

厚生労働省科学研究費補助金

感覚器傷害研究事業

内耳エネルギー不全の病態解析に基づいた突発性難聴の
新規治療法開発(H16-感覚器-006)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松永 達雄

平成17(2005)年 4月

目次

I. 総括研究報告書

- 内耳エネルギー不全の病態解析に基づいた突発性難聴の新規治療法開発 3
松永達雄

II. 分担研究報告書

1. 内耳エネルギー不全による突発性難聴モデルにおける蝸牛内 ATP 濃度測定 18
南修司郎、松永達雄、小川郁
2. 急性ミトコンドリア障害による突発性難聴モデルの急性期・慢性期の聴覚と組織像の解析による病態解明 22
岡本康秀、松永達雄、水足邦雄、藤井正人、小川郁
3. 内耳エネルギー不全による難聴発症 1 日後の蝸牛外側壁における網羅的遺伝子発現解析 37
藤波義明、濱崎裕子、神谷和作、水足邦雄、松永達雄
4. 内耳ミトコンドリア障害難聴モデルにおける Heat Shock Protein 70 発現の経時的解析 40
新田清一、南修司郎、神谷和作、藤波義明、藤井正人、松永達雄
5. 内耳エネルギー不全による突発性難聴モデルにおける蝸牛内炎症・免疫応答に関する検討 44
藤岡正人、松永達雄、小川郁
6. 内耳エネルギー不全による蝸牛外側壁の細胞死に対する小胞体ストレス応答の関与 49
藤波義明、神谷和作、藤井正人、松永達雄

7. 内耳エネルギー不全による突発性難聴モデルにおけるアポトーシ ス阻止による実験的難聴治療 水足邦雄、神谷和作、藤井正人、松永達雄	54
8. 内耳エネルギー不全による突発性難聴モデルにおける聴力回復メ カニズムの解析と幹細胞治療 神谷和作、藤波義明、藤井正人、松永達雄	58
9. コネキシン蛋白の発現と細胞増殖・分化の検討 小沢宏之、神谷和作、藤井正人、松永達雄	61
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	66
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

内耳エネルギー不全の病態解析に基づいた突発性難聴の新規治療法開発

主任研究者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

本研究では急性内耳エネルギー不全による難聴の動物モデルを用いて、その病態を解明し、その結果に基づいた治療方法を開発することを目的とした。作成したモデルラットは一過性あるいは永続性の難聴を呈した。傷害は特に蝸牛外側壁に強く、本難聴は蝸牛内のカリウムイオン輸送機構の破綻による難聴であると考えられた。永続性難聴モデルでは 50%程度蝸牛内 ATP 濃度を難聴発症の 1 日、7 日後共に減少することが確認された。一過性難聴モデルに起こる高度難聴は外側壁とらせん板縁の限局的かつ劇的なアポトーシスが主な原因であることが示され、さらにこの傷害は周囲の線維細胞の急激な増殖（再生）により修復されることが判明した。一過性難聴モデルでの蝸牛外側壁における難聴発症 24 時間後でのマイクロアレイ解析の結果、複数の遺伝子発現に顕著な変化が見られた。Hsp70 の発現は、一過性難聴モデルにおいて 1 日後をピークに増加したが、不可逆性難聴モデルでは有意な発現は認められず、免疫組織化学で血管条内に強く発現が認められた。一過性難聴モデル動物の蝸牛外側壁で小胞体ストレス関連分子の転写に増強が見られ、内耳への小胞体ストレス誘導剤投与で難聴が誘導され、本モデルの難聴に小胞体ストレスの関与が考えられた。一過性難聴モデルで、アポトーシス阻害薬により、顕著な聴力改善効果を呈し、組織学的にも蝸牛外側壁線維細胞に対して保護効果が認められた。一過性難聴モデルでの間葉系幹細胞を用いた治療法の検討では、蝸牛外側壁内部への同細胞の生着と聴力改善を認めた。コネキシン発現は正常組織に比較し腫瘍組織で低下していた。培養した腫瘍細胞にコネキシン遺伝子を強制発現させると、コネキシン蛋白は細胞内に局在し、細胞増殖が抑制される傾向が認められた。今後さらに本モデルでの聴覚障害の病態を分子細胞レベルで解明するとともに、

個体レベルでの難聴治療効果を上げるための検討を行う。

A. 研究目的

個別の検討ごとの目的を以下に列挙した。

1) 急性内耳エネルギー不全による難聴ラットモデルにおいて生化学的に蝸牛内の ATP 濃度を測定し、これらを基盤にエネルギー不全、低酸素、難聴の関係を明らかにする。

2) 急性内耳エネルギー不全による難聴モデルにおいて、超微形態を中心に経時的に形態学的観察を行い、蝸牛障害の病態を解明する。

3) 急性内耳エネルギー不全により起こる高度難聴では大部分の有毛細胞や神経細胞は生存しているにもかかわらず、蝸牛外側壁線維細胞が重度に傷害されている。この蝸牛外側壁線維細胞傷害は劇的なアポトーシスにより引き起こされている。本研究では、一過性難聴モデルの傷害発症後早期（24 時間後）において蝸牛外側壁に発現している遺伝子のスクリーニングをマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析にて行い、主としてアポトーシスに関与していると考えられる候補分子を同定する。

