

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

研究協力者	新田清一	済生会宇都宮病院耳鼻咽喉科医長
研究協力者	南修司郎	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科
研究協力者	神谷和作	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	藤波義明	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚・平衡覚研究部長
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

ミトコンドリア障害難聴モデル（一過性難聴モデル・不可逆性難聴モデル）の蝸牛における Hsp70 の発現について mRNA レベル、蛋白レベルで検討した。Real time PCR 法による Hsp70 の定量では一過性難聴モデルにおいて3時間後より上昇し、1日後では強く発現を認め、3日後には再び減少した。不可逆性難聴モデルではいずれの時間も有意な発現は認められなかった。また免疫組織化学検査では、一過性難聴モデルの1日後において血管条ないの特定の細胞に強く発現が認められた。このモデルの難聴は1日後より回復に向かうことから考えると、Hsp70 はミトコンドリアトキシンによる障害から蝸牛を保護し、その働きを正常化させることに寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

突発性難聴は臨床でよくみかける疾患であるが、時にその治療に難渋する。またそのメカニズムは明らかにな

っていない。我々はそのメカニズム解明のために、既にミトコンドリアトキシンを用いた内耳ミトコンドリア障害による難聴モデルの作成に成功し、

電子顕微鏡所見を含めた組織学的な検討も行った。今回は突発性難聴の治療を念頭に置き、蝸牛における分子レベルでのメカニズム解明を目的とした。特にストレスに対する保護物質といわれている Hsp70 の発現を一過性難聴モデルと不可逆性難聴モデルにおいて検討した。

## B. 研究方法

動物は Sprague-Dawley Rat (体重 180~210g ; 8~10 週令) を用いた。ミトコンドリアトキシゲン : 3-nitropropionic acid (3-NPA) を正円窓窩に局所投与し、その投与量により、一過性難聴モデル・不可逆性難聴モデルを作成した。モデル動物を解剖し、蝸牛のみ摘出して一検体とした。摘出

した蝸牛より AGPC 法を用いて RNA を抽出した後、逆転写酵素により cDNA を作成した。作成した cDNA を用いて、Hsp70 について real time PCR 法を用いて定量した。

対象検体は投与前 (con)、一過性難聴モデルの 3-NPA 投与後 3 時間 (3h)、3-NPA 投与後 1 日 (1d)、3-NPA 投与後 3 日 (3d)、不可逆性難聴モデルの 3-NPA 投与後 3 時間 (3hP)、3-NPA 投与後 1 日 (1dP)、3-NPA 投与後 3 日 (3dP)、生理食塩水投与後 3 時間 (3hC)、生理食塩水投与後 1 日 (1dC)、生理食塩水投与後 3 日 (3dC) の蝸牛をそれぞれ 4 耳ずつ用いた。

また免疫組織化学的手法を用いて、Hsp70 の蝸牛内での局在を検出した。

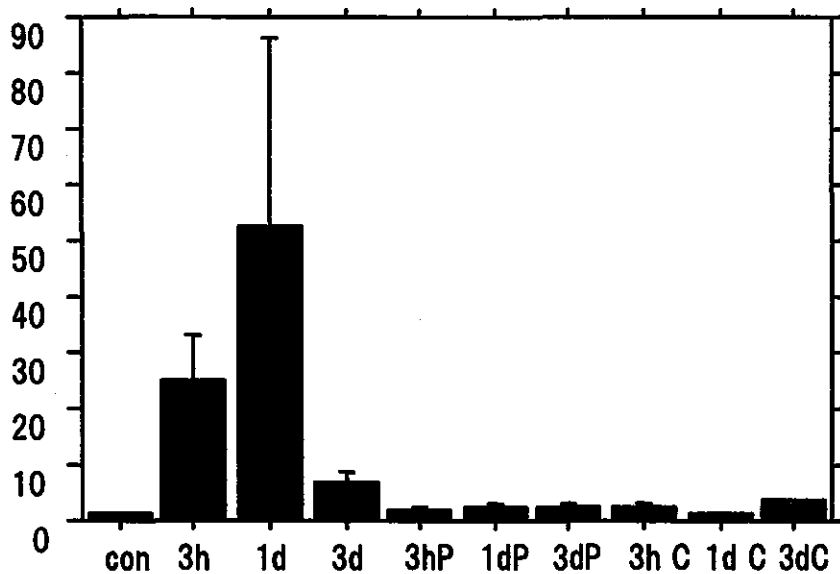


図 real time PCR 結果 (Hsp70)

