

16	Takahashi M, Ishida K, Iida M, Yamashita H, Sugawara K	Analysis of lifestyle and behavioral characteristics in Meniere's patients and a control population.	Acta Otolaryngol	21	254-256	2001
17	高橋正紘	めまいの診断—診断の変遷、診断基準の見直し—.	医薬ジャーナル	37	115-119	2001
18	高橋正紘	メニエール病の謎	耳鼻臨床	95	210-211	2002
19	Takumida M, Anniko M	Nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells following gentamicin exposure in vitro.	Acta Otolaryngol	121	346-350	2001
20	Takumida M, Anniko M, Popa R, Zhang DM	Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide.	Acta Otolaryngol	121	16-20	2001
21	Takumida M, Anniko M	Direct evidence of nitric oxide production in the guinea pig organ of Corti.	Acta Otolaryngol	121	342-345	2001
22	Takumida M, Anniko M	Detection of nitric oxide in guinea pig inner ear, using a combination of aldehyde fixative and DAF-2DA.	Acta Otolaryngol	121	460-464	2001
23	Sheykholeslami K, Murofushi T, Kaga K	The effect of sternocleidomastoid electrode location on VEMP.	Auris Nasus Larynx	28	41-43	2001
24	Ito K, Ishimoto S, Murofushi T	Narrow internal auditory meatus: an idiopathic case confirming the origin and pathway of the vestibular evoked myogenic potentials in humans.	Arch Otolaryngol Head Neck Surg	127	275-278	2001
25	Murofushi T, Matsuzaki M, Takegoshi H	Glycerol affects vestibular evoked myogenic potentials in Meniere's disease.	Auris Nasus Larynx	28	205-208	2001
26	Murofushi T, Shimizu K, Takegoshi H, Cheng PW	Diagnostic value of prolonged latencies in the vestibular evoked myogenic potentials.	Arch Otolaryngol Head Neck Surg	127	1069-1072	2001
27	Cheng PW, Murofushi T	The effect of rise/fall time on vestibular evoked myogenic potential by short tone burst.	Acta Otolaryngol	121	696-699	2001
28	Monobe H, Sugasawa K, Murofushi T	The outcome of the canalith repositioning procedure for benign paroxysmal positional vertigo. Are there any features of treatment failure cases?	Acta Otolaryngol Suppl	545	38-40	2001
29	Ushio M, Matsuzaki M, Takegoshi H, Murofushi T	Click- and short tone burst-evoked myogenic potentials in cerebellopontine angle tumors.	Acta Otolaryngol Suppl	545	133-135	2001
30	Matsuzaki M, Murofushi T	Vestibular evoked myogenic potentials in patients with idiopathic bilateral vestibulopathy.	ORL	63	349-352	2001
31	Mizukoshi K, Shojaku H, Aso S, Asai M, Watanabe Y	Meniere's Disease and Delayed Endolymphatic Hydrops in Children.	Acta Otolaryngol	Suppl 545	65-68	2001

32	Shojaku H, Takemori S, Kobayashi K, Watanabe Y	Clinical Usefulness of Glycerol Vestibular-evoked Myogenic Potentials:Preliminary Report.	Acta Otolaryngol	Suppl 545	6-9	2001
33	Fukusihima M, Kitahara T, Takeda N, Saika T, Uno A, Kubo T	Role of cholinergic mossy fibers in medial vestibular and prepositus hypoglossal nuclei	Neurosci	102	159-166	2001
34	Kitahara T, Takeda N, Mishiroy Y, Saika T, Fukushima M, Okumura S-I, Kubo T	Effects of exposing the opened endolymphatic sac to large doses of steroids to treat intractable Meniere's disease.	Ann Otol Rhinol Laryngol	110	109-112	2001
35	武田憲昭、北原紘	前庭代償のメカニズム	JOHNS	17	831-834	2001
36	北原紘、武田憲昭、西池季隆、宇野敦彦、福嶋宗久、奥村新一、久保武	前庭神経炎に対するステロイド治療の効果に関する検討	日耳鼻	104	1059-1064	2001
37	北原紘	めまいの外科治療	脳21	4	59-66	2001
38	北原紘、武田憲昭、近藤千雅、森鼻哲生、奥村新一、三代康雄、福嶋宗久、久保武	メニエール病に対する内リンパ嚢高濃度ステロイド挿入術による長期治療成績	日耳鼻	104	728-734	2001
39	Suzuki M, Ichimura A, Ueda K, Suzuki N	Clinical effect of canal plugging on paroxysmal positional vertigo with lateral canal lesion.	J Laryngol Otol	14	959-962	2000
40	鈴木 衛	病態からみた神経疾患の治療	医学と薬学	44	673-678	2000
41	鈴木 衛、渡嘉敷亮二、平松宏之、清水朝子、清水重敬、稲垣太郎	後半規管遮断術を行った頭位性眩暈の一例.	Equilibrium Res	60	24-28	2000
42	鈴木 衛	耳鼻咽喉科からみためまい.	東京都医師会雑誌	54	59-63	2001
43	鈴木 衛	めまいの外科的治療—半規管遮断術を中心に—	日耳鼻専門医通信	69	16-17	2001
44	Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A	Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin.	Hearing Res	140	1-6	2000
45	竹田泰三	メニエール病の成因と病態生理	Equilibrium Res	60	146-158	2001
46	Tomiyama S	Th1; Mediator lymphocytes of experimental autoimmune labyrinthitis.	Acta Otolaryngol	121	673-8	2001

書籍 (平成13年度)

番号	著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1	久保武	メニエール病の外科的治療	武田憲昭	耳鼻咽喉科診療プラクティス	文光堂	東京	2001	140-143
2	Takahashi M.	Vestibular function and the autonomic nervous system - versatile nature of motion sickness.	Appenzeller O	Autonomic Nervous System	Elsevier	Amsterdam	1999	351-362
3	高橋正紘 ほか	メニエール病の生活指導.	武田憲昭	耳鼻咽喉科診療プラクティス	文光堂	東京	2001	134-138
4	Anniko M, Takumida M	Functional morphology of the normal peripheral vestibular system.	Jahn AF, Santos-Sacchi J	Physiology of the Ear	SINGULAR THOMSON LEARNING	Canada	2001	481-514
5	工田昌矢	前庭	星野知之	CLIENT 21 内耳・内耳道	中山書店	東京	2001	30-40
6	鈴木衛	めまい・平衡障害	山口徹, 北原光夫	今日の治療指針	医学書院	東京	2002	950
7	Hozawa K, Hua JZ	Is cholesteatoma a cytokine disease? In vitro model of cholesteatoma.	Takasaka T, Yuasa R, Hozawa K	Recent advances in otitis media	Monduzzi Editore	Spain	2001	453-457
8	Ishida M, Hozawa K, Takasaka T, Sanada T, Yamada A, Kochi S	Risk factors of otitis media in cleft palate patients	Takasaka T, Yuasa R, Hozawa K	Recent advances in otitis media	Monduzzi Editore	Spain	2001	125-129
9	Suetake M, Hozawa K	Prevalence of antimicrobial resistance in otitis media.	Takasaka T, Yuasa R, Hozawa K	Recent advances in otitis media	Monduzzi Editore	Spain	2001	165-169
10	Takehata S, Hozawa K	Endoscopy of retraction pockets.	Takasaka T, Yuasa R, Hozawa K	Recent advances in otitis media	Monduzzi Editore	Spain	2001	475-479

