

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

熱ショック蛋白質誘導剤（ゲラニルゲラニルアセトン）を用いた
老人性難聴モデルマウスの難聴進行の抑制

御厨剛史

山口大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学分野（耳鼻咽喉科学）宇部市南小串1丁目1-1（〒755-8505）

Key words：熱ショック応答，老人性難聴，熱ショック蛋白質，熱ショック蛋白質誘導剤

和文抄録

【背景】老人性難聴とは老化に伴う進行的不可逆的な感音難聴であり，聴力の損失は著しくquality of lifeを低下させるが治療法はいまだない．本研究では生体を持つ根幹的なストレス応答である熱ショック応答と誘導される熱ショック蛋白質（Hsp）に着目した．Hspは変性した蛋白質の品質管理や細胞死を抑制することで生存を促進する．この応答は年齢とともに低下し，進行性神経変性疾患での病因の一つと考えられている．

Hspは種々の障害から内耳も保護することが知られている．内耳の老化でHspの変化を調べ，さらに様々な臓器でHsp誘導による保護効果を示し，かつ副作用が少ない薬剤であるGeranylgeranylacetone（GGA）を用い老人性難聴モデルマウスに対しての保護効果を検討した．

【材料と方法】4-40週齢の早期進行性老人性難聴マウスDBA/2Jと聴力正常のCBA/Nを用いた．GGAは，粉末餌に混ぜて4週齢から投与した．Hsp発現はwestern blot assayで評価した．聴覚評価には聴性脳幹反応検査（ABR）を使用した．組織学的評価をH.E.染色，蛍光免疫染色で評価した．さらに有毛細胞数を評価した．

【結果】対照マウスの蝸牛ではHsp70，Hsp110高発現が維持されていた．反対にDBA/2Jでは減少を認めた．このDBA/2JにGGAを投与すると有意にHsp

が誘導された．Hsp70は主な障害部位の有毛細胞に強く発現を認めた．ABRと有毛細胞欠損数で保護効果を示した．

【考察とまとめ】発現の違いが見られたHsp70・Hsp110は，加齢で発症する神経変性疾患においてその重要な役割が示唆されているものである．このことは内耳疾患でも同様の病態が存在することが推察された．GGAによって増強されたHspが強力に様々なpathwayを制御したため保護効果を示すことができたと考えられた．

はじめに

年齢に伴う感音難聴（老人性難聴）は65歳以上の約3分の1が罹患しているといわれ，超高齢化社会の日本ではますます増加の一步をたどっていると考えられる．難聴はコミュニケーションを著しく損なわせquality of lifeの低下につながる．しかし，老人性難聴をはじめとする進行性難聴の発症機序が複雑で解明されておらず，確立された予防法，治療法は少ないのが現状である¹⁾．

老人性難聴のモデルは約80種類存在し，そのうち10種類にahl alleleが共通していることが報告されている^{2, 3)}．このahl alleleはcadherin23（Cdh23）という感覚細胞である有毛細胞特有の蛋白質でmechanically-gated ion channelsを構成する^{4, 5)}．この障害が唯一の病因ではないが，年々蓄積して難聴を発症するのでこの遺伝子異常をもつマウスは内耳老化モデル研究によく用いられている．

熱ショック応答はあらゆる生物がもつ根幹的なストレス応答であるが、年齢とともに低下し、ハンチントン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などの進行性神経変性疾患での病因の一つとも考えられている^{6, 7)}。熱ショック応答とは細胞が通常より数度の高温環境下に置かれると、熱ショック転写因子 (heat shock transcriptional factor1 : HSF1) が活性化され、一連の熱ショック蛋白質 (heat shock proteins : Hsps) が誘導される応答である。これらHspsは、高温下で変性した蛋白質の凝集を抑制、処理などを行い、細胞機能を回復させる (シャペロン機能)。また、アポトーシスに至る細胞内シグナル伝達を抑制することで多くの細胞に対しては生存を促進する。この現象は他のストレスでも惹起され、生物の生存に必須である⁸⁻¹³⁾。