投与前 (コントロール)、3-NPA 投与後 1 日 (1d) (一過性難聴モデル)、生理食塩水投与後 1 日 (1dC) の蝸牛切片において検討した。

なお動物実験に際しては、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った。

## C. 結果

### 1. Real time PCR (図)

Hsp70 について、real time PCR 法で定量を試みた。結果を図に示した。縦軸は投与前の検体 (con) を 1 とした各検体の定量値の比である。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。

### 2. 免疫組織化学

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が、3-NPA 投与後 1 日 (1d) (一過性難聴モデル) では蝸牛内の特に血管条内の特定の細胞に強く発現が認められた。

## D. 考察

今回突発性難聴のモデルとして、ミトコンドリアトキシン投与による急性ミトコンドリア傷害難聴モデルを用いた。本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作用している可能性があるため、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 日後にはほぼ ABR による聴覚検査でスケールアウトになり、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あるいは、蝸牛内における Hsp70 の発現を増強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結果、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に強く発現が認められた。このことより、血管条内の特定の細胞より分泌された Hsp70 が蝸牛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。

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### E. 結論

一過性難聴モデルにて Hsp70 は蝸牛内、特に血管条で増加するが、不可逆性モデルでは有意な増加はない。本結果は Hsp70 が内耳エネルギー不全による蝸牛障害の軽減に働く可能性を示唆している。また将来的に Hsp70 投与あるいは発現の誘導により突発性難聴の治療に応用できる可能性が考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

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  
蝸牛内炎症・免疫応答に関する検討

研究協力者 藤岡正人 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  
分担研究員 小川 郁 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科教授

研究要旨

内耳エネルギー不全モデル蝸牛における炎症性サイトカインの発現を検討した。3NP 投与により mRNA レベルで IL-6, IL-1 $\alpha$  の発現が誘導される可能性が示された。定量 RT-PCR 法によって IL-6 の発現量を検討したところ、障害 3 時間後には TTS 群、PTS 群ともにきわめて高い発現上昇を認めた後、TTS 群では 1 日後に有意に上昇してピークを迎えてから 3 日後には低下したが、PTS 群では 3 時間後を最大値として低下の一途をたどった。我々の実験結果は、エネルギー不全状態に陥った蝸牛において IL-6 が何らかの調節機構を介した転写誘導をうける可能性を示唆している。また TTS モデルにおける発現のほうが高いことから、その作用は当該モデルにおいては蝸牛を防御する方向に働くと考えられる。今後、エネルギー蝸牛における炎症反応に関する更なる検討を進めていく方針である。

A. 研究目的

炎症反応は臓器を超えて普遍的に存在する生体防御に必須の生理的応答である。しかし、過度の炎症は逆に生体にとって有害な場合が多く、種々の炎症性疾患の原因となることが知られている。炎症反応を惹起する障害は多岐にわたり、免疫疾患や虚血から

外傷にまで及ぶ。蝸牛における炎症反応の基礎的検討はいまだその知見に乏しいが、実験的内耳炎で、炎症性サイトカインの発現とそれに遅れる炎症細胞浸潤が報告されている。

一般診療における突発性難聴の治療には複数の薬剤が用いられるが、なかでもステロイドホルモンを用いた

治療は広く受け入れられており、局所投与で著しく効果を上げるとの報告もある。このことから考えて、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。他方、我々の用いている3NPを用いた内耳エネルギー不全モデルは、その症状推移から突発性難聴の動物モデルになりうると考えられており、この意味で、当モデルにおける炎症反応・局所免疫応答の病態解析は、突発性難聴の新規治療法を探索するひとつの大きなブレイクスルーとなる可能性がある。

当該研究の目的は、内耳エネルギー不全モデルにおける蝸牛内炎症・免疫応答の関与を検討し、それを通して突発性難聴の病態生理における炎症反応・免疫応答の関与を推察・理解すると同時に新規治療の標的を探索することにある。

