪化したものを悪化、とすると最終投与時の改善率はそれぞれ125Hzで44%、250Hzで41%、500Hzで37%、1kHzで24%、2kHzで10%、4kHzで23%、8kHzで37%であった。各周波数別の聴力レベルの比較ではいずれの周波数においても有意な改善(7周波数平均で最大25.7dB)を認めた。

一般に感染、騒音、耳中毒性薬剤による難聴は感覚細胞が最も障害を受けやすい高音域から生じ、低音域の障害には内リンパ水腫あるいは血管条、血管障害などが関与するとされているが今回の検討から老人性難聴といえども高音域や低音域では聴力が改善する可能性が認められることが明らかとなった。今後は抗酸化剤のみならず血流改善剤などの併用により老人性難聴の予防治療の可能性について追及していきたい。

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10件)

1. Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, Hirakawa K, Anniko M: Expression of transient receptor potential channel melastin (TRPM) 1-8 and TRPA1 (ankyrin) in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol* 2009, in press. (査読有り)
2. Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, Hirakawa K, Anniko M: Age-dependent changes in the expression of klotho protein, TRPV5 and TRPV6 in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol* 2009, in press. (査読有り)
3. Takumida M, Anniko M: Radical scavengers for elderly patients with age-related hearing loss. *Acta Otolaryngol* 129: 36-44, 2009. (査読有り)
4. Ishibashi T, Takumida M, Akagi N, Hirakawa K, Anniko M: Changes in transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2,

- 3 and 4 expression in mouse inner ear following gentamicin challenge. Acta Otolaryngol 129: 116-126, 2009. (査読有り)
5. Takumida M, Akagi N, Anniko M: A new animal model for Meniere's disease. Acta Otolaryngol 128: 263-271, 2008. (査読有り)
6. Ishibashi T, Takumida M, Akagi N, Hirakawa K, Anniko M: Expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3 and 4 in mouse inner ear. Acta Otolaryngol 128: 1286-1293, 2008. (査読有り)
7. Akagi N, Takumida M, Anniko M: Effect of inner ear blood flow changes on the endolymphatic sac. Acta Otolaryngol 128: 1187-1195, 2008. (査読有り)
8. 大谷真喜子、工田昌矢: 女性めまい患者の年齢期別臨床検討-若年期・更年期・老年期の比較-. Equilibrium Res 67: 130-140, 2008. (査読有り)
9. Taguchi D, Takeda T, Kakigi A, Takumida M, Nishioka R, Kitano H: Expression of aquaporin-2, vasopressin type 2 receptor, transient receptor channel vanilloid (TRPV) 1 and TRPV4 in the human endolymphatic sac. Laryngoscope 117: 24-29, 2007. (査読有り)
10. Takumida M, Takeda T, Takeda S, Kakigi A, Nakatani H, Anniko M: Protective effect of edaravone against endolymphatic hydrops. Acta Otolaryngol 127: 1124-1131, 2007. (査読有り)

[学会発表] (計7件)

1. 工田昌矢、平川勝洋: モデル動物からみたメニエール病の病態. 第67回日本めまい平衡医学会. 2008年10月30日、秋田
2. 工田昌矢、石橋卓弥、平川勝洋: マウス内耳での TRPM、TRPA1 の発現. 第17回日本耳科学会. 2008年10月17日、神戸
3. 工田昌矢、大谷真喜子、東稔由加里: 高齢者の感音難聴に対する抗酸化剤の治療効果. 第8回日本抗加齢医学会総会. 2008年6月6日、東京
4. 石橋卓弥、工田昌矢、濱本隆夫、立川隆治、平川勝洋: GM 投与によるマウス内耳 TRPV の発現の変化. 第109回日本耳鼻咽喉科学会. 2008年5月16日、大阪
5. Takumida M, Hirakawa K, Akagi N, Anniko M: Endolymphatic hydrops caused by treatment of aldosterone and/or lipopolysaccharide: A new animal model for Meniere's disease. XXV Barany Society

Meeting. April 1, 2008, Kyoto.

6. 工田昌矢、平川勝洋: メニエール病の新しい動物モデル. 第66回日本めまい平衡医学会. 2007年, 11月, 15日, 大阪
7. 工田昌矢、石橋卓弥、平川勝洋: マウス内耳での TRPV の発現. 第17回日本耳科学会. 2007年10月18日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工田 昌也 (TAKUMIDA MASAYA)
 広島大学・病院・講師
 研究者番号: 00179590

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

平川 勝洋 (HIRAKAWA KATSUHIRO)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号: 30144843

石橋 卓弥 (ISHIBASHI TAKUYA)
 広島大学・病院・医員
 研究者番号: 50448239

濱本 隆夫 (HAMAMOTO TAKAO)
 広島大学・病院・医員
 研究者番号: 70448249