

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06589

研究課題名(和文) 感音性難聴発症の病態メカニズム解明を目指した内耳蝸牛細胞保護システムに関する研究

研究課題名(英文) Research on the inner ear cochlear cell protection system to elucidate the pathomechanism of sensorineural hearing loss

研究代表者

米山 雅紀 (Yoneyama, Masanori)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：00411710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、音響性難聴誘発モデルマウスを用いて、外部からの強大な音響刺激による聴力悪化が薬物処置によって予防されることを明らかにした。その予防メカニズムの一部として、内耳蝸牛らせん靭帯の外らせん溝細胞にはオートファジーによる細胞保護機構が存在し、オートファジーの活性化が音刺激による酸化ストレスに対して聴覚機能を維持する重要な役割をもつ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚組織において、蝸牛らせん靭帯には音響刺激に対してオートファジーによる細胞保護システムが存在し、その破綻に酸化ストレスが関わっていること、及び薬物処置により活性化させることで外部からの強大な音刺激による内耳障害を予防することが出来る可能性が示唆された。本研究結果は、聴覚機能障害の発症メカニズムを理解し、より適切な感音性難聴の治療を提供する上で極めて意義深いものであり、重要かつ社会的ニーズの高いものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we prepared an animal model of permanent hearing loss and sought to determine whether rapamycin (autophagy activator) have preventive effect on noise-induced hearing loss in the model mice. To determine the activation of autophagy following noise exposure, we evaluated the expression of LC3-II (LC3 = LC3-II/LC3-I, autophagy marker) in the cochlea after a 1-h exposure to noise at 110 dB SPL. Immunoblot analysis revealed that noise exposure produced a dramatic increase in the LC3-II level of the cochlea at 1-h post-exposure. Moreover, rapamycin significantly alleviated hearing impairment induced by exposure to noise at 110-dB SPL. In addition, immunohistochemistry analysis revealed that rapamycin was effective in enhancing expression of LC3 in the cochlear lateral wall. Taken together, our data suggest that autophagy activator is a candidate of preventive drugs for sensorineural hearing loss.

研究分野：薬理学

キーワード：感音性難聴 内耳 らせん靭帯 オートファジー 外らせん溝細胞

1. 研究開始当初の背景

聴覚は生活する上で非常に重要な器官で、その機能は内耳蝸牛を構成するコルチ器、蝸牛軸、および外側壁らせん靭帯によって維持される。感音性難聴は音響刺激、耳毒性薬物、加齢等により、これら組織のうち一つでも不可逆的に障害されると発症し、その原因の多くは蝸牛コルチ器の有毛細胞死であることがモデル動物を用いた基礎研究やヒト検体において示されているが、主因ではないことが分かってきた。事実、研究代表者等は音響誘発性難聴モデルマウスにおいて有毛細胞死に先立って、蝸牛らせん靭帯の細胞に障害がみられることを見出した(研究業績6)。すなわち、感音性難聴の病態メカニズムには有毛細胞死よりも発症初期段階での蝸牛らせん靭帯の機能低下が大きく寄与すると考えられるが、その分子機序の詳細は明らかではない。

一方、研究代表者が内耳研究を進めていく過程で、一定レベルの音響刺激では蝸牛組織が抵抗性を示し、その機能が障害されることはないことが分かってきた。具体的には、マウスへの110 dBの音響刺激は聴覚閾値の上昇(聴力悪化)を引き起こすが、90 dBの音響刺激では聴力が悪化しないことを見出した。すなわち、聴覚機能に重要な内耳蝸牛組織には何らかの保護システムが存在し、その破綻により感音性難聴が発症すると考えられた。そこで、研究代表者は細胞保護システムの一つであるオートファジーに着目し、蝸牛組織に対する音響刺激の影響を解析したところ、110 dBの音響刺激は蝸牛組織にオートファジーの機能異常(LC3-II/LC3-I上昇)を引き起こすが、90 dBでは正常に機能することを明らかにし、この現象は蝸牛らせん靭帯に特異的であった。以上より、蝸牛らせん靭帯にはオートファジーのような細胞保護システムが存在し、その破綻が感音性難聴の発症に関与する可能性が非常に高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、内耳蝸牛組織の保護システムとその破綻メカニズムに関与する細胞や分子の機能的役割の解明を通じて、感音性難聴発症の病態メカニズムを明らかにすることを目的とし、得られた新しい知見から内耳蝸牛細胞保護システムの機能を予防・維持・回復させる有効な薬物を同定して、感音性難聴に対する有効かつ効果的な治療方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 聴性脳幹反応による音響刺激後のマウス聴覚機能の解析