4) 急性内耳エネルギー不全による難聴モデルでの蝸牛における分子レベルでのメカニズム解明、特にストレ

スに対する保護物質といわれている Hsp70 の一過性難聴モデルと不可逆性難聴モデルにおける発現を解明する。

5) 突発性難聴の病態生理にはその背景に何らかの炎症反応を含む免疫学的機序が含まれている可能性が推察されるが、基礎実験を含め、検討は未だ十分とは言いがたい。そこで急性内耳エネルギー不全による難聴モデルにおける蝸牛内炎症・免疫応答のメカニズムを解明する。

6) 合成されたタンパク質は小胞体で正しい立体構造を獲得して細胞内外に輸送される。一方、折りたたみが不完全なタンパク質は小胞体内に留められる。この時、小胞体ストレス応答として知られる細胞内情報伝達経路が活性化し、分子シャペロンや転写因子が誘導される。急性内耳エネルギー不全による難聴モデルでの蝸牛外側壁線維細胞のアポトーシスに対する小胞体ストレス関連分子の関与を生化学的・分子生物学的手法を用いて解明する。

7) 突発性難聴のモデル動物として 3-nitropropionic acid(3-NP)を用いた、急性蝸牛エネルギー不全モデルラットの病態解明を行い、これまでの研

究で、本モデルの病態として蝸牛外側壁のアポトーシスが難聴の出現に大きく関わっていることが示された。そこでアポトーシスの阻止により難聴を治療できるか否かを解明する。

8) 急性内耳エネルギー不全による難聴モデルラットの病態解析を行うことにより、内耳エネルギー不全における聴力回復メカニズムを解析し、得られた知見を元に骨髄間葉系幹細胞の内耳への移植による新規治療法の効果を解明する。

9) コネキシンは内耳エネルギー不全に最も感受性の高い蝸牛外側壁線維細胞で発現されており、内耳でのイオン輸送に重要な働きをしていることが知られている。この線維細胞は、我々の現在までの研究で、内耳エネルギー不全により細胞増殖が誘導されることがわかってきている。最近になって、コネキシン蛋白が細胞周期に直接影響を与えるとする報告があり、コネキシンが細胞の増殖に深く関わりを持つ可能性が考えられている。本研究では、内耳エネルギー不全により生じる線維細胞の増殖とコネキシンとの関連を調べる前段階として、正常組織におけるコネキシン発現の動態と増殖が活性化した細胞、すなわち癌細胞におけるコネキシン発現とを比較し、さらに腫瘍細胞へのコネキシン遺

伝子の導入を行いその影響を解明する。

B. 研究方法

個別の検討ごとの方法を以下に列挙した。

1) 急性内耳エネルギー不全による難聴モデルラットを4つのグループに分けて、ATP測定を行った。生食投与後1日目、7日目、3-NP投与後1日目、7日目である。ラットをケタミン(100mg/kg)、キシラジン

(10mg/kg)にて麻酔、断頭し蝸牛を取り出した。150 μ lのRIPAバッファーに左右の全蝸牛をいれホモジナイズし、10000gで15分遠心して得られた上澄み液をATP測定に使用した。ATP定量はSigma社のATP bioluminescent assay kit とルミノメーターを用いた。ATPとルシフェリンを反応させ、その発光量をルミノメーターで測定した。

2) 急性内耳エネルギー不全による永続性難聴モデルでの検討を行った。生食投与後3時間・1日・14日・90日のコントロール群と3-NP局所投与後3時間・14日・90日の群それぞれ2耳で検討した。内耳は、十分に灌流固定を行なった後、断頭し摘出し、更に再固定し、脱灰後、洗浄し、後固定を行なった。脱水後、エポキシ樹脂

による包埋し、蝸牛軸に平行に切片を作り、光学顕微鏡用とした。更に蝸牛の第二回転部位を電子顕微鏡で、蝸牛外側壁、コルチ器、ラセン神経節を中心に、コントロール群とミトコンドリアトキシン投与群とを比較検討を行った。

3) 急性内耳エネルギー不全の一過性難聴モデルを作成し、同一個体の反対側に生理食塩水を同容量投与したコントロール耳と比較した。作成したモデルラットについて経時的な聴力閾値の推移を ABR (聴性脳幹反応) により測定した。24 時間経過後に左右内耳よりそれぞれ蝸牛外側壁を採取し、total RNA を抽出し、cDNA を作成した。これらの cDNA を鋳型としてビオチン標識 cRNA を合成し、GeneChip® Rat Expression Array 230A および同 230B (Affymetrix, Inc.) にハイブリダイゼーションし、専用スキャナーにより蛍光イメージの測定を行った。得られたデータについて画像処理ソフトウェアおよび解析用ソフトウェアを用いて蛍光強度を数値化し、解析を行った。

