

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16825

研究課題名（和文）NRF2活性化モニタリングマウスを用いた内耳酸化ストレス障害の局在と病態の研究

研究課題名（英文）Localization and pathogenesis of inner ear oxidative stress injury using NRF2 activation monitoring mice.

研究代表者

大石 哲也 (Oishi, Tetsuya)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30898995

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：内耳蝸牛における酸化ストレス障害部位を、NRF2の活性化を介して検出することを目的に、遺伝子改変マウスを構築し解析を行った。同マウスは酸化ストレスが発生した細胞において赤色蛍光の発現が誘導されるため、細胞レベルで酸化ストレス障害部位を同定することが可能なマウスである。このマウスに対してシスプラチン投与の酸化ストレス負荷を与えた所、蝸牛における蛍光発現細胞を多く認めた。更に、蝸牛内の蛍光発現細胞の分布を観察すると、血管条やラセン靭帯といった蝸牛側壁やラセン板縁に多く発現しており、酸化ストレス障害が生じやすい領域である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

NRF2の活性化は蝸牛における酸化ストレス障害を軽減させ、難聴の進行を抑制するという非常に重要な機能を持つと考えられる。

しかし、全身性のNRF2活性化マウスにおける加齢性難聴の解析では聴力低下の抑制が不十分な部分もあった。本研究では内耳の血管条やラセン靭帯といった蝸牛側壁や、ラセン板縁といった領域が酸化ストレス障害が生じやすいことが示唆され、その領域で特にNRF2活性化を誘導することが効果的な難聴治療・予防につながると考えられた。今後、これらの領域に着目し、更に検討を更に行うことで、酸化ストレス障害と関連した新たな分子機構の発見につながることも期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to detect the site of oxidative stress damage in the cochlea via activation of NRF2, we constructed and analyzed transgenic mice. The mice are capable of identifying the site of oxidative stress damage at the cellular level because red fluorescent expression is induced in the cells where oxidative stress occurs. When these mice were subjected to oxidative stress with cisplatin, many fluorescent-expressing cells were observed in the cochlea. Furthermore, observation of the distribution of fluorescent cells in the cochlea showed that they were mostly expressed in the lateral wall of the cochlea, such as the stria vascularis and spiral ligament, and at the spiral limbs, suggesting that these are the area vulnerable to oxidative stress injury.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内耳 酸化ストレス NRF2 シスプラチン難聴 ラセン靭帯

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴、騒音性難聴、シスプラチンによる薬剤性難聴といった後天性難聴の患者数は、世界中で増加している。特に加齢性難聴は、現代の超高齢社会において増加傾向であるが、加齢性難聴は、高齢者の QOL の低下をもたらすのみならず、脳機能低下や、アルツハイマー病やうつ病の発症率の上昇につながるということが報告されている。そのため、加齢性難聴に対する有効な予防法や治療法を確立することは、高齢者の生命、健康を守ることに大きく寄与することが期待される。加齢性難聴をはじめ、騒音性難聴や薬剤性難聴も、その発症に酸化ストレスが非常に深く関わることが明らかにされている。蝸牛において、酸化ストレス障害をもたらす活性酸素種 (ROS) は、主に NOXs (NADPH oxidases) やミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の過程で産生される。この酸化ストレスに対する最も主要な制御機構が、KEAP1-NRF2 制御系である。NRF2 は、多くの解毒や抗酸化に関わる遺伝子発現を制御する転写因子であるが、定常状態では細胞質タンパク質である KEAP1 と結合し、KEAP1-CULLIN3 ユビキチン E3 リガーゼ複合体によりユビキチン化され、プロテアソーム系により分解される。一方、酸化ストレス下では、KEAP1 は酸化修飾により失活し、安定化した NRF2 は核内へ移行して抗酸化物質応答配列に結合し、抗酸化や解毒に関わる多くの酵素の発現を誘導する。これまでのマウス実験において、騒音性難聴が NRF2 活性化で予防されることが報告されており、さらに本研究者は、NRF2 の活性化モデルである Keap1 ノックダウンマウスを解析し、NRF2 の活性化により加齢性難聴の進行が抑制されることを報告した(Oishi et al,2020)。つまり、NRF2 の活性化は、蝸牛における酸化ストレス障害を軽減させ、難聴の進行を抑制するという非常に重要な機能を持つと考えられる。一方、これまでのヒト側頭骨検体やマウスを用いた研究において、加齢性難聴では、蝸牛の有毛細胞や血管条、ラセン神経節といった複数の領域、騒音性難聴やシスプラチン難聴では、外有毛細胞に変性が生じやすいことが明らかにされている。しかし、これらは最終的な変性部位であり、変性が進行する過程において、特に酸化ストレス障害が生じやすい部位とは異なる可能性があるのではないかと考えた。そこで、内耳の有毛細胞、血管条、ラセン神経節、ラセン靭帯などの中で、酸化ストレス障害が生じやすい領域を同定し、その領域で特に NRF2 活性化を誘導することが、より効果的な治療・予防につながると考えた。本研究でこの局在を明らかにすることで、加齢性難聴のみならず、騒音性難聴や薬剤性難聴といった後天性難聴における、NRF2 活性化による新たな治療ターゲットや、酸化ストレス障害と関連した新たな分子機構の発見につながるという発想に至った。