正常モルモットの内耳構成細胞において、HSF1と主要なHspであるHsp70 familyが存在し、一過性の温熱負荷でHsp familyの核移行が行われ、Hsp70が誘導される^{14, 15)}。これらの報告は内耳においても、他の器官同様Hsp70 familyのストレス応答が存在することを示唆する。Hsp遺伝子上流にあるHSF1をノックアウトしたmiceを用い、音響ストレスを加えた際に生じる蝸牛外有毛細胞死がwild typeと比較し増加することで、音響障害においてHSF1が内耳保護に働くことが証明されており、内耳においても重要なストレス機構である¹⁶⁾。しかし内耳の老化と熱ショック応答の関連を評価した論文はこれまでになく、老化のメカニズムに蛋白質やDNAのダメージがありこれが内耳でも共通であると考え、蛋白質の品質管理を行う熱ショック応答は内耳老化において重要な位置づけであることが推察される。

現在各方面で広く熱ショック応答誘導剤として研究されているものに、Geranylgeranylacetone (GGA) がある。GGAは抗潰瘍薬で、日本では1984年以來臨床で広く処方されている副作用の少ない薬剤 (テブレノン, セルベックス[®]) であるが、胃粘膜、小腸、脊髄神経、肝細胞、心臓、脳神経、網膜などで熱ショック応答を惹起し、組織保護効果を認めている¹⁷⁾。GGAはHSF1を活性化し、ほとんどが副作用のない誘導能を示すとされる¹⁸⁾。内耳においてもモルモット音響障害モデルに対してこの薬剤が保護効果を示す¹⁹⁾。

本研究では老人性難聴モデルマウスの蝸牛におい

てHspsが年齢で減少し、GGAによって発現を維持すると進行性難聴に対して機能的組織学的に保護効果を示すことを報告する。

方法と材料

4-40週齢の早期進行性難聴モデルマウスDBA/2Jと聴力正常マウスCBA/Nを用いた。聴性脳幹反応検査 (ABR) を行い聴覚評価した。8, 16, 32kHzの3周波数刺激を用いた。組織学的検討は、4%パラホルムアルデヒドで経心灌流固定した後断頭し、蝸牛をとりだしプラスチック包埋を行った。3 μ mに薄切した切片をH.E.染色、Hsp70抗体で免疫蛍光染色したものを観察評価した。ウェスタンブロットでHsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp27, β -actinの発現を全蝸牛を用いて評価した。有毛細胞の評価にはsurface preparation techniqueでコクログラムを作製し、内・外有毛細胞欠損率を評価した。Hsp誘導にはGGA粉末と餌を0%, 0.5%, 1%の濃度で混合したものを、4週齢より自由に摂取させを行った。投与量、投与方法はKatsunoの方法に準じた²⁰⁾。3群間の結果の統計学的検討はDunnett's post hoc testで行った。p<0.05を有意差とした。すべての実験は山口大学生命科学実験施設委員会で審査受理され、規則を順守して行った。

結 果

図1では、対照であるCBA/Nは40週においてもABR、閾値上昇を認めないのに対し、DBA/2Jは4週齢から既に難聴を認め、32週齢頃には増悪しほぼ無反応となった。H.E.染色の観察では、感覚細胞である有毛細胞を含むコルチ器と、2次的変化と考えられるらせん神経節細胞の消失を認めた。従来の報告どおりこのマウスの障害部位と考えられた²¹⁾。蝸牛内Hspは、対照マウスでは加齢に伴いHsp110が発現の維持、Hsp70の高発現を認め、それ以外は減少した。一方DBA/2JではHsp70, Hsp110をはじめ多くのHspが減少した。この対照マウスでのHspの発現維持が聴力を保つ要因ではないかと考えた。そこで薬剤による難聴モデルでのHsp高発現を試みた。

