

博士論文

転写因子 NRF2 の活性化による
酸化ストレス増大に伴う内耳障害の予防効果の解明

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

神経・感覚器病態学講座 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

本藏 陽平

目次

第 I 章	要約	P. 3
第 II 章	研究背景	P. 7
第 III 章	研究目的	P. 11
第 IV 章	研究方法	P. 12
第 V 章	研究結果	P. 21
第 VI 章	考察	P. 30
第 VII 章	結論	P. 35
第 VIII 章	文献	P. 36
第 IX 章	図	P. 45
第 X 章	表	P. 57
第 XI 章	謝辞	P. 58

I. 要約

2015 年の世界保健機関 (WHO) の報告では、全世界で人口の約 5%にあたる約 3 億 6 千万人が難聴患者であるとされる。主要な感音難聴である加齢性難聴や騒音性難聴の主な病因は酸化ストレスによる内耳障害であるとされており、酸化ストレスに伴う内耳障害の有効な予防法や治療法を解明することは、健康長寿社会の実現のため大きく社会に貢献できると考える。

本研究では騒音性難聴と転写因子 NRF2 の関連に着目した。騒音性難聴の発症機序の一つは、内耳の虚血再還流障害であるとされる。つまり、強大音に曝露された際に内耳の血流が一時的に低下し、再還流に伴い増加する酸化ストレスが内耳の組織傷害や細胞機能低下をもたらす難聴を生じると理解されている。一方、転写因子 NRF2 は、酸化ストレスや外来異物の刺激により活性化され、生体防御機構を担う抗酸化酵素や解毒酵素群の遺伝子発現を統括的に誘導することで、酸化ストレス防御において中心的役割を果たす転写因子である。過去の報告から、内耳において NRF2 が酸化ストレス障害に対して保護的に作用している可能性が示唆されるものの、詳細な内耳における NRF2 の機能については未だ解明されていなかった。そこで、NRF2 活性化による酸化ストレス障害に対する内耳保護機能を明らかにすることを目的に、本研究を行うこととした。

まず、野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスを用いた強大音曝露実験では聴性脳幹反応 (ABR: Auditory brainstem responses) での評価により、NRF2 欠損で

は強大音曝露による聴力低下が大きいことが明らかとなった。

次に RT-PCR にてマウスの蝸牛での NRF2 標的遺伝子の発現を検討したところ、強大音曝露の刺激のみでは NRF2 は活性化されないが、NRF2 活性化剤である CDDO-Im の腹腔内投与により蝸牛での NRF2 を活性化できることを明らかとした。この CDDO-Im 投与による蝸牛での NRF2 の安定化はイムノブロットでも確認した。

そこで、NRF2 を恒常的に活性化することで騒音性難聴を軽減できるのではないかとの仮説を検証するため、CDDO-Im を投与してマウスでの強大音曝露実験を行った。ABR での聴力評価では、強大音曝露前に予め CDDO-Im を投与することで、NRF2 依存的に強大音曝露による聴力障害を軽減することができた。一方、強大音曝露後に CDDO-Im を投与しても聴力障害の軽減効果が認められなかった。この結果より、NRF2 を活性化することで強大音曝露による内耳障害を予防できることが明らかとなった。

さらに、内耳有毛細胞の損傷数についての組織学的な定量解析でも、ABR の結果と一致して、NRF2 欠損では損傷数が多く、CDDO-Im 投与により NRF2 依存的に損傷数が軽減する傾向が確認された。

次に、NRF2 活性化による強大音曝露に対する内耳保護のメカニズムを解明するため、マウスの蝸牛での酸化ストレスに着目して検討した。まず、免疫染色とイムノブロットでの、酸化ストレスマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE) の検討では、4HNE は強大音曝露により有毛細胞で検出されるようになり、特に NRF2

欠損ではより強く検出されることが分かった。さらに CDDO-Im は NRF2 依存的に 4HNE の蓄積を軽減することが明らかとなった。一方、グルタチオン定量解析では、NRF2 欠損マウスは野生型マウスと比較して、蝸牛のグルタチオン総量が少ないことが分かった。また、強大音曝露によりいずれの遺伝子型でも蝸牛の酸化型グルタチオン (GSSG) /還元型グルタチオン (GSH) 比が増加したが、特に NRF2 欠損では GSSG/GSH 比の増加が著明であった。さらに、CDDO-Im が NRF2 依存的に GSSG/GSH 比の増加を抑制することが明らかとなった。つまり、これらの結果から NRF2 の活性化による強大音曝露に対する内耳保護の機序は、内耳での酸化ストレスの軽減によるものであることが分かった。

最後に、これらのマウス実験から得られた結果を受けて、ヒトにおいても NRF2 と聴力の維持とに関連があるか検討するため、日常の職務の中で騒音曝露の機会が多いとされている陸上自衛隊員 602 人の健康診断データを用いて、*NRF2* プロモーター領域の一塩基多型 (rs6721961) と騒音性難聴との相関の有無について統計学的に解析した。その結果、NRF2 の発現量が少ない *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型を有する人は騒音性難聴のリスクが高いということを明らかにした。

以上のとおり、本研究によりヒトでもマウスと同様に NRF2 の活性と騒音性難聴の発症に関連があることが示された。NRF2 の発現量が少ない *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型を有する人は騒音性難聴のリスクが高い一方、強大音に曝される前に予め NRF2 活性化剤で NRF2 の働きを強めておくことで臨床的に騒音性難聴を予防でき

る可能性があることが見出された。

本研究では騒音性難聴に着目して解析したが、同様に酸化ストレスによる内耳障害がその主な病態であるとされている加齢性難聴についても、NRF2 を活性化して内耳の抗酸化機能を高めることで難聴予防につながるのではないかと期待される。

II. 研究背景

高齢化社会の進展に伴い難聴患者数は増加している。2015年の世界保健機関（WHO）の報告では、全世界で人口の約5%にあたる約3億6千万人、65歳以上に限定すれば人口の3分の1程度が難聴患者であるとされる。さらに、携帯音楽プレーヤーやスマートフォンの普及などによる不適切な強大音量での長期間の音楽聴取が原因となり世界中で11億人もの若者で難聴発症のリスクが高まっていると報告されている。加齢性難聴や騒音性難聴の主要因は酸化ストレスによる内耳障害であるとされており、酸化ストレスに伴う内耳障害の有効な予防法や治療法を解明することは、健康長寿社会の実現のため大きく社会に貢献できると考える。しかし、有効な予防法や治療法は未だ解明されていない。

騒音性難聴は比較的、発症機序が解明されている感音難聴であり、その機序の一つは内耳の虚血再還流障害であるとされている¹⁾⁻⁵⁾。虚血再還流障害とは、虚血とその後の血流再還流の際にミトコンドリアの機能不全による活性酸素種（ROS）産生が増加し組織傷害や細胞機能低下をもたらすものであり、臓器障害のメカニズムの一つとしてよく知られている^{6),7)}。内耳においては、強大音に曝露されると血管収縮作用を持つ8-イソプロスタニン-F2a量が増加し^{8),9)}内耳血流が一時的に低下し¹⁰⁾、再還流に伴い蝸牛でのROS産生が増加し³⁾内耳組織が傷害されることで難聴が生じると理解されている。

一方、騒音性難聴は職場や娯楽での強大音曝露が原因となることが多く、

受傷機会を予測しやすい難聴であると言える。そのため予防薬もしくは治療薬が開発されれば、臨床診療において薬を適切なタイミングで投与することが可能であり、開発の意義は高いと考えられる。

本研究では酸化ストレス防御において中心的役割を果たしている転写因子 NRF2 に着目し解析した。NRF2 は、酸化ストレスや外来異物の刺激により活性化され、それらに対する生体防御機構を担う抗酸化酵素や解毒酵素群の遺伝子発現を統括的に誘導する^{11), 12)}。NRF2 は非ストレス環境下の定常状態では細胞質において 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経路で直ちに分解されているものの、酸化ストレス環境下では KEAP1 の不活性化の結果 NRF2 は安定化し核に移行することで標的遺伝子群の発現を誘導する。このように NRF2 は、特徴的なストレス応答性の機能を持つ。

NRF2 と内耳との関連については、これまでに *Nrf2* 欠損マウスでは加齢性難聴が早期に進行することが報告されている¹³⁾。また、NRF2 の標的遺伝子として、*NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (Nqo1)*, *heme oxygenase 1 (Ho-1)*, *glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (Gclc)*, *glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (Gclm)* and *thioredoxin reductase 1 (Txnrd1)* などが知られているが、これまでに強大音曝露の刺激による蝸牛での Ho-1 の蓄積¹⁴⁾やグルタチオン産生の増加¹⁵⁾が報告されている。これらの報告から、内耳において NRF2 が酸化ストレス障害に対して保護的に作用している可能性が示唆されるものの、内

耳における NRF2 の詳細な機能については未だ解析されていない。また、これまでに NRF2 の恒常的活性剤を投与することで、肝臓や腎臓における虚血再還流障害が軽減することが示されており¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、内耳においても NRF2 を恒常的に活性化することで、強大音曝露での酸化ストレス増大による内耳障害に対して保護効果を示すことが期待できると考えた。そこで本研究では、酸化ストレスによる内耳障害のメカニズムを解明するとともにその予防・治療法を確立することを目的として、騒音性難聴に着目してマウスでの強大音曝露実験にて NRF2 活性剤 (CDDO-Im) の内耳保護効果について検討した。

また、ヒトにおいて *NRF2* 遺伝子のプロモーター領域には一塩基多型 (rs6721961) が存在し、それぞれの多型により NRF2 の発現量に差があることが知られている^{19), 20)}。NRF2 の活性は *NRF2* 遺伝子の発現量と NRF2 タンパク質の安定性によって規定されると考えられ、NRF2 発現量の少ない一塩基多型を有するヒトでは、急性肺障害や、喫煙に伴う肺がんのリスクが増加することが報告されている²⁰⁾⁻²²⁾。しかし、これまでヒトの難聴と *NRF2* 遺伝子のプロモーター領域の一塩基多型との関連について解析されたことはなかった。人の騒音性難聴の発症初期には 4kHz の聴力がまず障害されるという特異的所見が知られており²³⁾、一般的な純音聴力検査を用いて騒音性難聴の有無を鑑別することが可能である。本研究では、マウス実験で得られた強大音曝露に対する NRF2 の内耳保護機能がヒトにも適応できるか検討するため、日常の職務の中で騒音曝露の機会が多いとされている²⁴⁾陸上自衛隊員の

健康診断データを用いて、騒音性難聴と *NRF2* 遺伝子の一塩基多型との相関の有無について統計学的に解析した。

Ⅲ. 研究目的

本研究は以下の点を検証することを目的とする。1) 強大音曝露での酸化ストレス増大による内耳障害の防御に、NRF2 は関与しているか。2) NRF2 の活性化により、強大音曝露による内耳障害を予防もしくは治療することが可能か。

