

平成 10 年度厚生科学研究費補助金

(厚生科学特別研究事業)

研究課題名：ミトコンドリアからみた薬剤性感音難聴の発症機構、予防の研究

(H10-特別-028)

東北大学医学部附属病院耳鼻咽喉科

大 島 猛 史

研究報告書

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
（総括・分担）研究報告書

ミトコンドリアからみた薬剤性感音難聴の発症機構、予防に関する研究

（主任又は分担）研究者 大島 猛史 東北大学医学部附属病院耳鼻咽喉科 助手

研究要旨

シスプラチンは広く使われている非常に有用な抗ガン剤であるが、その聴器毒性の克服が重要な課題となっている。この発症機序を説くカギは薬剤投与による活性酵素の発生とそれによるミトコンドリア障害、内耳アポトーシスにあると考えた。シスプラチン投与により蝸牛に広範にアポトーシスが起きることが明らかとなった。ミトコンドリア遺伝子は核遺伝子より遥かに障害を受けやすいが、薬剤投与によるミトコンドリア遺伝子障害は確認されなかった。本研究から、シスプラチンをはじめとする薬剤性難聴は蝸牛組織のアポトーシスを伴う機能低下による事が示されたが、今後は、耳毒性薬剤によりアポトーシスを誘導する機序を解明していかなければならない。

分担研究者 菊地 俊彦

東北大学医学部附属病院耳鼻咽喉科
助手

A. 研究目的

シスプラチンは抗ガン剤として広く使用されているが、その副作用として感音難聴が治療後のQOLに大きな影響を及ぼしている。薬剤性難聴の副作用の機序は不明であるが、その解明、治療、予防はトピックスであり、国内外で精力的に研究されている。今回の研究は、薬剤投与によるミトコンドリア機能異常に着目し、難聴へと至る過程を解明する事を目的とする。

B. 研究方法

シスプラチンを投与した動物および正常対照動物（ラット、スナネズミ）で聴性脳幹反応、歪成分耳音響放射を用いて聴力の低下を確認した後、以下の点について検討した。

(1) シスプラチンによる蝸牛ミトコンドリア遺伝子障害の有無

シスプラチン 4 mg/kg/day を 5 日間投与後の翌日、蝸牛、骨格筋、血液を採取し DNA を抽出した。加齢、ある種の遺伝性難聴に伴って出現する約 5kbp の欠失変異を PCR 法で検出を試みた。検出できた場合、競合的 PCR で定量することとした。

(2) 蝸牛組織でのアポトーシス関連蛋白の発現の変化と DNA 断片化

動物（シスプラチン 4mg/kg/day を 5 日間投与）を 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、内耳を脱灰しパラフィン切片を作製した。抗 Bcl-2, Bax 抗体で染色し、ラセン神経節、コルチ器、血管条の染色性を正常動物と比較検討した。アポトーシスの一つの指標となる DNA 断片化は TUNEL 法で行い、陽性細胞数を計測した。

次に難聴患者末梢血からのミトコンドリア遺伝子変異（難聴と関連がある A1555G, A3243G 変異）の有無を検討した。薬剤性難聴を含む難聴患者、聾啞者を対象とした。PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素で消化し、その切断の有無で変異の有無をスクリーニングした。

シスプラチン以外の薬剤（アミノグリコシド、利尿剤）の内耳に対する影響を組織学的に検討した。

C. 研究結果

D. 考察

シスプラチンを投与されたスナネズミの蝸牛でまず TUNEL 法による DNA 断片化を検討した。TUNEL 陽性細胞は外有毛細胞、内有毛細胞、およびその周辺の支持細胞にみられたほか、血管条、ラセン神経節にも認められた。同時に抗 Bcl-2, Bax 抗体で染色性を正常対照動物と比較したところ、シスプラチンを投与された動物では、Bcl-2 の発現量が