図2で、DBA/2Jに4週齢からGGA混合餌を投与し12週齢でのHsp発現を評価した。蝸牛では0.5%濃

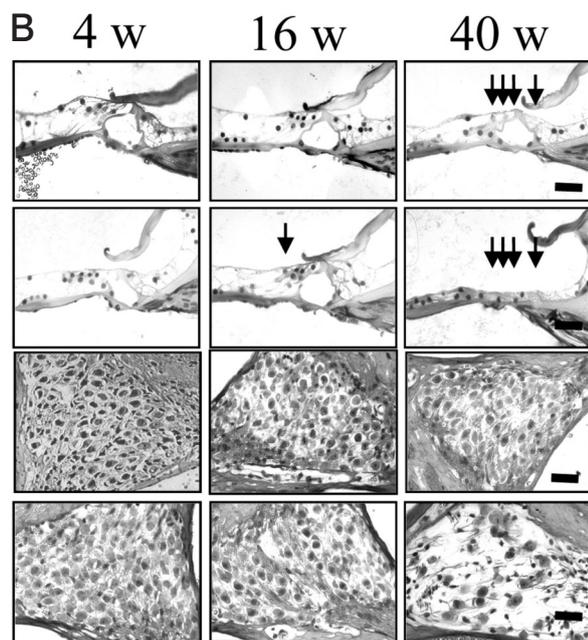
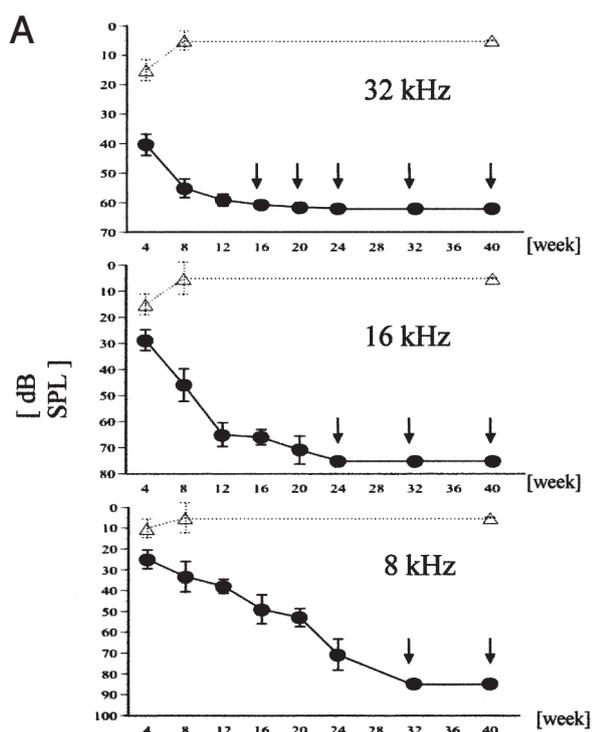
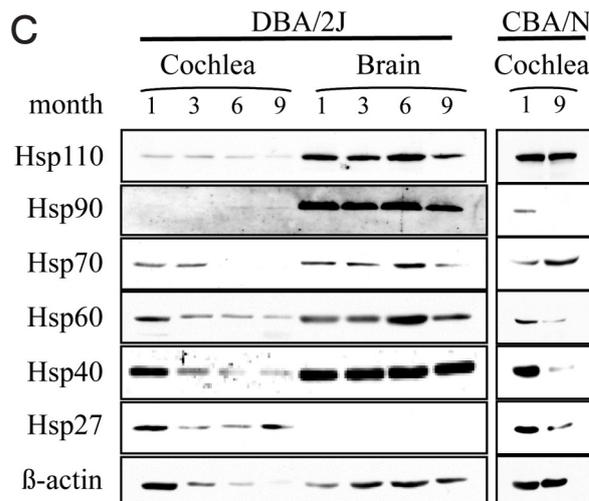


図1 加齢によるABR閾値とHspの変化(文献27より引用)
 (A) CBA/N (n=3, respectively), DBA/2J (n=7, respectively). 矢印は無反応を示す. Error bar: ± 1 SEM.
 (B) DBA/2Jのコルチ器とらせん神経節 (n=4, respectively). 上段: lower apex. 下段: lower base. 矢印は有毛細胞の欠損を示す. Bars=20 μ m.
 (C) HspsのWestern blot analysis. n=4, respectively.



度で有意にHspが誘導された. 1%濃度ではHspの誘導がみられなかった. 一方脳では1%でHsp70が誘導され, 蝸牛の方が至適濃度が低いと考えられた.

図3で図1で重要と考えられたHsp70に着目し, その局在を評価した. コントロールでは, ほとんど発現がないのに対し, 0.5% GGA投与では, 主な障害部位(図1)の有毛細胞, らせん神経節に強く発現を認めた. このことはHsp70がこのマウスの障害部位で作用することを示している.