研 究 報 告

1. 内耳プロテオーム解析—今後の展望—

八木聰明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑、齋藤明彦、ルビーパワンカール、
大久保公裕（日本医科大学耳鼻科）、大森彬（三菱化学生命科学研究所）、
渡辺淳（日本医科大学第2生化）

[Abstract]

Proteomic analysis of the COCH gene expression in the inner ear

Toshiaki Yagi(1) Tetsuo Ikezono(1) Susumu Shindo(1) Ruby Pawankar(1)

Akira Omori (2) Atsushi Watanabe (3)

(1) Dept. of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

(2) Mitsubishi kasei Institute of Life Sciences, Tokyo

(3) Dept. of Molecular Biology, Nippon Medical School, Tokyo

[Purpose] The novel term "proteome" is a compound of "protein" and "genome," which means constitutive whole proteins including post-translationally modified products in a cell type. Proteomics is a novel strategy for analyzing proteomes. In proteomics, high resolution two-dimensional electrophoresis is exclusively performed for isolation of proteins followed by amino acid sequencing for identification of proteins and determination of modifications. Thus, proteomics is becoming appreciated as a powerful tool to find out proteins important for the physiological or pathophysiological conditions. In order to better understand the physiology of the inner ear, we have performed a proteomic analysis of the inner ear proteins using 2D-GE.

[Method] Bovine inner ear tissue from cochlea, otolith organ and semicircular canals were dissected out separately and subjected to 2-D gel electrophoresis. The first dimension electrophoresis was done using an electrofocusing apparatus, Multiphor II, and Immobiline Dry Strips. Strips were casted onto slab gels and the second-dimension separation was performed. The gel was stained with silver.

[Results] We have identified some specific protein spots to each distinct regions of the inner ear. We also discussed the important experimental conditions.

[conclusion] Proteomic analysis is a useful tool for the study of the relationship of inner ear functions and protein expressions.

[はじめに]

アメリカのNIHと、ゲノムサイエンス社による熾烈な争いの結果、予定よりも早く、先ごろヒトゲノム解析の全貌が公表された。この結果、ヒト遺伝子の数は以前予想されていた10万個ではなく、それよりかなり少ない3.5万個程度であることが明らかになった。この遺伝子の数はヒトという生物の機能の多様性を説明するには少なすぎると考えられている。このギャップは遺伝子が転写、翻訳される際の多様性にあることが推測されており、これを解明する手段として注目されているのがプロテオーム解析である。

proteomeとはgenomeに対して作られた造語でありその臓器、組織に含まれる蛋白全体、蛋白のセットを意味する言葉である。この概念は1996年にオーストラリアのWilkinsによって提唱された(1)。

ポストゲノム世代に突入した現在、各分野で新たな研究課題、手法が模索されている。中でも、2次元電気泳動法を用いたプロテオームプロジェクトは大きな注目を集めており、既にいくつかの分野で重要な知見が得られている。

DNA、蛋白データベースが非常に発達している現在、このデータベースを有効活用すれば蛋白の部分配列を解析することにより、迅速に蛋白を同定しその生理的意義、病理学的動態を検討することが出来る(2)。

一般に蛋白はDNAと比較すると取扱いが煩雑で難しいとされている。しかし、あえて蛋白の解析を行うのはなぜであろうか。その理由として、疾患を発症させるのはほとんどの場合、蛋白レベルでの問題であることが先ず挙げられる。つまり、遺伝子レベルでの突然変異が、病的蛋白を作り酵素活性の欠如、病的蛋白の異常産生、機能喪失をもたらす。このため、将来的に治療を目的とする研究を行う場合、蛋白レベルでの研究が不可欠となる^{1)・2)}。

内耳研究の分野ではThalmanらがパイオニアであり、すでに1990年に2次元電気泳動法を用いて内耳組織蛋白の解析を行い、organ of corti protein 1、2等の蛋白を同定した。しかし、当時は蛋白同定に関わるデータベースは現在のように充実しておらず、その後の大きな発展は見られなかった(3)。その後、電気泳動関連の技術的な進歩により現在では再現性の高い、正確な泳動結果が安定して得られるようになりつつある。

今後、内耳のプロテオーム解析を慎重に進めていく上で重要となる実験条件に関する検討、さらに今後の展望を行う意味で内耳部位別2次元電気泳動解析を行った。

[対象と方法]

1. すでに論文ならびにデータベース上 (<http://oto.wustl.edu/thc/innerear2d.htm>) に公開されているThalmanらによる内耳の2次元電気泳動電気泳動結果と我々の結果を比較し検討した。
2. 内耳部位別の蛋白発現を比較するために牛内耳側頭骨をから内耳膜迷路を取り出す際に下記の手順で行った。顕微鏡下に牛側頭骨を内耳道側から削開し、まず蝸牛膜迷路を取り出した。次に前庭に入り耳石器を確認し摘出、最後に半規管を採取した。この組織を20倍体積のホモジェネート液(7 M urea, 2 M thiourea, 2% Triton X100, 1% Pharmalyte, 100mM dithiothreitol (DTT) and antiproteases mixture (Complete mini EDTA(-), Boehringer Mannheim) でホモジェネートし、蛋白を抽出する。2次元電気泳動には固定化pH勾配ゲルストリップ (Immobiline pH3-10, Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。1次元目に尿素変性条件下で等電点泳動をMultiphorII (Amersham Pharmacia Biotech)で行い、2次元目にSDS変性下で平板ゲル(3% stacking and 12% separating polyacrylamide gel) 電気泳動を行った。電気泳動ゲルを銀染色し、蛋白発現スポットを比較した。

[結果]

1. Ikezonoらの報告¹⁾ではCOCH蛋白が非常に明瞭に見えるが、OCP 2は不明瞭である。Thalmanらの報告²⁾ではこの逆で、OCP 2が非常に明瞭に見えるが、COCH蛋白は不明瞭である。(両者の電気泳動結果では、酸性アルカリ性の表示が逆になっていることに注意)
2. COCH蛋白の発現は内耳どこの部位でもほぼ同じであった。また、蛋白発現パターンを比較すると、各部位に特異的と思われるスポットがいくつか認められた。

[考案・結論]

1. 我々の報告とThalmanらの報告での蛋白発現の差異にはいくつかの原因が考えられる。まず我々は牛の内耳組織全体を用いているがThalmanらはモルモットのコルチ器のみを解析している。また組織から蛋白を抽出する際に用いるホモジェネート液に我々はチオウレアを使ったが彼らはこれを用いていない^{2)・3)}。チオウレアは蛋白の溶解度を上げ2次元電気泳動をより効率的に進めるために必要であることが報告されている⁴⁾。

このように2次元電気泳動においてはその実験条件設定が非常に重要であり、ある条件で観察される蛋白スポットが他の条件では全く認められないということも十分にあり得る。実験条件の設定が非常に重要であることが示された。

