

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月26日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592157

研究課題名（和文） 内耳熱ショック応答の加齢による変化と老人性難聴への応用

研究課題名（英文） The Relationship between Aging and Heat Shock Response in the Inner Ear

研究代表者

山下 裕司 (YAMASHITA HIROSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00210419

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、加齢内耳における熱ショック応答の変化を明らかにし、熱ショック応答を応用した内耳保護療法を老人性難聴に将来的に臨床応用することである。本研究においては老人性難聴マウスやHSF1欠損マウスにおける熱ショック蛋白質の発現について検討した。結果として加齢に伴う難聴の進行と内耳における熱ショック応答の変化が老人性難聴に強く関わっていることを明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms of age-related hearing loss have not been elucidated as aging processes are extremely complex. We examined age-related expression of HSPs in the cochlea of animal model of age-related hearing loss. The results showed that the mice showed weakening expression of Hsp70 and Hsp110 with age. In addition, we showed that hearing loss deteriorated in HSF1 null mice. These results demonstrate that the heat shock responses have a grate role in the age-related hearing loss.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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，老化，熱ショック蛋白質

1. 研究開始当初の背景

我が国の人口の高齢化は益々深刻化し、社会問題となっている。この高齢者において罹患率の高い疾患として老人性難聴が知られている。65-75歳の約40%が老人性難聴を発症しているとするデータも報告されており、さらに高齢者では罹患率は高いものと考えられる。難聴の進行は患者のQOLを低下さ

せるだけでなく、補聴器、人工内耳などの高額医療を必要とし、医療費、社会保障費を増大させる要因ともなっている。にもかかわらず、老人性難聴の病態は十分に明らかにされたとはいえず、その治療法も明らかにされていない。

これらのことから、老人性難聴の病態解明と治療方法の開発が強く望まれているのが

現状である。これまでの研究から、加齢内耳では感覚細胞障害、らせん神経節細胞障害、血管条の萎縮といった形態の変化が原因のひとつとして知られている。いかに長期的に副作用を伴わずに細胞障害を抑制するかが患者の聴覚予後を考える上で重要である。

我々は、すべての生体に備わる生体防御機構である熱ショック応答に着目し、それを制御する熱ショック転写因子 HSF1 による内耳保護が、新しい治療法の候補になると考えた。

まだ、検討中であるが、老人性難聴モデルマウスでは、内耳における熱ショック蛋白質の発現が変化しており、老人性難聴の原因のひとつとして、内耳における熱ショック応答の変化が関与している可能性があると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、加齢内耳における熱ショック応答の変化を明らかにし、熱ショック応答を応用した内耳保護療法を老人性難聴の治療の将来的な臨床応用に向けた研究を行うことである。そのため我々は、まず、加齢内耳において熱ショック転写因子 (HSF1) がどのような役割を持つのかを明らかにしたい。そして、熱ショック応答を誘導できる薬剤 (テプレノン等) を投与することで熱ショック応答を誘導し、熱ショック応答による老人性難聴の治療モデルを作成、解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 熱ショック応答の加齢内耳における役割の解析

加齢内耳における熱ショック転写因子の役割を明らかにするために、老人性難聴マウスにおける熱ショック蛋白質の発現について検討した。使用動物としては、CBA/N (コントロールマウス)、C57BL/6 (老人性難聴モデルマウス)、DBA/2J (早期老人性難聴モデルマウス) を用いた。これらのマウスの2ヶ月齢、8ヶ月齢の段階で ABR 検査、免疫組織学検査、ウエスタンブロット解析を行い、内耳機能、熱ショック蛋白質、熱ショック転写因子の内耳における局在、発現量について検討した。

上記のマウスを強大音に暴露することにより、内耳に熱ショック応答を誘導し、3、6、12 時間後に内耳組織を摘出する。ウエスタンブロット解析で熱ショック蛋白質の定量を行うことで、熱ショック応答の程度を検討する。また、組織学的検査で内耳における熱ショック応答の局在を評価した。

一部の動物は内耳障害後、2 週間生存させ、経時的に ABR 検査で聴覚機能を評価し、実験終了後に、組織学的に内耳感覚細胞の残存率を測定し、内耳障害の程度を評価した。

(2) 遺伝子改変動物を用いた加齢と熱ショック応答の解析

熱ショック転写因子である HSF1 の形質転換動物 (HSF1 欠損マウス (山口大学第二生化学講座より提供)、野生型マウス) を用いて、加齢と内耳における熱ショック応答の関係を明らかにした。

マウスを、8ヶ月まで飼育し、ABR 検査、組織学的検査、マイクロアレイ解析によって、熱ショック応答の過剰、あるいは減弱した状態が、内耳の加齢性変化にもたらす影響について検討した。