図4, 5でGGAの効果を検討した. 8 kHz刺激のABRでは, 8週齢から保護効果を示し20週齢まで効果が持続した. 高音域の16kHz, 32kHzでは部分的な効果であった. これは高音域の障害が高度であるためと考えられた. 1%濃度でもある程度の保護効果を示した. 20週齢の内・外有毛細胞数のカウントでは, ABRの結果と同様に中~低音域に対応する頂回転付近の有毛細胞で細胞欠損が抑制されていた.

考 察

対照と難聴マウス蝸牛で発現の違いが見られたHsp70・Hsp110は, 蛋白質のmisfoldingが関わる神経変性疾患においてその重要な役割が示唆されているものである²²⁾. Hsp110もHsp70と強調して働くことが知られ, これらのHspのシャペロン機能が聴力の維持に必要である可能性が示唆された²³⁾. 誘導されたHspsがどういう機序で保護したかはDBA/2Jマウスの難聴進行の原因が未解明であるのではっきり

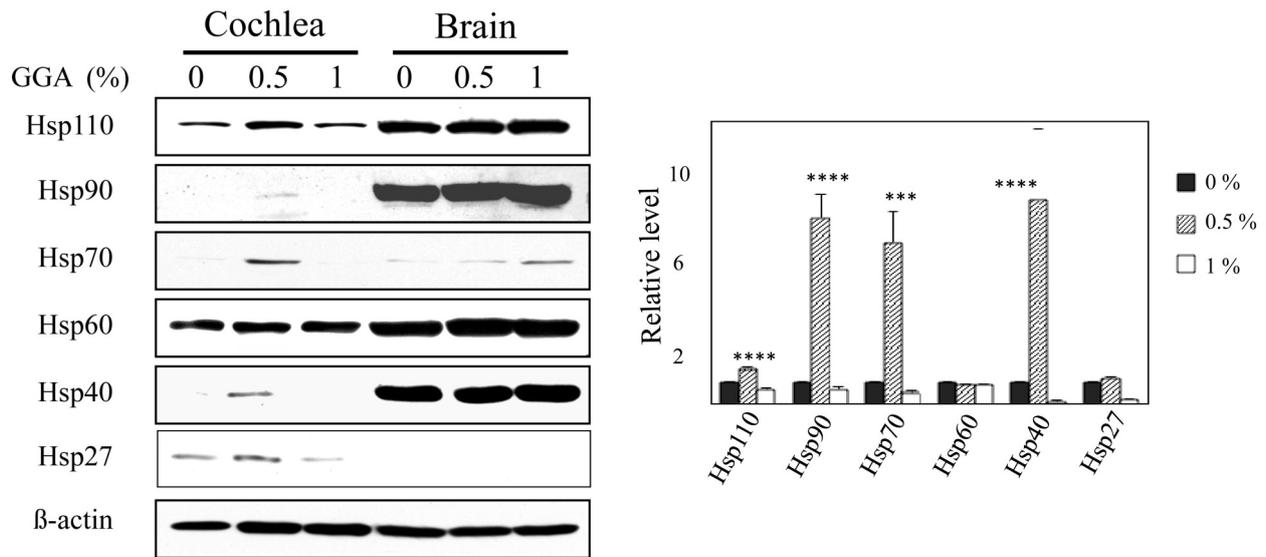


図2 GGAのHsp誘導への効果 (文献27より引用)

GGA混合餌を各濃度8週間摂取したDBA/2Jの蝸牛の Western blot analysis (n=4, respectively). 0%を1とした相対比を棒グラフで示している. ***p<0.001, ****p<0.0001, Error bar: ±1 SEM.