4) 急性内耳エネルギー不全による一過性難聴モデル・不可逆性難聴モデルから蝸牛を摘出し、RNA を抽出した後、cDNA を作成し、Hsp70 について real time PCR 法を用いて 3-NP

投与前、一過性難聴モデルの 3-NP 投与後 3 時間、3-NP 投与後 1 日、3-NP 投与後 3 日、不可逆性難聴モデルの 3-NP 投与後 3 時間、3-NP 投与後 1 日、3-NP 投与後 3 日、生理食塩水投与後 3 時間、生理食塩水投与後 1 日、生理食塩水投与後 3 日で検討した。さらに免疫組織化学的手法を用いて、Hsp70 の蝸牛内での局在を、3-NP 投与前、3-NP 投与後 1 日 (一過性難聴モデル)、生理食塩水投与後 1 日の蝸牛切片において検討した。

5) 内耳エネルギー不全モデル

(PTS モデル=永久的聴力閾値上昇モデル、および TTS モデル=一過性聴力閾値上昇モデル) における蝸牛内での炎症性サイトカイン発現を mRNA レベルで検討した。急性内耳エネルギー不全による一過性難聴モデル・不可逆性難聴モデルから蝸牛を摘出し、RNA を抽出した後、RT-PCR 法により 7 種類の炎症性サイトカインを検討した。プライマーは messageScreen™ Rat Inflammatory Cytokine Set2 Multiplex PCR Kits (BioSource International, Inc 製, Camarillo, CA, USA) を用いた。この結果をもとに、上記の標的遺伝子のうちの IL-6 の発現量を、定量 PCR 法を用いて検討した。測定は TaqMan プローブ (Applied Bioscience, US) を用

い、内因性コントロールには 18S rRNA を用いた。Real-time PCR には Mx3000p (Stratagene Co. Ltd., La Jolla, CA, USA) を用いた。解析はこれまでに我々が用いている対照群希釈系列を使い、検量線法により行った。

6) 内耳エネルギー不全の一過性難聴モデルおよび永続性難聴モデルについて、各時間経過後に蝸牛外側壁第二回転を採取し、total RNA を抽出した。各サンプルを cDNA にし、小胞体ストレスに参与している遺伝子それぞれに特異的なプライマーを用いて半定量的 reverse transcription-PCR (rt-PCR) を行い、各遺伝子の経時的発現動態の解析を行った。また内耳半規管から N 型糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin (TM) を投与して内耳細胞に小胞体ストレスを惹起させ、聴力閾値の推移を ABR にて測定した。

7) 内耳エネルギー不全の一過性難聴モデルを用いた。治療のためのアポトーシスの阻害には、アポトーシスカスケードの下流に位置するカスパーゼを広範に阻害する pan-caspase inhibitor である、z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) を用いた。Z-VAD-FMK は腹腔内から 3 日間連続で全身投与し、3-NP は

Z-VAD-FMK 投与 2 日目に局所投与した。コントロールとして Z-VAD-FMK の溶媒である DMSO を用いた。また聴力評価は Auditory Brainstem Response (ABR) にて術前、及び術後経時的に行った。3-NP 投与 28 日後に全身麻酔下に解剖を行い内耳を摘出、組織学的検討を行った。

8) 内耳エネルギー不全の一過性難聴モデルにおいて蝸牛の病態変化とその後の修復過程を、免疫組織化学 (BrdU の連続投与、TUNEL 法) により解析した。次いで骨髓間葉系幹細胞の内耳への移植を行った。間葉系幹細胞はラット大腿骨から採取し約 1 年間、継代を繰り返したものを使用した。3-NP 0.3M 投与後 3 日目に、外側半規管からチューブを挿入しシリンジポンプにて毎分 1×10^4 個の間葉系幹細胞を 10 分間注入し、後半規管から外リンパ液を排出することにより細胞液での還流を行った。3-NP 投与二週間後に剖検し、BrdU の免疫組織化学により生着した幹細胞を検出した。

9) まず癌組織と正常組織におけるコネキシン蛋白の発現を検討した。根治手術を行った頭頸部癌症例 8 例より摘出した検体を用い、肉眼的に分かる範囲で正常組織と癌組織の境界を含むように組織を採取した。固定後、パラフィンに包埋、切片を作成し、抗

ウサギ抗コネキシン 26 (Cx26) 抗体
および抗コネキシン 30(Cx30)抗体

(Zymed 社製) を用い、ABC 法で免疫染色を行い、各コネキシンの分布を観察した。mRNA 発現については、同じく根治手術後の検体を用い、腫瘍側および正常側より組織を採取し、tRNA を抽出し cDNA を作成した。Real Time PCR 法を用いて、各組織におけるコネキシンの mRNA を相対的に定量した。次いで HeLa 細胞を用いて腫瘍細胞へのコネキシン遺伝子の導入効果を検討した。遺伝子導入は pcDNA3.1 プラスミドを用い。このプラスミドに human connexin26 遺伝子 (hCx26) を組み込み、hCx26 と GFP (green fluorescent protein) の fusion protein を強制発現させるプラスミドを作成した。またコントロールとして、GFP のみを発現するプラスミドを作成し、Lipofectamine を用いて遺伝子導入し、その局在を蛍光顕微鏡で観察し、増殖能をコントロールと比較した。