IV. 研究方法

IV-1. 実験動物

野生型および *Nrf2* 遺伝子欠損 (*Nrf2*^{-/-}) マウス²⁵⁾ を用いた。いずれのマウスも遺伝的背景は C57BL/6 (Jackson Laboratory) とし、6-7 週齢 (体重 17-20g) を用いた。マウスの PCR によるジェノタイピングに用いたプライマーは、*Nrf2* forward 5' -TGG ACG GGA CTA TTG AAG GCT G-3' , *Nrf2*^{-/-} reverse 5' -GCG GAT TGA CCG TAA TGG GAT AGG-3' , *Nrf2*^{+/+} reverse 5' -GCC GCC TTT TCA GTA GAT GGA GG-3' である。全てのマウスは東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設の SPF 施設内で管理し、東北大学動物実験委員会の指針に基づいて研究を行った。

IV-2. 薬剤投与方法

CDDO-Im は持田製薬より提供を受けた。DMSO で溶解し体重 1kg あたり 30 μ mol を腹腔内投与した。マウスの聴力測定実験における CDDO-Im の投与プロトコールは図 4a に示した。有毛細胞損傷数の組織学的解析 (図 5) では、強大音曝露の 6 時間前に CDDO-Im を投与し、強大音曝露の 7 日後にサンプルを採取し解析した。定量 RT-PCR 解析 (図 3a) と NRF2 のイムノブロッティング解析 (図 3b, c) では CDDO-Im 投与の 6 時間後にサンプルを採取した。4HNE の組織学的検討 (図 6a) とイムノブロッティング解析 (図 6b) とグルタチオン定量解析 (図 7) では、強大音曝露の 6 時間前に CDDO-Im を投与し 2 時間の強大音曝露の 4 時間後にサンプルを採取し解析

した。

IV-3. 強大音曝露

マウスは覚醒状態で強大音曝露用チャンバーに入れ、音圧レベル 96 dB SPL、8-16 kHz のオクターブバンドノイズを 2 時間曝露した。

ノイズはノイズジェネレーター (SF-06, Random Noise Generator; RION) で作成した後、アンプ (D-75A; Crown) で増幅し、オーディオフィルター (Multifunction Filter; NF Corporation) で周波数帯域を設定し、チャンバー内の天井中央に取り付けたスピーカー (2446H; JBL) により出力した。音圧レベルは実験ごとに音圧測定装置 (2250L; Brüel & Kjær) で測定し確認した。

IV-4. マウスの聴力測定

マウスはケタミン (100 mg/体重 kg)、キシラジン (20 mg/体重 kg) の混合液の腹腔内注射により麻酔した。聴性脳幹反応 (ABR: Auditory brainstem responses) は TDT System 3 ワークステーションと BioSigRP ソフトウェア (Tucker-Davis Technologies) を用いて解析した。4, 8, 12, 16, 32 kHz のトーンバーストに対する誘発反応の加算平均 (1000 回) を記録した。刺激音は各周波数、100 dB SPL から 10 dB SPL まで 5 dB 間隔で提示した。ABR の閾値は少なくとも 1 つの波形が再現性を持って確認される最小の音圧閾値とした。ABR の測定はマウス

ごとに強大音曝露の前日と4時間後と7日後の3回測定した(図1a, 4a)。強大音曝露の4時間後と7時間後の聴力障害の程度については、それぞれの聴力閾値と強大音曝露前の聴力閾値の差(Threshold Shift (dB))を計算して評価した(図1c, d, 4b-e)。

IV-5. 定量 RT-PCR 解析

マウスは麻酔下に開胸し氷冷 10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.4) で心灌流した後に断頭し、直ちに側頭骨を摘出した。氷上で蝸牛部分のみを分離し RNA later (Life Technologies) 液中で -80°C 冷凍庫に保存した。その後、ISOGEN (Nippon gene) 液中に蝸牛を移しビーズホモジナイザーで15秒間ホモジネートした後、遠心分離し上清から total RNA を精製し、逆転写酵素 (ReverTra Ace, Toyobo) を用いて cDNA を合成した。1 サンプルあたり両側 2 個の蝸牛を用いた。定量 PCR 解析は、SYBR Green システムに対しては Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) および THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用い、Taqman probe システムに対しては THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (Toyobo) を用いて Applied Biosystems 7300 にて解析を行った。反応液 (25 μL) の濃度は SYBR Green システムでは 400 nM のプライマーとし、Taqman probe システムでは 300 nM のプライマーと 200 nM のプローブとなるように調整した。Thermal cycling コンディションは 50°C 2 分、 95°C 10 分の加温の後、 95°C 15 秒と 60°C 60 秒の 50 サイクルとした。

マウスの *Nrf2*, *Nqo1*, *Ho-1*, *Gclc*, *Gclm*, *Txnrd1*, *Gapdh* に対するプライマーとプローブは表 1 に記載した。

IV-6. 組織学的解析

マウスは麻酔下に開胸し 10 mM PBS で心灌流した後、10 mM PBS (pH 7.4) で希釈した 4%パラホルムアルデヒド (PFA) にて心灌流固定した。その後、断頭し直ちに内耳を取り出した後、実体顕微鏡下に蝸牛内を 4% PFA にて外リンパ灌流してから 4% PFA に浸し 4°C で一晩固定した。次に 10% EDTA 液に交換し 4°C で 2 日間脱灰した後、下記の各解析に用いた。

IV-6-(1) 内耳有毛細胞の損傷の定量

基板の surface preparation を行った。つまり、PBS に浸した状態で脱灰処理後の蝸牛を蝸牛軸に沿って 2 分割し、さらに各回転に分割した後、外側壁・ライスネル膜・蓋膜・ラセン板縁を切除しコルチ器を露出させた。サンプルを 0.3% Triton X-100/Tris buffered saline (TBS) に室温 10 分間浸した後、遮光条件で室温 30 分間 rhodamine-conjugated phalloidin (1:100, Invitrogen) で F-actin を染色した。その後、0.1% Triton X-100/TBS (TBST) で 5 分間 x2 回洗浄し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence) で撮影し BZ-H1 ソフトウェア (Keyence) を用いて観察した。得られた画像から Photoshop CS4 (Adobe) を用いて頂回転端から基底回転端までを

全て含む1枚の画像データを作成し、ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いてマウス蝸牛の周波数マップを作成した。8.0, 11.3, 16.0, 32.0 kHz の各周波数帯に相当する部位を各々400 μm ずつ有毛細胞の損傷数を計測し解析した。

IV-6-(2) 4HNE 免疫染色

脱灰処理後の蝸牛を 10 mM PBS で希釈した 10%シヨ糖溶液と 30%シヨ糖溶液に 4°C で各々一晩浸した後、Tissue-Tek O. T. C. Compound (Sakura Finetechnical) 中に実体顕微鏡で方向を確認しながら包埋し、液体窒素で冷却し凍結切片用ブロックを作成した。クライオスタット (CM3000, Leica Instruments) を用いて切片 (8 μm 厚) を作成した。0.1% TBST で洗浄した後、3% bovine serum albumin/0.3% TBST で室温 30 分間ブロッキング処理をした。その後 unconjugated AffiniPure Fab fragment anti-mouse IgG (1:10, Jackson ImmunoResearch) を室温で 2 時間反応させた。次に 0.3% TBST で希釈した 1 次抗体 (抗 4HNE 抗体; 1:400, JaICA. 抗 Myosin 7a 抗体; 1:500, Abcam) を 4°C で一晩反応させた。0.1% TBST で洗浄した後、蛍光 2 次抗体 (Cy3 anti-mouse; 1:500, Jackson ImmunoResearch, Alexa Fluor 488 anti-rabbit; 1:500, Jackson ImmunoResearch) と核染色液

(4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1:2,000) を遮光下に室温で 1 時間反応させ、共焦点顕微鏡 (LSM 780, Zeiss) で撮影し ZEN ソフトウェア (Zeiss) を用いて観察した。共焦点顕微鏡では Plane-Neofluar40x/1.3 oil immersion 対物レンズ

と、Blue-diode 405nm, Multi-Argon 458/488/511nm, DPSS 561nm のレーザーを使用した。

IV-7. イムノブロット解析

マウスは麻酔下に開胸し、氷冷 10 mM PBS (pH 7.4) で心灌流した。断頭した後、内耳を摘出し速やかに -80°C 冷凍庫に保存した。蝸牛 1 個を 1 サンプルとして 400 μL の RIPA buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1mM dithiothreitol, and 1x complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche)] を加えてビーズホモジナイザーで 15 秒間ホモジナイズした。 4°C で 15 分間遠心分離 (12,000 rpm) した後、各サンプルあたり 250 μL の上清を回収し、6x SDS sample buffer を加えて 95°C で 5 分間加熱した。各サンプルは 10% アクリルアミドゲルで SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) した後、タンパクを PVDF メンブレン (Millipore) に転写した。メンブレンを 0.05% Tween 20/TBS (TBST) で希釈した 5% スキムミルク液でブロッキングした後、1 次抗体 (抗 4HNE 抗体 (1:100, JaICA) もしくは抗 NRF2 抗体 (1:100)²⁶⁾) を 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄した後、1 次抗体に抗 4HNE 抗体を用いたメンブレンには horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (1:2,000, Life Technology) を、1 次抗体に抗 NRF2 抗体を用いたメンブレンには horseradish peroxidase-conjugated anti-rat IgG 抗体 (1:1,000) を室温で 30 分間反応させた。バンドは Chemi-Lumi One L (Nacalai

Tesque)を用いて検出し記録した。その後、各泳動レーンの蛋白量が同等であることを確認するため、メンブレンを再度、抗 Tubulin マウスモノクローナル抗体(1:2,000, Sigma Aldrich) もしくは抗 Lamin B goat ポリクローナル抗体 (1:1,000, Santa Cruz Biotech)で反応させてバンドを検出し記録した。

IV-8. グルタチオン定量解析

マウスは頸椎脱臼にて安楽死した後、直ちに側頭骨を摘出し重量を計測した後に液体窒素で急速凍結し -80°C 冷凍庫にサンプルを保存した。1 サンプルあたり両側 2 個の側頭骨 (蝸牛と前庭を含む、約 30 mg) とした。凍結サンプルに冷却メタノールで希釈した 500 μL の 50 μM internal standard solution (Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan)を加えてホモジナイズした。このホモジネートに 500 μL クロロホルム と 200 μL Milli-Q 水を加えて均質化した後、 4°C で 10 分間遠心分離 (750 g) し、水層を回収した。次にタンパクを除去するため Millipore 5-kDa フィルターにかけて 9,100 g で遠心分離し、回収した液体を凍結乾燥した後、25 μL Milli-Q 水に懸濁し CE-TOFMS 解析した。CE-TOFMS(Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan)解析は、Agilent 6210 time-of-flight mass spectrometer と Agilent 1100 isocratic HPLC pump と Agilent G1603A CE-MS adapter kit と Agilent G1607A CE-ESI-MS sprayer kit を装備した Agilent CE Capillary Electrophoresis System と Agilent G2201AA Chem- Station software version B.03.01 for CE (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用