2. 我々は、内耳部位別プロテオーム解析に着手した。今回の実験で内耳部位別に蛋白発現を検討したところ、COCH蛋白の発現は内耳どの部位でもほぼ同じであった。また、非常に興味深いことに、各部位に特異的な蛋白スポットが存在する可能性が示された。これらのスポットを今後同定し、アミノ酸配列を解説することで内耳機能に対する理解を深めていく予定である。

内耳は膜迷路が聴覚系、前庭系を形作っている。蝸牛では感覚細胞が高度に分化し内外有毛細胞となり、それぞれが機能を分担し、さらに周波数特異性も獲得している。一方、耳石や半規管の有毛細胞は蝸牛と比較してその機能分化はより低い。このような分化の違いをもたらす因子は何か。このような基礎的な疑問への回答を模索していく予定である。

また、我々はこのテクニックを用いて以下の実験を計画している。

- ・ COCH以外の難聴、めまいにかかわる遺伝子の解析
- ・ 正常内耳と病的内耳の比較
- ・ 微小重力、過大重力下の蛋白発現の比較
- ・ 発生過程における蛋白発現の動態
- ・ 外リンパの解析
- ・ 内耳自己免疫疾患の自己抗原の同定

[参考文献]

- 1) Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T. Identification of the protein product of the Coch gene - hereditary deafness gene - as the major component of bovine inner ear protein. *Biochimica Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2001;1535(3):258-265
- 2) Thalmann I, Kohut RI, Ryu JH, Thalmann R. High resolution two-dimensional electrophoresis: Technique and potential applicability to the study of inner ear disease. *Amer J Otol* 1995;16:153-157.
- 3) Thalmann I, Takahashi K, Varghese J, Comegys TH, Thalmann R. Biochemical features of major organ of corti proteis (OCP-1, OCP-2) including partial amino acid sequence. *Laryngoscope* 1990; 100: 99-105.
- 4) Electrophoresis 1998,19,758-760. Thierry Rabilloud. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis

タルマンの結果との比較 実験条件による差異

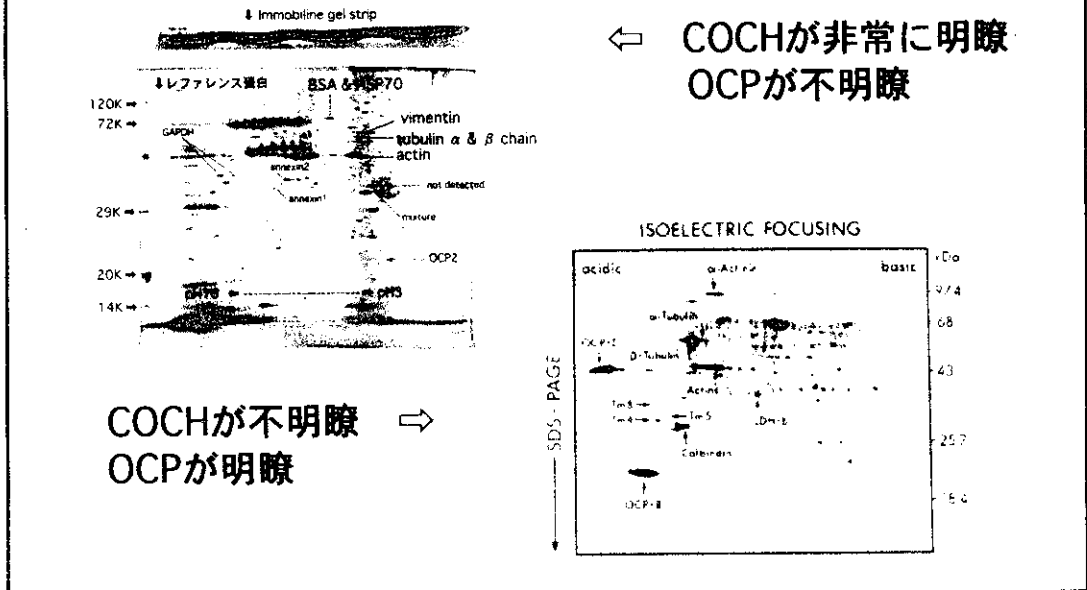


図1 タルマンの結果との比較 実験条件による差異

Ikezonoらの報告ではCOCH蛋白が非常に明瞭に見えるが、OCP 2は不明瞭である。Thalmanらの報告ではこの逆で、OCP 2が非常に明瞭に見えるが、COCH蛋白は不明瞭である。両者の電気泳動結果では、酸性アルカリ性の表示が逆になっていることに注意。

内耳部位別蛋白発現の比較

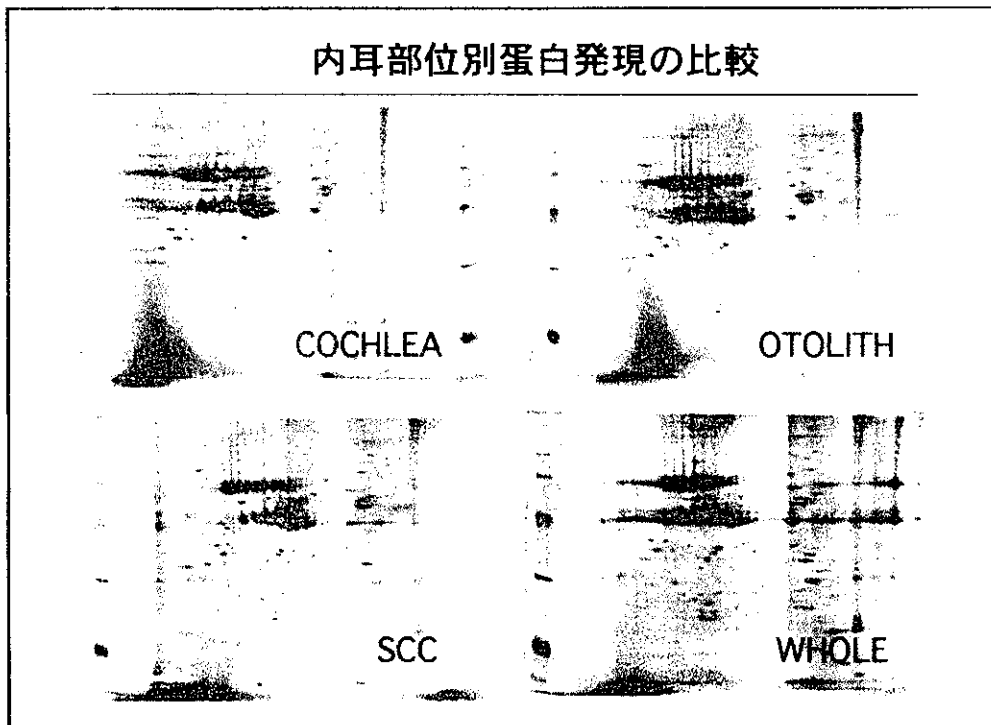


図2. 内耳部位別蛋白発現の比較

COCH蛋白の発現は内耳どの部位でもほぼ同じであった。また、蛋白発現パターンを比較すると、各部位に特異的と思われるスポットがいくつか認められた。

2. COCH遺伝子発現の異質性とプロモーター解析の有用性

八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑、ルビーパワンカール、（日本医科大学耳鼻科）、
石崎正通（日本医科大学第1病理）、渡辺淳（日本医科大学第2生化学）、
水田邦博（浜松医科大学耳鼻科）、小林俊光（東北大学耳鼻咽喉科）、
ラスク・アンダーセン（ウプサラ大学）、工田昌也（広島大学耳鼻科）