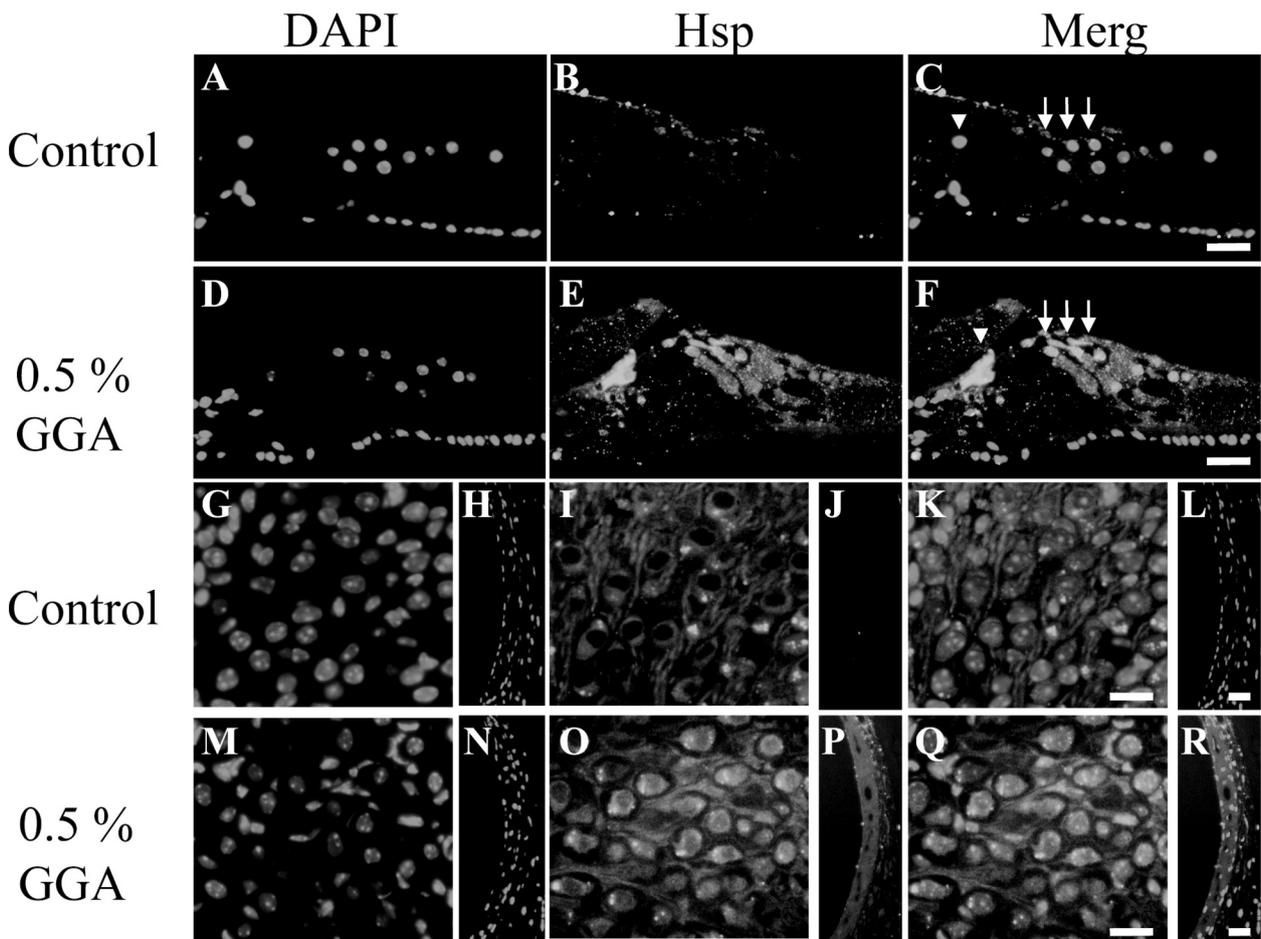


図3 高発現されたHsp70の局在 (文献27より引用)

Hsp70 (red channel) とDAPI (blue channel) を8週齢の蝸牛のcoronal sectionで示す (n=4, respectively). 観察部位はlower apex. A-FはCorti's organを, G, I, K, M, O, Qはらせん神経節, H, J, L, N, P, Rは血管条を示す. 矢印は外有毛細胞, 矢頭は内毛細胞. Bars=20 μm.