5週齢Std-ddY系雄性マウスに8 kHz octave band noise、90 dBあるいは110 dBの音響刺激を1時間曝露した。その後、各マウスをイソフルランによる全身麻酔下において、4、12および20 kHzの各周波数について聴性脳幹反応(ABR)を指標に聴力を測定した。

(2) マウス内耳内への薬物投与

Std-ddY系雄性マウス左耳後部を切開し、中耳から正円窓を露出させ、正円窓膜付近にchloroquine (CQ、オートファジー阻害剤) 40 mMを1時間留置し蝸牛内に浸透させた。一方、rapamycin (Rap、オートファジー活性化剤) 0.5 mMは110 dBの音響刺激24時間前にマウス左耳後部を切開し、中耳から骨胞を開放して露出させた蝸牛正円窓上部にRapを浸透させた止血用ゼラチンスポンジを留置し蝸牛内に浸透させた。

(3) 音響刺激後のマウス聴覚組織由来タンパク質抽出液の調整およびウエスタンブロットティング法による解析

音響曝露後のマウスから検鏡下において、蝸牛らせん靭帯を切り出し、その蝸牛組織からタンパク質抽出液を調整した。調整したタンパク質抽出液について、LC3 (LC3-II/LC3-I、オートファゴソームマーカー)、4-hydroxynoneal (4HNE、酸化ストレスマーカー)に対する抗体を用いてウエスタンブロットティング法により解析した。

(4) 音響刺激後のマウス聴覚組織切片の作成および免疫組織化学法による解析

音響刺激後のマウスを4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行った。続いて、摘出した内耳蝸牛をBouin固定液(飽和ピクリン酸、ホルマリン、酢酸 = 15:5:1)を用いて、内耳内を再還流し、同固定液で一晩固定を行った。固定後の内耳はパラフィン包埋して、内耳蝸牛切片を作成した。作成したマウス蝸牛切片について、LC3(オートファジーマーカー)およびSLC26A4(外らせん溝細胞マーカー)に対する抗体を用いて免疫組織化学法により解析した。

4. 研究成果

(1) 90 dB 音響刺激では蝸牛らせん靭帯ではオートファジー機能に異常はみられない

(1)-1 マウス聴覚機能に対する音響刺激の影響

マウス聴覚機能に対する音響刺激の影響を明らかにするために、5週齢の雄性マウスに90 dBあるいは110 dBの音響刺激を1時間曝露した後、4、12および20 kHzの各周波数について聴性脳幹反応(ABR)を指標に聴力を測定した。ABRの結果、90 dB音響刺激群では聴力変化はみられなかったが、110 dB音響刺激群では有意な聴覚閾値の上昇(聴力悪化)が認められた。

(1)-2 蝸牛らせん靭帯でのLC-3発現に対する90 dB音響刺激の影響

聴力悪化が認められる110 dBの音響刺激が蝸牛らせん靭帯特異的にオートファジーの機能異常(LC3-II/LC3-I上昇)を引き起こす。一方、90 dBの音響刺激は聴力を悪化させない。そこで、蝸牛らせん靭帯でのLC-3発現に対する90 dB音響刺激の影響について、90 dB音響刺激後のマウスから蝸牛らせん靭帯を切り出し、タンパク質抽出液を調整しLC-3に対する抗体を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、90 dB音響刺激はらせん靭帯でのLC3-II/LC3-Iの発現割合に影響しないことが明らかとなった。つまり、90 dBの音響刺激は、らせん靭帯でのオートファジー機能に影響しない、もしくはらせん靭帯では90 dBの音響刺激の影響をオートファジーシステムが速やかに排除している可能性が考えられた。

(2) 聴覚機能における音響刺激に対するCQの影響

(2)-1 蝸牛におけるオートファジー活性の発現

マウス蝸牛内でのオートファジー活性を解析するために、マウスの内耳内にオートファジー阻害剤であるCQ(40 mM)を処置し、CQ処置後に蝸牛内耳切片を作成後、オートファゴソームマーカーであるLC3に対する抗体を用いて免疫組織化学法を行った。その結果、対照群では蝸牛らせん靭帯でのみにLC3の発現が認められた。さらに、CQ処置後のマウス蝸牛において、コルチ器およびらせん神経節ではLC3の発現はみられなかったが、らせん靭帯ではLC3発現の明らかな増強が認められた。すなわち、マウス蝸牛らせん靭帯では恒常的にオートファジー活性が高いことが推察された。