(倫理面への配慮)

国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行なった。臨床検体を用いるにあたっては東京医療センター倫理委員会における審査され承認を得た。

C. 研究結果

個別の検討ごとの結果を以下に列挙した。

1) 3-NP(500mM)をラット中耳正円窓窩に 2 μ l 投与し、80dB 程度の聴力閾値の上昇を認める永久的な難聴モデルを作成した。ATP 測定時期は投与 1 日後と 7 日後とした。生食 (saline) を投与したコントロール群と比べて、3NP 投与群では 50%程度蝸牛内 ATP 濃度を 1 日(D1)、7 日(D7) 後共に減少させる傾向を確認した。各グループの数は 8 である。

2) 主たる変化は血管条とラセン靭帯に認められた。血管条では投与 3 時間後には辺縁細胞、中間細胞の萎縮像を認めた。1 日後、14 日後でも改善は認められないが、90 日後では改善した。ラセン靭帯では 3 時間後で線維細胞の萎縮像を認め。更に 1 日後、2 週間後には細胞破壊が進むが、90 日経過すると改善を認めた。外有毛細胞では 2 週間後にミトコンドリアの増殖と不正配列 (細胞周囲に配置されるミトコンドリアが、細胞の中心に集族される所見) を一過性に認めた。ラセン神経節細胞では直後よりミトコンドリアの一過性の膨化像を認めたが 2 週間以降では、ほぼ正常に改善していた。

3) 現在、本結果は未発表データで

あるため詳細を記すことはできないが、内耳エネルギー不全一過性難聴モデルの蝸牛外側壁において、複数のアポトーシス関連因子およびトランスポーター、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素系等の遺伝子発現に動きが見られた。

4) Hsp70 は、一過性難聴モデルでは3時間後には投与前のレベルの25倍以上の mRNA が発現し、1日後には50倍以上となり、3日後にはやや減少して10倍以下のレベルとなった。生食投与群と比較しても有意に上昇していた。一方、不可逆性難聴モデルでは生食投与群と比較して明らかな有意差は認められなかった。免疫組織化学では、3-NPA 投与後1日（一過性難聴モデル）では蝸牛内の特に血管条内血管内皮に強く発現が認められた。コントロールと生食投与モデルでは Hsp70 の明らかな発現は認められなかった。

5) RT-PCR 法による炎症性サイトカインスクリーニングにより、1) 3NP 投与により一部の炎症性サイトカインが発現、2) その発現は TTS 群に強く認められ、対照群と比較すると IL-6, IL-1 α の発現が誘導、3) PTS に至る量の 3NP 投与では逆に炎症性サイトカインの発現は減弱、4) これらの発現は、TTS 群では3時間後よりも

1日後に増強するが、PTS 群では直後のみに強い発現を認め、1日後以降ではむしろ対照群と差を認めないという点が明らかになった。

IL-6 の mRNA を定量では、障害3時間後には、TTS 群（3NP0.3M 投与群）、PTS 群（3NP0.5M 投与群）ともに対照群（生理食塩水投与群）と比べ、対照群と比べ20倍近い発現上昇を認めた。その後 TTS 群では1日後に有意に上昇 ($p < 0.01$) してピークを迎えてから、3日後には低下した ($p < 0.05$) が、他方、PTS 群では3時間後を最大値として低下の一途をたどり、3日後で対照群と同等のレベルに戻った。

6) rt-PCR の結果より、3-NP 投与により小胞体ストレスマーカーとして繁用され、アポトーシスにも深く関与する転写因子 GADD153/CHOP の転写が一過性難聴モデルおよび永続性難聴モデルとともに投与直後より増強されていた。さらに、永続性難聴モデルにおいては、投与3日後にも増強が起きていた。また、小胞体ストレスにより発現の増強を受け、GADD153/CHOP や GADD34 の転写に関与する ATF-4 の転写は3-NP 投与直後に一過性に増強されていた。TM の投与について投与経路や溶媒について検討を行ったところ、TM を

PUREBRIGHT MB-37-50T 溶液に溶解して半規管から投与した結果、TM 投与群では聴力閾値の上昇が起き、投与後 3 日で最大になった。7 日後まで観察を行ったが聴力の回復は見られなかった。対照群には変化が見られなかった。