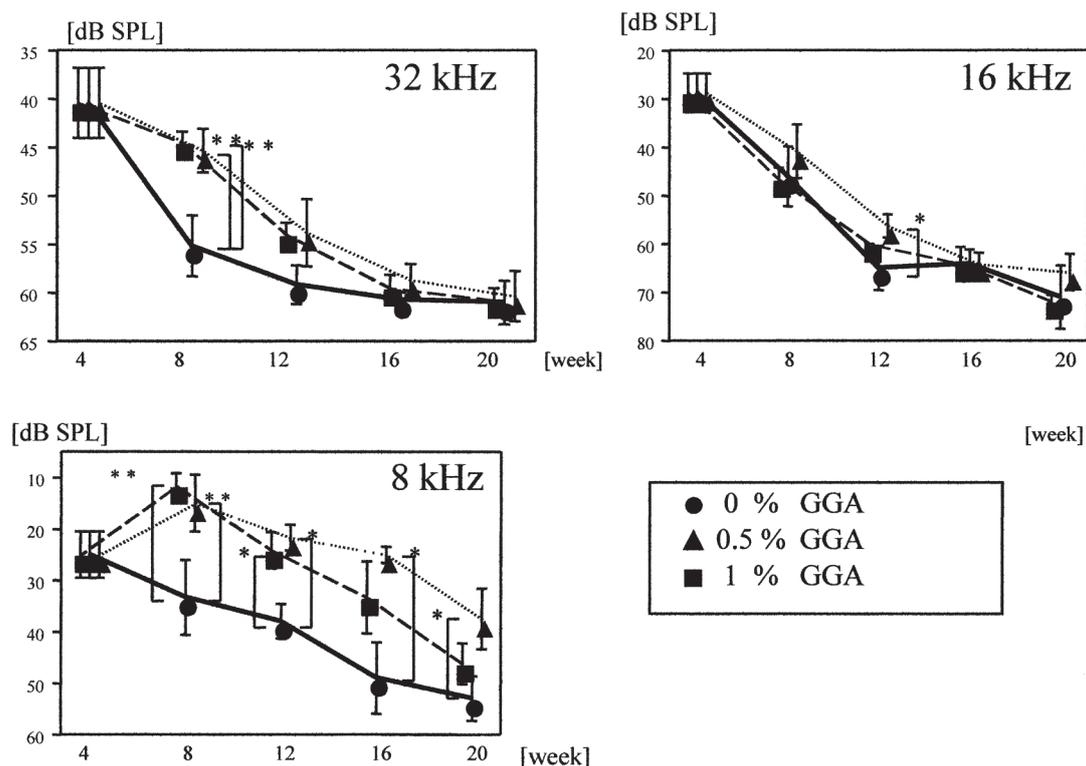


図4 GGAの進行性難聴に対する保護効果 (文献27より引用)

GGA混合餌を4週から20週齢まで各濃度摂取している (n=6, respectively). 0% GGA (●), 0.5% GGA (▲), 1% GGA (■) *p < 0.05, **p < 0.01, Error bar : ±1SEM.