いて行った。cationic 代謝物の分離と検出には以前の報告²⁷⁾と同様に、石英ガラス管 (50 lm i.d.; 980 cm total length) と cation 緩衝液 (Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan) を使用した。サンプルは 50 mbar 圧で 10 秒間 (約 10 nL) 注入した。電圧は 27 kV に設定した。Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) は positive ion mode に設定し、capillary voltage は 4,000 V とした。spectrometer は m/z 50 から 1,000 までスキャンした。CE-TOFMS 解析で得られた raw データは、Keio MasterHands²⁸⁾ を用いてデータ処理し解析した。

IV-9. ヒトの聴力測定

自衛隊中央病院で健康診断を受けた 602 人の陸上自衛隊員の日本人男性を対象とした。加齢性難聴の影響を排除するため、対象年齢は 49 歳から 50 歳とした。防衛医科大学校と自衛隊中央病院の倫理委員会の承認のもと、被験者から書面での同意を得た上でヘルシンキ宣言の指針に基づいて本研究を行った。純音聴力検査にはオーディオメーター(AA-79S, RION Inc., Tokyo, Japan)を用いた。被験者を 2 人の耳鼻咽喉科医師が診察することで、感音難聴と伝音難聴を鑑別した。純音聴力検査の結果により、研究対象者を良聴耳の 4 kHz の聴力が 20 dB hearing level (HL)以下のコントロール群と 20 dB HL 以上の騒音性難聴患者群の 2 群に分けて解析を行った。

IV-10. ヒトの一塩基多型解析

上記IV-9と同じ対象者に対し、防衛医科大学校と自衛隊中央病院の倫理委員会の承認のもと、被験者から書面での同意を得た上でヘルシンキ宣言の指針に基づいて防衛医科大学校にて解析を行った。ゲノムDNAは末梢血サンプルから抽出した²⁹⁾。*NRF2* 遺伝子のプロモーター領域の一塩基多型 (rs6721961) のジェノタイプピングは TaqMan method (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて、LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)²⁹⁾で行った。*NRF2* 遺伝子のプロモーター領域の一塩基多型と騒音性難聴との相関についての統計学的解析には software R (version 3.1.1) (<http://www.r-project.org/>)を用いた Cochran-Armitage trend test により行った。

V. 研究結果

1. NRF2 欠損では、強大音曝露による聴力障害の程度が大きい。

NRF2 を欠損することが、強大音曝露による内耳の易障害性と関連があるかを検証するため、強大音曝露実験を行い ABR にて野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスを比較した。強大音曝露および ABR 測定のプロトコールを図 1 a に示した。各群 8 匹のマウスを解析した。

強大音曝露前の ABR では野生型と *Nrf2* 遺伝子欠損マウスで差を認めなかった (図 1 b)。つまり、NRF2 は 6-7 週齢の時点での聴覚の正常発達には関与していないことが分かった。

短期的障害を反映するとされる強大音曝露 4 時間後の ABR では、いずれの遺伝子型マウスも聴力障害が認められた。聴力障害の程度は、野生型と比べて *Nrf2* 遺伝子欠損マウスで大きい傾向が認められたが、統計学的な有意差は認めなかった (図 1 c)。一方、長期的障害を反映するとされる強大音曝露 7 日後の ABR では、いずれの遺伝子型マウスも聴力障害が残存するものの、その障害の程度は野生型と比べて *Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは顕著であり、特に 12 kHz と 16 kHz の聴力では統計学的に有意な差を認めた (図 1 d)。以上の結果より、NRF2 が欠損することで強大音曝露による聴力障害が強く現れることが分かった。

2. 強大音曝露刺激だけでは、蝸牛での NRF2 標的遺伝子群の発現は上昇しない。

強大音曝露刺激により蝸牛での NRF2 が活性化されるか検討するため、強大音曝露の4時間後に最も蝸牛でのグルタチオン量が増加しているとの過去の報告¹⁵⁾を参考にして、強大音曝露4時間後のマウス蝸牛組織から total RNA を抽出し RT-PCR により NRF2 標的遺伝子の発現について解析した (図 2)。3 回の実験の平均値で評価した。

その結果、野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスの両方において、いずれの NRF2 標的遺伝子 (*Nqo1*, *Ho-1*, *Gclc*, *Gclm*, *Txnrd1*) の強大音曝露前後の発現量には統計学的に有意な差を認めなかった。つまり、強大音曝露刺激だけでは、蝸牛での NRF2 の活性化は認められなかった。

3. NRF2 活性化剤 (CDDO-Im) 投与により、蝸牛での NRF2 が活性化される。

NRF2 の有無は強大音曝露による聴力障害の程度に関連している (図 1d) もの、強大音曝露刺激だけでは NRF2 を十分に活性化できない (図 2) というここまでの実験結果をふまえ、外因的に NRF2 を活性化することで騒音性難聴を軽減できるのではないかと考え、それを検証するため NRF2 活性化剤として知られる CDDO-Im³⁰⁾⁻³²⁾ を投与してマウスでの強大音曝露実験を行う計画とした。まず、他の臓器では NRF2 の活性化が認められている CDDO-Im の腹腔内投与法³⁰⁾⁻³²⁾ により、実際に蝸牛での NRF2 が活性化されるかを検討するため、CDDO-Im を腹腔内投与した 6

時間後のマウス蝸牛組織から抽出した total RNA を用いて RT-PCR で NRF2 標的遺伝子の発現を検討した (図 3a)。データは 3 回の実験の平均値として解析した。さらに、NRF2 タンパク質をイムノブロットで検討した (図 3b, c)。

その結果、野生型マウスでは CDDO-Im 投与により NRF2 の標的遺伝子である *Nqo1*, *Ho-1*, *Gclc*, *Gclm*, *Txnrd1* の全ての発現が有意に上昇していることが示された。この CDDO-Im 投与による標的遺伝子の発現上昇は *Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは認められず、NRF2 に依存的な作用であることが確認された (図 3a)。また、イムノブロットでは、NRF2 のタンパク量は強大音曝露だけでは増加せず、CDDO-Im 投与により増加することが確認された (図 3b)。この結果は、RT-PCR での強大音曝露だけでは NRF2 の標的遺伝子群の発現は上昇しないが (図 2)、CDDO-Im 投与により標的遺伝子群の発現が上昇する結果 (図 3a) と一致している。さらに、蝸牛での CDDO-Im による NRF2 タンパクの安定化の程度は、脳の一部である嗅球より高く、肝臓と同程度であることが分かった (図 3c)。これらの結果より、CDDO-Im は腹腔内投与により蝸牛での NRF2 を十分に活性化できることが明らかとなった。

4. CDDO-Im は NRF2 依存的に騒音性難聴を軽減する。

CDDO-Im が蝸牛での NRF2 を活性化することが確認された (図 3) ので、次に NRF2 を活性化することで騒音性難聴を軽減できるか検証するため、CDDO-Im を腹腔内投与してマウスでの強大音曝露実験を行い、聴力を ABR で評価した。CDDO-Im

の投与タイミングが異なる 3 群と偽薬群に分け実験を行った (図 4a)。CDD0-Im 投与群は強大音曝露の 6 時間前に一度だけ投与する pre 群と、強大音曝露の 6 時間前と 1 日後と 3 日後の合計 3 回投与する 3 times 群と、強大音曝露の直後に一度だけ投与する post 群の 3 群とした。各群 5-6 匹のマウスを解析した。

野生型マウスでの結果を解析すると、強大音曝露 4 時間後の短期障害については、いずれの CDD0-Im 投与群と偽薬群とで有意な差を認めなかったものの (図 4b)、強大音曝露 7 日後の長期障害については、CDD0-Im を投与した pre 群と 3 times 群では偽薬群と比較して聴力障害が軽度であった (図 4c)。ただし CDD0-Im を投与した post 群は偽薬群と有意差を認めず、さらに CDD0-Im を投与した pre 群と 3 times 群の比較では聴力障害の軽減が同程度であったこと (図 4c) から、強大音曝露に伴う聴力障害を軽減するためには、強大音曝露前に CDD0-Im を投与して強大音曝露の時点で十分に NRF2 を活性化していることが重要であり、曝露終了後の NRF2 の活性化は聴力障害の軽減のためには効果がないことが示された。

さらに、この CDD0-Im 投与による聴力障害の軽減効果が NRF2 に依存的であるかを検証するため、野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウス間で CDD0-Im を投与した pre 群の ABR 結果を比較した (図 4d, e)。すると、強大音曝露 4 時間後の短期障害では野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスで有意な差を認めなかった (図 4d) が、強大音曝露 7 日後の長期障害では野生型で認められた CDD0-Im 投与での聴力障害軽減効果が、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは認められなかった (図 4e)。これらの結

果から、CDDO-Im は NRF2 依存的に強大音曝露による聴力障害を軽減することが示された。

5. NRF2 欠損では、強大音曝露による内耳有毛細胞の損傷が大きい。

CDDO-Im による NRF2 の活性化で聴力障害が軽減することが ABR により示されたが (図 3c)、この CDDO-Im 投与による内耳保護効果が形態的にも認められるかを検証するため、強大音曝露の 7 日後に摘出した内耳有毛細胞の損傷について組織学的に比較した (図 5)。

Surface preparation 画像 (図 5a) では、野生型マウスではコントロール群では損傷有毛細胞が少数認められるものの、CDDO-Im 投与群で損傷細胞はほとんど認められなかった。一方、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは CDDO-Im 投与群でもコントロール群と同様に複数の損傷細胞を認めた。

次に ABR で確認された聴力障害の差と組織学的な有毛細胞損傷の程度との関連を検討するため、8.0, 11.3, 16.0, 32.0 kHz に相当する部位の有毛細胞損傷数を定量評価した (図 5b)。各群 5-6 匹のマウスを解析した。

野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスの比較では、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して損傷細胞数が多く、11.3, 16.0, 32.0 kHz の周波数帯域においては有意な差を認めた。これは ABR で検出された聴力障害の差 (図 1c) を反映していると考えられた。一方、野生型マウスでの CDDO-Im 投与群とコントロール

群の比較では、両群とも損傷細胞は少数のみであり 2 群間に有意な差を認めなかった。これは、ABR での 40 dB 程度以下の聴力障害では、形態的な有毛細胞損傷までは至らず機能障害にとどまるという過去の報告^{33),34)}とも矛盾しない結果であった。

6. NRF2 活性化により、蝸牛の酸化ストレスが軽減する。

ここまでの結果で、NRF2 活性化剤である CDDO-Im を投与することで強大音曝露による内耳障害を軽減できることを示したが、そのメカニズムを検討するため、内耳の酸化ストレスに着目し、強大音曝露 4 時間後の蝸牛サンプルを用いて免疫染色 (図 6a) およびイムノブロット (図 6b) にて酸化ストレスマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE) の解析を行った。