7) Z-VAD-FMK 投与により低周波数域では術後 1 日目のピークが約 50dB とコントロールと比較して抑制され、また術後 7 日後に術前聴力に回復しており、これもコントロールより早かった。高周波数域では、術後 1 日目に聴力が約 70dB とコントロールと比較して抑制されており、また術後 14 日目にはほぼ術前聴力に回復し、難聴が永久に残存したコントロールと比較して著明な治療効果が認められた。組織学的には、コントロール群では蝸牛基底回転の外側壁の線維細胞に著明な細胞脱落を認めた。一方 Z-VAD-FMK 投与群では、ほとんど細胞脱落を認めず、著明な外側壁線維細胞の保護効果を認めた。

8) 蝸牛組織では、両群ともに聴力の低下に伴いラセン板縁および外側壁の線維細胞に限局的かつ劇的なアポトーシスが観察された。この傷害部周囲の線維細胞が急激に再生していることが同時に確認され聴力もそれに伴い回復していった。このモデルラ

ットの外リンパ液へラット骨髄間葉系幹細胞を移植したところ、約半数のラットにおいて外側壁への生着が確認された。外側壁内には生着せずに外リンパ腔内で骨壁に未分化様の細胞塊を形成するものも見られた。ABR にて聴力回復をモニタリングした結果、3-NP 投与後二週間において 8kHz、20kHz、40kHz とともに聴力回復率が上昇する傾向が見られ、2 週間後の回復率は有意に上昇した。

9) Cx26 の発現は、a.正常側粘膜は、基底層の細胞から染色され全層がほぼ均一、b.下咽頭癌の検体では腫瘍側では正常側と比較して染色が弱く、その他の検体（舌・喉頭・口腔底）では、免疫染色の結果では正常側と腫瘍側とで明らかな差を認めない、c.腫瘍内で Cx26 は点状に染色された。Cx30 の発現は、a.正常側粘膜では基底層の細胞は染色が弱く、有棘層に強く染色、b.喉頭では基底層より強く染色、下咽頭では正常側より腫瘍側で発現が多い、c.腫瘍内で Cx30 は主に細胞膜に染色、d.その他の検体（舌・喉頭・口腔底）では、正常側と腫瘍側との間で差がない。Cx26 および Cx30 の mRNA の発現には、正常組織と腫瘍組織における明らかな傾向はなかった。

今回用いたプラスミドによる遺伝子導入で 50%程度の細胞に遺伝子が

導入された。強制発現した Cx26 蛋白は、大部分は膜へ配置されずに細胞質内に存在した。増殖能については、現時点で検討中であるが、Cx26 導入細胞で増殖能が抑制されている印象があった。

D. 考察

個別の検討ごとの考察を以下に列挙した。

1) 3-NP 投与で蝸牛内の ATP 濃度が低下する傾向と 80dB 程度の難聴を認めたことより、蝸牛内エネルギー欠乏と難聴の関係が更に明らかになったと考えられる。今回残念ながら、有意な差に達しなかったが、その原因としてルシフェリンを用いた ATP 測定方法の感度が十分ではなかった可能性と、3-NP によるミトコンドリア障害が蝸牛全体ではなく一部に限られている可能性が考えられる。

2) 蝸牛外側壁は、血管条とラセン靭帯からなり、蝸牛のリンパ液恒常性維持に重要な役割を果たしているといわれている。つまり、ラセン靭帯線維細胞と血管条の各細胞は Na-K ATPase やイオンチャンネル、イオンポンプにより内外リンパ液の電解質濃度勾配を作り出し、蝸牛内電位 (EP) を保っている。蝸牛内電位は、有毛細胞の興奮のための起電力とな

っており、蝸牛内電位の低下は直ちに聴覚閾値上昇をもたらす。故に本結果に見られる外側壁の著明な障害は単独でも聴覚閾値上昇の原因となりうると考えられ、観察されたラセン靭帯線維細胞と血管条の著明な萎縮像は外側壁での機能障害を現し、蝸牛内電位の低下が聴覚閾値上昇をもたらす病態である可能性が考えられた。

3) 内耳エネルギー不全一過性難聴モデルの蝸牛外側壁におけるアポトーシスには、本結果より得られたアポトーシス関連因子の増減が少なくとも一部関与していると考えられる。さらに、このアポトーシスに向かう経路にはトランスポーター、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素系等の動態が影響している可能性がある。

4) 急性内耳エネルギー不全モデルではミトコンドリアトキシンの投与量により難聴は一過性もしくは不可逆性になる。一過性モデルで難聴が回復していく過程において、蝸牛障害を保護する内因性物質が関係している可能性がある。今回は代表的なストレス応答蛋白である Hsp70 をターゲットにし、蝸牛内の発現を検討した。一過性難聴モデルで投与早期から始まる難聴は、1日後にほぼ聾になり、3日後には回復してくる。その過程に合わせるように Hsp70 の mRNA が増