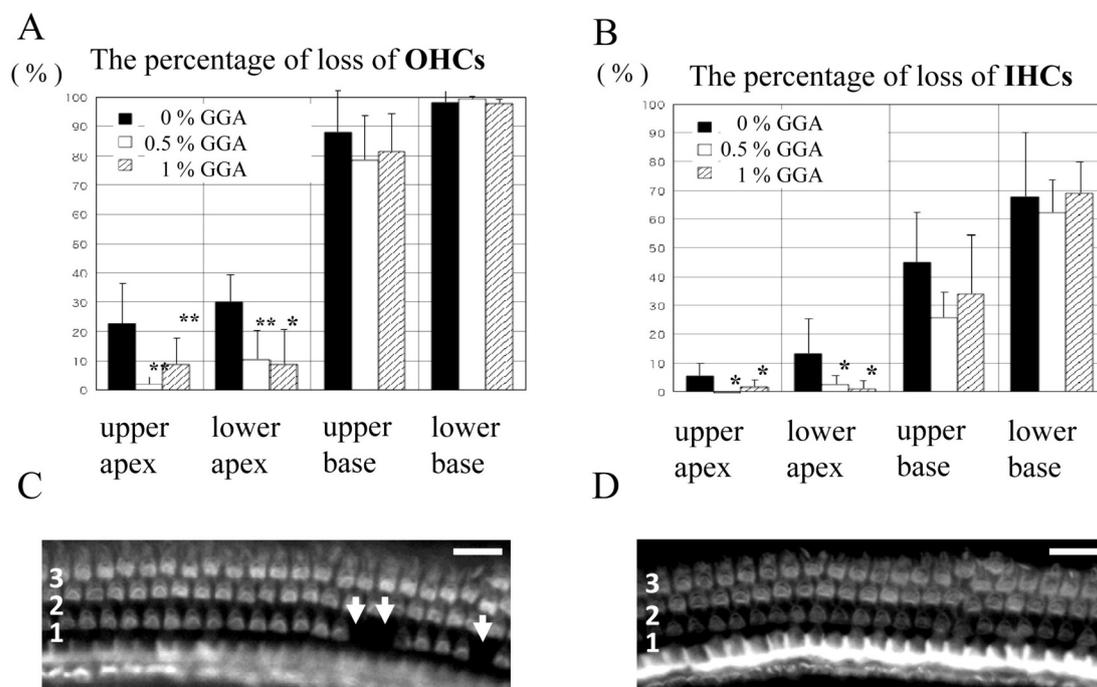


図5 GGAの蝸牛有毛細胞に対する効果 (文献27より引用)

ABRを20週齢で検査後断頭して有毛細胞の欠損率を百分率にして示す (n=6, respectively). 蝸牛を4つの部分にわけ、upper and lower apex, upper, lower baseと表記している。Aが外有毛細胞 (OHCs), Bが内有毛細胞 (IHCs). *p < 0.05, **p < 0.01, Error bar : ±1SEM. surface preparationによる有毛細胞の観察をCとDに示す。1-3は3列のOHCsで、矢印はOHCsの欠損を示す。Cが0% GGA摂取群, Dが0.5% GGA摂取群。Bars=20 μm.

はしないが, GGA投与により熱ショック応答が増強・維持され, Hspsのシャペロン機能, 抗アポトーシス作用が長期間作用することで保護効果を示したのではないかと考えられた. 特にahlがコードする有毛細胞特有の蛋白質の障害とそれに伴う細胞死を軽減している可能性が推測された. ABR, 有毛細胞欠損数において1%GGA投与群で早期には保護効果を認めた. これにはGGAにはHsp誘導作用の他に抗酸化作用やミトコンドリア機能への作用などを有しており, そのため1%GGA投与群でも保護効果が認められたのではないかと考えた²⁴⁻²⁶⁾.

DBA/2Jのような早期に進行する障害の強いモデルでの保護効果の証明はこれまでにない. これは熱ショック応答が強力に様々なpathwayを制御しているから成しえたことだと考えられた. また, GGAもすでに臨床応用されている薬剤であり, 内耳の進行性難聴に対して新しい有用な治療法になる可能性が示唆された.

ま と め

早期進行性老人性難聴モデルのDBA/2Jと対照CBA/Nの蝸牛内Hspの加齢による発現変化を評価した. Hsp70, Hsp110が聴力の維持に必要な可能性が示唆された. Hsp誘導剤でHsp発現を維持すると難聴の進行と有毛細胞死を抑制できた.

参 考 文 献

- 1) Someya S, Yamasoba T, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiol Aging* 2006 ; 28 : 1613-1622.
- 2) Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res* 1997 ; 114 : 83-92.
- 3) Johnson KR, Zheng QY, Erway LC. A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics* 2000 ; 70 : 171-180.
- 4) Zheng QY, Johnson KR. Hearing loss associated with the modifier of deaf waddler (mdfw) locus corresponds with age-related hearing loss in 12 inbred strains of mice. *Hear Res* 2001 ; 154 : 45-53.
- 5) Siemens J, Lillo C, Dumont RA, Reynolds A, Williams DS, Gillespie PG, Muller U. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 2004 ; 428 : 950-955.
- 6) Fawcett TW, Sylvester SL, Sarge KD, Morimoto RI, Holbrook NJ. Effects of neurohormonal stress and aging on the activation of mammalian heat shock factor 1. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 32272-32278.
- 7) Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 2004 ; 15 : 657-664.
- 8) Lindquist S. The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 1986 ; 55 : 1151-1191.
- 9) Morimoto RI. Regulation of heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 3788-3796.
- 10) Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2 : 469-475.
- 11) Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA. Hsp 27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2 : 645-652.
- 12) Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 2000 ; 19 : 4310-4322.
- 13) Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*

