

## 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 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592170

研究課題名（和文） 免疫操作による老人性難聴の予防—分子生物学的機序の解析

研究課題名（英文） Immunological prevention of age-related hearing loss: analysis of its molecular biological mechanisms

研究代表者 岩井 大（Iwai Hiroshi）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10232638

研究成果の概要（和文）：老人性難聴の予防法はいまだ確立できていない。我々はこの難聴の原因の一つが、免疫担当細胞である CD4<sup>+</sup> T リンパ球の遺伝子異常にあると考え、老人性難聴モデルマウス（SAMP1）を用いて研究した。その結果、若いマウスから採取された T リンパ球の接種や、T リンパ球を産生する胎児胸腺の移植によって、難聴を予防できること、その機序は T リンパ球のインターロイキン 1 受容体 2 型（IL-1R2）遺伝子の発現抑制と関係していることを明らかにした。本研究結果は、難聴予防やさらに抗加齢治療解明に役立つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that rejuvenation of the recipient immunity by inoculation of young CD4<sup>+</sup> T cells or a fetal thymus graft led to down regulation of the interleukin 1 receptor type II (IL-1R2) gene in CD4<sup>+</sup> T cells and reduced age-related hearing loss in SAMP1 mice, a murine model of human senescence. Our studies on the relationship between age-related systemic immune dysfunctions and neurodegeneration mechanisms open up new avenues of treatment of neurosenescence, including presbycusis, for which there is no effective therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：老人性難聴、免疫老化、IL-1R2、CD4<sup>+</sup>T 細胞、胎児胸腺、Treg、浸透圧ポンプ

## 1. 研究開始当初の背景

難聴による意思の疎通障害は、生活の質（QOL, quality of life）を損ねるとともに、

精神活動を阻害し、社会環境からの孤立を招く。加齢性感音難聴（age-related hearing loss, AHL）、いわゆる老人性難聴は哺乳類共

通の疾患であり、加齢個体で頻度の高い感覚障害である。高齢化社会を迎えた先進諸国では、この老人性難聴の罹患人口は多く、さらには増加傾向である。したがって老人性難聴は、社会において早急に解決されるべき懸案の一つといえるであろう。しかしながら、この重大な加齢性神経変性 (neurodegeneration) 疾患に対する予防法や治療法は、いまだ確立されていない。抗加齢研究のひとつにカロリー制限があり、ほ乳類の加齢性変化の速度を遅らせ寿命を延長するという報告や、齧歯類の加齢に伴う難聴や蝸牛の組織障害を遅延させるという報告がある。ただし、このカロリー制限はヒトにおいては摂食習慣の制限を強いるものであり、先進諸国の国民において、実行不可能、あるいは生活の質を低下させるものとも考えられる。

胸腺組織の萎縮は、免疫老化 (immunosenescence) の主な原因であり、血液幹細胞からの前駆 T リンパ球を成熟させ体循環に供給する機能を停止させる。内耳免疫機構は、全身免疫機構の一部であり (iwai et al. 1999, 2008)、蝸牛変性や難聴との関連性が指摘されている (Cserr and Knopf, 1992)。今回我々は、SAMP1 (the senescence-associated mouse type 1) という老人性難聴モデルマウスを用いて実験を行った。SAMP1 は、AKR/N マウスと同じ遺伝子背景を持つがこのマウスと異なり、早期胸腺萎縮と T リンパ球を中心とした免疫機能低下を示し、さらに AHL (およそ 5ヶ月齢から難聴が顕著化)・螺旋神経節 (spiral ganglion, SG) 細胞萎縮・老人性角膜炎・脱毛・脊椎彎曲などの加齢徴候を示す。我々はこのマウスを用い、病原体が除かれた環境で飼育すると AHL 進行が遅延することを示した (iwai, et al. 2003)。実際、免疫学的に清潔な環境での飼育は、カロリー制限と同様、実験動物の免疫老化を遅らせ寿命を延長するとされる (Hosono et al. 1997)。