## B. 研究方法

以上の背景に基づき、今年度、我々は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。

### 1) RT-PCR法を用いた炎症性サイトカインのスクリーニング

本報告書における新田らの方法と同じ方法でPTSモデルとTTSモデルとで、RT-PCR法により経済的に蝸牛における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、38サイクルでPCR法を施行した。

### 2) 定量RT-PCR法を用いたIL-6 mRNAの発現量の測定

前項の実験結果(後述)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。

すべての動物実験は、国立病院機構東京医療センター動物実験指針、および慶應義塾大学医学部動物実験指針に準じて行った。

### C. 研究結果

1) RT-PCR 法による炎症性サイトカインスクリーニング

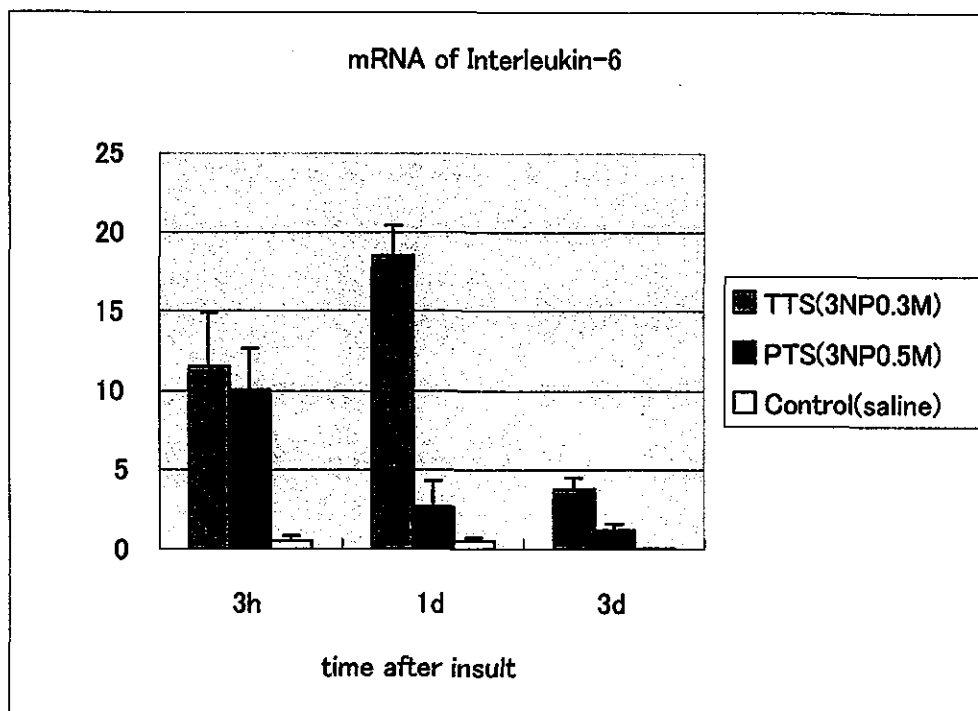
PTS 群 (3NP0.5M 投与群) では 3 時間後に IL-6 を、1,3 日後に一部の個体で IL-1 $\beta$  を認めた。これに対し TTS 群 (3NP0.3M 投与群) では IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の発現を認め、とくに 1 日後に著名であった。他方、対照群 (生理食塩水投与群) においても、1,3 日後に IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の発現を若干認め、薬剤投与の際に巧みな手術の影響と思われた。

以上より、1) 3NP 投与により一部の炎症性サイトカインが発現した。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 $\alpha$  の発現が顕著に誘導されていた。3) PTS 群では逆に炎症性サイトカインの発

現は減弱した。4) これらの発現は、TTS 群では 3 時間後よりも 1 日後に増強するのに対し、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。この四点が明らかになった。

2) 定量 RT-PCR による IL-6 mRNA 発現量の変化

以上の結果に基づいて我々は引き続き、薬剤投与後 3 時間、1 日、3 日後の 3 点で IL-6 の mRNA を定量した。結果を下図に示す。障害 3 時間後には、TTS 群 (3NP0.3M 投与群)、PTS 群 (3NP0.5M 投与群) とともに対照群 (生理食塩水投与群) 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。