まず内耳コルチ器の免疫組織学的検討では、野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスのいずれでも、強大音曝露なしの群では 4-HNE の赤色蛍光は検出されなかった。一方、強大音曝露あり群では内有毛細胞と外有毛細胞のマーカーである Myosin7a の緑色蛍光に一致して 4 HNE の赤色蛍光が検出された。特に *Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して 4HNE 蛍光が強く検出された。また、野生型マウスでは CDDO-Im 投与群では偽薬投与群と比較して 4HNE の蛍光強度が低下しているものの、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは CDDO-Im 投与群でも偽薬群と同程度の 4HNE の蛍光強度を示した (図 6a)。

イムノブロット解析では、免疫組織学的検討の結果と同様に、野生型マウ

スでは強大音曝露により増加した 4 HNE が CDDO-Im 投与により軽減することが確認された一方、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスでは強大音曝露後には 4 HNE のバンドがより強く検出され、CDDO-Im 投与でも軽減しなかった (図 6b)。

これらの結果より、NRF2 欠損では強大音曝露による蝸牛の酸化ストレスが増大することと、CDDO-Im は NRF2 依存的に酸化ストレスを減弱することが明らかとなった。つまり、ここまでに示してきた NRF2 の活性化による強大音曝露にともなう内耳障害の予防効果は、酸化ストレスの軽減によるものであることが示された。

7. NRF2 欠損では還元型グルタチオン (GSH) が減少する。

さらに蝸牛における酸化ストレスについての検討を加えるため、蝸牛の還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) の定量を CE-TOFMS で行った (図 7)。野生型マウスと *Nrf2* 遺伝子欠損マウスをそれぞれ、コントロール群、強大音曝露群、CDDO-Im 投与後に強大音曝露した群の 3 群に分けて解析した。各群 3 匹のマウスを解析した。

まず、酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの比 (GSSG/GSH) に着目すると、野生型マウスも *Nrf2* 遺伝子欠損マウスも強大音曝露群はコントロール群と比較して GSSG/GSH 比の増加が認められた。さらに、CDDO-Im 投与後に強大音曝露した群を強大音曝露群と比較すると、野生型マウスでは GSSG/GSH 比が減少していた一方、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスではこの GSSG/GSH 比の減少は認められなかった。

この結果は、NRF2 欠損では強大音曝露により酸化ストレスマーカーである 4HNE が増加し、CDDO-Im は NRF2 依存的に 4HNE を減少した結果（図 6）と一致するものと考えられる。

次に、グルタチオン総量（GSH + GSSG）に着目すると、*Nrf2* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスより GSH + GSSG が少なかった。この結果から、NRF2 は蝸牛におけるグルタチオン量の調節と維持に貢献していると考えられた。

これらの結果から、NRF2 は蝸牛におけるグルタチオンの還元と合成に関与しており、NRF2 を活性化することにより、還元型グルタチオン量を増加させ抗酸化能を高めることで強大音曝露による内耳障害を軽減するものと理解される。

8. ヒトの *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型と騒音性難聴には相関がある。

ここまで、マウスでは NRF2 と強大音曝露での酸化ストレスによる内耳障害とに関連があることを示してきた。そこで最後に、ヒトにおいても NRF2 と聴力の維持とに関連があるか検討するため、日常の職務の中で騒音曝露の機会が多いとされている陸上自衛隊員 602 人の健康診断データを用いて、*NRF2* 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型（rs6721961）と騒音性難聴との相関の有無について統計学的に解析した（図 8）。rs6721961 の一塩基多型には、NRF2 の発現量が多い G アレルと NRF2 の発現量が少ない T アレルが知られている²⁰⁾⁻²²⁾（図 8a）。

まず 602 人を純音聴力検査での 4kHz の聴力閾値を指標として、20dB HL 以

上の騒音性難聴群 (Case; 195 人) と 20dB HL 以下の正常聴力群 (Control; 407 人) に振り分けた。騒音性難聴群ではマイナーアレルである T アレルのヘテロは 86/195 人、ホモは 17/195 人であり、minor allele frequency (MAF) は 0.308 であった。一方、正常聴力群では T アレルのヘテロは 152/407 人、ホモは 26/407 人であり、MAF は 0.250 であった。相関解析の結果、T アレルと 4 kHz の聴力低下には統計学的に有意な相関がありオッズ比は 1.33 であった (図 8b)。つまり、NRF2 の発現量が少ない *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型を有する人は騒音性難聴のリスクが高いということが明らかとなった。

VI. 考察

NRF2 欠損マウスでは強大音曝露による内耳障害が強く現れることから、NRF2 は強大音曝露刺激に対する内耳防御機構において重要な機能を担っていることが明らかとなった。また、騒音曝露の機会が多いとされる陸上自衛隊員²⁴⁾のデータを解析したところ、*NRF2* の発現量が少ないことが知られている *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型と騒音性難聴の発症との間には統計学的に有意な相関があることが明らかとなった。これらの結果より、NRF2 の活性化は、強大音曝露での酸化ストレス増加による内耳障害を軽減するための重要な臨床的なターゲットになると考えられる。

一方、強大音曝露だけでは蝸牛での NRF2 の活性化は検出されなかった結果 (図 2, 3b) から、強大音曝露だけでは NRF2 の活性化に十分な刺激とならない可能性があると考えられた。つまり、NRF2 の内耳保護効果を十分に発揮するためには、外因的に NRF2 を活性化することが有効であると思われた。本研究では、CDDO-Im は強大音曝露前の投与では聴力保護効果を示したものの、強大音曝露後の投与では保護効果を示さなかったこと (図 4c) から、NRF2 活性化により内耳を保護するためには、酸化ストレスが増加する時点ですでに NRF2 が十分に活性化されている必要があることが分かった。つまり臨床応用を考えた場合、強大音曝露前に予め予防薬として投与する方法が有効であると思われる。この場合、騒音性難聴は職場や娯楽での強大音曝露が原因となることが多く、受傷機会が予測しやすいため、予防投

与も現実的に可能であると思われる。

本研究でのイムノブロットでの NRF2 タンパク量の検討により、CDDO-Im の腹腔内投与による蝸牛での NRF2 活性化の程度は、脳より高く、肝臓と同程度であることが分かった (図 3c)。つまり、一般的に内耳研究では内耳への薬物移行性が問題となることが多いものの、CDDO-Im は比較的、蝸牛での NRF2 を活性化しやすい薬剤であると考えられた。しかしながら、今回の研究では CDDO-Im が内リンパへ到達しているか、もしくは蝸牛のいずれの細胞に作用して NRF2 を活性化しているかについて十分に検討できておらず、今後の検討課題と考えられる。

これまでも、酸化ストレスを減弱させることで騒音性難聴を軽減するというコンセプトに基づき、いくつかの化合物の有効性が報告されている。興味深いことには、これらの化合物はいずれも KEAP1-NRF2 系と関連があるものばかりである。例えば、GSH や glutathione monoethylester (GSHE) や N-acetylcysteine (NAC) はいずれも KEAP1-NRF2 系の制御下にある化合物やその類似化合物である。さらに、ebselen³⁵⁾ や resveratrol³⁶⁾ や allopurinol³⁷⁾ や deferoxamine mesylate³⁸⁾ はいずれも NRF2 を活性化することが知られている化合物である。また最近、rosmarinic acid が NRF2 の活性化を介して有効性を示すと報告された³⁹⁾。これらの報告からも、騒音性難聴の予防のためには NRF2 の活性化はとても重要なターゲットであることが示唆される。

NRF2 の活性は、KEAP1 により制御されている NRF2 タンパク質の安定性と、

NRF2 遺伝子の発現量の2つの要因によって規定されると考えられている。実際、*NRF2* の発現量の差異が各種病態に影響を与えることが報告されており^{20)-22), 40)}、例えばヒトの *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型場合、*NRF2* 遺伝子の発現量が少ない一塩基多型のヒトでは、急性肺障害や、喫煙に伴う肺がんのリスクが増加することが報告されている¹⁹⁾⁻²¹⁾。そして本研究では新たに、この一塩基多型と騒音性難聴の発症に有意な相関があることを明らかにした (図 9)。つまり、この一塩基多型では、*NRF2* の発現量が少ないことを要因として *NRF2* 活性が低く抗酸化能が低いため、酸化ストレスによる内耳障害が強く現れるということである。そこで、*NRF2* 発現量の少ない一塩基多型の人に *NRF2* 活性化剤を投与する意義を考察すると、まず *NRF2* 活性化剤は *NRF2* を安定化することで、*NRF2* 活性を高める。すると、*NRF2* 発現量が少ないことに起因する元来の *NRF2* 活性の低さが補完され、抗酸化能が高まることが期待される。つまり、騒音にさらされる機会が多い人、特に *NRF2* の発現量が少ない一塩基多型を有する人は、強大音に曝される前に予め *NRF2* 活性化剤で *NRF2* の働きを強めておくことで騒音性難聴の予防が可能となると考えられる (図 10)。

本研究は、*NRF2* 欠損マウスの解析により、騒音性難聴と *NRF2* との関連について決定的データを示すことができた点で大きな意義があると考えられる。しかしながら本研究の限界の一つは、全身性の *Nrf2* 遺伝子欠損マウスを用いた解析である点である。マウスの強大音曝露による内耳障害は、そのほとんどが蝸牛の局所的な障害要因によるものであると理解されている一方、全身的なストレス環境への応答に

よるヒートショックプロテインの増加が内耳保護効果を示すとの報告もあり⁴¹⁾、本研究での *Nrf2* 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 実験の結果が、NRF2 の内耳における局所的な保護機能によるものだけでなく、全身性の NRF2 の酸化ストレス防御機能による影響が加わっている可能性も完全には否定できない。

さらに、本研究の限界のもう一つは、RT-PCR およびイムノブロット (図 2, 3, 6b, 7) において全蝸牛を一塊に解析している点である。つまり、蝸牛にはコルチ器や血管条やラセン神経節細胞などの、正常聴覚を維持する上で重要な多種類の組織や細胞が存在しているが、本研究ではそれぞれを分離して解析できていない。例えば本研究では、強大音曝露だけでは蝸牛の NRF2 の活性化は検出されなかったが (図 2, 3b)、過去の研究において、強大音曝露により蝸牛の外側壁の部分だけでグルタチオン合成の増加が検出されたとの報告¹⁵⁾ や、内耳のいずれの細胞が ROS 産生の主要因であるかについての見解の一致はいまだ無いものの、血管条や外有毛細胞で酸化ストレスの蓄積が組織学的に認められるとの報告⁴²⁾ があることから、NRF2 は強大音曝露刺激により蝸牛の特定の部分のみで活性化される可能性があると考えられる。つまり本研究での一塊の蝸牛から抽出した RNA やタンパク質は内耳の特定の組織を反映したものではなく、いずれかの部位のみで生じていた有意な変化が遮蔽されてしまい、NRF2 の活性化を検出できなかった可能性がある。