[Abstract]

Heterogeneity of the COCH gene expression in the inner ear

Toshiaki Yagi(1) Tetsuo Ikezono(1) Susumu Shindo(1) Li Lishu(1) Ruby Pawankar(1) Masamichi Ishizaki (2) Atsushi Watanabe (3) Kunihiro Mizuta (4) Toshimitsu Kobayashi (5) Helge Rank-Andersen (6) Masaya Takumida (7)

(1) Dept. of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

(2) Dept. of Pathology, Nippon Medical School, Tokyo

(3) Dept. of Molecular Biology, Nippon Medical School, Tokyo

(4) Dept. of Otorhinolaryngology, Hamamatsu Medical School, Hamamatsu

(5) Dept. of Otorhinolaryngology, Tohoku Univ., Sendai

(6) Dept. of Otorhinolaryngology, University Hospital of Uppsala, Uppsala

(7) Dept. of Otorhinolaryngology, Hiroshima Univ., Hiroshima

[Purpose] In order to better understand the cause of DFNA9, we have performed a 2 dimensional gel analysis of the COCH gene product and Immunohistological analysis.

[Method] Bovine inner ear tissue were subjected to 2-D gel electrophoresis. The first dimension electrophoresis was done using an electrofocusing apparatus, Multiphor II, and Immobiline Dry Strips. Strips were casted onto slab gels and the second-dimension separation was performed. Protein containing regions detected by Coomassie blue stain were excised and subjected to N-terminal or internal amino acid sequencing using reverse-phase HPLC apparatus and an automated gas phase protein sequencer. Rabbit polyclonal antibody was generated against a synthetic peptide corresponding to the Cochlin isoforms. Sections of paraffin embedded inner ear were examined.

[Results] We have found very unique properties of the bovine homolog of protein product of the human COCH gene product, Cochlin. The Coch protein occupies 70% of bovine inner ear proteins and is composed of 16 different protein spots, with charge and size heterogeneity. These spots were classified into 3 groups of isoforms, p40s, p44s and p63s. Immunohistochemistry revealed heterogenic expression of the Cochlin isoforms. Heterogeneity of this protein suggests that the Coch gene expression is processed in several ways, at the transcriptional and/or posttranslational level.

[conclusion] The COCH gene is responsible for one of the hereditary hearing impairment, DFNA9, and was recently suggested to be the possible genetic factors contributing to Meniere's disease. Study of the Cochlin might provide more information on the mechanism of hearing and vestibular disorders. Also promotor and enhancer, of the COCH gene will be usefull for the future gene therapy of the inner ear disease.

[はじめに]

非症候性遺伝性難聴は、先天性難聴の大多数を占めると言われている。難聴・めまいと言った内耳障害に起因する症状以外に目立った異常所見が見られない（非症候性）この種の難聴の原因遺伝子を同定するのは非常に困難であった。しかし、近年の分子生物学の発展によりこの分野はここ4年間に急速に進歩し、現在、40個以上の非症候性遺伝性難聴の遺伝子座が明らかになっており、このうち9個の原因遺伝子が同定されている (<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/oto/oto/HHIhome.htm>)。一方、これらの難聴病因遺伝子の蛋白レベルでの研究はほとんどなされていない。2次元電気泳動による難聴原因蛋白の同定の報告は我々の報告が最初である。

遺伝性内耳疾患の研究には大きくわけて3つのアプローチがある。

1. 原因遺伝子、およびその突然変異を探す

一般には日本では家系が小さいので新たな遺伝子の同定は難しいと言われているが、厚生労働省急性高度難聴調査研究班（星野知之班長）では、現在日本の難聴家系から新たな原因遺伝子同定の試みがなされている。

2. 患者ゲノムに「既知の」原因遺伝子の突然変異を探す

DNAチップなど新たな技術開発が進んでおり、遺伝性内耳疾患に関する基礎的な知識を実際に臨床に生かすことが可能になってきている。我々の基礎的研究を臨床上の利益とするためには最も重要な分野である。

3. 原因遺伝子自体の研究

今回の我々の研究はこのアプローチに相当する。遺伝子の機能、病理を探ることを目的としており、最終的には治療法の開発を視野に入れている。COCH遺伝子のような未知の遺伝子が発見されてきており、内耳におけるまったく新しい知見が得られている。

我々は、内耳のプロテオーム解析を行い、興味深い知見を得た。

[対象と方法]

今回の実験は下記の手順で行った。

1. 内耳組織の2次元電気泳動
 2. 各スポットのアミノ酸配列を解読
 3. 結果を遺伝子・蛋白データベースをもちいて解析
 4. タンパクの内部構造の解析
 5. 抗COCH蛋白抗体を2種類作成しアイソフォームごとの発現を免疫組織学的に検討した。
1. ウシ内耳膜迷路組織を摘出しこれを20倍体積のホモジェネート液（7M urea, 2M thiourea, 2% Triton X100, 1% Pharmalyte, 100mM dithiothreitol (DTT) and antiproteases mixture (Complete mini EDTA(-), Boehringer Mannheim) でホモジェネートし、蛋白を抽出する。2次元電気泳動には固定化pH勾配ゲルストリップ (Immobiline pH3-10, Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。1次元目に尿素変性条件下で等電点泳動をMultiphorII (Amersham Pharmacia Biotech)で行い、2次元目にSDS変性下で平板ゲル（3% stacking and 12% separating polyacrylamide gel）電気泳動を行った。電気泳動ゲルを銀染色、もしくはクマシーブルーで染色した。
 2. アミノ酸配列の解読
P V D F membraneにプロットした蛋白のN末端アミノ酸配列は 492 cLC pulse-liquid phase sequencer (Applied Biosystems)を用いて解読した。また、内部配列はlysylendopeptidase AP-1 (Lys-C, Wako Pure Chemical Industries) で消化したのちにペプチドをHPLC apparatus, Model 172 (Applied Biosystems) で分離したのちに解読した。アミノ酸配列からGENETYX (Software Development) and BLAST (NCBI)等のデータベースを用いて蛋白を同定した。

3. ゲルイメージのコンピューター画像解析

ImageMaster 2D Elite software (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて内耳2次元電気泳動の各蛋白泳動スポットのパターンを解析した。ソフトウェアを先ず2D SDS-PAGE standards (Bio-Rad Industries)を用いてキャリブレーションし、各スポットの分子量、等電点、ゲル上の前蛋白スポットに対する比率を計算した。

4. 蛋白のペプチドマップ作成

これは蛋白全体像を比較する方法であり、In-gel digestion法、またはクリーブランド法と呼ばれている。Lys-Cをあらかじめゲル内に溶かし混んでおき、蛋白をstackingゲル内で部分消化させる。それを電気泳動するとその蛋白独自のパターンが得られる。

