

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390440

研究課題名（和文）老人性難聴の発症機序の解明および予防法の開発に関する研究

研究課題名（英文）Study on the mechanism of the age-related hearing loss and establishment of its preventive treatment

研究代表者

山嵜 達也（YAMASOBA TATSUYA）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60251302

研究成果の概要（和文）：ビタミンC合成のできないSMP30/GNL欠失マウスを用いた研究ではビタミンCの内耳での著明低下により有意に老人性難聴が悪化すること、ビタミンCを過剰に補っても老人性難聴の予防はできないことが判明した。ミトコンドリア内のCatalaseを過剰発現させると老人性難聴の発現は抑止された。また17種の活性酸素除去効果のあるサプリメントの検討では $\alpha$ リポ酸、CoQ10、NACの3種類に抑制効果が見られた。これら老人性難聴の進行が抑制されたマウスの蝸牛ではBakの発現が有意に減少していた。Bak欠失マウスでは老人性難聴は抑制された。これらの結果から、蝸牛内に生じる活性酸素による慢性的障害がBakを介したアポトーシスを蝸牛内細胞に引き起こし、老人性難聴が生じることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Deficiency of vitamin C accelerated presbycusis (ARHL), whereas supplementation of vitamin C did not attenuate ARHL in C57BL/6 mice. The onset of ARHL was delayed when catalase was over-expressed in mitochondria in C57BL/6 mice. Such attenuation of ARHL was also observed when C57BL/6 mice were given alpha-lipoic acid, CoQ10, or NAC. Expression of Bak significantly decreased in the cochleae of the mice showing attenuation of ARHL. ARHL was significantly attenuated in Bak-deficient mice, but not in Bax-deficient mice. These findings suggest that chronic oxidative stress induced Bak-dependent apoptosis in the cochlear cells, resulting in the development of ARHL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：老化、蝸牛、ミトコンドリア、アポトーシス、難聴、酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

65歳以上の25-40%、75歳以上の40-66%、85歳以上の80%以上が老人性難聴に罹患すると推定される (Yueh B et al, *JAMA* 2003)。日本では現在800万人が老人性難聴に罹患していると思われ、高齢化に伴い今後の増加が予想される。聴力障害は高齢者のQOLおよび社会活動に大きく影響することが示されており、その経済的影響も大きい。しかしながら老人性難聴の発症機序は不明であり、その予防・治療についてもほとんど検討されていない。

老化の原因にはいくつかの説があるが、酸化ストレス説とミトコンドリア機能障害説の二つが主に考えられている。前者ではsuperoxide dismutase (SOD) の欠失 (ホモ) マウスで加齢による難聴の進行が示されたが、ヘテロでは聴力への影響は無く、SOD過剰発現マウスでも難聴の予防は見られないことなども報告されている。蝸牛内の内在性antioxidantの加齢に伴う変化も一様ではなく、free radical scavengerによる老人性難聴予防効果に関する報告も少ない。

ミトコンドリア機能障害は酸化ストレスの下流の現象として重要であり、特にmitochondrial DNA (mtDNA) の変異・欠失と老化の関係が注目されている。この説に基づいた老人性難聴の発症・予防に関する基礎研究は国内外で2、3のグループしか行っていない。我々はmtDNA 異常による感音難聴の発症に興味を持ち、特定の遺伝子変異による感音難聴について聴覚生理・側頭骨病理・分子生物学的手法を用いて研究

してきた。またミトコンドリア脳筋症モデル動物も作成し、内耳病態について解析した。最近 mtDNA の修復機能をもつ polymerase  $\gamma$  に点変異を導入して mtDNA の変異が加速的に蓄積するマウス (POLGマウス) を作成し、早期から白髪・脱毛・脊椎彎曲などの加齢変化を示すこと、有毛細胞・ラセン神経節のapoptosisによる変性から難聴を来すことを報告した (Kujoth GC et al, *Science* 2005)。この結果は加齢に伴う mtDNA 変異の蓄積が老人性難聴を引き起こすことを示唆している。