2. 研究の目的

蝸牛の有毛細胞、血管条、ラセン神経節、ラセン靭帯などの中で、酸化ストレス障害が生じやすい領域が存在し、その領域で特に NRF2 活性化を誘導することが、より効果的な治療・予防につながると考えた。そこで本研究では、この局在を明らかにすることで、加齢性難聴のみならず、騒音性難聴や薬剤性難聴といった酸化ストレスが関連した後天性難聴において、NRF2 活性化による難聴治療のターゲットとするべき細胞領域を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

Cre/loxP システムを用いた遺伝子改変マウスである、Neh2-Cre:tdTomato マウスを構築し解析を行った。同マウスは、酸化ストレス (親電子性ストレス) が発生した細胞において tdTomato の発現が誘導されるため、細胞レベルで酸化ストレス障害部位を同定することが可能なマウスと考えられた (図 1)。

同マウスに、KEAP1 阻害剤 (=親電子性ストレス) である CDDO-Im を全身投与することで、全身の臓器で tdTomato の発現が誘導されることを確認した (図 2)。

同マウスを用いて、加齢性難聴、騒音性難聴、シスプラチン難聴が進行する経過において以下を検討した。

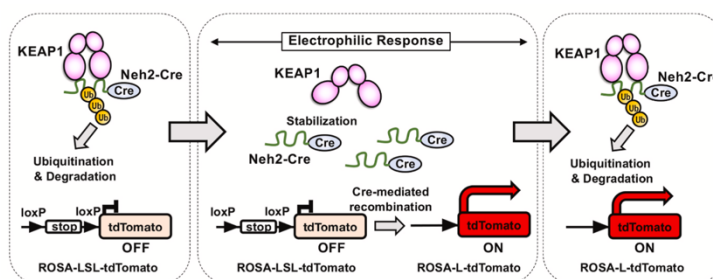


図 1 酸化ストレスによる tdTomato 発現誘導の機序

(1) ABR による聴力解析

難聴の聴力経過について ABR を用いて評価する。

(2) 組織学的解析

蝸牛の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて tdTomato 発現細胞を観察することで、蝸牛における NRF2 活性化部位を検討する。

蝸牛の回転領域ごとの差異についても評価し、酸化ストレス障害がもたらされやすい回転領域を検討し、聴力低下を示す周波数帯域との関連を検討する。

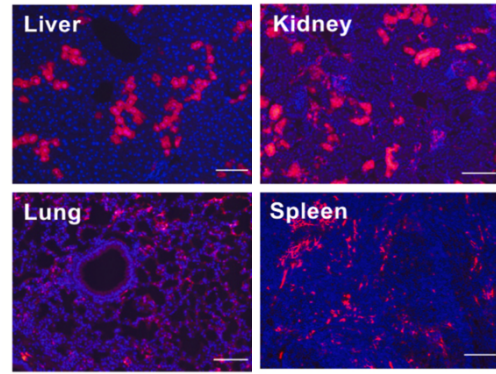


図 2 CDDO-Im による全身臓器での tdTomato 発現誘導

4. 研究成果

同マウスに強大音曝露、シスプラチン腹腔内投与、加齢といった酸化ストレス負荷を与えた所、内耳蝸牛における tdTomato 発現細胞、すなわち、酸化ストレス障害を受けたと考えられる細胞を最も多く認めたのはシスプラチン投与であった。この結果から、シスプラチンによる内耳障害には酸化ストレスが大きく関与していると考えられた。