5. COCH蛋白抗体の作成

COCH蛋白のアイソフォーム解析の結果を元に抗LCCL配列と全てのアイソフォームに共通の配列に対する抗ペプチドポリクローナル抗体を作成し免疫染色を行った。

上記配列の合成ペプチドをCysを介したマレイミド法でKLHキャリアー蛋白に結合させ、ウサギに免疫させた。免疫プロトコールは2週間隔4回感作で、3回感作後にエライザにて力価測定し、抗血清全量をProteinAで精製した。その後さらにProA精製分をペプチドアフィニティカラムで精製した。抗体の特異性は内耳蛋白を抗原としたウェスタンブロッティングで確認した。

[結果]

今回我々はウシ内耳蛋白のプロテオーム解析を行い、その過程で非常にユニークな知見を得た(1,2)。

常染色体優性遺伝性難聴の一つである、DFNA9の原因遺伝子、COCH 3) の蛋白産物Cochlinは

1. 内耳の構成蛋白の70%を占めること
2. Cochlinは3つの異なったN末端を持ち、分子量がそれぞれ63kDa、44kDa、40kDaの3種類のアイソフォームp63、p44、p40に分類される
3. それらのアイソフォームはさらに等電点異なる合計で16個の蛋白から構成されている
4. ヒトDFNA9患者にみられる突然変異部位は全てp63にのみ含まれておりp44、p40には含まれていなかった
5. さらに、この突然変異部位はCOCH遺伝子のLCCL領域のみならず、このLCCL領域がCOCH遺伝子の機能に重要な部分であることが予測される
6. 抗LCCL配列抗体、抗COCHLIN抗体を用いて免疫染色を行った。ラセン板縁、ラセン靭帯は両抗体で強く染色された。蝸牛軸の神経周囲は、抗LCCL配列抗体のみで染色された。

これらの事実はCOCH蛋白の生理機能、発現調節、DFNA9の病態解明に寄与するまったく新しい知見である。

以上の結果を図1、2、3と表1、2に示した。

[考案・結論]

常染色体優性遺伝性難聴を呈するDFNA9の内耳病理所見が Khetrapal により1991年に報告された。原因遺伝子はRobertsonらによって1998にCOCHであると報告³⁾された。この遺伝子が作る蛋白はCochlin (COCH蛋白)と命名されている。

DFNA9はヒト病理所見、原因遺伝子、臨床所見が報告されている数少ない遺伝性難聴である。その臨床像は

- ・常染色体 優性 非症候性遺伝性難聴 35-55歳で発症
- ・高音が障害され徐々に中、低音域にも及ぶ感音難聴
- ・ベルギー、オランダ、アメリカ、日本、オーストラリアで報告され、今まで6ヶ所の突然変異部位が報告されている。

・耳閉感、耳鳴りを伴うめまい発作がある(特にPRO 51 SER の25%)ことから メニエール病との関連性が示唆されている⁴⁾。

DFNA9 めまい・難聴発症のメカニズムは、分子生物学的にdominant negative effect (優勢ネガティブ効果)という言葉で説明されている。それは、「ヘテロ接合体において突然変異遺伝子産物がそれ自体の機能を喪失するだけでなく、正常対立遺伝子産物の機能を妨げること」を意味している。変異蛋白が内耳に沈着して機能を妨げる、もしくは変異蛋白が周囲の組織の蛋白と異常な反応を起こして異常蛋白を作る結果、神経、感覚細胞の変性をきたす、というプロセスが推察されている。

COCH遺伝子の機能はまだ不明である。一般に分子生物学ではそのアミノ酸配列のモチーフ解析から手がかりを探るという手法がとられている。図3に示したようにCOCH遺伝子には3つのモチーフが存在する。

1. Signal Sequence

分泌性の蛋白によくみられる配列で、その蛋白が細胞内外どの部位に行くべきか、指令していると考えられている。

2. LCCL module

2000年にハンガリーのグループにより命名された新しいモチーフ⁵⁾。である。機能はまだ不明である。

下記の3つの遺伝子に含まれている事からこの名前がつけられた。

- ・ Limulus factor C 自然免疫能に関与 血液凝固
- ・ COCH 聴覚 平衡
- ・ LGL1 ラットの肺の発生に関与

3. vWF (フォンビルブランド因子) type A domain

下記に示すような多様な蛋白にみられるモチーフである。

- ・ 分泌性蛋白 (可溶性、非可溶性)

止血系 (vWF) 補体系 (C2, factorB) 免疫系 (LFA-1, MAC-1etc) など。

extracellular matrix (CMP, Collagen 6.7.12.14)

fibrillar collagens, glycoproteins, proteoglycans への結合作用があることが知られている。

このモチーフ解析の結果からC末端のvWF type A domainがコラーゲンに結合し、N末端部分のLCCL moduleがなんらかの重要な機能を担っているのではないかと我々は推測している。

光学顕微鏡による組織学的検討の結果、内耳でp63とp40は異なる部位に発現していた。現在電子顕微鏡による検討、並びに発生学的な観点からも現在検討を加えている。

我々の研究の結果、COCH遺伝子は、電気泳動上、全部で3つの分子量、16個のアイソフォームを認め、免疫組織学的にはアイソフォームにより組織内発現部位がことなるという、遺伝子発現の異質性が確認された。この遺伝子発現の異質性をもたらす原因として

- ・ 遺伝子の転写レベルでの調節 alternative splicing, exon skipping,
- ・ 翻訳後の修飾 P63-p40変換酵素の存在、化学的修飾 (リン酸化 糖鎖の付加 など)

などの可能性を考え検討を加えている。

今回の研究からCOCH遺伝子は内耳の支持組織に特異的に発現していることが判明した。さらにそのアイソフォームはそれぞれ特有のメカニズムで転写制御されていることが示された。この転写制御はCOCH遺伝子プロモーター、エンハンサー領域に起因すると考えられる。将来的に内耳に外来遺伝子を導入する際に、内耳特異的な発現調節が求められる。COCH遺伝子の発現制御の研究およびプロモーターのクローニングは内耳の遺伝子治療に新たな道を開く重要なアプローチと考えられる。

また、COCH蛋白は内耳特異的に多量に発現していることから我々が従来研究している自己免疫性内耳性難聴^{6)・7)}の自己抗原である可能性もある。今後様々な角度からCOCH遺伝子について解析を加えていきたい。

【参考文献】

- 1) Ikezono T, Omori A, Ichinose S et al. Identification of the protein product of the *Coch* gene - hereditary deafness gene - as the major component of bovine inner ear protein. *Biochim BiophysActa* 2001; 1535(3): 258-
- 2) 内耳プロテオーム解析による *COCH* 遺伝子発現の検討
八木聰明、池園哲郎、新藤晋、ら。厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成12年度報告書、p42-44、2000
- 3) 265Robertson, N.G. Lu L, Heller S et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic sensorineural deafness with vestibular dysfunction. *Nature Genet.* 20, 299-303. (1998)
- 4) Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI et al. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the *COCH* gene. *Hum Mol Genet* 1999 Aug;8(8):1425-9
- 5) Trexler M, Banyai L, Patthy L. The LCCL module. *Eur J Biochem* 2000 Sep;267(18): 5751-7
- 6) Ikezono T Tomiyama S, Pawankar R et al. Passive transfer of the experimental autoimmune labyrinthitis. *Audiol Neurootol* 2000 5(5): 292-9
- 7) 2次元電気泳動法による内耳自己抗原の検索 八木聰明、池園哲郎、齋藤明彦ら。厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成12年度報告書 kepp39-41、2000

