

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462655

研究課題名(和文) 老人性難聴治療に向けた胸腺移植および胸腺移植の検討

研究課題名(英文) Thymus transplantation therapy for age-related hearing loss and analysis of the mechanism of thymus functions

研究代表者

岩井 大 (IWAI, Hiroshi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：増加するもいまだ治療法のない老人性難聴および老化のモデルマウスSAMP1を用い、細胞性免疫老化、加齢性難聴・蝸牛神経節萎縮が、同系胎児胸腺移植により治療できる可能性を明らかにした。また、胸腺移植前・後の比較により、CD4+ T リンパ球のうち、interleukin 1 receptor type 2 (IL-1R2: IL-1をブロック) 陽性リンパ球(T1R2)と naturally occurring regulatory T cells(nTreg)は老人性難聴・免疫老化に関与し、これら2細胞以外のリンパ球(ナイーブCD4+ T リンパ球)は難聴改善、免疫若返りに働く可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence has indicated the relationship between the systemic immune system and the central nervous system including the inner ear. We have found that age-related developments of T-cell dysfunction, hearing loss, and degeneration of cochlear spiral ganglion (SG) neurons in 6-month-old mice were recovered at 12 months old after fetal thymus transplants were given twice, and that CD4+ T cells expressing interleukin 1 receptor type 2 (IL-1R2) and naturally occurring regulatory T cells (nTregs), which expanded in aged 12-month-old mice, were reduced in the thymus-grafted mice of the same age. Therefore, it is conceivable that the rejuvenation of systemic immune function by fetal thymus grafts contributes not only to the activation of cellular immunity but also to the decrease of IL-1R2+ CD4+ T cells or nTregs, which cause age-related hearing loss (AHL) as a consequence of neurodegeneration of the cochlear neurons.

研究分野：内耳免疫

キーワード：老人性難聴 CD4 陽性Tリンパ球 Treg IL-1受容体2型 螺旋神経節 聴性脳幹反応 胸腺移植 細胞性免疫

1. 研究開始当初の背景

難聴は人の生活の質 (quality of life) を著しく損なう疾患であり、コミュニケーション障害からくる精神・社会活動の低下、孤立、失業などを引き起こす。難聴の中で老人性難聴 (加齢性感音難聴) は、哺乳動物一般に生じる加齢症状の一つであり、75 歳以上の高齢者の半数に認められる (Gate GA and Mills JH, 2005)。高齢化社会が進み、難聴人口が増えているにもかかわらず、この加齢性神経萎縮 (neurosenescence) に対し、耳鼻咽喉科医は予防・治療の術をいまだ確立できないでいる。

こうした中で、全身免疫機構と中枢神経系 (蝸牛螺旋神経節などの聴覚系を含む) との関連性が次第に明らかとなってきた。胸腺摘出を受けた動物では、リンパ球・マクロファージなどの免疫担当細胞とサイトカインに不均衡が生じ、これが脳血液関門を通して中枢に及び、認知障害が生じると報告されている (Song et al, 2002)。また、中枢認知機能障害であるアルツハイマー病は、急性・慢性全身炎症の増強により進行する (Holmes et al, 2009)。難聴の研究においても、その原因を蝸牛のみに求めるのではなく、全身免疫機構障害の蝸牛への影響に目が向けられ、慢性炎症 (inflammaging) と老人性難聴との関連を調べた研究では、75 歳以上の高齢者において、白血球数が高いほど難聴が進んでいた (Versuur C, et al, 2014)。2 型糖尿病や心臓血管病患者では、健康人に比し老人性難聴が進んでいた (Frisna ST, et al 2006, Gates GA, et al, 1993)。我々は以前、早期老化・老人性難聴のモデルマウス (SAMP1) を、不潔環境 (コンベンション) 下での飼育群と、炎症を惹起する微生物環境の少ない清潔環境 (SPF) 下飼育群とで比較した。聴力検査 (聴性脳幹反応検査、brain stem auditory response、ABR) を行ったところ、SPF 下飼育動物群で難聴進行が遅延することを観察した (Exp Gerontol 2003)。