減少し、Bax の発現量が増加することがわかった。

シスプラチン投与により蝸牛では外有毛細胞だけでなく広汎にアポトーシスが引き起こされ、これが難聴の原因となっていることが推察された。アポトーシスとミトコンドリアは密接な関係があることが知られているが、これがミトコンドリアの遺伝子レベルで関係しているのかどうかを約 5kbp の欠失変異の出現をみることにより検討した。シスプラチン 4mg/kg/day を 5 日間投与後の翌日では、蝸牛、骨格筋、血液いずれからも欠失変異は検出できなかった。このことから、少なくともシスプラチンの短期間の曝露ではそれにより難聴をきたしたとしても、ミトコンドリア遺伝子に明らかな障害を与えないと考えられる。

東北大学附属病院耳鼻咽喉科外来の両側性感音難聴患者 100 例の中から 3 例に A3243G が見いだされた。聾啞者 46 例の中から A1555G が 5 例に見つかった。この中でも 2 例はその病歴からアミノグリコシド投与による難聴と考えられ、ミトコンドリア遺伝子と薬剤性難聴との関連を示す所見であった。

シスプラチン投与により主に外有毛細胞が脱落することは多くの研究から明らかな事実である。しかし、シスプラチン投与により蝸牛が広汎にアポトーシスをきたすことから、シスプラチンが外有毛細胞に直接的に働くのではなく蝸牛内の他の部位の障害により 2 次的にコルチ器の障害が起きる可能性も十分に考慮する必要があると考えられる。

E. 結論

シスプラチンをはじめとする薬剤性難聴は蝸牛組織のアポトーシスを伴う機能低下によることが明らかとなった。今後は、耳毒性薬剤によりアポトーシスを誘導する機序を解明していかなければならない。そのとき、ミトコンドリアの機能異常が非常に大きく関わってくるのではないかと考えている。この研究が薬剤性難聴の治療、予防に繋がっていくと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Hearing loss with a mitochondrial gene mutation is highly prevalent in Japan.

Oshima,T., Ueda,N., Ikeda,K., Abe,K. and Takasaka,T.

Laryngoscope 109:334-338, 1999.

(2)Expression and localization of the Na⁺-H⁺ exchanger in the guinea pig cochlea.

Goto,S., Oshima,T., Ikeda,K. and Takasaka,T.

Hearing Res. 128:89-96, 1999.

(3)Acute effects of combined administration of kanamycin and furosemide on the stria vascularis studied by distortion product otoacoustic emission and transmission electron microscopy.

Alam,S.A., Ikeda,K., Kawase,T., Kikuchi,T., Katori,Y., Watanabe,K. and Takasaka,T.

Tohoku J.Exp.Med. 186:79-86, 1999.

(4)Sensorineural hearing loss associated with byler disease.

Oshima,T.,Ikeda,K.,and Takasaka,T.

Tohoku J.Exp.Med. 186:73-83, 1999.

2. 学会発表

(1) Mutations in mitochondrial and connexin 26 gene in Japanese patients with hearing loss.

T. Kudo, T. Oshima, K. Ikeda, T. Takasaka
Abstract #41, Association for Research in Otolaryngology, 2/14/1999, FL USA

(2) Sensorineural hearing loss with a mitochondrial gene point mutation is highly prevalent in Japan.

T. Oshima, K. Ikeda, N. Ueda, T. Takasaka
Abstract #43, Association for Research in Otolaryngology, 2/14/1999, FL USA

(3) Endonuclease cleavage of DNA induced by cisplatin in the Mongolian gerbil cochlea.

S. Alam, K. Ikeda, T. Kikuchi, T. Kawase, N. Funaki, T. Takasaka

Abstract #627, Association for Research in Otolaryngology, 2/16/1999, FL USA

(4) Localization of Na, K-ATPase activity and a gap junction protein, connexin 26, in developing mouse cochleas. A.P. Xia, T.Kikuchi, Hozawa,K., Katori,Y., Takasaka,T

G. 知的所有権の取得状況

特になし