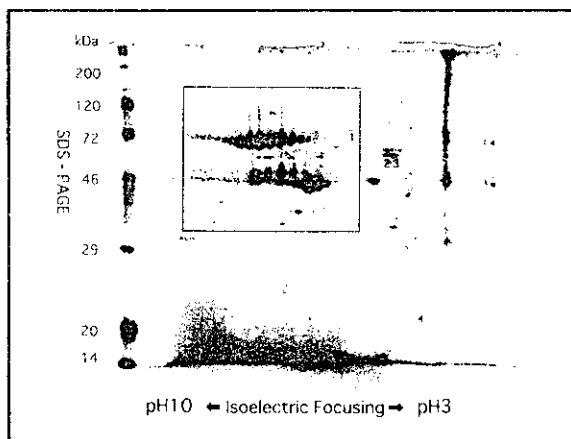


図 1a 牛内耳蛋白 2次元電気泳動結果
ウシ内耳蛋白を 2次元電気泳動したもの。全体像をクマシーブルーにより染色した。代表的な既知の蛋白 1: BSA、2: α tublin、3: β tublin、4: OCP-2 を示してある。この蛋白泳動パターンは内耳特有のもので他の臓器、組織からはこのパターンは得られない。

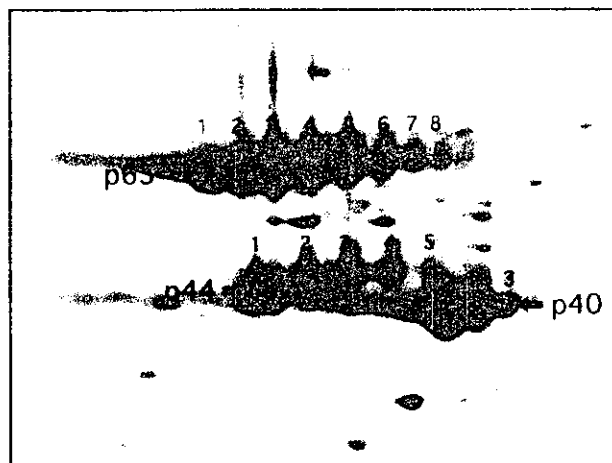


図 1b 2次元電気泳動上のCochlinアイソフォーム
図 1aのボックス部分を拡大したもの。Cochlinのアイソフォームをアルカリ側から酸性側にナンバーを付け、p63-1 から P63-8、p44-1 から p44-5 and p40-1 から p40-3と表示してある。

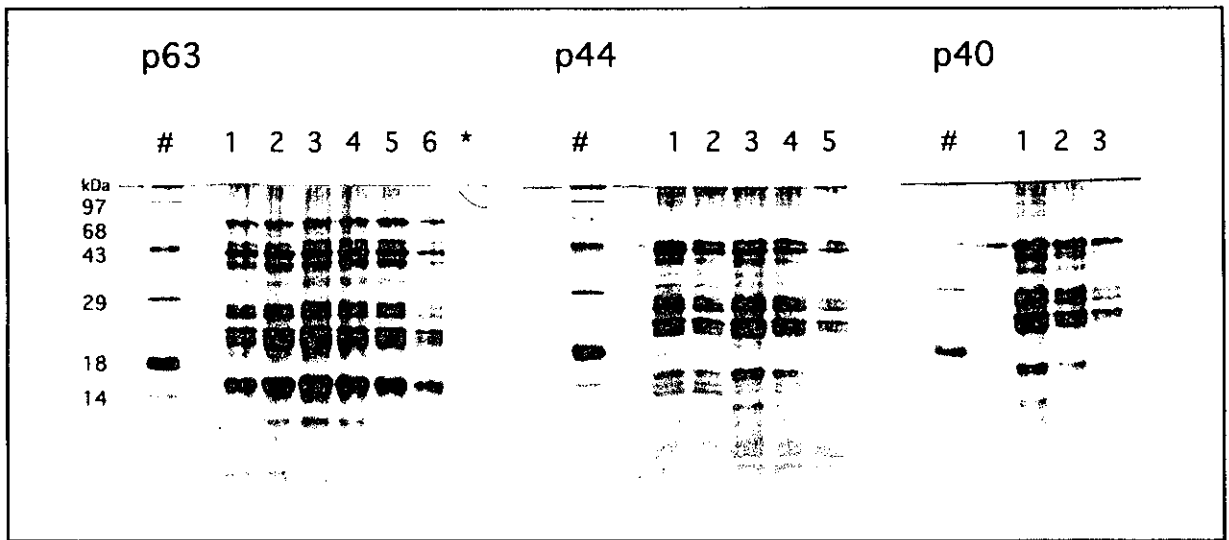


図2 Cochlin各アイソフォームのペプチドマップ

ウシCochlin各アイソフォームをクリーブランド法により部分消化して得られたペプチドマップ。それぞれの蛋白の内部構造がほぼ同一である事を示す結果が得られた。

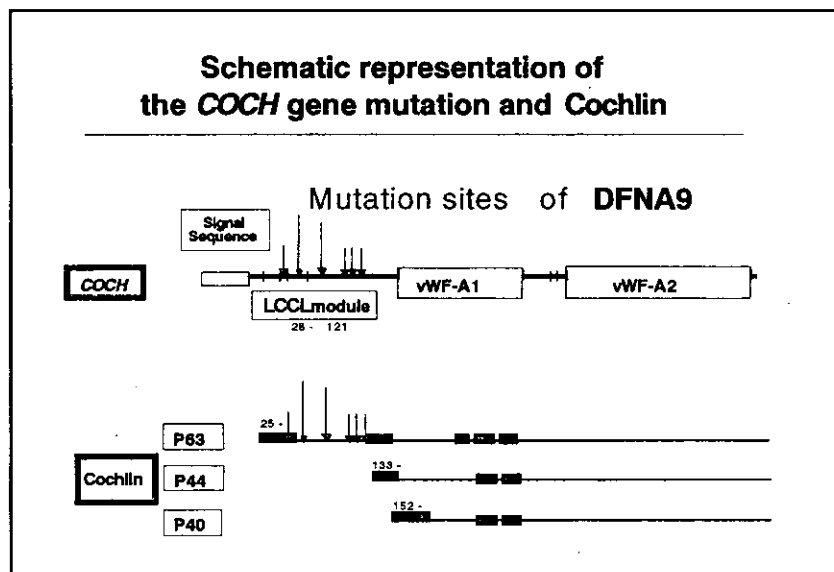


図3 COCH遺伝子とCochlin蛋白の構造模式図

ヒトCOCH遺伝子、ウシCochlin、ならびに今まで報告されているヒトDFNA9の突然変異部位を示す。突然変異は全てP63アイソフォームのN末端にのみ含まれており、その他のアイソフォームには含まれていなかった。