また、このマウスに同種骨髄移植や、若年 (2 ヶ月齢) 同系マウスから採取した CD4⁺ T cell の

移入、あるいは同系胎児胸腺移植を行い、全身免疫機構の「若返り」(immune rejuvenation) を導いたところ、加齢に伴う難聴や蝸牛螺旋神経節萎縮を予防出来ることが明らかとなった (Brain Res 2008, J Neuroimmunol 2012)。

では、免疫老化と蝸牛老化に、免疫担当細胞のどの細胞が関与するのであろうか。我々は遺伝子検索や細胞表面抗原の検索から、CD4⁺ T cell のうち、ナイーブ CD4⁺ T cell (リンパ球) が両者の予防 (免疫若返りと老人性難聴の予防) に働いていると推定した。さらに、CD4⁺ T cell のうち、加齢で増加する Interleukin-1 receptor type 2 (IL-1R2) 陽性 T cell (CD121b⁺ CD4⁺ T cell、T_{1R2}) と、同様に加齢で増加し、胸腺で産生される内在性 Treg (naturally occurring regulatory T cell、nTreg) とが、免疫老化と蝸牛老化を促進している可能性を考えた (J Neuroimmunol 2012)。

IL-1 は細胞表面の IL-1 receptor type 1 (IL-1R1) を介して細胞内にシグナルが伝達され、一方、IL-1R2 や IL-1R antagonist (IL-1Ra) によってブロックされる。アデノウイルスベクターを用い蝸牛局所に IL-1Ra を分泌させると、螺旋神経節細胞が萎縮する (Komeda et al, 1999) ことから分かるように、この細胞には IL-1R1 が存在し、IL-1 と結合することで螺旋神経節細胞を維持 (抗萎縮) している。一方、内耳 (蝸牛を含む) 免疫機構は全身免疫機構の一部とされており (Hashimoto S, et al 2005)、T_{1R2} の増加により IL-1 の作用が阻害され、神経節萎縮が生じる可能性が考えられる。

nTreg の増加は、若年では自己免疫性疾患を惹起し、老年では抗腫瘍反応や抗微生物反応の減弱と組織萎縮の促進につながるとされる (Jagger A, et al, 2014, Yamaguchi T, et al. 2007)。視神経モデルでは、nTreg が増えると神経萎縮が進むとされ (Kipnis J, et al, 2004)、螺旋神経節萎縮も促進させる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

哺乳類において、加齢とともに細胞性免疫機能が低下するが、これは胸腺の萎縮によることが知られている。SAMP1 は、ヒトと同じく加齢性胸腺

萎縮と細胞性免疫能の低下、および難聴が生じるため、全身免疫機構と蝸牛とを検討する格好の早期老化・老人性難聴モデルマウスである。

我々はこれまで、骨髄移植や CD4⁺ T cell 接種によって、SAMP1 における老人性難聴が予防できることを示した。本研究では、さらに難聴の治療を目指す。すなわち、一旦細胞性免疫老化と難聴、螺旋神経節萎縮が生じた SAMP1 において、胎児胸腺同系(同じ SAMP1 間)移植による細胞性免疫の賦活(免疫若返り)を図り、一旦生じた老人性難聴を回復させられるかを、このモデルマウスを用いて検討する。また、加齢促進へ導くと推定している T_{1R2} と nTreg が、実際に加齢で増加し、胸腺移植後の難聴を含めた老化徴候改善時に減少するかを検討する。

3. 研究の方法

SAMP1 を以下の 4 群に分けた。

A 群: 2 ヶ月齢

B 群: 6 ヶ月齢

C 群: 12 ヶ月齢

D 群: 12 ヶ月齢。6 ヶ月齢において左腎被膜下へ、また、8.5 ヶ月齢において右腎被膜下へ、同系の胎児(胎齢 18-19 日)胸腺半葉をそれぞれ移植した。

なお、動物の管理と取り扱いについては、文部科学省 grant application agency (21592170 および 10232636) 認可のもとに行われた。