#### D. 考察

過去の報告によると、蝸牛外側壁の線維細胞は培養条件下で TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  といった障害早期に発現する炎症性サイトカインの刺激に応じて量依存的に IL-6 を産生することが明らかになっている。昨今の研究から音響外傷蝸牛において外側壁線維細胞における局所炎症の存在が示唆されているが、我々もこれまでに、音響外傷蝸牛において外側壁線維細胞に IL-1 $\beta$  や IL-6 が発現することを確認している。他方、今回我々が検討したミトコンドリア障害による内耳エネルギー不全モデルにおいては、障害が外側壁線維細胞に極めて強いことが確認されており、当実験で IL-6, IL-1 $\alpha$  といった炎症性サイトカインが発現したことも、蝸牛外側壁での産生による可能性が考えられる。今後免疫組織染色による局在の検討していく予定である。

TTS,PTS モデルによって IL-6 の発現量はとその推移パターンは大きく異なったが、この現象にはいくつかの解釈（仮説）が考えられ、今後の検討課題と思われる。

1) IL-6 産生細胞の *viability* を反映している可能性

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。TTS,PTS モデルの主な組織学的差異は外側壁の細胞の、残存状態に集約される。すなわち PTS モデルのほうが残存細胞数は少なく、また生存した細胞の *viability* も TTS モデルと比べて低いことが想定される。以上の事項と遺伝子転写にエネルギーを要することを考え合わせると、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。

2) 炎症関連遺伝子群のクロストークによる負の転写制御の変化

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。これは IL-6 の下流に SOCS3 などの遺伝子



が存在し、IL-6 のレセプターレベルで強力なネガティブフィードバックをかけているためである。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。

### 3) IL-6 の発現量による細胞死抑制の可能性

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いる。実際、*In vivo* においても脳虚血モデルで IL-6 の阻害により梗塞面積が悪化することが知られている。このことと考え合わせると、3NP0.5mM 投与 (PTS モデル) よりも 3NP0.3mM 投与 (TTS モデル) で IL-6 発現が極めて高かったことから、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。

## E. 結論

我々の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 $\alpha$ , 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

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 IL-6 は聴力悪化度の小さい群でむしろ発現量が多いことが判明した。このことから、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。今後、突発性難聴患者への臨床応用に向け、エネルギー障害内耳における IL-6 の機能に関するいっそうの検討が必要と考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究協力者	藤波義明	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	神谷和作	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚・平衡覚研究部長
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

当研究室で作成した内耳エネルギー不全モデル動物を用いた結果より、急性内耳エネルギー不全により起こる高度難聴での主な傷害部位は蝸牛外側壁線維細胞であることが判明している。これまでの当研究室の研究結果から蝸牛外側壁線維細胞の細胞死はアポトーシスであることが明らかとなっている。また近年、多くの細胞でエネルギー不全によるアポトーシスにおいて小胞体ストレスの関与が明らかとなっている。そこで、本研究では蝸牛外側壁のアポトーシスに対する小胞体ストレスの関与について検討を行った。内耳エネルギー不全モデル動物の蝸牛外側壁第二回転部分を採取し、total RNAを抽出した後cDNAとした。これについて半定量的reverse transcription PCRを行った結果、GADD153/CHOPおよびATF-4の転写に増強が見られた。この結果からエネルギー不全により内耳に小胞体ストレス応答が起きている可能性があると考えられた。また、内耳に小胞体ストレス誘導剤であるtunicamycinを投与した結果、聴力閾値の上昇が観察され、現在のところ聴力の回復は見られていない。これより、小胞体ストレスにより難聴が起きることが明らかとなった。