シスプラチンの副作用として良く知られている腎障害も、その発生機序に酸化ストレスが関与することが報告されているが、今回、同マウスに対するシスプラチン投与において、他の全身臓器と比較し、腎臓において tdTomato 発現細胞が多い傾向であった(図 3)。この結果から、シスプラチンによる腎障害の発生には、やはり酸化ストレスが関与することが示唆され、同マウスが、シスプラチン投与による全身臓器の酸化ストレス障害を比較的適切に反映するモデルであると考えられた。

次に、シスプラチンを 3 サイクル反復投与後、ABR による聴力評価を行い、蝸牛内の tdTomato 発現細胞の分布を検証した(図 4)。ABR では、全周波数域でシスプラチン投与による聴力閾値の上昇を認めた(図 5)。tdTomato 発現細胞に関しては、有毛細胞やラセン神経節細胞にも発現は認められたが、血管条やラセン靭帯といった蝸牛側壁、ラセン板縁により多く発現している傾向であった(図 6, 7)。これは、シスプラチンの全身投与では、蝸牛において比較的血流分布が豊富な血管条やラセン靭帯に薬剤が到達しやすく、また残留性が高いため、同部位での酸化ストレス障害が生じやすいことが示唆された。

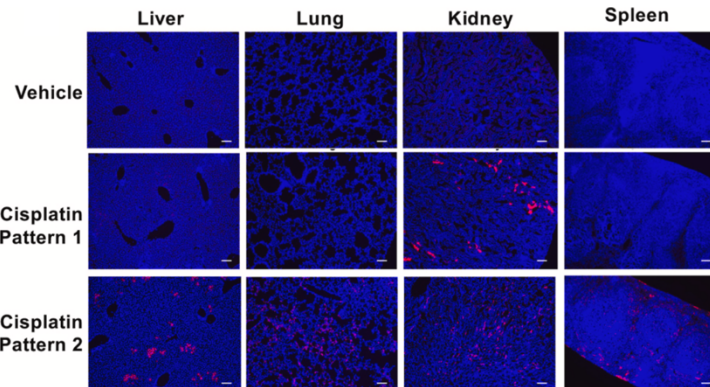


図 3 シスプラチンによる腎臓での tdTomato 発現誘導

一方で、蝸牛の回転領域ごとの tdTomato の発現には有意差を認めなかった。この結果は、前述の周波数による聴力閾値の上昇の差異がなかったことと矛盾しないと考えられた。

更に、脂肪酸結合蛋白質の一つである FABP7 を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトした、Fabp7 ノックアウト (KO) マウスを用いた研究も行った。FABP7 は多価不飽和脂肪酸の細胞内キャリアで、脂肪酸の代謝調節や転写調節、シグナル伝達等に関与することが知られている。

今回、野生型マウスと比較し、Fabp7KO マウスへの音響曝露による騒音性難聴が抑制されることが示され、免疫染色では酸化ストレスマーカーの 4-HHE が

減少していた。この結果から、FABP7 の欠損による音響曝露後の過剰なシグナル伝達の抑制や、酸化ストレスの減少が細胞保護的に働いた可能性が示唆された。また、FABP7 の蝸牛での発現部位を検討すると、有毛細胞には発現しておらず、ラセン靭帯やラセン板縁、コルチ器支持細胞等に発現していた。この結果も、ラセン靭帯やラセン板縁といった部位が、酸化ストレス障害にお