(1) T 細胞増殖能(細胞性免疫能)

脾リンパ球に T リンパ球分裂因子の Concanavalin A (ConA) を作用させ、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay にてその増殖能を見た。

(2) T リンパ球における主な細胞集団の解析

標識抗マウス CD3、CD4、CD8 ラットモノクローナル抗体を用い、細胞表面抗原を flow cytometry (FACScan) にて解析した。

(3) 聴性脳幹反応 (auditory brainstem response, ABR)

クリック音と純音(4・12・36kHz)の4種の音を用い、聴力検査を行った。マウスの麻酔にはアトロピンとペントバルビタールを用いた。

(4) 蝸牛検索

4%パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液による心還流固定の後、D 群では腎臓の切片を作製して H&E 染色を行い、腎被膜下に移植された胸腺を観察した。また、全群において蝸牛部分を EDTA で脱灰し、4 μm で連続切片を作製した。H&E 染色の後、蝸牛の頂回転、中回転、基底回転の螺旋神経節を観察するとともに螺旋神経節細胞密度(10,000 μm²)を計測した。

(5) CD4⁺ T cell 内の細胞集団の検索

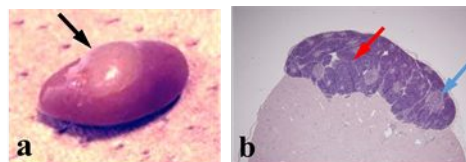
ラット抗マウス抗体のうち、FITC 標識 CD4⁺抗体と抗ビオチン標識抗 folate receptor 4 (FR4) モノクローナル抗体(mAb、Yamaguchi T, et al.2007)を nTreg(Fr4^{hi}CD4⁺あるいは Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺)検索に用い、FACScan により解析した。加えて、T_{1R2}(CD121b⁺CD4⁺T cell)と T_{1R1}(CD121a⁺CD4⁺T cell)の検索には、それぞれ PE 標識抗 CD121b(IL-1R2)mAb と抗 CD121a(IL-1R1)mAb とを用いた。

4. 研究成果

A. 研究結果

(1) D 群のマウスを 12 ヶ月齢において検索したところ、10 匹いずれにおいても腎被膜下胸腺は正着していた。すなわち、移植片において胸腺に特徴的な皮質と髓質が明瞭に認められた。(図 1)

図 1. 胸腺移植片の正着

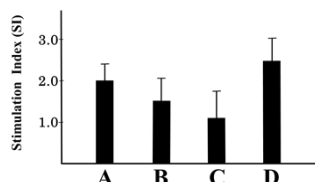


a: 肉眼所見。移植片: 矢印、b: 組織所見。皮質: 髓質: 赤矢印。青矢印。H&E 染色 × 10

(2) ConA による T 細胞増殖能を MTT assay にて検索したところ、2 ヶ月齢(A 群)、6 ヶ月齢(B 群)、12 ヶ月齢(C 群)へと加齢が進むに従い分裂能が落

ち、免疫老化を示した。一方、胎児胸腺を 6 ヶ月齢以降に移植された D 群では、免疫能は 6 ヶ月齢 (B) 群より改善し、2 ヶ月齢 (A) 群と同程度になり、免疫若返りを示した。(図 2)

図 2 . MTT assay



(3) 12 ヶ月齢の C 群と胸腺移植の D 群において、T リンパ球 (CD3⁺ cell) の主な 2 つの細胞群 CD4⁺CD3⁺ cell と CD8⁺CD3⁺ cell を比較したところ、CD8⁺CD3⁺ cell の割合に変化はなかった。しかし、CD4⁺CD3⁺ cell の割合は D 群において増加しており、このリンパ球が胸腺移植片から供給されたことが伺えた。(表 1)