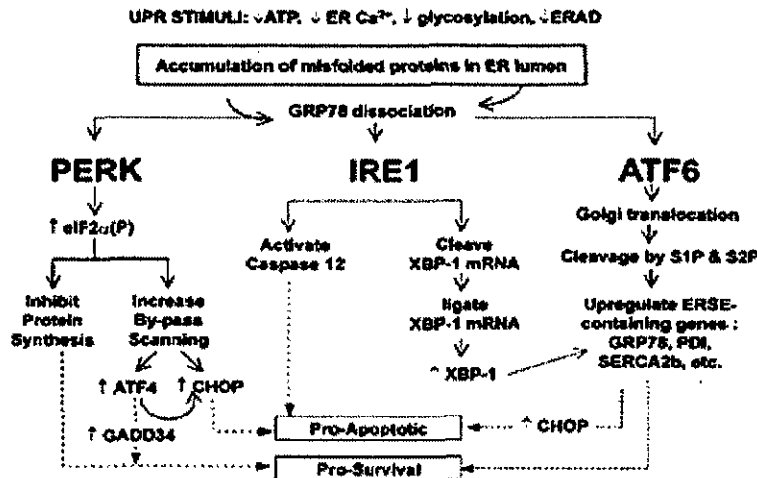
## A. 研究目的

突発性難聴は、日本で年間 25,000 人が発症する比較的発症頻度の高い内耳性難聴である。しかしながら、いまだその病態は原因が解明されていない。現在では、内耳循環障害とウイルス感染の二種類の可能性が考えられている。しかし、突発性難聴発症の際にウイルス感染を起こしていたとしても原因としては蝸牛内毛細血管内皮細胞の腫脹による内耳循環障害である可能性が指摘されている。当研究室で作成した内耳エネルギー不全モデル動物を用いた結果より、急性内耳エネルギー不全により起こる高度難聴での主な傷害部位は蝸牛外側壁線維細胞であることが判明している。これまでの当研究室の研究成果から蝸牛外側壁線維細胞の細胞死はアポトーシスであることが明らかとなっている。

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。そして、小胞体内に留められているタンパク質は折りたたみを修正されて活性を得るかあるいはユビキチン化され分解される運

命をたどる。小胞体ストレス応答現象には大きく分けて新規タンパク質の合成停止、不完全タンパク質の再折りたたみ、細胞死の誘発がある。前者 2 つは小胞体の恒常性維持に働く。新規タンパク質の合成停止により不良タンパク質の蓄積を抑制し、Bip 等の分子シャペロンにより不良タンパク質の再折りたたみを行って細胞を生存させる働きを担う。それと同時に CHOP と呼ばれるアポトーシスに参与する転写因子の発現や小胞体に特異的な Caspase-12 の活性化が起き、細胞はアポトーシスに向かう。小胞体ストレス応答時の Survival と Death シグナルのバランスのより細胞の生死が決定される。

## Diagram of the UPR network



*Journal of Neurochemistry*, 2004, 91, 1-9

本研究は、内耳エネルギー不全による難聴の病態メカニズムを解明し、新規治療薬開発のためのターゲット因子の発見や新規治療法の開発に貢献することを目的として、まずは内耳エネルギー不全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析を行った。

### B. 研究方法

1) 6-8週齢SDラット雄の内耳蝸牛正円窓窩にミトコンドリア電子伝達系酵素サブユニットII阻害剤である3-nitropropionic acid (3-NP)を投与し一過性難聴モデル(0.9 μmoles投与)および永続性難聴モデル(1.5 μmoles投与)を作成した。作成した

両モデルラットについて、聴力閾値をABR(聴性脳幹反応)により経時的に測定した。各時間経過後に蝸牛外側壁第二回転を採取し、Trizolを用いてtotal RNAを抽出した。各サンプルをorigo(dT)プライマーを用いて逆転写反応を行いcDNAにした。これらのサンプルについて、小胞体ストレスに関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および両モデルの比較を行った。転写量の寡多については輝度測定を行い、数値化した。

2) 6-8週齢SDラット雄の内耳蝸牛正円窓窩あるいは半規管から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