表1 Cochlin N末端のアミノ酸配列

protein		sequence	position in COCH	sequence identity
p63-1 to 8	human	EGAAPIAITCFTRGLDIRKEKADVLCPGG	25-53	83%
	bovine	---V--P--*S-----*---		-
	mouse	---V--PV-----		86%
	chicken	DSS-SN-----L---TE-----AN		48%
p44-1 to 5	human	ATGQAVSTAHPPTGKRLKKTPE	133-154	95%
	bovine	-----A-----		-
	mouse	---R-----S-----		86%
	chicken	-V-RS-A--R-A---P---L-		68%
p40-1 to 3	human	TPEKKTGNKDKADIAFLIDGSFNIGQRRF	152-181	97%
	bovine	-----*-----		-
	mouse	-----		97%
	chicken	-L---A-----Y-----		87%

今回の実験で得られたウシCochlinのN末端アミノ酸配列を、既知のヒト、マウス、チキンのcDNAから類推されるアミノ酸配列と比較した表。左から、アイソフォームのナンバー、種、配列、ヒトCOCH遺伝子のアミノ酸に相当する部位、ウシアミノ酸配列とそれぞれの種のアミノ酸との相同性、を表示してある。内部配列もあわせると全体でヒトCOCH遺伝子と89.3%という非常に高い相同性が得られ、これらの蛋白スポットはヒトCochlinホモログであることが示された。

表2 ゲルイメージコンピューター解析

protein [HPLC peak No.]		sequence	position in COCH	sequence identity
p63-1 [1]	human	SSTQEATGQAVSTAHPPTGK	128-147	80%
	bovine	-G-Q-----*---A---		-
	mouse	-----R-----S--		70%
	chicken	NLAL--V-RS-A--R-A---		50%
p63-1 [2]	human	EVGFRGNSNTGK	234-246	92%
p44-1 [5]	bovine	--A-----		-
p40-1 [7]	mouse	-----		92%
	chicken	-L-----		85%
p63-1 [3]	human	FFTVDAGVRK	255-264	70%
p44-1 [6]	bovine	---A-T-A--		-
p40-1 [8]	mouse	---A-T----		90%
	chicken	--SMEN-A--		60%
p63-1 [4]	human	IEFYLK	215-220	100%
	bovine	-----		-
	mouse	-----		100%
	chicken	-----		100%

ウシ内耳蛋白2次元電気泳動パターンのゲルイメージコンピューター解析の結果。各アイソフォームの全蛋白に占める割合、等電点、分子量が表示してある。Cochlinのは内耳全蛋白中、70%を占める非常に多量に存在する蛋白である事が示された。ただし、我々の方法ではコラーゲン等の繊維性蛋白はゲルに乗らずこれらの蛋白を除いた場合の比率である。

3. 幹細胞移植による内耳感覚細胞の再生

伊藤 諱一

[Abstract]

Regeneration of the inner ear hair cells by transplantation of the stem cells.

Juichi Ito, Department of Otolaryngology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

[Purpose] In order to investigate the possibility of the treatment of vestibular dysfunction and sensorineural hearing disturbance, adult rat hippocampus-derived neural stem cells (NSC) were grafted into newborn rat inner ear. [Method] NSC were grafted into newborn rat inner ear. [Results] Within two to four weeks of grafting to the cochlea, some NSC survived in the inner cavity. Some of them had adopted the morphologies and positions of hair cells. Then, inner ear stem cells were also taken out from rat embryo. [Conclusion] These results suggest that NSC and inner ear stem cells can adapt to the environment of the inner ear and give hope for treatment of equilibrium dysfunction and sensorineural hearing loss.

[はじめに]

再生に関し、最近特に注目を受けているのが「幹細胞」である。本研究では海馬由来の神経幹細胞を内耳に直接投与し、内耳への生着、有毛細胞への分化への期待をこめてその経過を観察した。一方、神経幹細胞より有望なものとして内耳由来の幹細胞の同定・培養を試みた。

[対象と方法]

実験にはウイスター系のラットを用いた。成ラットの海馬由来神経幹細胞を新生ラット（生後2～3日）の内耳内に投与した。投与2～4週間後、動物を還流固定し、内耳を摘出、連続切片を作って内耳有毛細胞の特異抗体で反応させた。さらに胎仔ラットの耳胞から内耳由来の幹細胞を分散培養法、限界希釈法にて培養・同定した。

[結果]

内耳に神経幹細胞を投与して2～4週後、前庭・蝸牛の内部に海馬由来神経幹細胞が一塊となって見出され、海馬由来神経幹細胞が移植後数週間経っても生着し続けることが分かった。また一部有毛細胞に置き換わっているのではないかという所見も見られた。一方、胎仔の耳胞から内耳幹細胞を取り出すことができた。さらにそれらの幹細胞は3種類の cell line のものが同定された。

[考案・結論]

近年幹細胞を移植のドナーとして使用しようとする試みは数多くなされており、哺乳動物でも種々の部位から幹細胞が抽出されている。海馬由来神経幹細胞は、動物実験の段階では中枢神経系の様々な部位に移植されている。障害を与えた内耳に神経幹細胞を移植した際に、神経幹細胞の一部が形態学的には内耳有毛細胞と類似の細胞に分化した。また、内耳由来の幹細胞を抽出、培養、さらにクローン化できたので、内耳幹細胞は神経幹細胞よりも内耳に対する移植の可能性は高まると考えられる。

[参考文献]

- 1) Ito J, Kojima K, Takahashi M, and Kawaguchi S. Survival of neural stem cells in the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 121 : 140-142,2001
- 2) Ito J, Murata M, and Kawaguchi S. Regeneration and recovery of the hearing function of central auditory pathway by transplants of embryonic brain tissue in adult rats. *Exp. Neurology* 169 : 30-35,2001

4. 人工内耳術後めまいの年次発生率の解析

久保 武、山本好一、井脇貴子、真本祥弼

[Abstract]

A sequential study for the occurrence rate of dizziness following cochlear implant.

Takeshi Kubo, Koichi Yamamoto, Takako Iwaki, Yoshinori Mamoto

Department of Otolaryngology, Osaka University School of Medicine

[Purpose] A sequential study for occurrence rate of dizziness after cochlear implant operation.

[Method] The occurrence rate of dizziness after cochlear implant was studied on the basis of operations conducted from 1991 to 2000. Subjects were 161 cases, in which pre- and post-lingual deaf subjects, aged from 2 to 84 y.o. were included. Three groups of dizziness were noted such as the dizziness occurred immediately after the operation and subsided within one month (immediate type), the one lasted over one month (continuous type) and the vertigo abruptly occurred later than one month (delayed vertigo). [Results] When the occurrence rate was compared with our own previous study, a slight decrease for immediate dizziness was noted. However, there was no difference in delayed vertigo. As far as the etiology of deafness is concerned, the immediate dizziness was found in each group of etiology, but delayed vertigo was not in meningitis group. As delayed vertigo occurred abruptly and lasted for a long period, this type of dizziness was the most hazardous. [Conclusion] Dizziness after cochlear implantation does not depend on the technical refinement, but more depend on the pre-operative vestibular condition.