最後に、本研究では騒音性難聴に着目し解析を行ったが、高齢化社会の進展に伴い今後さらなる患者増加が予想される加齢性難聴も、騒音性難聴と同様に酸

化ストレスによる内耳障害が主な病態であるとされる⁴³⁾。ミトコンドリアは活性酸素種（ROS）の主な発生源であるが、加齢にともないミトコンドリア機能が低下するとさらに ROS の増加をもたらし、酸化ストレスに伴う組織障害を引き起こす⁴⁴⁾。これまでに加齢性難聴が軽減すると報告されている有効な方法は、食事摂取カロリー制限だけある。カロリー制限では、ミトコンドリアでの NADPH 産生が促進され、還元型グルタチオンが増加し、ミトコンドリアで発生する ROS が還元されることで酸化ストレスが軽減することが、加齢性難聴軽減の機序であるとされている⁴⁵⁾この機序をふまえて考えると、NRF2 の活性化は内耳の酸化ストレスを減弱することで、騒音性難聴と同様に加齢性難聴をも軽減する効果があるのではないかと予測される。

VII. 結論

本研究により、NRF2 欠損マウスでは強大音曝露に伴う内耳障害が強いことと、ヒトでは *NRF2* の発現量が少ない *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型を有する人、すなわち NRF2 の活性が低い人は騒音性難聴のリスクが高いことが示された。つまり、ヒトでもマウスでも同様に NRF2 の活性と騒音性難聴の発症に関連があることが明らかとなった。

さらにマウスにおいて、NRF2 活性化剤である CDDO-Im を強大音曝露前に予め投与して NRF2 を活性化しておくこと、蝸牛での酸化ストレスを減弱することで内耳障害を予防できることが示された。

これらの結果から、NRF2 の活性化は騒音性難聴予防のための臨床的ターゲットになると考えられる。特に、*NRF2* の発現量が少ない *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型を有する人は、強大音に曝される前に予め NRF2 活性化剤で NRF2 の働きを強めておくことで騒音性難聴を予防できる可能性があると考えられる。

本研究では騒音性難聴に着目したが、同様に酸化ストレスによる内耳障害がその主な病態であるとされている加齢性難聴についても、NRF2 を活性化して内耳の酸化機能を高めることで難聴予防につながるのではないかと期待される。これからの超高齢社会においては、難聴の予防は高齢者が健康で社会とつながりを持ち続けるためにとても重要な要素である。本研究成果による NRF2 の内耳保護作用の解明は、活力ある高齢社会の実現への貢献が期待される。

VIII. 文献

- 1 Lipscomb DM, Roettger R L: Capillary constriction in cochlear and vestibular tissues during intense noise stimulation. *Laryngoscope* 1973;83:259-263
- 2 Thorne PR, Nuttall AL: Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res* 1987;27: 1-10
- 3 Le Prell CG, Yamashita D, Minami SB, Yamasoba T, Miller JM: Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention. *Hear Res* 2007;226:22-43
- 4 Quirk WS, Avinash G, Nuttall AL, Miller JM: The influence of loud sound on red blood cell velocity and blood vessel diameter in the cochlea. *Hear Res* 1992;63:102-107
- 5 Quirk WS, Seidman MD: Cochlear vascular changes in response to loud noise. *Am J Otol* 1995;16:322-325
- 6 Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C: Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol* 2011;3:186-200
- 7 Poulouse N, Raju R: Aging and injury: alterations in cellular energetics and organ function. *Aging Dis* 2014;5:101-108

- 8 Miller JM, Brown JN, Schacht J: 8-iso-prostaglandin F(2alpha), a product of noise exposure, reduces inner ear blood flow. *Audiol Neurootol* 2003;8:207-221
- 9 Ohinata Y, Miller JM, Altschuler RA, Schacht J: Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res* 2000;878:163-173
- 10 Yamane H, Nakai Y, Konishi K, Sakamoto H, Matsuda Y, Iguchi H: Strial circulation impairment due to acoustic trauma. *Acta Otolaryngol* 1991;111:85-93
- 11 Motohashi H, Yamamoto M: Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 2004;10:549-557
- 12 Uruno A, Motohashi H: The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide* 2011;25:153-160
- 13 Hoshino T, Tabuchi K, Nishimura B, Tanaka S, Nakayama M, Ishii T, Warabi E, Yanagawa T, Shimizu R, Yamamoto M, Hara A: Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;415:94-98
- 14 Matsunobu T, Matsunobu T, Satoh Y, Ogawa K, Shiotani A: Heme oxygenase-1 expression in the guinea pig cochlea by intense noise stimulation. *Acta*

Otolaryngol Suppl 2009;562:18-23

- 15 Yamasoba T, Harris C, Shoji F, Lee RJ, Nuttall AL, Miller JM: Influence of intense sound exposure on glutathione synthesis in the cochlea. *Brain Res* 1998;804:72-78
- 16 Satoh T, Okamoto SI, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, Tohyama K, Lipton SA: Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophillic] phase II inducers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:768-773
- 17 Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H: Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int* 2009;76:277-285
- 18 Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijevic D, Smith AC, Mitchell SJ, Dodd MS, Kirwan J, Byrne JJ, Ludwig C, Isackson H, Yavari A, Stottrup NB, Contractor H, Cahill TJ, Sahgal N, Ball DR, Birkler RI, Hargreaves I, Tennant DA, Land J, Lygate CA, Johannsen M, Kharbanda RK, Neubauer S, Redwood C, de Cabo R, Ahmet I, Talan M, Gunther UL, Robinson AJ, Viant MR, Pollard PJ, Tyler DJ, Watkins H: Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab* 2012;15:361-371
- 19 Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW: Enhanced expression of the

- transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 2002;22:2883-2892
- 20 Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, Yamamoto M: Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol* 2013;33:2402-2412
- 21 Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A, Ishii Y, Kure S, Koyama A, Sakamoto T, Sekizawa K, Motohashi H, Yamamoto M: Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:72-79
- 22 Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, Kleeberger SR: Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB journal : official publication of the FASEB J* 2007;21:2237-2246
- 23 Mehrparvar AH, Mirmohammadi SJ, Ghoreyshi A, Mollasadeghi A, Loukzadeh Z: High-frequency audiometry: a means for early diagnosis of noise-induced hearing loss. *Noise Health* 2011;13:402-406

- 24 Harada H, Ichikawa D, Imamura A: Course of hearing recovery according to frequency in patients with acute acoustic sensorineural hearing loss. *Int Tinnitus J* 2008;14:83-87
- 25 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y: An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:313-22
- 26 Maruyama A, Tsukamoto S, Nishikawa K, Yoshida A, Harada N, Motojima K, Ishii T, Nakane A, Yamamoto M, Itoh K: Nrf2 regulates the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific antioxidant response elements. *Arch Biochem Biophys* 2008;477:139-145
- 27 Soga T, Heiger DN: Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2000;72:1236-1241
- 28 Sugimoto M, Hirayama A, Robert M, Abe S, Soga T, Tomita M: Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction and isotopic pattern information in CE-TOFMS data. *Electrophoresis* 2010;31:2311-2318
- 29 Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito

- K, Kusanagi Y, Chiba T, Tadokoro S, Takada Y, Oikawa, Y, Inoue H, Suzuki K, Okada R, Nishiyama J, Domoto H, Watanabe S, Fujita M, Morimoto Y, Naito M, Nishio K, Hishida A, Wakai K, Asai Y, Niwa K, Kamakura K, Nonoyama S, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Hamajima N, Shinomiya N: Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med* 2009;1:5ra11
- 30 Yates MS, Kwak MK, Egner PA, Groopman JD, Bodreddigari S, Sutter TR, Baumgartner KJ, Roebuck BD, Liby KT, Yore MM, Honda T, Gribble GW, Sporn MB, Kensler TW: Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole. *Cancer Res* 2006;66:2488-2494
- 31 Hiramoto K, Satoh H, Suzuki T, Moriguchi T, Pi J, Shimosegawa T, Yamamoto M: Myeloid lineage-specific deletion of antioxidant system enhances tumor metastasis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014;7: 835-844
- 32 Shirasaki K, Taguchi K, Unno M, Motohashi H, Yamamoto M: NF-E2-related factor 2 promotes compensatory liver hypertrophy after portal vein branch

- ligation in mice. *Hepatology* 2014;59:2371–2382
- 33 Liberman MC, Beil DG: Hair cell condition and auditory nerve response in normal and noise-damaged cochleas. *Acta Otolaryngol* 1979;88: 161–176
- 34 Kujawa SG Liberman MC: Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci* 2006;26:2115–2123
- 35 Sakurai T, Kanayama M, Shibata T, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Uchida K: Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile. *Chem Res Toxicol* 2006;19:1196–1204
- 36 Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, de Cabo R, Csiszar A: Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H18–24
- 37 Demirel U, Yalniz M, Aygun C, Orhan C, Tuzcu M, Sahin K, Ozercan IH, Bahcecioglu IH: Allopurinol ameliorates thioacetamide-induced acute liver failure by regulating cellular redox-sensitive transcription factors in rats. *Inflammation* 2012;35:1549–1557
- 38 Chung JH, Kim YS, Noh K, Lee YM, Chang SW, Kim EC: Deferoxamine promotes osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells via the

- nuclear factor erythroid 2-related factor-mediated antioxidant signaling pathway. *J Periodontal Res* 2014;49:563-573
- 39 Fetoni AR, Paciello F, Rolesi R, Eramo SL, Mancuso C, Troiani D, Paludetti G: Rosmarinic acid up-regulates the noise-activated Nrf2/HO-1 pathway and protects against noise-induced injury in rat cochlea. *Free Radic Biol Med* 2015;85:269-281
- 40 Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Zhang LY, Kensler TW, Kleeberger SR: Linkage analysis of susceptibility to hyperoxia. Nrf2 is a candidate gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:42-51
- 41 Yoshida N, Kristiansen A, Liberman MC: Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *J Neurosci* 1999;19:10116-24.
- 42 Usami S, Hjelle OP, Ottersen OP: Differential cellular distribution of glutathione--an endogenous antioxidant--in the guinea pig inner ear. *Brain Res* 1996;743:337-340
- 43 Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K: Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res* 2013;303:30-38
- 44 Wallace DC: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev*

Genet 2005;39:359-407

45 Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA: Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. Cell 2010;143:802-812