我々は以前、自己免疫性疾患モデルマウスである MRL/lpr において、併発する進行性感音難聴の原因が、蝸牛異常にあるのではなく全身免疫機能異常にあることを示した。すなわち、このマウスの難聴や蝸牛病変が、非疾患マウスからの骨髄細胞を用いて全身免疫機構を置き換える同種 (allogeneic) 骨髄移植により、予防、さらに治療できることを示した (iwai, et al. 2005, 2008)。また、SAMP1 において、若年マウスのリンパ球を同系 (syngeneic) 接種すると、加齢 SAMP1 の AHL 進行を阻止できることを示した (iwai et al. 2008)。

## 2. 研究の目的

SAMP1 を用い、免疫学・分子生物学の両側

面から老人性難聴発症機序と予防法の解明を行う。すなわち、ホストの胸腺萎縮と免疫老化を防ぐために、胎児胸腺の移植を行い、移植胎児胸腺の免疫若返り (rejuvenescence)・免疫老化阻止・難聴阻止の効果を検討する。さらに、この効果に寄与する免疫担当細胞とその遺伝子を同定し、全身免疫機構が関与する蝸牛聴覚ニューロン (SG) の抗加齢作用機序を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス: SAMP1、AKR マウスは SLC (静岡) より購入され、当大学動物センターにて SPF 下に飼育された。

(2) プロトコール 1: SAMP1 胎齢 18-19 日の胎児から採取した胸腺 1 個を、麻酔された 2ヶ月齢 SAMP1 の左腎被膜下に移植した。6ヶ月後に T リンパ球機能・聴覚検査・胸腺移植片と蝸牛の病理学的検査を行った。コントロールとして、無処置の 2ヶ月齢 SAMP1 と 8ヶ月齢 SAMP1 を用い、各群 10 匹ずつとした。

(3) プロトコール 2: SAMP1 を各群 10 匹の 6 群とした。4 および 6 ヶ月齢の時点で、2ヶ月齢の SAMP1 の 1 個の脾臓から採ったリンパ球または T リンパ球、CD4<sup>+</sup>T リンパ球、CD8<sup>+</sup>T リンパ球、B リンパ球、生理食塩水 (コントロール群として) を経静脈的に接種した。

(4) プロトコール 3: AKR/N (コントロール群)、2ヶ月齢 SAMP1 (A 群)・8ヶ月齢 SAMP1 (B 群)・プロトコール 1 と同様に胎児胸腺を移植された 8ヶ月齢 SAMP1 (C 群) を作製した。これらのマウスの脾臓 CD4<sup>+</sup>T リンパ球を用いて、加齢性免疫機能障害に加え加齢性聴覚機能障害に関する遺伝子を DNA microarray を用いて検討した。また、脾臓およびリンパ節からのリンパ球の細胞表面抗原をフローサイトメトリーで検索した。

(5) プロトコール 4: 28 日型ミニポンプに、抗 IL-1R2 抗体、または、IL-7、Keratin growth factor (KGF) を装填し、これを 3ヶ月齢 SAMP1 の背部皮下に移植した。28 日ごとに取り出して新たに移植し、合計 84 日間に渡りこれらの投与を行い、その後聴覚機能を検討した。

(6) 聴性脳幹反応 (auditory brainstem response, ABR): sound stimulator よりクリック音あるいは純音を発生させ、マウスの一側外耳道に閉鎖チューブで伝えた。聴覚閾値決定には螺旋神経節の機能を示す第 1 波を指標とした。

(7) 病理組織学および免疫組織化学的検査: マウスを心還流固定のち蝸牛を取り出し、脱灰のうえ凍結切片を作製し、HE 染色を行った。

(8) SG 細胞カウント: SG の切片で、apex、middle、basal 各 turn の SG 細胞数を Lumina Vision Software (Mitani Corp, 福井) で計測し、10,000  $\mu\text{m}^2$  における細胞密度を算出した。

(9) T細胞増殖反応: 脾リンパ球を T細胞増殖因子である concanavalinA (conA) とともに培養し、増殖能を測定した。

(10) フローサイトメトリー: 脾臓あるいはリンパ節からのリンパ球を採取し、蛍光 (PE あるいは FITC) 標識抗体を用い、FACSscanにて解析した。

(11) 同系接種用リンパ球の単離: 脾リンパ球からの Tリンパ球、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球、CD8<sup>+</sup>T、Bリンパ球の分離には、各種ラット抗マウス抗体とシーブ抗ラット IgG 付着ビーズを用いる negative selection を行った。