Key words: Dizziness, cochlear implant, yearly occurrence, etiology of dizziness

[はじめに]

多チャンネル人工内耳に対する埋め込み手術は、本邦においては1985年より始まった。保険適応（1994年）、複数の機種種の登場（1999年）により、益々多数の施行例が報告されるにいたり、昨年では約400例に手術がなされた。人工内耳埋め込み術は比較的安全な手術であり、重篤な合併症は少ない。数少ない合併症の一つとしてめまいがある。人工内耳術後めまいの発生率は、報告により0.4-47%まで様々である^{1) - 6)}。この理由として、対象となった症例、取り上げるめまいの種類、手術手技などが影響していると考えられる。我々は、人工内耳術後のめまい（術後めまい）が、術直後型、持続型、遅発型に分類できることを報告してきた^{5)・7)}。

本研究では、術後めまいの発生率を年次により検討し、その発生原因について考察した。この結果を1997年迄の集計結果と比較し、発生傾向に差があるかどうかについても検討した。

[対象と方法]

当科にて、1991年から2000年4月までに人工内耳埋め込み術をおこなった症例164例を対象にして、術後めまいの発生率を調べた。人工内耳埋め込み症例の年齢は2～82歳にわたり、失聴時期別には言語習得前失聴者、言語習得後失聴者とにわけられる。前者のグループの失聴原因は、先天聾、髄膜炎後聾、妊娠時のウイルス感染、遺伝性症候性難聴であった。前者のグループの失聴原因は、原因不明の進行性感音性難聴が約半数をしめ、他は薬剤性、内耳炎、髄膜炎などであった。術後めまいを、術後1ヶ月以内に消退する術直後型、1ヶ月以上続く持続型、1ヶ月を過ぎてから発作性におこる遅発型とに分類し集計した。

[結果]

図1に、術直後型、遅発型および持続型めまいの発生率を、1997年迄のものと比較して示した。この結果、術直後型めまいは、31%から27%とやや減少傾向を示した。他方、遅発型めまいは16%から17%と変化なく、持続型めまいは2%から5%と微増傾向を示した。

図2に、1991年から2000年4月までの年次別手術件数と、術後めまいの年次別発生率を示した。術直後型めまいは、1997年をピークに近年は減少傾向がみられる。遅発型めまいは、2000年度の集計を除いて発症のみられなかった年はなく、毎年起こっていた。しかし、年次による発生率に一定の傾向はみられなかった。

失聴原因別めまいの発生率を図3に示す。術直後型めまいの発生は、失聴原因に関係なく起こっている。他方、遅発型めまいの発生はアミノグリコシド系抗生物質によって失聴した薬剤性群に高く、髄膜炎例にはみられなかった。

図4にめまいの持続時間を、術直後型めまいと遅発型めまいとで比較して示した。術直後型めまいは殆どが30分以内の短時間のものであった。また、その起こり方は、体動時の誘発性めまいが多かった。他方、遅発型めまいの持続時間は、30分以上6時間以内が36%、6時間以上3日以内が40%、3日以上持続するめまいが16%と、長時間持続するものであった。遅発性めまいの多くは、自発性発作性におこりその持続時間も長いことから、人工内耳手術の合併症として比較的重篤なものと考えられる。

また、遅発性めまいの随伴症状として、嘔吐、嘔気が75%にみられた他、術側の耳鳴がめまい時に増大する例、人工内耳の聞え方の異常、すなわち音が響く、こもって聞こえるといったことが、それぞれ66.7%にみられた。このようなメニエール病にみられる随伴症状と類似しており、遅発性めまいの多くが術側の内耳障害に起因していることを示唆するものであった。

[考察・結論]

術後めまいの発生率は研究者により様々であり、0.4%から47%に及ぶ。近年の報告では、高い発症率を指摘する報告が多い。

術直後めまいの発生原因として、

- λ 開窓部よりの外リンパ瘻
- λ 異物に対する免疫反応
(漿液性内耳炎)
- λ 電極装入による内耳障害
(物理的、化学的、環境要因)

が考えられている6)・8)が、このうちの外リンパ瘻や電極装入による物理的障害については手術手技の向上により予防可能になる事が推察される。今回の我々の年次推移からの検討では、術直後型めまいの発生率にわずかな減少傾向がみられた。他方、遅発性めまいには一定の傾向はなかった。この事実より、術直後型めまいは、人工内耳電極手術手技の向上により減少する可能性がある。

失聴原因別めまい発生率の検討から、術直後めまいは失聴原因に関係なく起こるが、遅発型めまいは薬剤による失聴例に多く、髄膜炎例にはみられなかった。これらの群の術前前庭機能の状態が、遅発型めまいの発生に関係していると考えられ、今後すべき問題と思われる。人工内耳術後の遅発型めまいは最近まで注目されいなかった疾患であるが、近年このめまいに関する報告が散見されるようになった。下記に我々が渉猟した報告例を示す。

- λ Huygen PLM (1994) 4); 2 case report
- λ Nakai Y (1997) 9); 1 case report
- λ Ito J (1998) 10); 8% out of 55 cases
- λ Kubo et al (2000) 7); 49% out of 94 cases

今後、蝸牛軸密着型電極をもつ人工内耳が普及していくので、この場合に術後めまいの発生がどう推移す

るか注意深く見守る必要がある。

本研究のまとめを下記に示す。

- 1) 術直後型めまいの発生率は43.3%、遅発性めまいの発生率は17.1%であり、2年前の統計と大きな差はなかった。
- 2) 人工内耳術後のめまいを年次別、失聴原因別に調べた。術直後型めまいは減少傾向にあったが、遅発性めまいの発生率に一定の傾向はみられなかった。
- 3) 失聴原因別統計では薬剤性群に遅発性めまいの発生が多かった。

[参考文献]

- 1) Cohen N, Hoffman RA, Stroschein M : Medical or surgical complications related to the nucleus multichannel cochlear implant. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988 ; 97(Suppl 1) : 8-13
- 2) Harrison HC, Gibson WPR : Complications of cochlear implantation in children. *Transplants and Implants in Otology* (Ed.N. Yanagihara and J Suzuki), 1992 ; 327-330, Kugler(Amsterdam)
- 3) Broek VD, Huygen PLM, Mens LHM, et al : Vestibular function in cochlear implant patients. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1993 ; 113 : 263-265
- 4) Huygen PLM, Hinderink JB, Broek VD, Borne VD, Brokx JPL, Mens LHM, Admiraal RJC. The risk of vestibular function loss after intracochlear implantation. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995 ; Suppl 520 : 270-272
- 5) 守田雅弘、久保武、渡辺雄介他 : 人工内耳手術後のめまい・平衡障害の検討. *Equilibrium Res* 1995 ; 54 : 307-311
- 6) Kempf HG, Johann K, Lenarz T. Complications in pediatric cochlear implant surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999 ; 256 : 128-132
- 7) Kubo T, Yamamoto K, Iwaki T, Doi K, Tamura M. Different forms of dizziness occurring after cochlear implant. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (in press)
- 8) Black FO, Lilly DJ, Peterka RJ, Fowler LP, Simmons FB. Vestibulo-ocular and vestibulospinal function before and after cochlear implant surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987 ; 96 (Suppl 128) : 106-109
- 9) Nakai Y, Sakashita T, Kubo T, Ymane H, Matsutani H, Kato A, Iguchi H, Takayama M, Ito J. Temporal bone pathology of a patient with cochlear implant. *ORL* 1997 ; 59 : 230-234
- 10) Ito J. Influence of the multichannel cochlear implant on vestibular function. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998 ; 118 : 900-906