

200500611A

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

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

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松永 達雄

平成18（2006）年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 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 1  
松永達雄

### II. 分担研究報告

1. 内耳ミトコンドリア機能不全による蝸牛外側壁の細胞死に小胞体ストレスが 9  
関与した  
藤波 義明、神谷 和作、藤井 正人、松永 達雄
2. 内耳エネルギー不全モデルにおける蝸牛内炎症・免疫応答に関する検討 14  
藤岡 正人、松永 達雄、小川 郁
3. 急性蝸牛エネルギー不全におけるカスパーゼ阻害薬による難聴阻止効果 18  
水足 邦雄、藤井 正人、松永 達雄
4. 内耳エネルギー不全モデルによる突発性難聴モデルに対するアポトーシス阻 22  
害剤の内耳保護効果  
瀧口 洋一郎、松永 達雄、小川 郁
5. 急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞特異的变化 25  
水足 邦雄、藤井 正人、松永 達雄
6. 骨髄間葉系幹細胞の移植による蝸牛の機能的再構築に関する研究 28  
孫 廣煒、幸池 浩子、松永 達雄
7. 蝸牛外側壁線維細胞 in vitro 培養系を用いた 2 型線維細胞の増殖分化に関する 32  
研究  
務台 英樹、松永 達雄
8. 成熟マウス・蝸牛外側壁線維細胞のタイプ別細胞分離法の確立 34  
幸池 浩子、務台 英樹、孫 廣煒、松永 達雄

9. 哺乳類蝸牛上皮に存在する有毛細胞前駆細胞の性状解析 務台 英樹、松永 達雄	38
---	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	40
---------------------	----

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

突発性難聴は国内で年間約 25000 人発症と頻度の高い高度の内耳性難聴であり、その病態は不明で、難聴は永続性となる場合も多く、永続性難聴に対しては現在有効な治療法がない。本研究は世界で初めて我々が開発した突発性難聴の臨床症状と類似した動物モデルを用いて、病態を分子レベルから解明し、それに基づいて新規の治療法を開発することを目的としている。我々は、前年度までの研究から、内耳急性エネルギー不全による難聴の発症と回復が、蝸牛線維細胞のアポトーシスと再生により生じていること、その病態としてカスパーゼ、シャペロン分子、炎症系サイトカイン、小胞体ストレス関連分子の関与を解明した。本年度の研究では、以上の病態における詳細な関連分子の動態を解明し、本モデルの平衡障害の病態が有毛細胞の傷害、特に不動毛の傷害から生じることも解明した。以上の成果は、これまで技術的問題から分子レベルの研究に適したラット、マウスの突発性難聴モデルがなかったため不明であった急性内耳エネルギー不全の細胞・分子レベルの病態を初めて解明した成果であり、今後の突発性難聴に対する治療法開発の基礎となる意義がある。本成果に基づいた治療法の研究としては、本モデル動物へのカスパーゼ阻害薬の全身投与による蝸牛線維細胞の細胞死阻止と有意な聴覚回復促進の成功、内耳への骨髄間葉系幹細胞移植による蝸牛外側壁の組織再構築と有意な聴覚回復促進効果に成功した。カスパーゼ阻害薬の投与は急性期の突発性難聴患者に対する臨床応用が近い成果であり、骨髄間葉系幹細胞移植は慢性化した突発性難聴患者に対する新規治療法として期待できる成果である。また、蝸牛線維細胞の培養実験系が確立され、本細胞を用いた各種の細胞アッセイが可能となり、従来未知であった蝸牛線維細胞の分化誘導因子の同定が進んだ。これにより今後、未分化線維細胞の分化誘導等の新たな治療法開発の可能性が開けた。最終年度は、以上の成果に基づいて薬剤と細胞移植の併用効果の検討を中心としたより効果的な治療法の開発を進める。

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

分担研究者 小川 郁  
慶応義塾大学医学部  
耳鼻咽喉科学教室教授

## A. 研究目的

突発性難聴は発症頻度が比較的高く（国内で年間約 25000 人発症）、50-60 歳台をピークとして小児まで発症する難聴である。難聴により人と人とのコミュニケーションが困難となるため、社会全体に与える影響も大きい疾患である。その病態は不明であり、高度の内耳性難聴から徐々に回復する場合もあるが、持続する確率が高く、発症後 1 ヶ月を過ぎて回復しない場合には永続性難聴となり、有効な治療法がない。本症では平衡障害を合併する頻度も高く、日常生活をより困難としている。原因は不明であるが、内耳循環障害とウイルス感染が原因の場合が多いと考えられている。またウイルス感染の場合でも蝸牛内毛細血管の内皮細胞腫張から結果的に内耳循環障害から難聴を生じている可能性が指摘されている。今日まで、突発性難聴の有効な治療法が開発できなかった主たる理由は、直接患者の内耳を採取できないこと、および動物モデルがなかったことから、その病態が不明であった点が上げられる。