(12) CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の単離と total RNA 抽出: 上記で得られた CD4<sup>+</sup>Tリンパ球は、さらに positive selection (FITC-抗 CD3 抗体と PE-抗 CD4 抗体、FACSscan を用いたソーティング) された。調節された細胞から total RNA を抽出した。

(13) DNA microarray 遺伝子解析: total RNA は RNA amplification を行い cDNA に変換後、Alligent Whole Mouse Genome microarray (Alligent Technologies) を用いて hybridization を行った。

(14) インターロイキン 1 受容体タイプ 1 (IL-1R1) および IL-1R2 検索: PE 抗 IL-1R1 (CD121a) 抗体と抗 IL-1R2 (CD121b) 抗体を用いて、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球のフローサイトメトリーを行った。

(15) 28 日型ミニポンプに、抗 IL-1R2 抗体、または、IL-7、Keratin growth factor (KGF) を装填し、これを SAMP1 の背部皮下に移植した。28 日ごとに取り出して新たに移植し、合計 84 日間に渡り、これらの投与を行い、その後聴覚機能を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 研究の主な成果

(1) プロトコール 1 において、①同系移植された胎児胸腺は腎被膜下に正着し、正常な構築を示していた (図 1)。

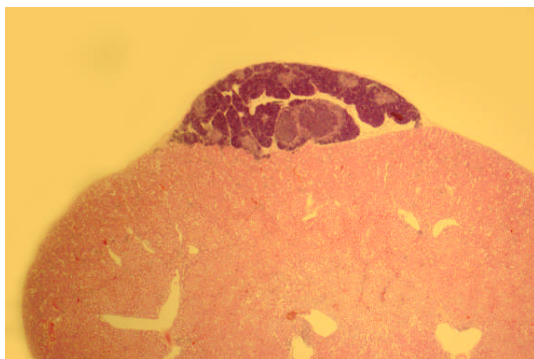


図 1. 腎被膜下に移植された胸腺 (雑誌論文⑤より引用)

②胎児胸腺移植群では、加齢性の T細胞増殖反応低下・ABR 低下 (図 2) ・SG 萎縮が軽減し

た。

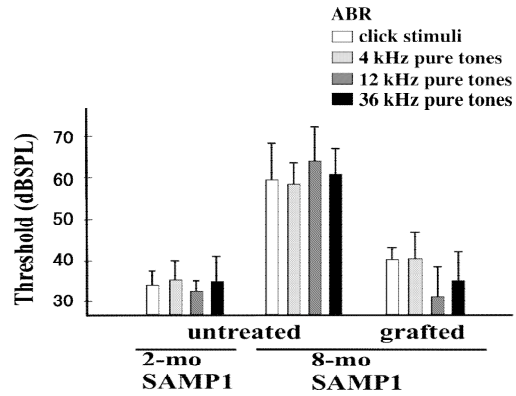


図 2. 胸腺移植の HL 抑制効果-クリック音・純音 ABR (雑誌論文⑤より引用)

(2) プロトコール 2 において、2ヶ月齢脾リンパ球のうち、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球を含む細胞 (脾リンパ球、Tリンパ球、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球) を接種された群では、その他の群 (CD8<sup>+</sup>Tリンパ球、Bリンパ球接種や無処置) に比し、AHLの進行が抑制された (図 3)。

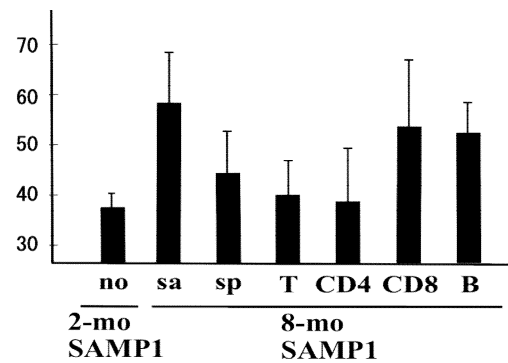


図 3. CD4<sup>+</sup>Tリンパ球接種の AHL 抑制効果-クリック音 ABR (雑誌論文⑤より引用)