(2)-2 音響刺激に対するCQ処置の影響

マウスの内耳内にCQ(40 mM)を処置1時間後に90 dBの音響刺激を行った。その1時間後に刺激したマウスの聴覚閾値をABRにより測定した。その結果、4、12および20 kHzの全ての周波数において、CQ処置は90 dB音響刺激による聴覚閾値変動を有意に上昇させることが明らかとなった(図1、** $p < 0.01$ vs CQ処置群)。すなわち、聴力を悪化させない90 dB音響刺激が、蝸牛らせん靭帯でのオートファジー機能が阻害されることにより、マウス聴覚機能の異常を誘発した可能性が示唆された。

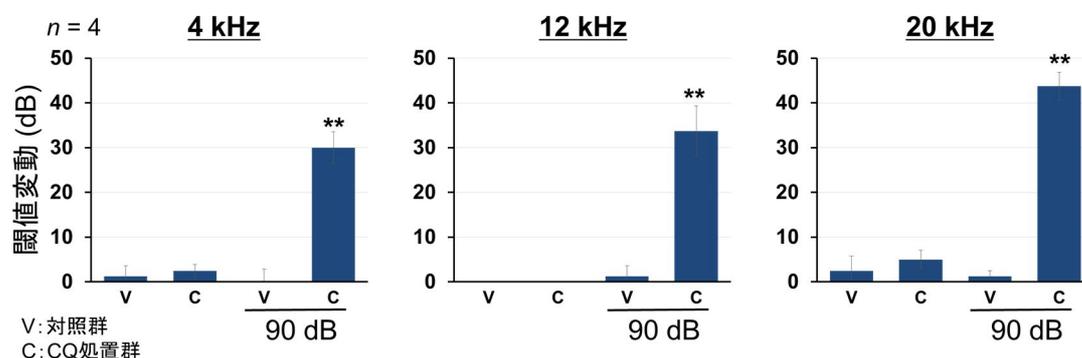


図1 90 dB音響刺激による聴覚閾値変動に対するCQの影響

(3) 聴覚機能における音響刺激に対する Rap の影響

(3) - 1 音響刺激に対する Rap の影響

マウスの蝸牛内耳内にオートファジー活性化剤である Rap(0.2 mM、0.5 mM)を処置後に蝸牛内十分に浸透させた。続いて、110 dB の音響刺激を 1 時間行った後、ABR により聴覚閾値を測定した。その結果、4、12 および 20 kHz の全ての周波数において、Rap 処置は 110 dB 音響刺激による聴覚閾値の上昇を濃度依存的に抑制することが明らかとなった(図 2、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 対照群)。つまり、オートファジー機能の活性化は 110 dB 音響刺激による聴力悪化を抑制することが推察された。

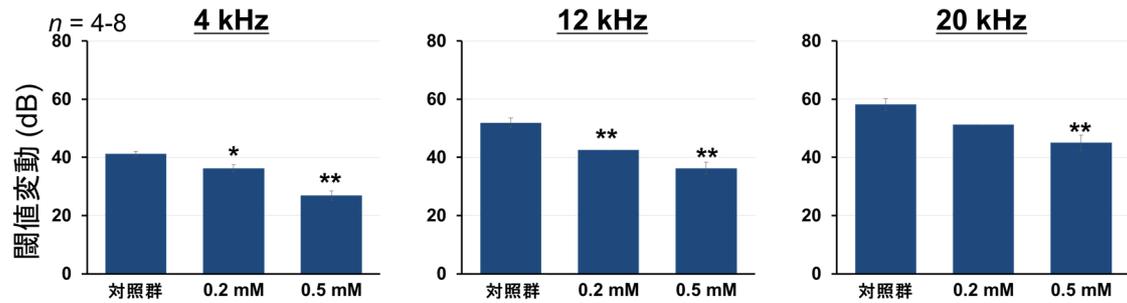


図 2 110 dB 音響刺激による聴覚閾値変動に対する Rap の影響

(4) 蝸牛らせん靭帯におけるオートファジー活性化細胞の同定

先行研究において、マウス蝸牛らせん靭帯での LC3 陽性細胞は、その形態学的特長から外らせん溝細胞であると推察されたため、110 dB 音響刺激後のマウスを 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後に内耳蝸牛を取り出し、パラフィン包埋して、内耳蝸牛切片を作成した。作成したマウス蝸牛切片について、LC3 および SLC26A4 (外らせん溝細胞マーカー) に対する抗体を用いて免疫組織化学法により解析した。その結果、対照群および 110 dB 音響刺激群ともに SLC26A6 と LC3 両抗体の陽性反応は完全に一致し、110 dB 音響刺激群では対処群に比べて明らかな増強反応が認められた(図 3)。このことから、蝸牛らせん靭帯の外らせん溝細胞において、オートファジー活性が高いことが明らかとなった。