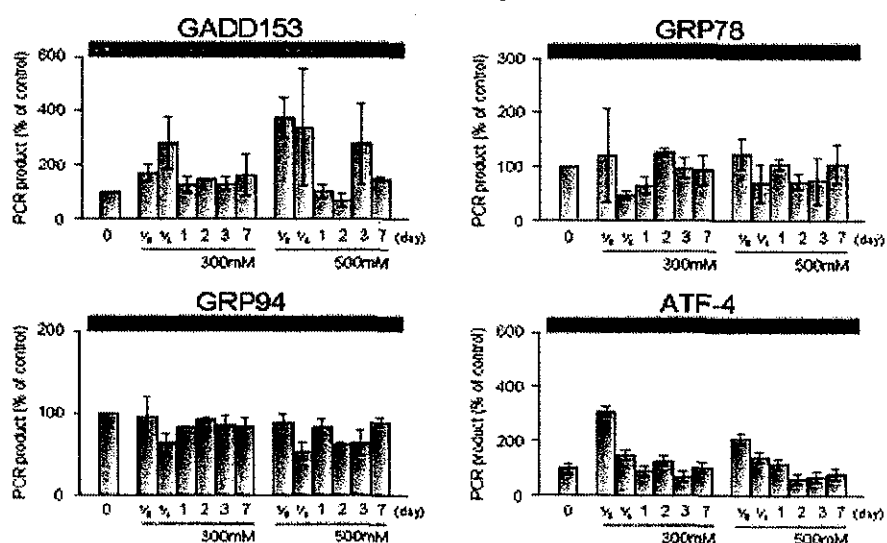
トレスを惹起させ、聴力閾値の推移を ABR にて測定した。その後は 4% パラホルムアルデヒドで還流固定を行い、蝸牛を採取し EDTA による脱灰を行った後、パラフィンにて包埋した。なお、本研究では動物実験を行うにあたり、倫理面に配慮し「大学等における動物実験について(昭和 62 年 5 月 25 日 文部省国際学術局長通知 文学情第 141 号)」および「国立病院機構 東京医療センター動物実験指針」を遵守して進めた。

### C. 研究結果

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。しかし、GADD153/CHOP と同様に小胞体ストレスマーカーとして繁用される小胞体内分子シャペロン GRP78/Bip および GRP94 については軽度の減少は認められるものの、ほとんど変化が見られなかった。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。

## Reverse Transcription-PCR



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、対照群には変化が見られない条件が確立された。聴力閾値の上昇は投与後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。

#### D. 考察

内耳エネルギー不全モデルでの実験では、一部の小胞体ストレスマーカー遺伝子が陽性ではないため断定することはできないが、ミトコンドリア機能阻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。

TM処置について、まず投与経路の検討を行った結果、正円窓窩からの投与ではTMは膜透過をしないことがわかった。次にDMSOを溶媒とした半規管からの投与では、DMSOが内耳細胞を傷害する可能性が示唆された。そこで、溶媒をPUREBRIGHT MB-37-50T溶液に変更しての半規管からの投与の結果から、TMによって聴力低下が起きることが明らかとなった。また、3-NP投与は膜透過を通じて蝸牛内に移行するのに対し、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。この結果は、永続性難聴モデルでGADD153/CHOPの転写は二相性に増加しており、一相目ではミトコンドリアとのクロストークによるものだと考えられる。そして、二相目の転写増強には小胞体ストレスが単独で関与している可能性が考えられる。

TM投与による難聴で傷害を受けている部位を観察するため、TM投与7日後の組織標本を作成し、検討中である。また、長期の聴力閾値の推移および傷害部位の観察を行うため、あるいは投与量を変化させての聴力閾値の推移および傷害部位の観察を行うためにTM投与ラットを作成し、経過観察中である。今後は、傷害部位を特定した後に生化学的・分子生物学的手法を用いて解析を行う予定である。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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  
アポトーシス阻止による実験的難聴治療

研究協力者 水足邦雄 国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科  
研究協力者 神谷和作 国立病院機構東京医療センター  
臨床研究センター研究員  
分担研究者 藤井正人 国立病院機構東京医療センター  
臨床研究センター聴覚・平衡覚研究部長  
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

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い、その効果について検討した。アポトーシスの阻害にはカスパーゼ阻害薬である Z-VAD-FMK を用いた。その結果、低音部では著明な聴力改善効果が見られたが、高音部では難聴が残存した。一方組織学的には、蝸牛外側壁線維細胞の保護効果が見られた。

A. 研究目的

これまで、当研究部において 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を作成し、突発性難聴のモデル動物として病態解明を行ってきた。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唆されているが、今回はアポトーシス障害的による難聴の治療効果につい