(3) プロトコール 3 において、IL-1R2 遺伝子発現亢進 (up regulation, UR) が加齢性免疫機能低下・蝸牛障害の原因と考えた。その考察過程は以下のとおりである。

①CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の DNA 分析された 10,475 個の遺伝子のうち、(a) AKR/N (ワイルドタイプ) に比して、生まれて 2ヶ月を経た 2ヶ月齢 SAMP1 で遺伝子発現が変化なし、あるいは UR (2倍以上) の遺伝子、および、(b) SAMP1 の 2ヶ月齢に比し、より加齢を経た 8ヶ月齢で UR を示す遺伝子、(c) 8ヶ月齢 SAMP1 に比し、胸腺移植された SAMP1 で UR を示さない遺伝子、(d) SAMP1 の 2ヶ月齢に比し、胸腺移植をされた群で、UR も down regulation (DR, 2倍以上) も示さない遺伝子を検討し、共通する遺伝子を検索したところ、Hoxd9・Tgfb1・Tmod2・IL-1R2 の 4 遺伝子が候補に上がった。前 3 者は CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の免疫機能に直接関係しない遺伝子であり、IL-1R2 が AHL 関連遺

伝子と考えた(図4)。

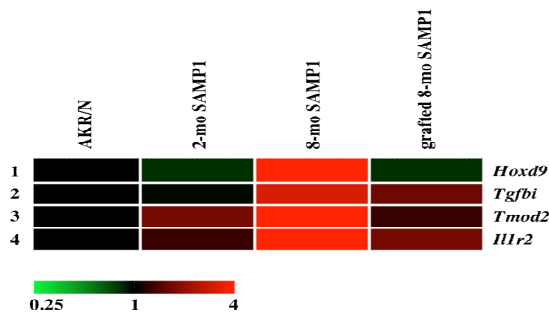


図4. DNA分析によるCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のAHL関連遺伝子の選択(雑誌論文⑤より引用)

(e) 上記の結果をを確認するために、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球上のIL-1R2をフローサイトメトリーで検索しところ、IL-1R2遺伝子発現と同様に、2ヶ月齢SAMP1でIL-1R2の発現は弱く、8ヶ月齢SAMP1で強く、一方、胸腺移植SAMP1で弱くなっていった。コントロールとして測定したIL-1R2の発現は、どの群でも一定していた(図5)。CD4<sup>+</sup>Tリンパ球のIL-1R2発現を抑えるための抗IL-1R2抗体投与や、胸腺機能を賦活化させるIL-7、KGFの投与では、SAMP1のAHL進行は抑えることが出来なかった。

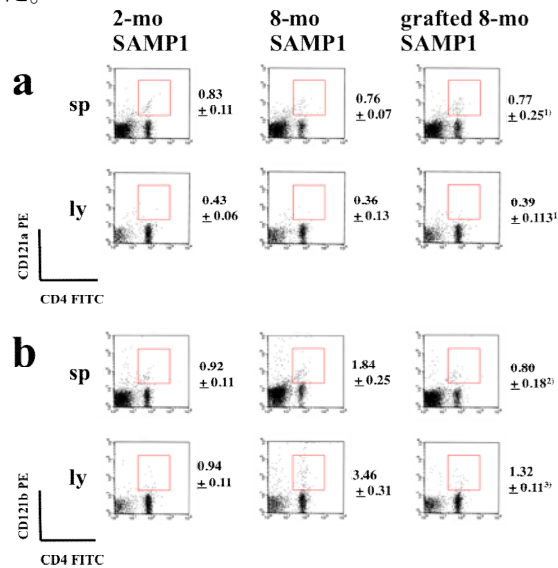


図5. 脾リンパ球(sp)・リンパ節リンパ球(ly)細胞表面におけるIL-1R1(a)・IL-1R2(b)のフローサイトメトリーによる解析(雑誌論文⑤より引用)