(3) 老人性難聴の治療モデルの開発

HSF1 を介した熱ショック応答誘導物質であるテプレノンを経口投与し、老人性難聴モデルマウスの老人性難聴を抑制できないかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 熱ショック応答の加齢内耳における役割の解析

老人性難聴モデルマウス・コントロールマウス共に、内耳における熱ショック蛋白質の発現は加齢と共に増加する傾向を認めた。強大音に暴露すると熱ショック蛋白質の発現はさらに増加するが、老人性難聴マウスでは、強大音に暴露しても熱ショック蛋白質の発現は増加しなかった。このことは、加齢内耳では熱ショック応答が減弱しており、結果として障害されやすい状態になっていると考えられた。

(2) 遺伝子改変動物を用いた加齢と熱ショック応答の解析

熱ショック転写因子である HSF1 の形質転換動物を用いて、加齢と内耳における熱ショック応答の関係を明らかにした。

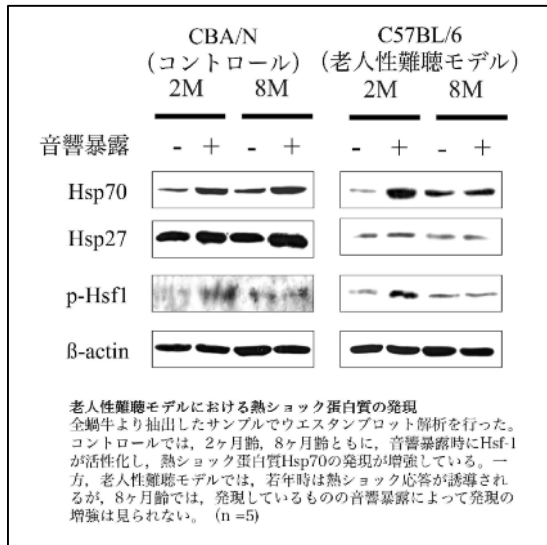
実験動物として、野生型マウス、HSF1 欠損マウス (山口大学第二生化学講座より提供) を、8ヶ月まで飼育し、ABR 検査、組織学的検査、RNA マイクロアレイ、ウエスタンブロット解析によって、熱ショック応答の過剰、あるいは減弱した状態が、内耳の加齢性変化にもたらす影響について検討した。

その結果、HSF1 欠損マウスは、加齢とともに難聴が進行し、内耳感覚細胞の障害が進行した。内耳障害の様式は老人性難聴に類似するものであった。また、加齢に伴い内耳における熱ショック蛋白質の発現が減弱していることが明らかとなった。この変化は、加齢内耳の脆弱性の一因として熱ショック応答の減弱が関与していると考えられた。現在、英語論文作成中で近日中に報告予定である。

(3) 老人性難聴の治療モデルの開発

老人性難聴モデル動物に対して、テプレノン投与し、聴覚を評価したところ。テプレノン投与群では難聴の進行が抑制された。12ヶ月まで評価予定で有り、最終評価終了後、

組織学的検討を加えて、報告予定である。



以上の結果は、加齢に伴う難聴の進行と内耳における熱ショック応答の変化が老人性難聴に強く関わっていることを示唆するものである。結果は国内外の学会で発表し、高い評価を得ることができた。

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 12 件)

- ① Nakamoto T, Mikuriya T, Sugahara K, Hirose Y, Hashimoto T, Shimogori H, Takii R, Nakai A, Yamashita H. Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. *Auris Nasus Larynx*: Epub, 2011. (査読有)
DOI: 10.1016/j.anl.2011.06.001
- ② 橋本 誠, 山下裕司. 難聴に対する鼓室注入による局所治療. *ENTONI* 132 : 50-54, 2011. (査読無)
- ③ 吉田周平, 菅原一真, 豊田英樹, 金川英寿, 下郡博明, 山下裕司. SSSR、FGLM-NH2 による有毛細胞保護効果について. *頭頸部自律神経* 25 : 22-23, 2011. (査読無)
- ④ 豊田英樹, 下郡博明, 菅原一真, 吉田周平, 山下裕司. AMPA による末梢前庭障害に対する FGLM+SSSR の効果. *頭頸部自律神経* 25 : 20-21, 2011. (査読無)
- ⑤ 橋本 誠, 山下裕司. めまい急性期に対するカクテル療法. *ENTONI*120 : 8-13, 2010. (査読無)
- ⑥ 山下裕司. 前庭神経炎. *CLINICAN*587 : 33-37, 2010. (査読無)
- ⑦ 山下裕司, 御厨剛史. 熱ショック応答と

内耳保護機能. *耳鼻咽喉科展望* 52:10-16, 2009. (査読無)