て検討した。

B. 研究方法

Sprague-Dawleyラット（6週齢、雄）を用いて実験を行った。3-NPの投与はこれまでの報告通り、全身麻酔下に耳後部切開をおき中耳骨胞を開放、正円窓窩を明視化におき同部に3-NPをマイクロチューブにて300mM, 2 $\mu$ l局所投与した。投与後ゼラチンスポンジにて固定をして縫合

した。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。

#### (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。

#### C. 研究結果

実際の聴力データを図1~2に示した。8kHzにおいて、コントロール群では3-NP投与2時間後に約50dBの難聴を生じ、1日後に約70dBでピークとなる。また、その後徐々に聴力は回復し21日後にはほぼ術前聴力に回復する。一方Z-VAD-FMK投与群では、術後1日目のピークが約50dBと抑制されており、また術後7日後に術前聴力に回復する。20kHzでは、コントロ

ール群は術後2時間で約70の難聴となり術後1日目に約85dBとピークとなる。その後緩やかに回復するが、術後28日でも約55dBの難聴が残存する。一方Z-VAD-FMK投与群では、術後1日目に聴力が約70dBと抑制されており、また術後14日目にはほぼ術前聴力に回復し、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。

#### D. 考察

本モデルでは、これまでの研究で蝸牛外側壁の線維細胞がアポトーシスをきたすことが組織学的検討により示されていたが、今回のカスパーゼ障害薬を用いた実験で難聴の治療が可能であり、外側壁の細胞死を防ぐことができたことより、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、より明確となった。一方、本治療に対して高音域の聴力改善は不良であり、対応する基底回転のコルチ器の障害が改善できなかったことから、本難聴に外側壁線維細胞以外にコルチ器などの傷害が関与し



ている可能性が示唆された。

### E. 結論

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、低音部では著明な聴力改善が見られたが、高音部では難聴が残存した。一方組織学的には、前回蝸牛外側壁線維細胞の保護効果が見られた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1

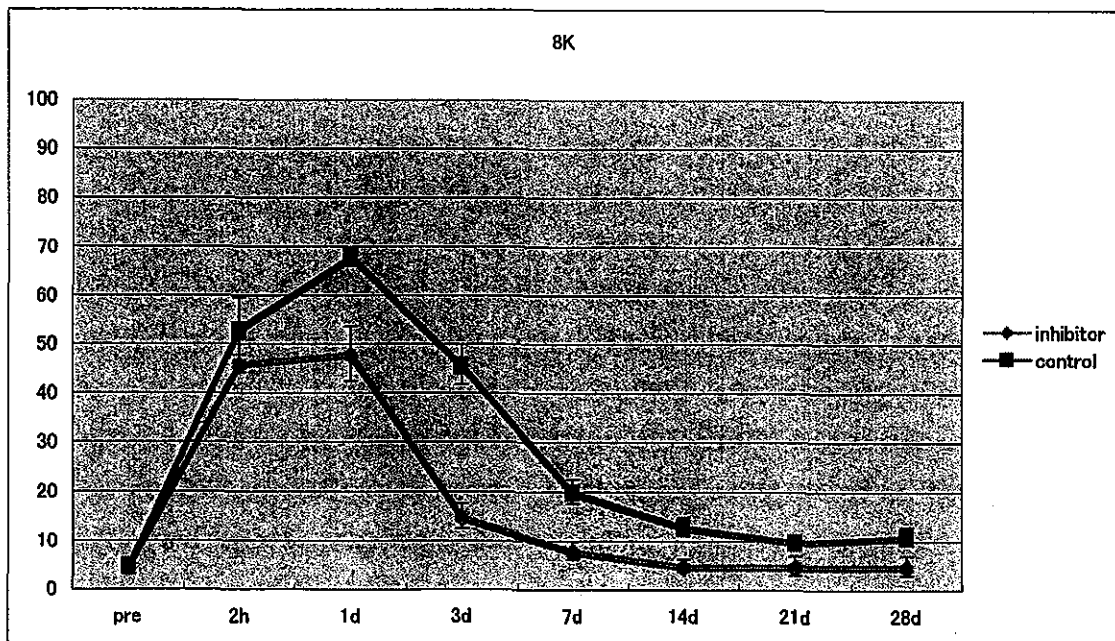
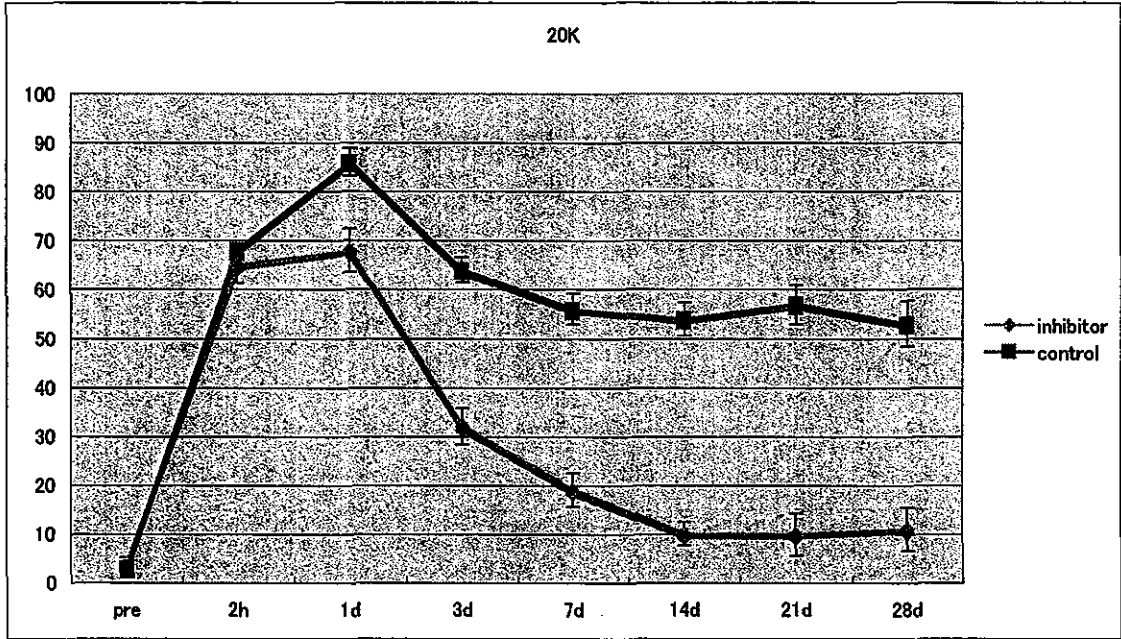