図 4 シスプラチン反復投与のプロトコル

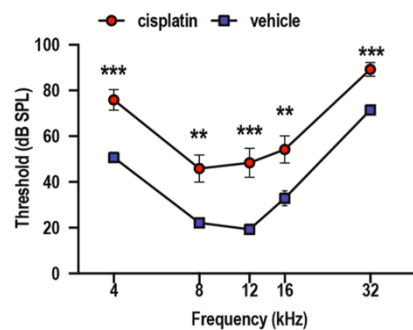
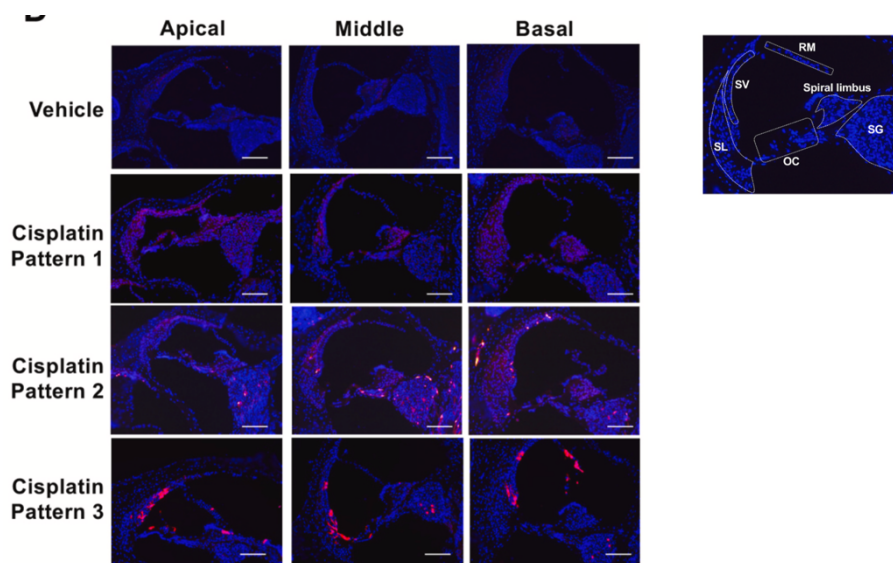


図 5 シスプラチン投与後の聴力閾値

いて重要な領域である可能性を示唆していると考えられた。



Mouse ID	Cisplatin					
	tdTomato-positive area (%)			tdTomato localization		
	Apical turn	Middle turn	Basal turn	Apical turn	Middle turn	Basal turn
# AC1	30.182	38.539	38.792	SL	SL	-
# AC2	43.199	52.561	48.769	SL	SL, limbus	SL
# AC3	51.012	36.219	54.561	SL	SL, limbus	-
# AC2-2	19.828	21.234	44.02	SL, limbus, SGN	SL, limbus	SL
# AC2-3	12.506	19.302	21.935	SGN	SL, SV, SGN	SV, SGN
# AC2-4	53.703	66.809	55.357	SL, SV, OC, limbus, SGN	SL, SV, limbus, SGN	SL, SV, limbus, SGN
# NC1	2.461	6.664	6.271	SL	SL, limbus	RM
# NC3	38.71	5.835	7.829	SL, SV, OC	Limbus, SGN	SL, limbus, SGN
# NC4	3.11	29.562	25.401	-	SL, limbus	-
# NC5	8.626	7.782	7.811	SL, SV, OC, RM	SL, SV, OC, SGN	SL, SV, SGN, RM
Average	26.334	28.451	31.074			

図 6, 7 シスプラチン投与による蝸牛内の tdTomato 発現細胞

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 1件）

1. 著者名 Hiroshi Kitamura, Tetsuya Oishi, Shohei Murakami, Tomoe Yamada-Kato, Isao Okunishi, Masayuki Yamamoto, Yukio Katori, Hozumi Motohashi	4. 巻 193
2. 論文標題 Establishment of Neh2-Cre:tdTomato reporter mouse for monitoring the exposure history to electrophilic stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 610-619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jun Suzuki, Tomotaka Hemmi, Masamitsu Maekawa, Masahiro Watanabe, Hitoshi Inada, Hiroyuki Ikushima, Tetsuya Oishi, Ryoukichi Ikeda, Yohei Honkura, Yoshiteru Kagawa, Tetsuaki Kawase, Nariyasu Mano, Yuji Owada, Noriko Osumi, Yukio Katori	4. 巻 13
2. 論文標題 Fatty acid binding protein type 7 deficiency preserves auditory function in noise exposed mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-48702-4.	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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