CD121a: anti-IL-1R1抗体。CD121b: anti-IL-1R2抗体。

### 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

加齢性免疫機能障害と認知障害は、加齢の過程における代表的な特徴である。免疫反応

異常は中枢神経での認識障害を引き起こすため、アルツハイマー病などの脳疾患にしばしば認められる。全身をめぐる免疫担当細胞が、ニューロンを含めた脳の免疫監視を行い、局所の免疫反応や炎症反応に関与するとされる。実際、胸腺を切除された動物では、Tリンパ球、マクロファージ、サイトカイン間のバランス異常のため、神経伝達や神経内分泌の異常を生じ、記憶障害を示すとされる。内耳免疫も、血液脳関門と同様の血液内耳関門を通して全身免疫機構により制御される。しかし、蝸牛の聴覚機能や聴覚ニューロン維持に関する全身免疫の作用機序はいまだ不明であり、この際に働く分子生物学的機構についてはまったく解明されてこなかった。今回用いられたSAMP1は、早期に胸腺が萎縮してTリンパ球機能が低下し、同時に老化徴候を示す。したがって今回の研究結果は、移植された胎児胸腺が、本来は加齢により萎縮する宿主の胸腺に代わって骨髄幹細胞をサポートし、naïve Tリンパ球を全身免疫機構に供給して、免疫老化と蝸牛老化の防止に働いたと考えられる。また、同様の防止効果は2ヶ月齢SAMP1から採取されたCD4<sup>+</sup>Tリンパ球の接種にても得られ、総じてTリンパ球系機能の維持により、蝸牛機能も維持できることが明らかとなった。今回の我々の研究で、AHLが胸腺移植やCD4<sup>+</sup>Tリンパ球接種で予防できることが初めて明らかとなった。

次に行ったDNA解析およびフローサイトメトリーで、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球のIL-1R2が免疫・神経老化に関与していると考えられた。難聴とIL-1R2についての研究は少なく、ヒトの自己免疫性難聴において、IL-1R2発現量がステロイド治療の予後の指標となるとする報告があるのみであるが(Vambutas et al, 2009)、今回の結果から、AHLの進行にIL-1R2遺伝子発現が関与していることが初めて明らかとなった。IL-1R2は細胞内への信号伝達機能のない(decoy)受容体であり、発現することでIL-1R2と競合し、IL-1(β)への反応を低下させるとされる。IL-1は、Tリンパ球を含めた局所浸潤細胞や局所細胞に、炎症・免疫の調整因子として働き、ニューロンの細胞死や細胞維持の両方に働くとされる。アデノウイルスベクターを用いたIL-1R1 antagonist(IL-1Ra)の局所投与で、SGが萎縮することが報告されており(Komeda, et al, 1999)、IL-1は局所のnerve growth factor(NGF)や各種のサイトカイン産生を促し、神経細胞維持として作用すると考えられる。シュワン細胞や局所浸潤したTリンパ球を含めたリンパ球・マクロファージは、IL-1R1表出とIL-1分泌を行い、さらにautocrineおよびparacrineにIL-1に反応する。こうしたことから、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球におけるIL-1R2遺伝子の加齢性発現亢進は、SG

での IL-1 に対する反応性やサイトカインネットワークを阻害し、SG 萎縮や機能障害 (AHL)に至るものと考えられる。ただし、今回行った抗 IL-1R2 抗体持続投与の AHL 阻止効果は少なく、単純な抗 IL-1R2 抗体は治療には不十分と思われる。

CD4<sup>+</sup>T リンパ球が AHL と関係するもう一つの機序として、胸腺で発達しリンパ節や脾臓などの各臓器に散布され、CD4<sup>+</sup>T リンパ球のうちマウスでは 30%、ヒトでは 5%を占める CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> regulatory T リンパ球 (Treg)の関与が考えられる。このリンパ球は、抗炎症性サイトカインである IL-10 産生 T リンパ球 (Tr1)からの IL-10 あるいは細胞接触 (cell contact)により活性化され、加齢・感染・悪性腫瘍・慢性炎症・自己免疫性疾患の際の免疫機能を制御するとされる。したがって、若い SAMP1 からの CD4<sup>+</sup>T リンパ球の接種や胎児胸腺の移植により供給された Treg が、SG のアポトーシスを惹起する effector T リンパ球を抑制した可能性を考える。そこで我々は、SAMP1 の胸腺の加齢性萎縮を阻止し胸腺からの Treg 供給を増やすため、胸腺萎縮を抑制するとされる IL-7 や KGF の持続投与を行ったが効果は低かった。その理由として、これらのサイトカイン自身に効果がないのか、投与方法に問題があったのかは不明であるが、今後こうした胸腺萎縮防止療法は、AHL 等の加齢徴候の予防法として発展する可能性がある。