表 1 . T リンパ球細胞集団の解析

群	CD4 ⁺ CD3 ⁺ (%)	CD8 ⁺ CD3 ⁺ (%)
C	10.4±0.08	3.85±0.21
D	12.9±0.26 ¹⁾	3.86±0.36 ²⁾

(4) さらに D4⁺ T cell の T_{1R1}、T_{1R2}、nTreg の割合を、各群で検討した。まず、T_{1R1} においては、各群に差異は認められず一定であり、加齢や胸腺移植による影響は認められなかった。一方、T_{1R2} と nTreg の割合は、加齢に従って増加し (A 群 B 群 C 群)、しかるに胸腺移植を受けた D 群で低下していた。(図 3、表 2)

図 3 . FACScan における gating

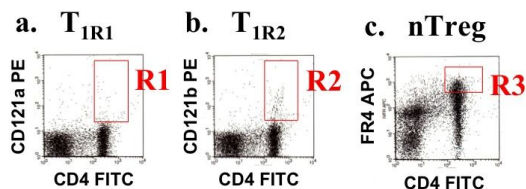


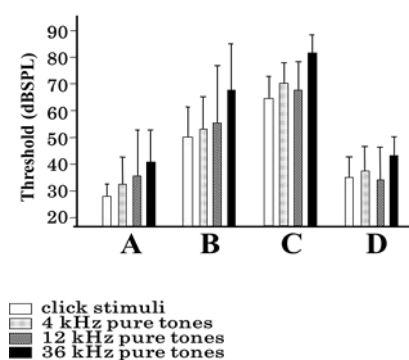
表 2 . 胎児胸腺移植における CD4⁺ T cell 亜集団の割合の変化

群	Gate R1 ¹⁾	Gate R2	Gate R3
	T _{1R1} ²⁾ (%)	T _{1R2} (%)	nTreg (%)
A	0.46 ± 0.07	0.33 ± 0.08	11.02 ± 0.81
B	0.39 ± 0.14	0.83 ± 0.21	23.52 ± 0.80
C	0.46 ± 0.18	1.07 ± 0.13	22.10 ± 1.63
D	0.58 ± 0.28	0.57 ± 0.03	12.85 ± 0.54

図 3 の gate R1 (CD121a⁺CD4⁺ cells: T_{1R1})、gate R2 (CD121b⁺CD4⁺ cells: T_{1R2})、gate R3 (FR4^{hi} CD4⁺ cells: nTreg) のデータを示す。T_{1R1} は、加齢や胸腺移植で変化を認めなかった。T_{1R2}・nTreg は、加齢とともに増加し胸腺移植で A 群と有意差を認めなくなった。ただし、両細胞群とも、B-C 群間で有意差を認めなかった。

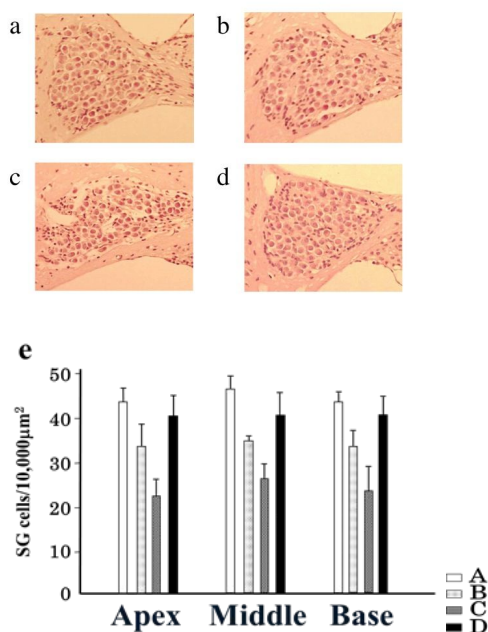
(5) 加齢および胸腺移植による難聴進行の変化を見るために、各群での ABR(クリック音および 4、12、36Hz の純音)を行った。いずれの音刺激によっても加齢に伴い難聴は進行していたが、胸腺移植 D 群では、胸腺移植が開始された 6 ヶ月齢の時期より難聴は回復し、2 ヶ月齢 A 群と同程度となっていた。(図 4)