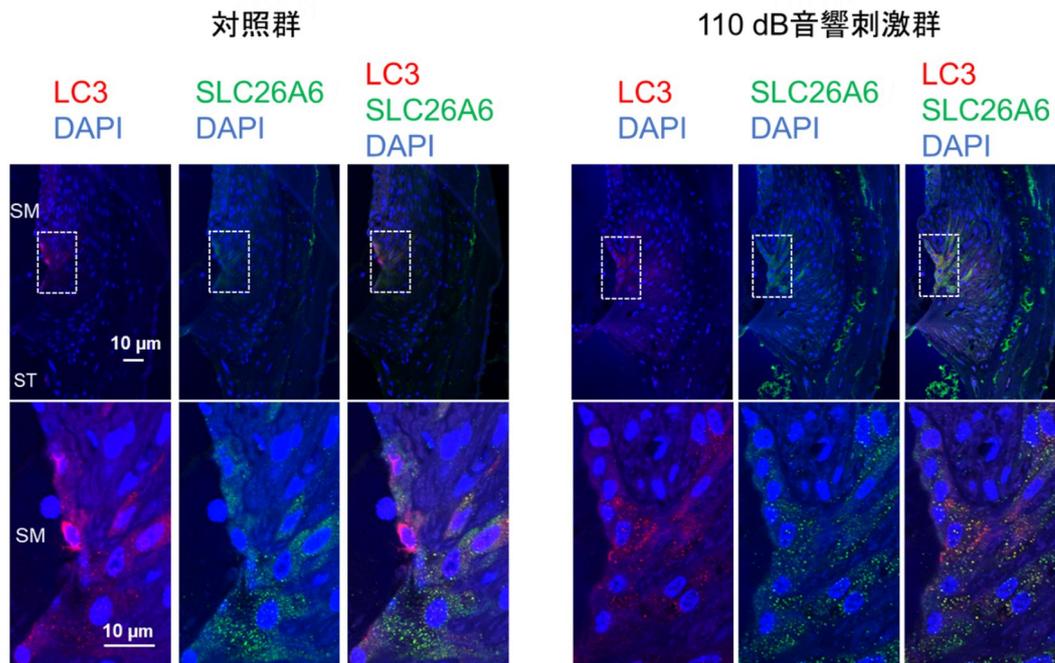


図 3 110 dB 音響刺激後の蝸牛らせん靭帯における LC3 及び SLC26A6 の発現

(5) 音響刺激は蝸牛らせん靭帯での酸化ストレスを誘発する

先行研究において 110 dB の音響刺激が蝸牛らせん靭帯特異的にオートファジーの機能異常 (LC3-II/LC3-I 上昇) を引き起こす。そこで、110 dB 音響刺激後のマウスから蝸牛らせん靭帯を切り出し、その蝸牛組織からタンパク質抽出液を調整した。調整したタンパク質抽出液について、4HNE に対する抗体を用いてウエスタンブロットング法により解析した。その結果、110 dB 音響刺激群において 4HNE 付加タンパク質の有意な発現増加が認められる複数のバンドが検出された。さらに、発現増加が認められた 4HNE 付加タンパク質に対する Rap の影響を解析したところ、Rap 処置はらせん靭帯での 110 dB 音響刺激由来の 4HNE 付加タンパク質の発現増加を有意に抑制することが明らかとなった。すなわち、110 dB の音響刺激は蝸牛らせん靭帯において酸化ストレスを誘発すると考えられ、らせん靭帯ではオートファジーにより酸化ストレスから細胞を保護している可能性が示唆された。