#### 今後の展望

胸腺や CD4<sup>+</sup>T リンパ球の機能が IL-1R2 遺伝子発現として表れ、さらに加齢で変化する蝸牛機能に関与する機序が明らかとなった。したがって、AHL 予防として、(1)ヒトにおいて胸腺は 18 歳から萎縮し始めるため、この年齢に達するまでに CD4<sup>+</sup>T リンパ球を採取して保存し、老化の始まる年齢に達した時点で、元のホストに経時的に分割して接種する。(2) 幼児の心臓手術の際を含め、18 歳を越える前に胸腺組織を一部採取し、同様に将来移植する。(3) 自己の人工多能性幹 (iPS) 細胞から胸腺組織を作製し、自己に移植する。CD4<sup>+</sup>T リンパ球は、免疫老化だけでなく、全身の老化徴候とも関連しており、これらの方法は AHL 予防のみならず抗老化効果も示す可能性があり、抗加齢医学の発展に寄与するものと考えられる。

#### 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 5 件)

- ① Iwai H, Inaba M. Fetal Thymus Graft Prevents Age-Related Hearing Loss and

Up Regulation of the IL-1 Receptor Type II Gene in CD4<sup>+</sup> T cells. J Neuroimmunol in press. (査読有り)

- ② Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. J Gastroenterol. 46,1368-81. 2011. (査読有り)
- ③ Hoshino S, Inaba M, Iwai H, Ito T, Li M, Gershwin ME, Okazaki K, Ikehara S. The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. J Autoimmunity 34, 380-389, 2010. (査読有り)
- ④ Suzuki S, Iwai H, Kaneko T, Sakaguchi M, Hoshino S, Inaba M. Induction of parotitis by fine-needle aspiration in parotid Warthin's tumor. Otolaryngol (査読有り) Head Neck Surg 141, 282-284, 2009.
- ⑤ Iwai H, Nakamichi N, Nakae K, Konishi M, Inaba M, Hoshino S, Baba S, Amakawa R. Parotid mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma regression after Helicobacter Pylori eradication. Laryngoscopy 119, 1491-1494, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Iwai H, Inaba M, Baba S, Tomoda K. Fetal Thymus Graft Prevents Presbycusis and Age-Related Up Regulation of The IL-1 Receptor Type II Gene in Helper T cells. The 48<sup>th</sup> Inner Ear Biology Workshop. 18-24 Sep. 2011. Lisbon, Portugal

- ② Iwai H, Inaba M, Baba S, Sakaguchi M, Ikehara S, Tomoda T. Immunological and genetical influence of systemic helper T cell on age-related cochlear functions. 47th Inner Ear Biology Workshop. 29 Aug- 1 Sep, 2010. Prague, Czech Republic.
- ③ Iwai H, Baba, Inaba M, Sakaguchi M, Lee S, Ikehara S, Tomoda K. Inoculation of helper T cells as a strategy for the prevention of age-related hearing loss in SAMPl mice. 48th Workshop on Inner Ear Biology. 12-15 Sep, 2009 Utrecht, The Netherland.
- ④ Baba S, Iwai H, Inaba M, Sakaguchi M, Lee S, Ikehara S, Tomoda K. Preventive effects of thymus graft on age-related hearing loss. 48th Workshop on Inner Ear Biology. 12-15 Sep, 2009 Utrecht, The Netherland.
- ⑤ 岩井 大、坂口麻理子、馬場 奨、李 進隆、友田幸一。T細胞機能維持による進行性老人性難聴予防。第19回日本耳科学会。2009, 10月8-10日。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩井 大 (IWAI HIROSHI)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10232638

### (2) 研究分担者

稲葉宗夫 (INABA MUNEO)  
関西医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：70115947

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：