図 4 . 聴力の推移と胸腺移植の効果



(6) 蝸牛の組織学的検索では、加齢とともに螺旋神経節の各部位 (apex、middle、base) の細胞密度は低下していたが、胸腺移植 D 群では、胸腺移植が開始された 6 ヶ月齢の時期より回復し、2 ヶ月齢 A 群と同程度となっていた。(図 5)

図5．螺旋神経節細胞密度の推移と胸腺移植の効果



A群(a) B群(b) C群(c) D群(d)の代表的所見(H&E, ×100)。10,000 μm²あたりの螺旋神経節細胞核数(e)。

B. 成果と考察

今回の研究では、組織学的検討として蝸牛のうち、SAMP1が加齢とともに萎縮を示す部位である螺旋神経節を中心に検索を行った。感音難聴者の人工内耳の適応を考えた場合、螺旋神経節細胞の残存が重要であり、臨床に即した研究と思われる。

以前我々は、SAMP1において、若いSAMP1から採取した脾リンパ球分画を接種(静脈注射)し、CD4⁺T cellやこれを含んだ分画が接種されたときに難聴が予防されることを示した(J Neuroimmunol 2012)。胸腺は、SAMP1においては早期に退縮するが、一般的に骨髄からの造血前駆細胞を育て、ナイーブCD4⁺T cellとして全身に供給する。したがって今回の研究では、移植された胎児胸腺が全身にナイーブCD4⁺T cellを供給し(表1)、難聴(図4)、さらに、螺旋神経節萎縮(図5)、免疫老化(図2)を回復させたものと考えられる。なお、前実験において、シャム手術群と胸腺移植群を比較し、シャム手術群ではこうした効果のないことを確認している。

CD4⁺T cellを検討すると、A~D群においてT_{1R1}の割合に差異は認められず一定であり、加齢や胸腺移植による影響は認められなかった。一方、T_{1R2}とnTregの割合は、加齢に伴って増加し、胸腺移植後には減少した(表2)。また、細胞性免疫能(図2)や聴力(図4)、螺旋神経節密度(図5)においても、加齢で悪化し胸腺移植後に回復していた。したがって、ナイーブCD4⁺T cellが細胞性免疫と蝸牛の若返りに働き、T_{1R2}とnTregが免疫と蝸牛の老化促進に関与している可能性が考えられる。

なお、蝸牛螺旋神経節細胞の細胞密度が、胸腺移植D群において6ヶ月齢B群に比し回復を見た(図5)。この理由として、A)節細胞が一旦アポトーシスを起こして細胞数が減少(萎縮)したものの、胸腺移植後に再生した場合や、B)節細胞がアポトーシス・萎縮の前段階として浮腫や細胞質内の代謝産物蓄積のため細胞質が腫大して細胞密度が低下し、同時に機能(聴力)障害も起こしたが、胸腺移植後に回復した場合とが考えられる。このどちらの場合かは今後検討が必要であろう。ただし、SAMP1の聴力低下と螺旋神経節萎縮との間には時期的な相違があり、まず螺旋神経節細胞の機能障害としての難聴が生じ、のちにこの節細胞の萎縮が進行するとされるため(Saitoh Y, et al.1994)、後者の可逆的な細胞質の腫大が理由として考えやすいかもしれない。我々は以前、自己抗体からなる抗原抗体複合物が血管条と腎系球体基底膜に沈着し、自己免疫性難聴とループス腎炎を示すSLEモデルマウスMRL/lprにおいて、正常全身免疫機構への置き換え、すなわち正常マウスの骨髄を用いた骨髄移植を行い、難聴や腎炎が消失することを示した(Iwai H, et al,2005)。かつて血液脳関門と同様に血液内耳関門が想定されたが(Cserr HF, et al.1992)、この関門はTリンパ球により容易に通過されることを我々は明らかにしている(Iwai H, et al, 1995,1999)。全身免疫機構と蝸牛機能との関係は「1.研究開始当初の背景」で記述したが、これまで難聴の原因を蝸牛に求めていた疾患の中には、実は全身免疫機構の異常に起因しているものが存在するかもしれない。