以上の結果から、蝸牛らせん靭帯の外らせん溝細胞にはオートファジーによる細胞保護機構が存在し、そのメカニズムの一部に外部からの音刺激による酸化ストレスに対して聴覚機能を維持する重要な役割をもつ可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taro Yamaguchi, Masanori Yoneyama, Yusuke Onaka, Kiyokazu Ogita	4. 巻 86
2. 論文標題 A novel model of sensorineural hearing loss induced by repeated exposure to moderate noise in mice: the preventive effect of resveratrol	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 381-388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.23-0477	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 Yusuke Onaka, Taro Yamaguchi, Masanori Yoneyama	4. 巻 1796
2. 論文標題 Treatment with cyclophosphamide in post-weaning mice causes prolonged suppression of neural stem cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2022.148108	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30件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎拓夢、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 Fluoxetineは腫瘍切除後に持続する社会性の低下および海馬microgliaの形態変化を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 米山雅紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 NMDA受容体の活性化はマウス中大脳動脈閉塞による脳損傷を抑制する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口太郎、井上奈美、清水陽介、尾中勇祐、新村貴博、合田光寛、石澤啓介、米山雅紀
2. 発表標題 シスプラチンが引き起こす薬剤性難聴に対する予防薬の探索
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森重幸紀、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 海馬顆粒神経細胞変性後の神経幹・前駆細胞に対するPAR-1阻害薬の脳室内投与の影響
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎拓夢、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 腫瘍切除マウスの行動異常はフルオキセチン感受性の抑うつ症状を反映する
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 メマンチンはトリメチルスズが誘発する一過的な認知機能障害の回復を遅延させる
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口太郎、井上奈美、清水陽介、尾中勇祐、吉岡俊彦、合田光寛、石澤啓介、米山雅紀
2. 発表標題 シスプラチンによる薬剤性難聴に対する予防薬の探索
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎拓夢、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 腫瘍切除マウスにおけるうつ様行動および海馬神経細胞の構造変化に対するmicrogliaの関与
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 若林由莉、山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 反復騒音曝露に伴う聴覚障害における蝸牛マクロファージの関与
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米山雅紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 マウス脳虚血再灌流障害に対するNMDA前投与の神経保護効果
3. 学会等名 第66回日本神経化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎拓夢、米山雅紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 腫瘍切除マウスのうつ様行動における海馬ミクログリアの形態変化の関与
3. 学会等名 第143回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米山雅紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 マウス脳虚血性神経損傷に対するN-methyl-D-aspartic acid前処置による脳保護効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上奈美、山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 有毛細胞障害時に放出される蝸牛由来細胞外小胞に関する基礎的研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 若林由莉、山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 蝸牛マクロファージは内有毛細胞 - 蝸牛神経間のシナプス数を減少させる
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口太郎、井上奈美、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 蝸牛器管培養における有毛細胞 - 蝸牛神経間のシナプスの評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 シクロホスファミドは持続的な成体海馬神経幹・前駆細胞の増殖能の低下を伴うストレス反応性の増大を誘発する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米山雅紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 成体脳海馬歯状回神経変性後に生成された神経系幹・前駆細胞のグルタチオンによる増殖制御
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 蝸牛内マクロファージは内有毛細胞シナプス数を減少させることにより感音難聴発症に関与する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 離乳後のクロホスファミドの急性適応が成体期のストレス反応性および海馬神経幹・前駆細胞の増殖能に与える影響
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎拓夢、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 腫瘍切除マウスの物体探索意欲の低下における海馬ミクログリアの関与
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山川三貴也、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 成体海馬由来神経幹・前駆細胞の増殖および分化におけるプロスタグランジンI2シグナルの役割に関する薬理的検討
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾中勇祐、山口太郎、新谷紀人、橋本均、米山雅紀
2. 発表標題 ミノサイクリンは腫瘍切除マウスで認められるうつ様行動および海馬ミクログリアの形態変化を改善する
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米山雅紀、林里紗、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 ニューロン障害後の海馬歯状回神経系幹・前駆細胞の増殖にグルタチオンが関与する
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中谷公紀、米山雅紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 強大音響曝露に対する蝸牛内オートファジー活性化による外らせん溝細胞の役割
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 太郎、喜多 知子、坂本 達則、三輪 徹、尾中 勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いたメトホルミン全身投与後の内耳内分布の可視化
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米山雅紀、中谷公紀、山口太郎、尾中勇祐
2. 発表標題 ラバマイシンは蝸牛外側壁でのオートファジーを促進して騒音刺激による聴力損失を軽減する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾中勇祐、中島由紀典、米山雅紀、山口太郎
2. 発表標題 腫瘍切除後に持続する社会性の低下における海馬ミクログリアの関与の可能性
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口太郎、上村真侑子、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 蝸牛内の炎症は内毛細胞-蝸牛神経間のシナプス数を減少させる
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上村真侑子、山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀
2. 発表標題 難聴発症における蝸牛内マクロファージの関与
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村拓郎、尾中勇祐、山口太郎、米山雅紀
2. 発表標題 幼若期におけるシクロホスファミド投与が海馬神経幹・前駆細胞に与える持続的な影響
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

摂南大学 薬学部 薬理学研究室
<https://jet-p1ow-362.notion.site/Top-719c4ed990304cacbec0b7394a34c79c>
摂南大学薬学部薬理学研究室
<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakuri/>

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	山口 太郎 (Yamaguchi Taro) (30710701)	摂南大学・薬学部・講師 (34428)	

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