加・減少した。つまりこの結果は、内耳エネルギー不全による一過性難聴モデルにおいて、内因性の Hsp70 が蝸牛障害を何らかのメカニズムで保護する働きを持つ可能性を示唆させる。一方不可逆性モデルでは難聴は高度のまま回復しない。このモデルにおいては Hsp70 の発現はコントロールに比べて有意に増加はしなかった。このことにより、難聴発症早期に Hsp70 を蝸牛内に投与することができれば、難聴を軽減させる可能性があると思われた。免疫組織化学検査により Hsp70 の蝸牛での局在を検討した。コントロールではほとんど発現は認められないが、一過性難聴モデルでは血管条内の血管内皮に強く発現が認められ、Hsp70 が外側壁の保護に関係していることが示唆された。今後は Hsp70 の蝸牛内投与により不可逆性難聴が改善するかなどを検討する予定である。

5) 生理食塩水投与群と比較して 3NP 投与群では、投与量に関わらず投与 3 時間後というきわめて早期から IL-6 の mRNA 量が上昇した。このことからミトコンドリア障害下で、何らかの未知の経路を介して、IL-6 の転写誘導が生じていることが考えられる。他方、TTS、PTS モデル間で発現量の経過は大きく異なり、TTS モデルでは

1 日後に一旦上昇してから 3 日後には低下するのに対し、PTS モデルでは 1 日、3 日と発現低下の一途をたどった。PTS モデルでは残存細胞の viability の低下により、エネルギー不足で本来産生すべき IL-6 を産生できなくなっている可能性がある。

通常細胞レベルでの IL-6 の発現は一過性のものであることが多い。TTS モデルにおいて IL6 の転写が 1 日後でも維持されていることは、何らかの細胞内もしくは細胞間の情報伝達のクロストークによりネガティブフィードバック機構が抑制されていることによる可能性がある。

IL-6 は下流に JAK2-STAT3 や ERK1,2 といった細胞内情報伝達系が存在し、炎症誘導の他にも、神経細胞保護作用をもたらすことが知られており、IL-6 発現がエネルギー障害を受けた細胞に対して保護的に働いた結果として、聴力障害が抑制された可能性が示唆される。

6) 内耳エネルギー不全モデルでの実験では、ミトコンドリア機能障害により蝸牛外側壁において小胞体ストレス応答が引き起こされている可能性が示された。半規管からの TM 投与の結果から、小胞体ストレスによって聴力低下が起きることが明らかとなった。また TM 投与は半規管から直

接蝸牛内に投与したにもかかわらず、TM 投与における聴力閾値の上昇は3-NP 投与群に比べ緩やかに推移していることから、小胞体ストレスによる聴力低下は緩やかに進行する可能性が示唆された。

7) 今回アポトーシス阻害薬で難聴の治療が可能であったことより、本モデルにおける難聴出現のメカニズムに蝸牛外側壁線維細胞のアポトーシスが強く関与していることが機能面からも示された。一方、組織学的に外側壁船体細胞の変性が消失しているにもかかわらず高音域の聴力改善は不良であったことから、本難聴に外側壁線維細胞以外の組織が関与している可能性が示唆された。

8) 本実験により、このモデルで起こる急性の内耳ミトコンドリア障害は、聴覚受容に直接働く有毛細胞や神経細胞の変化ではなく、内耳リンパ液のイオン組成の維持に重要な働きをする蝸牛線維細胞を中心としたアポトーシスにより高度な聴力低下を誘発し、その後の線維細胞の再生によって聴力回復が起こることが示された。これらは高音域に聴力低下を残す不完全な自己聴力再生であるが、骨髄間葉系幹細胞による再生治療の検討では外側壁への生着が確認され、更に回復率の上昇が見られたことから、今後

の検討により自己回復の困難な症例も含め、新規治療法として応用することが可能であると考えられる。

9) 正常扁平上皮ではCx26は各層でほぼ均一に発現を認めたが、Cx30は基底層では発現が少なかった。また絨毛上皮を持つ喉頭ではCx30は基底層より発現を認めた。増殖の亢進した状態である腫瘍組織ではコネキシンの発現は減少する傾向があった。腫瘍細胞では同じコネキシんでもCx26では細胞質内に点状に存在し、Cx30は細胞膜に存在した。各コネキシン蛋白が増殖に伴う役割が異なる可能性があると考えられた。

腫瘍細胞にCx26を強制発現させた結果はCx26は必ずしも細胞膜に局在せず、大部分が細胞質にあり、臨床検体で見られたCx26の分布と一致していると考えられた。

今後は各コネキシン蛋白の細胞殖への関与のメカニズムについて検討を行い、機能障害の生じた内耳における線維細胞の再生にコネキシンがどのように関わってくるのかを解明していく予定である。

E. 結論

個別の検討ごとの結論を以下に列挙した。

1) ミトコンドリアを障害する

3NPを局所的に投与し、蝸牛内のATP濃度が7日後まで50%程度に減少させる傾向を確認した。この結果よりミトコンドリア障害性難聴において蝸牛内エネルギー欠乏が重要な役割を示しているのではないかと考えられた。