今回の研究で、螺旋神経節内にリンパ球が明確に浸潤している所見は認められず、ナイーブ CD4⁺ T cell、T_{1R2}、nTreg が実際どのように螺旋神経節に作用しているかは現時点で不明である。ただし、螺旋神経節細胞には IL-1R1 が表出され、IL-1 の作用で細胞萎縮を免れていることが報告されている (Komeda M, et al, 1999)。中枢神経傷害に際し T リンパ球は局所に浸潤し IL-1 や神経栄養因子などのサイトカインを分泌する。これによって局所のミクログリアが活性化して同様にサイトカインを産生し、互いのサイトカインで互いにさらに活性化し、局所を修復するとされる (Allan SM, et al, 2005, Jagger A, et al. 2014)。一方、IL-1R2 を表出し IL-1 の作用をブロックする T_{1R2} にこうした作用はなく、逆に神経節細胞の萎縮作用を持つと考えられる。nTreg は、一般に Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ リンパ球として示されるが、Fr4 を表出し Fr4^{hi}CD4⁺ リンパ球ともされる (Yamaguchi T, et al. 2007)。そこで今回は後者を nTreg の同定に用いた。nTreg は加齢により胸腺が萎縮するなか、増加する細胞集団である。若年マウスでこの細胞の活性(あるいは細胞数)が増加すると、自己攻撃性 T リンパ球に対する抑制能が下がり自己免疫性疾患が増え、一方、老年マウスで活性が上がると、免疫能が低下し、感染性微生物排除能や抗腫瘍作用が減退し、組織では免疫学的維持機構が障害され萎縮が進行する (Jagger A, et al. 2014)。この細胞が存在しないと視神経障害の修復が改善する (Kipnis J, et al. 2004)。したがって今後、全身および蝸牛免疫機構と蝸牛萎縮との関係に注目した詳細な研究が必要と思われる。

冒頭で述べたごとく、老人性難聴の治療法はいまだ確立されていない。我々は今回、マウスレベルではあるが、老人性難聴の治療法を考案し、さらに、加齢に関与する全身免疫機構の中のナイーブ CD4⁺ T cell、および、T_{1R2}、nTreg の 3 種の細胞集団を明らかにするに到った。T_{1R2} かつ / または Treg が老人性難聴を促進するのであれば、その除去により難聴が防げる可能性がある。あるいは、全身免疫機構全体の若返りとして、血液から

採取した細胞のうちナイーブ CD4⁺ T cell を増殖させて体内に戻す方法や、iPS 細胞から作製した胸腺 (Inami Y, et al. 2011) の移植により、ナイーブ CD4⁺ T cell の割合を増加できれば、ヒトでも老人性難聴が予防できる可能性が考えられる。本研究は広く老化予防 (抗加齢療法) に発展しうる研究と考えられる。

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 1 件)

Iwai H, Inaba M. Fetal thymus graft enables recovery from age-related hearing loss and expansion of CD4-positive T cells expressing IL-1 receptor type 2 and regulatory T cells. *Immunity & Ageing* DOI: 10.1186/s12979-015-0053-9, 12-26, 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

— Iwai H, Inaba M, Baba S, Tomoda K. Fetal thymus graft treats presbycusis and prevents age-related up regulation of the IL-1 receptor type II on CD4+ lymphocytes. 51st Inner Ear Biology Workshop. Sheffield, UK. Aug.30-Sep.2, 2014

— Iwai H, Inaba M. Fetal thymus graft enables recovery from age-related hearing loss and expansion of CD4-positive T cells expressing IL-1 receptor Type 2 and regulatory T cells. 52nd Inner Ear Biology Workshop. Roma, Italy. Sep. 12-15, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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・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