- ⑧ Orita H, Shimogori H, Yamashita H. Unilateral intra-perilymphatic infusion of substance P enhances ipsilateral vestibulo-ocular reflex gains in the sinusoidal rotation test. *Neuroscience Letters*449 : 207-210, 2009. (査読有)
- ⑨ 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 中本哲也, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司. 加齢における内耳熱ショック蛋白質発現の変化. *頭頸部自律神経* 第26回頭頸部自律神経研究会記録集 23 : 33-35, 2009. (査読無)
- ⑩ 菅原一真, 宮内裕爾, 広瀬敬信, 御厨剛史, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司. 前庭感覚細胞死における Bcl-xL の役割. *頭頸部自律神経* 第 26 回頭頸部自律神経研究会記録集 23 : 30-32, 2009. (査読無)
- ⑪ 池田卓生, 橋本 誠, 山下裕司. ImageJ を用いた眼振解析とその表示-平衡機能検査法基準化のための資料に基づいて-. *Equilibrium Res*68 : 92-96, 2009. (査読無)
- ⑫ 山下裕司. 内耳疾患の治療をめざして-基礎研究の最前線-末梢前庭器保護を目的とした治療戦略-. *日本耳鼻咽喉科学会会報* 112 : 12-17, 2009. (査読無)

[学会発表] (計 29 件)

- ① Hideki Toyota, Hiroaki Shimogori, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita : Topical Application of FGLM-NH2 and SSSR Facilitates Vestibular Functional Recovery Induced by AMPA 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012. 2. 25 San Diego (USA) (ポスター)
- ② Syuhei Yoshida, Hiroaki Shimogori, Hideki Toyota, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita : Vestibular Research and AMPA 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012. 2. 25 San Diego (USA) (ポスター)
- ③ Kazuma Sugahara, Junko Tsuda, Eiju Kanagawa, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Age Related Hearing Loss in the Animal Model of Diabetes with Obesity 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012. 2. 25 San Diego (USA) (ポスター)
- ④ Kazuma Sugahara, Junko Tsuda, Eiju

- Kanagawa, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Relation Between Formation of Aggregations and Upregulation of Heart Shock Protein in Animal Models 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012.2.25 San Diego (USA) (ポスター)
- ⑤ Makoto Hashimoto, Takuo Ikeda, Kazuma Sugahara, Hironori Fujii, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Analysis of the Eye Movement by Original Video-Oculography, HI-VOG 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012.2.25 San Diego (USA) (ポスター)
- ⑥ Eiju Kanagawa, Kazuma Sugahara, Hideki Toyota, Takefumi Mikuriya, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Action of Substance P on the Recovery from the Acoustic Trauma 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012.2.25 San Diego (USA) (ポスター)
- ⑦ Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita : Screening for Protective Effect in Supplement Drugs Using the Zebrafish Lateral Line 35th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology 2012.2.25 San Diego (USA) (ポスター)
- ⑧ Kazuma Sugahara, Junko Tsuda, Hiroshi Yamashita : Age related hearing loss in animal model of diabetes with obesity. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2011.12.8 ANA クラウンプラザ神戸 神戸 (講演)
- ⑨ Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Takefumi Mikuriya, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Intratympanic Free Radical Scavenger (Edaravone) as Rescue Therapy in Sudden Sensorineural Hearing Loss. 34th ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2011.2.19 Baltimore (USA) (ポスター)
- ⑩ Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Eiju Kanagawa, Syuhei Yoshida, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Incase of Aggregations After Noise Injury in Guinea Pig. 34th ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2011.2.19 Baltimore (USA) (ポスター)
- ⑪ Eiju Kanagawa, Kazuma Sugahara, Hideki Toyota, Takefumi Mikuriya, Kenji Takeno, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Effect of Substance P on the Recovery from the Acoustic Trauma. 34th ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2011.2.19 Baltimore (USA) (ポスター)
- ⑫ Syuhei Yoshida, Kazuma Sugahara, Eiju Kanagawa, Hideki Toyota, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Insulin-Like Growth Factor-1 Peptide Can Protect Vestibular Hair Cells Against the Neomycin Ototoxicity. 34th ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2011.2.19 Baltimore (USA) (ポスター)
- ⑬ Hideki Toyota, Hiroaki Shimogori, Syuhei Yoshida, Kazuma Sugahara, Hirotaka Hara, Hiroshi Yamashita : Unilateral Intra Perilymphatic Infusion of FGLM-Amide and SSSR Facilitates Vestibular Functional Recovery Against AMPA-Induced Vestibulotoxicity. 34th ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2011.2.19 Baltimore (USA) (ポスター)
- ⑭ Hiroaki Shimogori, Hideki Toyota, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Takefumi Mikuriya, Hiroshi Yamashita : Can Antidepressant Facilitate the Recovery of Peripheral Vestibular Function from Inner Ear Damage? 34th ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2011.2.19 Baltimore (USA) (ポスター)
- ⑮ Hiroshi Yamashita : The Strategies against the Hair Cell Degeneration with Otoprotective Molecules. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders 2010.11.14 国立京都国際会館 京都 (シンポジスト)
- ⑯ Hiroaki Shimogori, Hideki Toyota, Kenji Takeno, Hiroshi Orita, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita : Effect of Unilateral Intra-perilymphatic Infusion of Substance P or P-derived Peptide (FGLM-NH₂) on AMPA-induced Vestibulotoxicity in Guinea Pigs. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders 2010.11.14 国立京都国際会館 京都 (講演)
- ⑰ Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori,