本研究の目的は、我々の施設で世界で初めて開発した突発性難聴モデル動物としての急性内耳エネルギー不全ラットを用いた

解析によって、これまで不明であった本症による聴覚・平衡覚障害の病態を分子レベルから初めて解明するとともに、その結果に基づいて薬剤治療、遺伝子治療、蛋白質・ペプチド治療、細胞治療を組み合わせた有効な治療法を新規に開発することである。特に急性内耳エネルギー不全では蝸牛外側壁（血管条とラセン靭帯）の障害が主体であることが、本モデル動物の検討から明らかになったことから、治療法開発の標的を蝸牛外側壁の保護、修復、再生とした。

具体的にはまず急性期治療法として、蝸牛外側壁傷害を抑制する分子機構を同定し、そこに作用する治療法を開発することにより難聴発症後の初期障害を少しでも抑制する。さらに慢性期治療法として、失われた蝸牛線維細胞の再生の分子機構を解明してその再生を促進する薬剤治療法を開発するとともに、倫理的な制約が低く安全性が高い自己骨髄間葉系幹細胞の移植を効果的に行なう方法を開発する。最終的に、以上の治療法を組み合わせる最も効果の高い治療法を開発する。

## B. 研究方法

研究方法の概略を順に以下に記した。詳細は分担研究報告書を参照。

- 1) 急性内耳エネルギー不全モデル動物において、経時的に小胞体ストレス関連因子のリアルタイム PCR による定量、免疫組織化学による局在、TUNEL assay によるアポトーシスとの関係を検討した。
- 2) 急性内耳エネルギー不全モデル動物において、蝸牛外側壁での炎症系サイトカイ

- ンファミリーの経時的発現の RTPCR によるスクリーニング、リアルタイム PCR による定量的解析、活性型マクロファージと汎炎症系細胞のマーカーも含めた免疫組織化学による局在解析を行った。
- 3) 急性内耳エネルギー不全モデル動物において、アポトーシス阻害剤であるカスパーゼインヒビターの予防的腹腔投与による、難聴予防効果、組織障害抑制効果、アポトーシス阻害効果を検討した。
  - 4) 急性内耳エネルギー不全モデル動物において、実際の臨床に即した治療としての障害後の経静脈的アポトーシス阻害剤投与による聴覚改善効果を検討した。
  - 5) 急性内耳エネルギー不全モデル動物の平衡障害の病態を解明するための、3NP 投与後の経時的な自発眼振およびカロリック刺激に対する反応の解析、姿勢および歩行の動態解析、前庭内耳の組織学的解析を行った。
  - 6) 成熟マウス蝸牛の外側壁線維細胞と骨髄間葉系幹細胞との共培養による、相互の分化および増殖に与える影響を、分化特異的マーカーに対する免疫組織化学、細胞数カウント、形態観察により検討した。
  - 7) 分散培養した幼弱ラット蝸牛外側壁線維細胞の 2 型成熟蝸牛線維細胞への分化誘導法を、分化特異的マーカー NKCC1、NaKATPase beta1 の発現を指標として検討した。
  - 8) 成熟ラット蝸牛外側壁線維細胞における、
    - i) 幹細胞様の性質を持つ細胞の存在、
    - ii) エネルギー不全による傷害の薬剤治療法開発を目的として、本細胞の初代、分散培養法を検討した。
  - 9) 成熟ラット有毛細胞の再生を目的として、蝸牛感覚上皮細胞の増殖能およびその制御メカニズムを解明するために、新生ラット蝸牛感覚上皮細胞の培養系を用いて幹細胞としての性質を otoshpere 形成能を指標として検討した。
- (倫理面への配慮)
- 本研究では、動物実験を行なうため、「ヘルシンキ宣言」、「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）」、「国立病院機構東京医療センター動物実験指針」を遵守して進める。すなわち人類の知的基盤、健康、福祉へ貢献する社会的に有益な研究の実施、本指針に基づく研究計画の作成、遵守及び事前の倫理審査委員会の審査・承認による研究の適正性の確保、研究の実施状況の第三者による調査と研究結果の公表を通じた研究の透明性の確保に関して、十分に注意を払いながら実施する。実験を行なう際には、衛生的な環境での飼育、適切な栄養、苦痛を最小限とするために十分麻酔をかけてからの絶命といった動物愛護上の配慮をする。以上の徹底により倫理面での問題がないと判断する。本研究は、事前に国立病院機構東京医療センター動物実験委員会の審査、承認による研究の適正性の確保を得て実施する。