老人性難聴の発症には遺伝素因と環境要因など複雑な要素が影響していると推測されるが、このようなheterogeneousな要因の解析には遺伝子やタンパク質を網羅的に解析する手法が適している。我々はDNA microarrayを用い、マウス蝸牛から遺伝子発現を解析する手法を確立した。これまでいくつかの老人性難聴モデルマウスを解析し、ミトコンドリア機能・エネルギー代謝の障害により有毛細胞・ラセン神経節細胞などがp53を介した経路でapoptosisになり、老人性難聴が出現するという仮説を得ている。また26%カロリー制限がC57BL/6マウスの加齢に伴う難聴・蝸牛組織変化・蝸牛内遺伝子発現変化を抑制すること、これがエネルギー代謝に関与するミトコンドリア関連遺伝子や*Sirt1*の発現亢進に伴うことを見出した (Someya S et al, *Neurobiol Aging* 2007)。これらの結果はmtDNAの障害を予防してミトコンドリア機能を維持することにより、老人性難聴が予防可能であることを示唆している。

カロリー制限は老化を予防する介入方法であり、*Sirt1*発現増加が重要であることが知られている。我々は*Sirt1*欠失マウスを作成し機能解析・遺伝子解析を行っている。これ自体意義のある研究であるが、さらに*p53*欠失マウスとの交配により、*Sirt1*の機能と*p53*を介したapoptosis発現との関係も検討する。赤ワインに含まれるresveratrolは*Sirt1*を亢進させてカロリー制限と同じ老化抑制効果を示すこと、 $\alpha$ -リポ酸、ALCARなどのmitochondrial metabolite、ビタミンC、Eなどの抗酸化物質も老化抑制効果を示すことが報告されている (Yamasoba T et al, *Hear Res* 2007)。今回の研究ではこれらのサプリメントを含め、抗加齢作用を持つ物質を単独・組み合わせで投与し、マウスでの老人性難聴の予防効果を検討する。この結果はヒトにおける老人性難聴の予防を考える上で重要である。特にmtDNAの障害蓄積が促進されるPOLGマウスにおいて予防効果が得られれば重大な意義を持つと思われる。

## 2. 研究の目的

次の点を明らかにする。

- (1) 寿命延長の重要因子である*Sirt1*の老人性難聴発現における役割
- (2) Apoptosisの誘導と老人性難聴の発現との関係
- (3) カロリー制限の老人性難聴予防効果の機序
- (4) 各種サプリメントやその組み合わせによる老人性難聴の予防法の開発

## 3. 研究の方法

研究は大きく、遺伝子改変マウスを用いた実験と、サプリメント等食餌療法の効果を調べる実験に分かれる。解析は 1) ABR を用いた機能解析、2) 光顕・免疫染色・透過電顕

による組織観察、3) DNA microarray、Quantitative PCR法による遺伝子解析により行った。

## 4. 研究成果

まずビタミンC合成のできないSMP30/GNL欠失マウスを用い、ビタミンCの欠乏による老人性難聴の影響を調べた。ビタミンCを与えないマウスでは蝸牛内、肝臓、血漿中のビタミンCが著明に低下し、ビタミンC投与群や野生型と比べて有意に老人性難聴が悪化し、ラセン神経節細胞も減少していた。一方ビタミンCを投与しても老人性難聴の予防はできなかった。

次にミトコンドリア内のCatalase過剰発現マウスを用いて、加齢によるABR閾値上昇を調べた。その結果Catalase過剰発現により老化に伴う聴力低下がC57BL6マウスに比べて有意に抑えられていた。

さらに17種の活性酸素除去効果のあるサプリのC57BL6マウスにおける老人性難聴進行抑制効果を調べた。このうち $\alpha$ リポ酸、CoQ10、NACの3種類は有意に老人性難聴の進行を抑制した。これら老人性難聴の進行が抑制されたマウスの蝸牛ではBakの発現が有意に減少していた。

そこでBak欠失マウスを用い、老人性難聴発現におけるBakの働きを調べた。Bax欠失マウスでは加齢によるABR閾値上昇がC57BL6マウスと差がなく、Baxは老人性難聴発現に関与しないことが判明した。一方、Bak欠失マウスでは加齢によるABR閾値上昇がC57BL6マウスに比べて抑えられることを見出した。これらの結果から、蝸牛内に生じる活性酸素による慢性的障害からBakを介したアポトーシスが蝸牛内の細胞に生じ、老人性難聴が生じることが示唆された。