- Hiroshi Yamashita : The Protective Effect of Resveratrol against the Hair Cell Degeneration Induced by Neomycin. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders 2010. 11. 14 国立京都国際会館 京都 (講演)
- ⑱ Hiroshi Yamashita, Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Hiroaki Shimogori : The Role of HSF1 in the Maintenance of the Inner Ear Function. 13th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery 2010. 9. 9 Seoul (Korea) (講演)
- ⑲ Hiroshi Yamashita, Hiroaki Shimogori, Hideki Toyota, Kenji Takeno, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto : Unilateral intra perilymphatic infusion of sub-stance P facilitates vestibular functional recovery against AMPA-induced vestibulotoxicity. 26th Barany Society Meeting 2010. 8. 18 Reykjavik (Iceland) (講演)
- ⑳ Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Yujiro Fukuda, Hideki Toyota, Kenji Takeno, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : The protective effect of resveratrol on vestibular hair cells death 26th Barany Society Meeting 2010. 8. 18 Reykjavik (Iceland) (海外招待講演)
- ㉑ Makoto Hashimoto, Kazuma Sugahara, Ikeda Takuo, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : Quantitative Analysis of Nystagmus by Image Analysis Technique 33RD ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2010. 2. 6 Anaheim (USA) (ポスター)
- ㉒ Tetsuya Nakamoto, Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita : The Expression of Proinflammatory Cytokines After Acoustic Overexposure 33RD ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2010. 2. 6 Anaheim (USA) (ポスター)
- ㉓ Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Yujiro Fukuda, Hideki Toyota, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : The Protection of Vestibular Hair Cells with Resveratrol 33RD ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2010. 2. 6 Anaheim (USA) (ポスター)
- ㉔ Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : The Change of Aggregations with Heat Shock Protein 70 in the Cochlea During Aging 33RD ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2010. 2. 6 Anaheim (USA) (ポスター)
- ㉕ Hiroaki Shimogori, Hideki Toyota, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Hiroshi Yamashita : Can Inner Ear Application of Rolipram, a P-CREB Up-Regulator, Induce Phosphorylation of CREB in Vestibular Ganglion Cells? 33RD ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY 2010. 2. 6 Anaheim (USA) (ポスター)
- ㉖ Hiroshi Yamashita, Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Hiroaki Shimogori, Akira Nakai : The Role of HSF1 in the Maintenance of the Inner Ear Function 10th Taiwan Japan Otolaryngology Head & Neck Conference 2009. 12. 4 Yilan (Taiwan) (講演)
- ㉗ Hiroshi Yamashita : HSF1 is essential for the maintenance of inner ear function 46th Workshop on Inner Ear Biology 2009. 9. 12 Utrecht (Netherlands) (講演)
- ㉘ Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita : The oral administration of teprenone can protect the vestibular hair cells. 第19回 IFOS 2009 BRAZIL 2009. 6. 1 Sao Paulo (Brazil) (ポスター)
- ㉙ Hiroshi Yamashita : Efficacy Using Animal Models 第19回 IFOS 2009 BRAZIL 2009. 6. 1 Sao Paulo (Brazil) (シンポジスト)
- [図書] (計4件)
- ① 菅原一真, 山下裕司. 永井書店 感音難聴と酸化ストレス. よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて : 2010. 334-336
- ② 山下裕司. 中外医学社 前庭神経炎の治療のEBMとは?. EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 : 2010. 218-219
- ③ 山下裕司, 菅原一真. 炎症・再生医学事典. 再生医学-体性幹細胞と組織修復-耳鼻咽喉 : 2009. 450-452
- ④ 山下裕司, 下郡博明. 金原出版 耳内ドラッグデリバリーと薬物療法. めまいと平衡障害 : 2009. 145-149

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 裕司 (YAMASHITA HIROSHI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00210419

(2) 研究分担者

下郡 博明 (SHIMOGORI HIROAKI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70226273
菅原 一真 (SUGAHARA KAZUMA)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20346555
御厨 剛史 (MIKURIYA TAKEFUMI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00467797