IX. 図

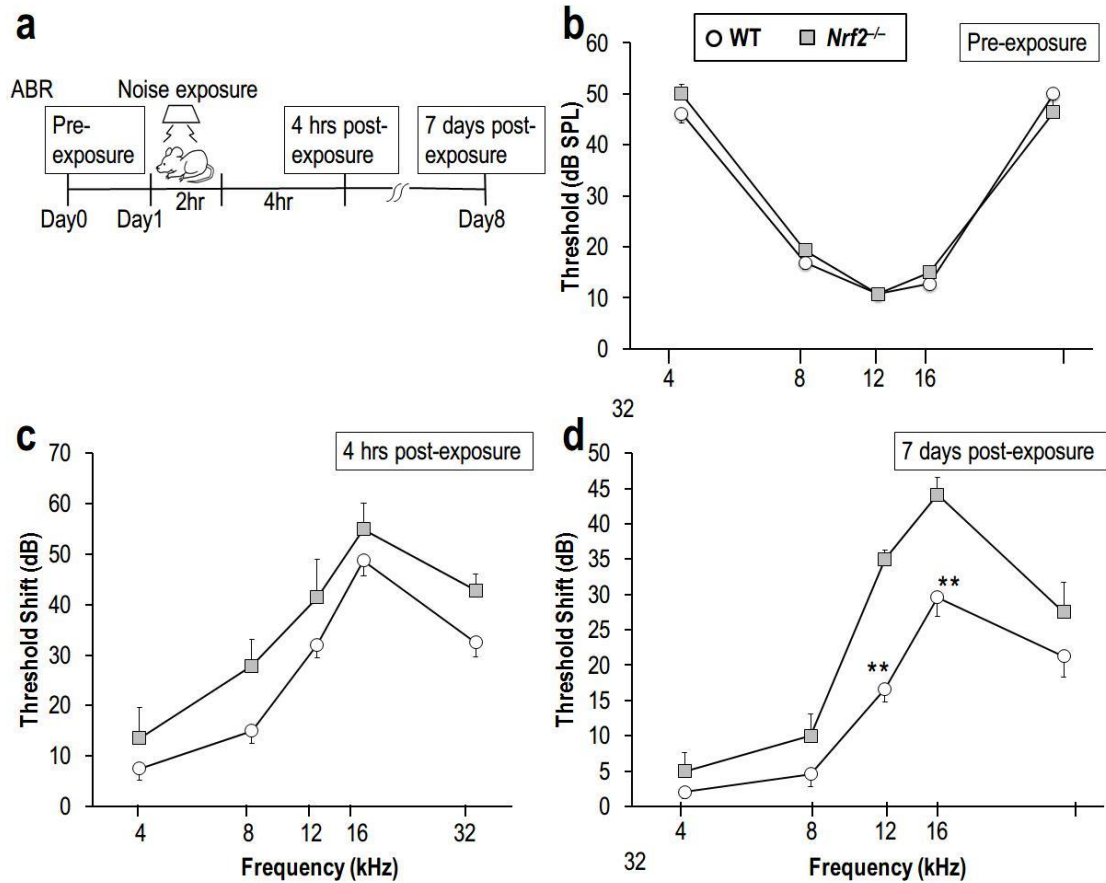


図1. NRF2 欠損では、強大音曝露による聴力障害の程度が大きい。

図1aは、強大音曝露および聴性脳幹反応 (ABR: auditory brain stem response) 測定のプロトコールである。強大音曝露の前日に ABR を測定 (Pre-exposure) し、強大音を2時間曝露した後、4時間後 (4hrs post-exposure) と7日後 (7days post-exposure) に ABR を測定した。

図1bは、強大音曝露前の ABR 結果であり、グラフの縦軸は反応閾値を表す。

図1cは 強大音曝露4時間後の ABR 結果であり、図1dは強大音曝露7日後の ABR 結果である。グラフの縦軸は強大音曝露前と比較した反応閾値の変化量を表す。

データはマウス各群8匹の平均値±S. E. M. で表記した。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス、** : P < 0.01

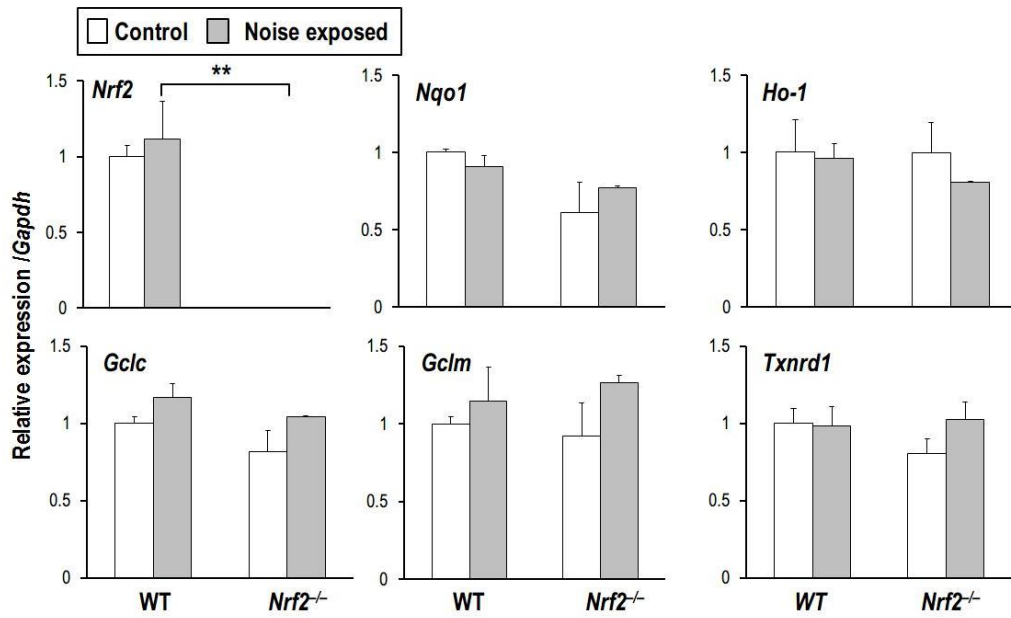


図 2. 強大音曝露刺激だけでは、蝸牛における NRF2 標的遺伝子群の発現上昇は認められない。

強大音曝露の 4 時間後のマウス蝸牛組織から total RNA を抽出し RT-PCR により *Nrf2* と NRF2 の標的遺伝子群 (*Nqo1*, *Ho-1*, *Gclc*, *Gclm*, *Txnrd1*) の発現量について検討した。

データは 3 回の実験の平均値 ± S. D. で表記した。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス、** : P < 0.01

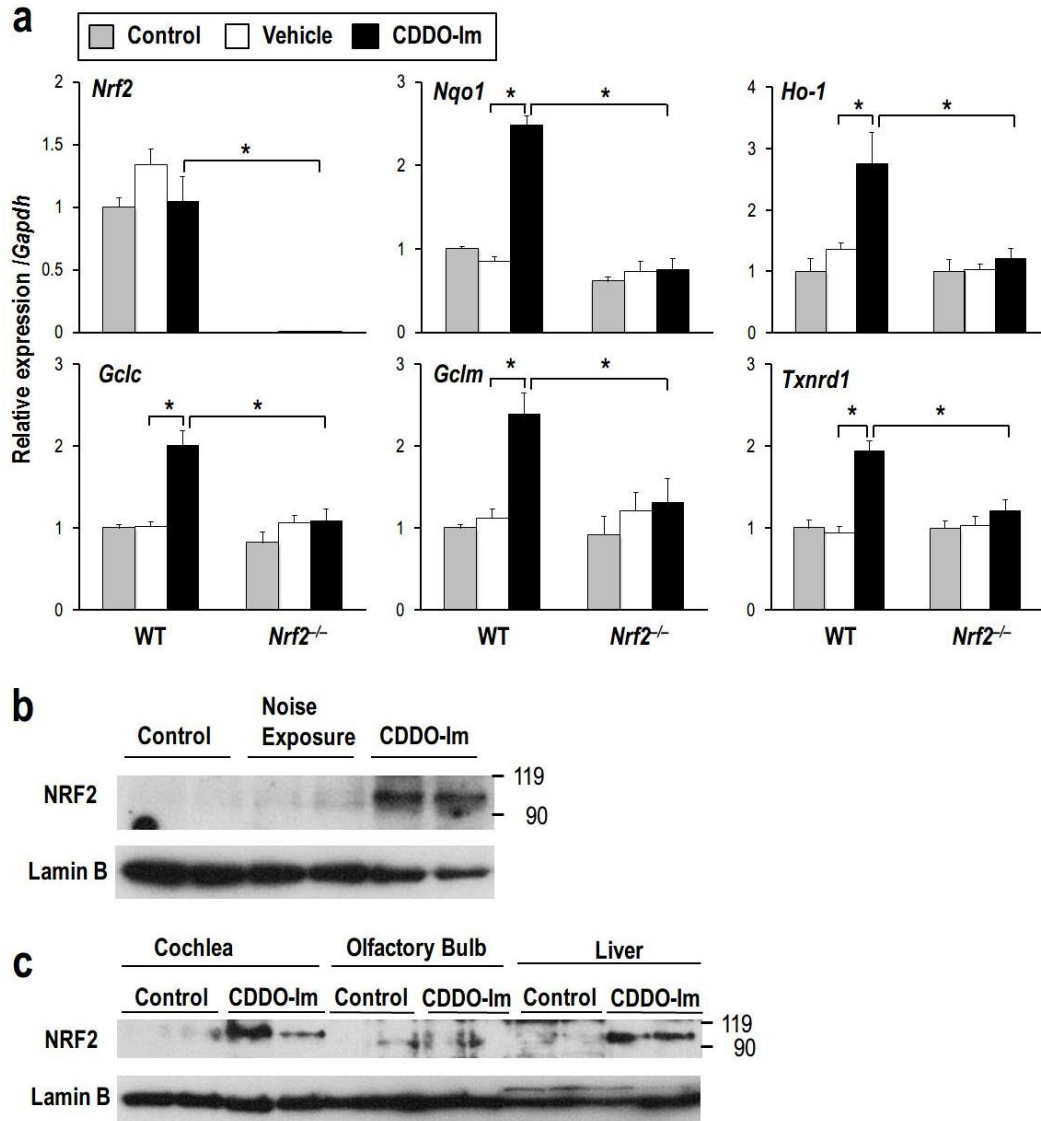


図 3. NRF2 活性剤 (CDDO-Im) 投与により、蝸牛での NRF2 標的遺伝子群の発現が上昇し、NRF2 タンパク量も増加する。

図 3a は、CDDO-Im もしくは偽薬を腹腔内投与した 6 時間後のマウス蝸牛組織から total RNA を抽出し RT-PCR により *Nrf2* および NRF2 の標的遺伝子群 (*Nqo1*, *Ho-1*, *Gclc*, *Gclm*, *Txnrd1*) の発現量について解析した結果である。

データは 3 回の実験の平均値 ± S. D. で表記した。* : $P < 0.05$

図 3b は、マウス蝸牛組織からタンパク質を抽出し、イムノブロットで NRF2 タンパク量を検討した結果である。Noise Exposure 群は強大音曝露の 4 時間後に蝸牛を摘出し、CDDO-Im 群は腹腔内投与の 6 時間後に蝸牛を摘出して解析に用いた。

図 3c は、マウスの蝸牛、嗅球、肝臓からタンパク質を抽出し、イムノブロットで NRF2 タンパク量を検討した結果である。CDDO-Im 群は腹腔内投与の 6 時間後に各