2) 急性内耳エネルギー不全モデルにおける不可逆性閾値上昇は蝸牛外側壁の機能障害が主たる原因で、長期に外側壁の形態学的改善を伴う聴力改善も認めたことより、外側壁の障害が一つの急性感音難聴の病態として非常に重要であると考えられた。

3) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、内耳エネルギー不全後極めて早期(24時間後)の蝸牛外側壁において特徴ある発現動態をしている遺伝子を絞り込むことができた。この中には傷害に関与している可能性のある分子、あるいは保護に作用している可能性のある分子が含まれており、そのバランスが崩れることにより蝸牛外側壁線維細胞がアポトーシスに向かうと考えられる。今後、特定の分子を刺激あるいは阻害するなどして機能的意義を解析する必要がある。それにより得られる結果から内耳エネルギー不全を起因とする突発性難聴の新規治療薬につながる候補分子を絞り込んでいく予定である。

る。

4) 急性内耳エネルギー不全の一過性難聴モデルにてHsp70は蝸牛内、特に血管条内血管内皮で増加するが、不可逆性モデルでは有意な増加はない。よって、Hsp70は内耳エネルギー不全による蝸牛障害を軽減させる働きがあると考えられた。また将来的にHsp70投与により突発性難聴が治療できる可能性が示唆された。

5) 内耳エネルギー不全モデル蝸牛においては、障害早期からIL-1 α 、IL-6といった炎症性サイトカインが発現することが示され、内耳エネルギー不全の病態における炎症反応の関与が示唆された。また、中でもエネルギー不全によって転写誘導されたIL-6が、蝸牛に対して保護的に働いている可能性が示唆された。

6) 内耳エネルギー不全による永続性難聴モデルでの聴力低下と内耳傷害に小胞体ストレス応答が関与している可能性が示唆された。

7) 3-NPによる、急性蝸牛エネルギー不全モデルラットを用い、アポトーシスの阻止により難聴の治療を行った。その結果、著明な聴力改善効果が認められた。組織学的検討から、本治療効果が蝸牛外側壁線維細胞の保護効果によるものであることが解明された。

8) 本研究では内耳エネルギー不全状態では、有毛細胞よりむしろ蝸牛外側壁やらせん板縁の蝸牛線維細胞が起因となって高度難聴が起こることが示され、蝸牛線維細胞の再生を新たなターゲットとして治療法の検討を行う必要があること、半規管からの骨髄間葉系幹細胞の移植による蝸牛線維細胞の補充が有効であることが示された。

9) 頭頸部癌の周囲正常組織に比較し腫瘍組織でのコネキシン蛋白の発現は低下する傾向があると考えられた。また正常組織でもコネキシン蛋白の発現の分布が異なっていた。腫瘍細胞にコネキシン遺伝子を導入し強制発現させた結果、コネキシン蛋白は細胞内に局在し、臨床検体の腫瘍細胞におけるコネキシン蛋白の局在に一致しており、細胞増殖にコネキシン蛋白が関連している可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced

ototoxicity. *Hear Res.* 2004 Dec;198(1-2):137-43.

Yamashita D, Miller JM, Jiang HY, Minami SB, Schacht J. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. *Neuroreport.* 2004 Dec 22;15(18):2719-22.

Minami SB, Yamashita D, Schacht J, Miller JM. Calcineurin activation contributes to noise-induced hearing loss. *J Neurosci Res.* 2004 Nov 1;78(3):383-92.

Hoya N, Okamoto Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T: A novel animal model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. *Neuroreport* 2004;15:1597-1600.

Okamoto Y, Hoya N, Kamiya K, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T: Permanent Threshold Shift Caused by Acute Cochlear Mitochondrial Dysfunction Is Primarily Mediated by Degeneration of the Lateral Wall of the Cochlea. *Audiol Neurootol* 2005;20:220-233.

2.学会発表

Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM. 2005 Creatine Attenuates Noise-Induced Hearing Loss. Abstr Midwinter Meeting Assoc for Res Otolaryngol. New Orleans, LA.

南 修司郎、山下 大介、小川 郁 2005 音響外傷難聴における calcineurin の役割 第 14 回日本耳科学会総会学術講演会 京都

Minami SB, Yamashita D, Schacht J, Miller JM. 2004 FK506 Reduces Noise-Induced Hearing Loss. Abstr Midwinter Meeting Assoc for Res Otolaryngol. Daytona Beach, FL.

Hoya N, Okamoto Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T: Local application of a mitochondrial toxin, 3-Nitropropionic Acid causes dose-dependent ABR threshold shift on rat cochlea: a model for sudden deafness. 2003. Spain.

Okamoto Y, Hoya N, Kamiya K, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T: Degeneration of the fibrocytes in the spiral ligament primarily mediates hearing loss caused by acute

cochlear mitochondrial dysfunction. ARO. Feb 21, 2004. Florida.