高脂肪食により老人性難聴が悪化するか、

またそれが水素水やスタチンにより予防できるかに関して実験を開始したところ、高脂肪食により糖代謝が悪化し、体重が増加し、難聴が悪化する傾向が見られた。水素水投与により難聴悪化は抑制傾向にあったが、有意には至らなかった。なお水素水は同じく酸化ストレスの関与する音響外傷においては有意に内耳障害を軽減した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ①Lin Y, Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Kakigi A, Yamasoba T. Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Neurosci Lett*. 2011;487:12-6. 査読有
- ②Someya S, Tanokura M, Weindruch R, Prolla TA, Yamasoba T. Effects of caloric restriction on age-related hearing loss in rodents and rhesus monkeys. *Curr Aging Sci*. 2010;3:20-5. 査読有
- ③樫尾明憲、山岨達也. 老人性難聴へのアプローチ. 酸化ストレスとミトコンドリア障害説. *Otol Jpn* 20:191-196, 2010. 査読有
- ④Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, Rabinovitch PS, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Prolla TA. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:19432-19437. 査読有
- ⑤Kashio A, Amano A, Kondo Y, Sakamoto T, Iwamura H, Suzuki M, Ishigami A, Yamasoba T. Effect of vitamin C depletion on age-related hearing loss in SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390:394-398. 査読有
- ⑥山岨達也. 老人性難聴の発生機序および予防法の検討. 高齢難聴者のケア. p105-110, 2009 長寿科学振興財団. 査読無
- ⑦山岨達也. 聴覚の老化予防. *医学のあゆみ* 231: 253-254, 2009. 査読無
- ⑧山岨達也. 内耳疾患の治療をめざして 基礎研究の最前線 加齢による内耳変性 老人性難聴の予防に向けて 日耳鼻 2009: 112: 414-421. 査読有
- ⑨Someya S, Yamasoba T, Kujoth GC, Pugh TD, Weindruch R, Tanokura M, Prolla TA: The role of mtDNA mutations in the pathogenesis of age-related hearing loss in mice carrying a mutator DNA polymerase  $\gamma$ . *Neurobiol Aging* 2008;29:1080-1092. 査読有
- ⑩山岨達也. 聴覚とアンチエイジング. アンチエイジング医学の基礎と臨床 (改訂 2 版) *Medical View* 358-360, 2008. 査読無
- ⑪染谷慎一、山岨達也、田之倉優. 老人性難聴とカロリー制限. *Anti-aging Medicine* 4:614-620, 2008. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ①第111 回日本耳鼻咽喉科学会 2010. 5. 20-22 仙台  
林穎, 樫尾明憲, 山岨達也 Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced temporary threshold shifts.
- ②聴覚アンチエイジング研究会 2009. 7. 3 東京  
樫尾明憲, 岩村 均, 坂本幸士, 山岨達也, 近藤嘉高, 石上昭人 SMP30/GNLK0マウスを用いた加齢性難聴に対するビタミンC の

影響

③聴覚アンチエイジング研究会 2009. 7. 3

東京

坂本幸士, 榎尾明憲, 安井拓也, 鈴木光也,  
山嵜達也 C57BL/6 マウスの蝸牛・脳にお  
ける抗酸化物質含有量の経年齢的变化の検  
討

④Biochemistry and toxicology of the inner  
ear Kresge Hearing Research Institute  
Symposium 2009. 6. 25 Ann Arbor,  
Michigan, USA

Yamasoba T Role of mitochondrial ROS in  
age-related hearing loss.

⑤日本抗加齢医学会 2009. 5. 28-30 東京

山嵜達也, 榎尾明憲, 近藤嘉高, 石神昭人,  
坂本幸士, 岩村 忍, 鈴木光也 マウスの  
老人性難聴に対するビタミンC の欠乏およ  
び補充の影響

⑥日本抗加齢医学会 2009. 5. 28-30 東京

染谷慎一, 近藤健二, 山嵜達也, 田之倉優,  
Prolla TA. 老人性難聴における酸化ストレ  
スの役割 .

⑦ARO 32nd MidWinter Meeting 2009. 2. 14-19  
Baltimore, USA

Tatsuya Yamasoba, Akinori Kashio,  
Takashi Sakamoto, Hitoshi Iwamura,  
Mitsuya Suzuki, Yoshitake Kondo, Akihito  
Ishigami.  
Effect of modulating vitamin C levels on  
age-related hearing loss

⑧第109回日本耳鼻咽喉科学会 2008.

5. 15-17 大阪

山嵜達也 加齢による内耳変性 老人性難  
聴の予防に向けて

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山嵜 達也 (YAMASOBA TATSUYA)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60251302

(2)研究分担者

近藤 健二 (KONDO KENJI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40334370

坂本 幸士 (SAKAMOTO TAKASHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50323548

(3)連携研究者

なし