臓器を摘出して解析に用いた。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス

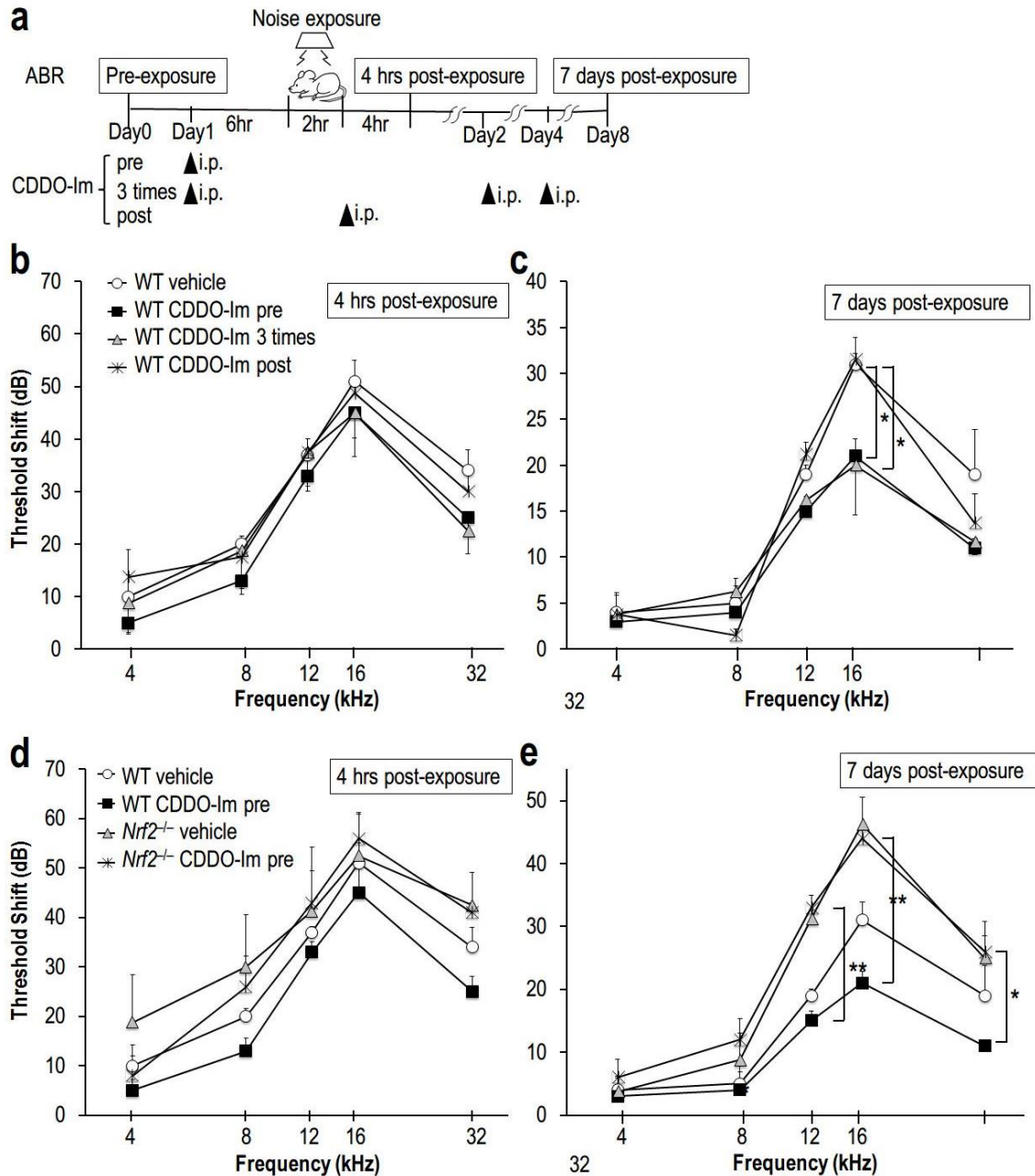


図4. CDDO-Imを強大音曝露前に投与することで、Nrf2 依存的な聴力低下の軽減効果が認められる。

図4aは、強大音曝露、ABR測定、およびCDDO-Im投与のプロトコールである。CDDO-Imの投与法は強大音曝露の6時間前に一度だけ投与する“pre”と、強大音曝露の6時間前と曝露1日後と3日後の合計3回投与する“3 times”と、強大音曝露の直後に一度だけ投与する“post”の3つの方法を用いた。

図4bと図4cは、野生型マウスにおけるCDDO-Imの各投与方法の効果を検討した

結果である。図 4b は強大音曝露 4 時間後の ABR 結果であり、図 4c は強大音曝露 7 日後の ABR 結果である。

図 4d と図 4e は、野生型および *Nrf2* 遺伝子欠損マウスにおける CDDO-Im 投与の効果を検討した結果である。CDDO-Im の投与方法は、図 4c で効果を認めた” pre” を用いた。図 4d は強大音曝露 4 時間後の ABR 結果であり、図 4e は、強大音曝露 7 日後の ABR 結果である。

データは各群マウス 5-6 匹の平均値±S. E. M. で表記した。グラフの縦軸は強大音曝露前と比較した反応閾値の変化量を表す。図 4b と 4d、図 4c と 4e の野生型マウスのデータは同じものであり、比較のために記載した。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス、*: P< 0.05, **: P< 0.01

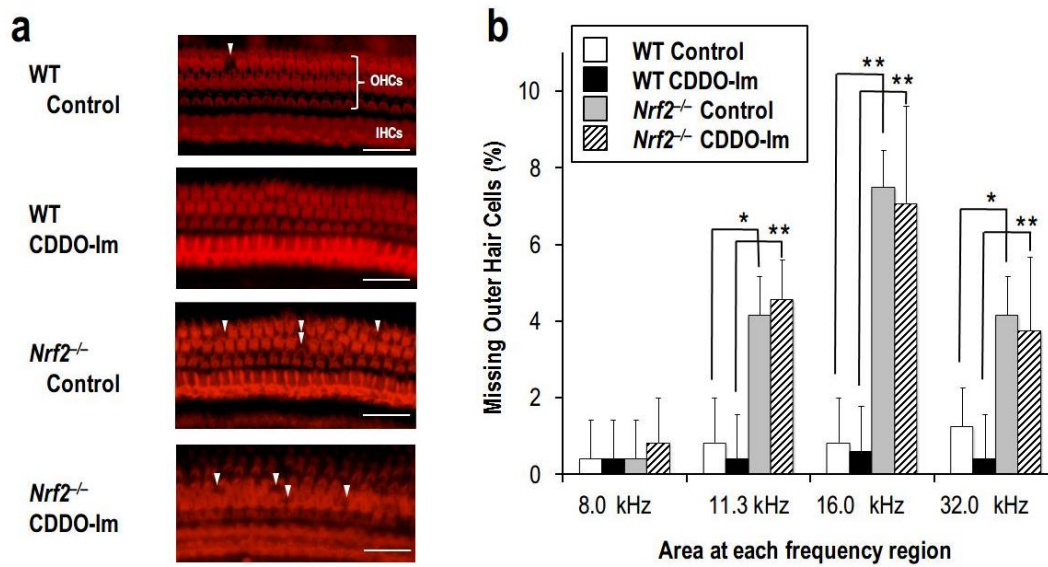


図 5. NRF2 欠損では、強大音曝露による内耳有毛細胞の損傷が大きい。

図 5a は、強大音曝露の 7 日後の蝸牛より採取したコルチ器の surface preparation 画像である。矢頭は損傷した有毛細胞を示す。

OHCs: 外有毛細胞、IHCs: 内有毛細胞、スケールバー: 40 μ m。

図 5b は、各周波数 (8.0, 11.3, 16.0, 32.0 kHz) 対応部位ごとの外有毛細胞の損傷数を定量評価した結果である。データは各群マウス 5-6 匹の平均値 \pm S. E. M. で表記した。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス、*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

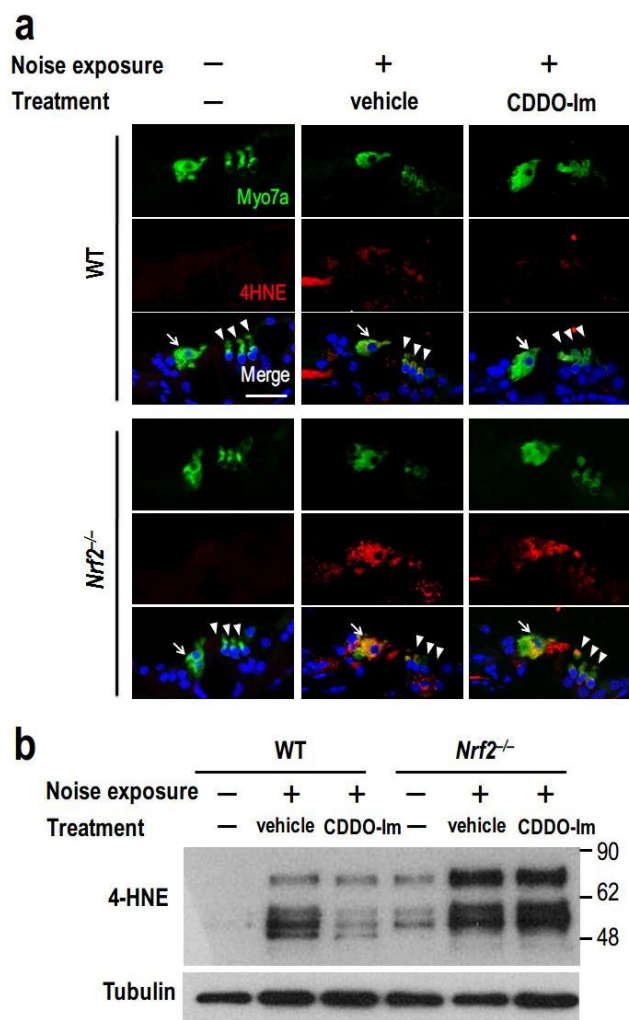


図6. NRF2 活性化により、蝸牛の酸化ストレスが軽減する。

CDDO-Im もしくは偽薬を投与した 6 時間後に強大音を 2 時間曝露し、強大音曝露の 4 時間後に摘出した蝸牛サンプルを用いて、酸化ストレスマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE) について検討した。

図 6a は、コルチ器の免疫染色組織所見である。緑色蛍光は有毛細胞マーカーであるミオシン 7a (Myo7a) であり、赤色蛍光は 4HNE であり、青色蛍光は DAPI での核染色である。矢印は内有毛細胞、矢頭は外有毛細胞、スケールバーは 40 μ m を表す。

図 6b は、蝸牛から抽出したタンパクを用いて 4HNE をイムノブロットにて検討した結果である。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス

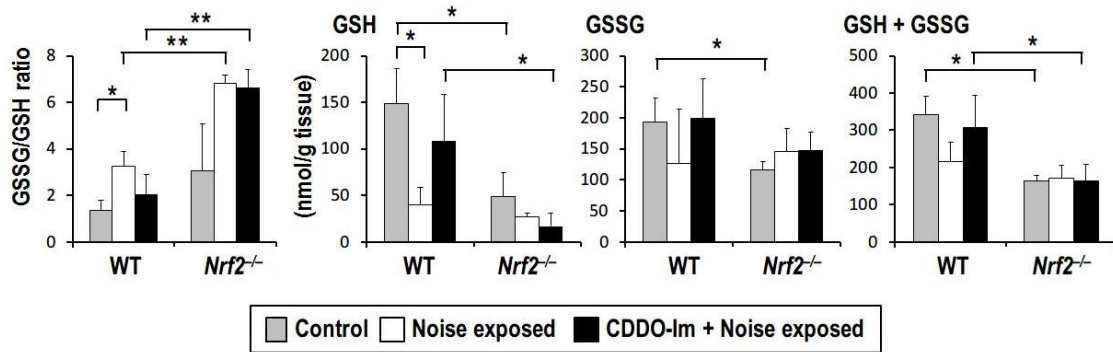


図7. NRF2 欠損では酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン比が増加し、グルタチオン総量が減少する。

CDDO-Im もしくは偽薬を強大音曝露の6時間前に投与し、2時間の強大音曝露が終了した4時間後の蝸牛に含まれるグルタチオン量を定量解析した。データは3回の実験の平均値±S. D. で表記した。

WT: 野生型マウス、*Nrf2*^{-/-}: *Nrf2* 遺伝子欠損マウス、
 GSH: 還元型グルタチオン、GSSG: 酸化型グルタチオン、
 *: P < 0.05, **: P < 0.01

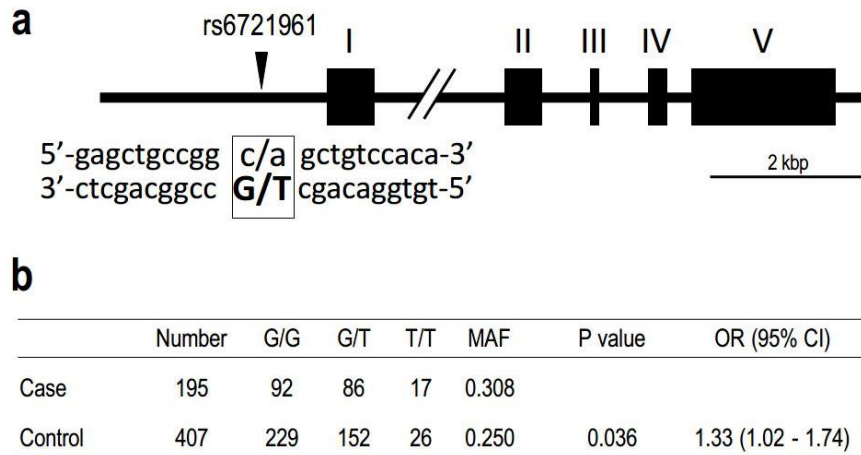


図 8. ヒトの *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型と騒音性難聴の頻度には有意な相関がある。

図 8a は、ヒトの *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型 (rs6721961) を表す。

図 8b は、陸上自衛隊員 602 人を標準純音聴力検査での 4kHz の聴力閾値を指標にして騒音性難聴群 (Case) と正常聴力群 (Control) に分け、それぞれの群での *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型 (G もしくは T allele) の頻度を解析した。P value は相関解析により算出した。

MAF: minor allele frequency、OR: odds ratio、CI: confidence interval

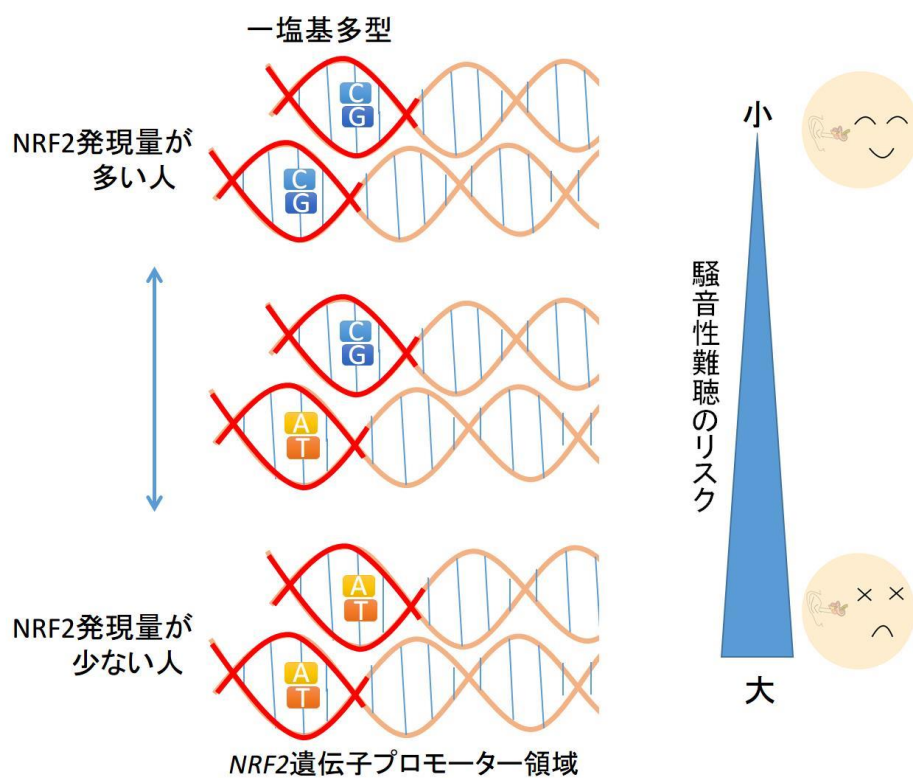


図9. ヒトの *NRF2* プロモーター領域の一塩基多型と騒音性難聴リスクの相関。

NRF2 の発現量が少ないことが知られている *NRF2* 遺伝子プロモーター領域の minor allele (T allele) を持つヒトは、騒音性難聴のリスクが増加する。

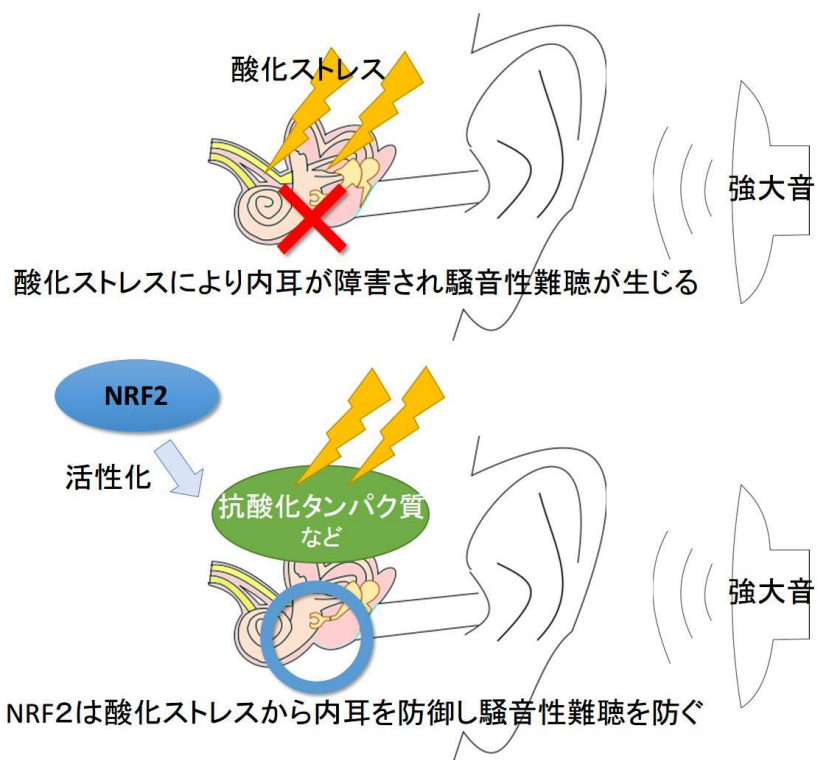


図 1 0. 騒音性難聴の予防における NRF2 の蝸牛での機能。

NRF2 の活性化は、蝸牛での酸化ストレスを軽減する。強大音に曝される前に予め NRF2 活性化剤で NRF2 の働きを強めておくことで騒音性難聴を予防できる可能性があると考えられる。

X. 表

表 1. RT-PCR に使用したプライマーとプローブ

Gene	Forward primer	Reverse primer	Probe
<i>Gapdh</i>	5' -GAGATGATGACCCT TTTGGC-3'	5' -GTCGTGGAGTCTACT GGTGTCTT-3'	-
<i>Nrf2</i>	5' -CAAGACTTGGGCCA CTTAAAAGAC-3'	5' -AGTAAGGCTTTCCAT CCTCATCAC-3'	5' -FAM-AGGCGGCTCA GCACCTTGTATCTTGA-T AMRA-3'
<i>Nqo1</i>	5' -AGCTGGAAGCTGCA GACCTG-3'	5' -CCTTTCAGAATGGCT GGCA-3'	5' -FAM-ATTTTCAGTTC CCATTGCAGTGGTTTGGG -TAMRA-3'
<i>Ho-1</i>	5' -GTGATGGAGCGTCC ACAGC-3'	5' -TTGGTGGCCTCCTTC AAGG-3'	5' -FAM-CGACAGCATG CCCCAGGATTTGTC-TAM RA-3'
<i>Gclc</i>	5' -ATCTGCAAAGGCGG CAAC-3'	5' -ACTCCTCTGCAGCTG GCTC-3'	5' -FAM-ACGGGTGCAG CAAGGCCCA-TAMRA-3 ,
<i>Gclm</i>	5' -TGGAGCAGCTGTAT CAGTGG-3'	5' -AAATCTGGTGGCATC ACACA-3'	-
<i>Txnrd1</i>	5' -AGAAAGTGCTGGTC TTGGATTTTG-3'	5' -ACACGTTCTCCGAG ACCC-3'	5' -FAM-TCTGGTCCCA AGAGGAGTCGGTGTG-TA MRA-3'

XI. 謝辞

本研究にあたり、熱意あるご指導をいただきました東北大学加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野の本橋ほづみ教授に深く感謝申し上げます。実験をご指導頂くとともに有意義なアドバイスをいただきました村上昌平さん、グルタチオンの解析にご尽力いただきました太田奈緒さんをはじめ多くのご支援をいただきました遺伝子発現制御分野の皆様に御礼を申し上げます。また、ヒトの騒音性難聴と一塩基多型のデータ解析に関して、防衛医科大学校 耳鼻咽喉科学および分子生体制御学講座の諸先生方に多大なご協力をいただき感謝しております。貴重な研究の機会を与えて頂きご支援いただきました香取幸夫教授、川瀬哲明教授はじめ内耳研究についてご指導いただきました東北大学耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野の先生方に深く感謝申し上げます。そして、生活を支えてくれた家族、亜季と暖香に心より感謝致します。