保谷則之、岡本康秀、神谷一作、藤井正人、松永達雄：ミトコンドリアトキシン投与によるラット内耳障害：突発性難聴モデルの作成、第 13 回日本耳科学会、2003.10.16、幕張

岡本康秀、保谷則之、神谷一作、藤井正人、小川郁、松永達雄：ミトコンドリアトキシン投与による内耳障害：突発性難聴モデルの組織学的検討、第 13 回日本耳科学会、2003.10.16、幕張

岡本康秀、小川郁、松永達雄：内耳急性エネルギー不全による不可逆性域値上昇(PTS)モデルの長期経過（組織学的変化を中心に）、第 14 回日本耳科学会、2004.10.21、大坂

神谷和作、保谷則之、岡本康秀、新田清一、中川進、藤井正人、松永達雄 演題名：内耳ミトコンドリア機能障害による難聴モデルラットの作成とその難聴の病態解析第 51 回日本実験動物学会総会、長崎市、2004 年 5 月 21 日

Kamiya K, Hoya N, Okamoto Y, Fujinami Y, Komatsuzaki R, Kusano R, Nakagawa S, Fujii M, Matsunaga

T. Regeneration of cochlear
fibrocytes leads to hearing recovery
in a rat model of acute cochlear
mitochondrial dysfunction.5th
Molecular Biology of Hearing and
Deafness, Bethesda, MD, USA,
October 3rd,2004

H. 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む。）
なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

内耳エネルギー不全による突発性難聴モデルにおける
蝸牛内 ATP 濃度測定

研究協力者 南修司郎 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科
主任研究者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター聴覚障害研究室長
分担研究者 小川 郁 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科教授

研究要旨

蝸牛のエネルギー不全が様々な感音性難聴に関わっている事は示唆されている。これまで、我々はミトコンドリア complex II 酵素コハク酸デヒドロゲナーゼ阻害剤である 3-nitropropionic acid (3NP) を局所的に投与し、難聴を起こす事を報告した。今回、3NP による難聴動物モデルを用いて、蝸牛内の ATP 濃度を定量的に測定した。3NP(500mM)をラット中耳正円窓窩に 2 μ l 投与し、80dB 程度の永久的な難聴モデルを作成した。ATP 測定時期は投与 1 日後と 7 日後とした。生食を投与したコントロール群と比べて、3NP 投与群では 50%程度蝸牛内 ATP 濃度を 1 日、7 日後共に減少させる傾向を確認した。この結果より蝸牛内エネルギー欠乏と難聴の関係が更に明らかになったと考えられる。

A. 研究目的

ミトコンドリアの障害は多様な神経疾患、筋疾患、糖尿病など種々の症状の原因となる事が知られているが、感音難聴も様々なミトコンドリア脳筋症に見られる。日本人の原因不明両側性感音難聴の 3%に 3243A→G 変異があり、感音難聴の約 3%に 1555A→G 変異を認めると報告されて

いる。また、老人性難聴においてもミトコンドリアの障害が示唆されている。ミトコンドリアは次のような種々の役割をこなす。ピルビン酸酸化、クレブスサイクル、アミノ酸、脂肪酸、ステロイドの代謝、そして、ミトコンドリアの最も重要な役割は、アデノシン三リン酸 (ATP) としたエネルギーの産生である。本研究は、

エネルギー不全がミトコンドリア障害性難聴の機序として重要であると考え、ミトコンドリア障害性難聴ラットモデルを用い生化学的に蝸牛内の ATP 濃度を測定する。我々は実験動物において独自に開発した方法で、局所的にミトコンドリア阻害剤を投与し、ミトコンドリア障害性難聴を作成する事が可能である。これらを基盤に本研究を推進することにより エネルギー不全、低酸素、難聴の関係を明らかにし、エネルギー貯蔵促進剤などの新しい難聴の治療の安全性、科学性、倫理性の確立することを成果とする。

B. 研究方法

1. ミトコンドリア障害性難聴モデルラットの作製

既に疾患モデルとして確立されているミトコンドリア障害性難聴モデルラットを作製する。内耳内ミトコンドリアを障害し難聴を誘導するために complex II 酵素コハク酸デヒドロゲナーゼ阻害剤である 3-nitropropionic acid (3-NP) を局所的に投与する。500 μ M 3-NP 又は生食

を鼓室正円窓窩に 2 μ l 投与した

2. ATP 測定

4つのグループに分けて、ATP 測定を行った。生食投与後 1 日目、7 日目、3-NP 投与後 1 日目、7 日目である。ラットをケタミン (100mg/kg)、キシラジン (10mg/kg) に麻酔、断頭し蝸牛を取り出した。150 μ l の RIPA バッファーに左右の全蝸牛をいれホモジナイズし、10000g で 15 分遠心して得られた上澄み液を ATP 測定に使用した。ATP 定量は Sigma 社の ATP bioluminescent assay kit とルミノメーターを用いた。ATP とルシフェリンを反応させ(下図参照)、その発光量をルミノメーターで測定した。

(倫理面への配慮) 全ての処置に置いて動物に苦痛を与えないよう配慮し国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行なった。