- 2000 ; 2 : 476-483.
- 14) Fairfield DA, Kanicki AC, Lomax MI, Altschuler RA. Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. *Hear Res* 2002 ; 173 : 109-118.
 - 15) Akizuki H, Yoshie H, Morita Y, Takahashi K, Hara A. Nuclear translocation of heat shock protein in guinea pig cochlea after hyperthermia. *Hear Res* 1995 ; 92 : 126-130.
 - 16) Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, Takemoto T, Shimogori H, Yamashita H, Nakai A. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear Res* 2003 ; 182 : 88-96.
 - 17) Hirakawa T, Rokutan K, Niwaka T, Kishi K. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996 ; 111 : 345-357.
 - 18) Otaka M, Yamamoto S, Ogasawara K, Takaoka Y, Noguchi S, Miyazaki T, Nakai A, Odashima M, Matsushita T, Watanabe S, Itoh H. The induction mechanism of the molecular chaperone HSP70 in the gastric mucosa by geranylgeranylacetone (HSP-inducer). *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; 353 : 399-404.
 - 19) Mikuriya T, Sugahara K, Takemoto T, Tanaka K, Takeno K, Shimogori H, Nakai A, Yamashita H. Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. *Brain Res* 2005 ; 1065 : 107-114.
 - 20) Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 16801-16806.
 - 21) Ohlemiller KK, Gagnon PM. Apical-to-basal gradients in age-related cochlear degeneration and their relationship to "primary" loss of cochlear neurons. *J Comp Neurol* 2004 ; 479 : 103-116.
 - 22) Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance : degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 1993 ; 27 : 437-496.
 - 23) Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR. The Hsp110 and Grp1 70 stress proteins : newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* 2000 ; 5 : 276-290.
 - 24) Rokutan K, Teshima S, Kawai T, Kawahara T, Kusumoro K, Mizushima T, Kishi K. Geranylgeranylacetone stimulates mucin synthesis in cultured guinea pig gastric pit cells by inducing a neuronal nitric oxide synthase. *J Gastroenterol* 2000 ; 35 : 673-681.
 - 25) Hirota K, Nakamura H, Arai T, Ishii H, Bai J, Itoh T, Fukuda K, Yodoi J. Geranylgeranylacetone enhances expression of thioredoxin and suppresses ethanol-induced cytotoxicity in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 275 : 825-830.
 - 26) Aron Y, Vayssier-Taussat M, Bachelet M, Polla BS. Geranylgeranylacetone protects human monocytes from mitochondrial membrane depolarization independently of Hsp70 expression. *Cell Mol Life Sci* 2001 ; 58 : 1522-1527.
 - 27) Mikuriya T, Sugahara K, Sugimoto K, Fujimoto M, Takemoto T. Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. *Brain Res* 2008 ; 30 : 9-17.

**Attenuation of Progressive Hearing Loss
in a Model of Age-related Hearing Loss
by a Heat Shock Protein Inducer,
Geranylgeranylacetone**

Takefumi MIKURIYA

Department of Otolaryngology (Otolaryngology),
Yamaguchi University Graduate School of
Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi
755-8505, Japan

SUMMARY

Aging processes being extremely complex, mechanisms of age-related hearing loss (ARHL) have not been elucidated. Although oxidative stress and apoptotic cell death are involved in progression of ARHL, number of trial to treat ARHL is limited. Heat shock response is characterized by induction of heat shock proteins (Hsps) in response to stresses such as heat shock, which diminishes during aging. Hsps act as molecular chaperones, and some Hsps also inhibit apoptotic pathways. Here, we examined age-related expression of Hsps in the cochlea of ARHL model DBA/2J mice and control CBA/N mice. Western blot assay revealed that CBA/N mice showed constant expression of Hsp70 and Hsp110 with age, but not in DBA/2J mice. The result suggests that pharmacological upregulation of Hsps might attenuate ARHL. We administered DBA/2J mice with food containing geranylgeranylacetone (GGA) that induces Hsps in the cochlea, and found that its administration suppresses ARHL examined by ABR test and histological examination though protection is specific for the apical part of the cochlea. These results demonstrate that dietary supplementation of GGA could be an effective therapeutic strategy for treatment of ARHL.