### C. 研究結果

研究結果の概略を、方法の各項目に対応させて順に以下に記した。詳細は分担研究報告書を参照。

- 1) 16 年度に行った半定量的 reverse transcription PCR の結果、転写増強の見られた C/EBP homologous protein (CHOP) および Activating transcription factor-4 (ATF-4) について定量的 Real-Time PCR を行った結果、3-nitropropionic acid (3-NP) 投与直後に両分子が有意に上昇していた。続いて、組織切片上で小胞体ストレス由来のアポトーシスに関連する CHOP の発現を見たところ、傷害部位に局在が認められた。これは TUNEL 陽性領域と一致した発現部位であった。
- 2) 内耳エネルギー不全モデル蝸牛における炎症反応を検討した結果、炎症性サイトカインのうち IL-1 $\beta$ , IL-6 の産生亢進を認めた。IL-6 の発現は III 型線維細胞が主体であり、その産生量は聴力回復群で有意に高かった。ミクログリアや単球系の炎症細胞の浸潤像を外側壁のらせん靭帯、血管条に認めた。これらの細胞は突起伸張を伴い、形態上活性型を呈していた。
- 3) 急性蝸牛エネルギー不全モデルラットを用いて、その難聴をアポトーシスインヒビターの予防的腹腔内投与にて *in vivo* で改善を試みた結果、蝸牛外側壁の線維細胞は保護され、低音から中音域にかけて著明な聴力改善を認めた。また、コントロール群で認められた蝸牛外側壁線維細胞のアポトーシスは完全に防止することができた。
- 4) 急性蝸牛エネルギー不全モデルラットを用いて、モデル動物作成直後・1日後・2日後に経静脈的に全身投与した。モデル動物作成後聴力はスケールアウトとなり、未治療では回復しないが、治療したモデル動物では低音部では6日目より聴力改善効果のみとめ徐々に聴力改善が得られ20日目にほぼ固定した。一方高音部では改善効果のみとめなかった。
- 5) 急性蝸牛エネルギー不全モデルラットにおける平衡障害についての検討では、300mM, 500mM の 3-NP 投与にて著明な眼振を認め、高度の平衡障害が示唆された。また、投与1週間後に行ったカロリックテストでは、500mM では完全な外側半規管機能の消失(CP)を、300mM では機能の残存が認められた。組織学的には前庭有毛細胞の脱落を認めた。
- 6) 骨髄 MSC の Conditioned Medium (CM)の添加により、蝸牛線維細胞の増殖が促進されること、蝸牛線維細胞からの CM の添加により、一部の細胞は蝸牛線維細胞の特異的マーカーを発現することを明らかにした。
- 7) 蝸牛外側壁より未分化線維細胞の初代

培養をおこない、約 10%の培養細胞が線維細胞で最も障害を受けやすい 2 型線維細胞マーカーを発現する、細胞分化誘導系の確立に成功した（詳細は論文にて報告予定）。

- 8) 蝸牛外側壁線維細胞にはタイプ I, II, III, IV, V までの 5 つの細胞タイプに分類される。本研究では、成熟マウスを用いて外側壁線維細胞の初代培養を試みた。培養条件を工夫することにより、全てのタイプの線維細胞を含む培養系を確立することに成功した。
- 9) 生後ラット蝸牛上皮を用い、聴覚感覚細胞へ分化能をもつ、増殖性前駆細胞の初代培養系を確立した。さらに、生後 1 日齢から 14 日齢にかけて経時的に、上皮中の前駆細胞数が著しく低下することを発見した。

#### D. 考察

考察の概略を、方法と結果の各項目に対応させて順に以下に記した。詳細は分担研究報告書を参照。

- 1) 本研究結果は、エネルギー不全により内耳に引き起こされた小胞体ストレスが、本モデルの主な傷害部位である蝸牛外側壁のアポトーシスの一部に関与していることを示唆しており、今後、小胞体ストレスに対する薬剤治療が突発性難聴に対して有効である可能性が考えられる。
- 2) 本研究結果は、急性のエネルギー不全に
- 3) 本研究結果は、カスパーゼが内耳虚血などの急性エネルギー不全の病態に関与していることを示唆しており、またカスパーゼ阻害薬が内耳虚血などの急性エネルギー不全による感音難聴の治療に有効である可能性を示唆している。突発性難聴の急性期治療への応用が考えられる。
- 4) これまで内耳障害モデルに対する caspase inhibitor の効果を *in vivo* に検討した実験としては、GM 或いは CDDP による難聴モデルに対し、z-VAD-fmk の内耳局所投与を行い内耳保護効果が得られたとの報告がある。これらのモデルの主たる障害部位が外有毛細胞であると報告されている。一方、本急性エネルギー不全難聴モデルの主たる障害部位は蝸牛外側壁であり、同部位は血流豊富な部位である。このため本研究で経静脈的な薬剤投与によって効果発現が得られた可能性があると考えられる。ヒトに対して薬剤の内耳局所投与を行うことは実際上困難であるが、経静脈投与で有効性を示せたことは、本薬剤による治療は臨床応用の可能性が高いといえる。
- 5) 本モデルにおける蝸牛障害では線維細