图 2



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  
聴力回復メカニズムの解析と幹細胞治療

研究協力者	神谷和作	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	藤波義明	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚・平衡覚研究部長
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

本研究では内耳エネルギー不全モデル（聴力回復モデル）を用いて、内耳組織における聴力回復メカニズムを解析した。その結果このモデルに起こる高度難聴は当初予想されていた有毛細胞の傷害ではなく、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た。これらの傷害部は周囲の線維細胞が急激に再生することにより修復されており、これにより内リンパ液のカリウムイオン濃度が正常化し、聴力が回復すると考えられる。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、更なる改善を目指し、骨髄間葉系幹細胞を用いた再生治療法の検討を行った。その結果、蝸牛外側壁内部に同細胞を生着させ、二週間後の聴力回復率を有意に上昇させることに成功した。

A. 研究目的

哺乳類の内耳蝸牛では聴覚刺激受容のために多くのエネルギーを消費する。特に蝸牛外側壁が中心的に機能するカリウム輸送システムは内リン

パ液を高カリウムイオン状態に保ち、有毛細胞での脱分極を誘発するために必須のシステムであり、多くの ATP を必要とする。

本研究では突発性難聴症例と類似

した聴力低下と回復過程を示す内耳ミトコンドリア機能障害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新規治療法の検討を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 内耳エネルギー不全モデル

SDラット8-10週齢の蝸牛正円窓下に0.3Mの3-NPを3 $\mu$ l滴下し、投与後の聴力をABR(聴性脳幹反応)によりモニタリングした。投与後の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。

### 骨髄間葉系幹細胞の内耳への移植

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 $1 \times 10^4$ 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。これらは国立病院機構東京医療センター実験動物指針を遵守して行なった。

## C. 研究結果

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。頂回転、中回転の有毛細胞の変性は見られなかった

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。

## D. 考察

本実験により、このモデルで見られる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