胞が選択的に障害されるが、本研究結果より前庭障害では有毛細胞が選択的に障害されていることが明らかとなり、内耳の器官によって異なる病態を呈していることが明らかになった。平衡障害に対する治療は、聴覚障害とは異なったアプローチが必要である可能性があることを示している。

- 6) 本研究結果は、骨髄 MSC 移植による蝸牛の機能的な回復は、骨髄 MSC から蝸牛線維細胞への分化による作用機序以外にも、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が考えられる。今後、骨髄 MSC と蝸牛線維細胞との液性因子を介した相互制御機構を解明することにより、新たな再生治療を開発できる可能性を示している。
- 7) 本研究で未分化線維細胞を 2 型線維細胞様に分化誘導に成功したことから、この 2 型線維細胞マーカー発現細胞を分取し、他の細胞種との遺伝子発現の差異を検索することにより、2 型線維細胞の分化関連因子を同定し、急性内耳エネルギー不全による障害後に残存する線維細胞を 2 型細胞へ分化転換する新たな再生治療が開発できる可能性がある。
- 8) 本研究で、各線維細胞の初代培養に成功したため、今後はフローサイトメトリーの手法に従い、各線維細胞特異的な細胞表面抗原を指標に、線維細胞の各タイプの分離を行い、分取したタイプ別の線維細胞の培養系で、3NP 等による急性エネ

ルギー不全の際の傷害と再生の分子機構を解析することにより、各タイプ固有の傷害・再生の分子機構が解明されると期待される。

- 9) 本研究結果は、生後のコルチ器において有毛細胞再生を長期抑制する機構が出現する可能性を示唆している。このため現在は、前駆細胞減少の分子機構を、発達期に転写制御をうける遺伝子群の同定を指標として探索している。今後は、候補遺伝子の機能解析から、前駆細胞の増殖能調節研究、そして再生治療へと発展する可能性が考えられる。

## E. 結論

これまで技術的問題から分子レベルの研究に適したラット、マウスの突発性難聴モデルがなく、その分子病態は未知であった。今回は初めて急性内耳エネルギー不全の細胞・分子レベルの病態解明が進み、この結果に基づいて考案されたカスパーゼ阻害薬および骨髄間葉系幹細胞移植で、難聴の回復を有意に促進できた。カスパーゼ阻害薬は急性期の突発性難聴患者に対する臨床応用が近い治療法であり、骨髄間葉系幹細胞移植は慢性化した突発性難聴患者に対する新規治療法としての応用が期待できる成果である。今後さらに本研究で解明された分子機構に基づいた薬剤治療を組み合わせることにより、より効果的な治療法が開発が可能になると考える。またこれ以外にも、本研究で解明された障害の分子機構を制御する薬剤による新規治療の効果についても検討を加える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Neurotol* 2005,10 (4) 220-233

Matsunaga T, Kamiya K, Okamoto Y, Hoya N, Mizutari K, Fujinami Y, Fujii M. 2005. Degeneration and regeneration of cochlear fibrocytes mediate hearing loss and its recovery in a model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. In *Proceedings of the Fifth International Symposium. Meniere's disease & Inner Ear Homeostasis Disorders*. David J Lim, editor. House Ear Institute. Los Angeles, California, USA. 250-251.

神崎仁、松永達雄、突発性難聴・最近の話題 *日医雑誌* 2005, 134 (8) 1504-1508

2. 学会発表

Matsunaga T, Kamiya K, Okamoto Y, Hoya N, Mizutari K, Fujinami Y, Fujii M. Degeneration and regeneration of cochlear fibrocytes mediate hearing loss and its recovery in a model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. The

fifth international symposium. Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders. Los Angeles, California, USA, April 2-5, 2005

Kamiya K, Hoya N, Okamoto Y, Fujinami R, Komatsuzaki R, Kusano R, Satoh H, Fujii M, Matsunaga T. Mesenchymal stem cell transplantation targeting cochlear fibrocytes accelerates the hearing recovery in a rat model of acute mitochondrial dysfunction. The forty second workshop on inner ear biology. Tubingen, Germany, September 18-20, 2005

Mizutari K, Kamiya K, Fujinami Y, Nakagawa S, Fujii M, Matsunaga T. Inhibition of caspases promotes recovery of hearing in a rat model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. The forty second workshop on inner ear biology. Tubingen, Germany, September 18-20, 2005

藤岡正人、岡本康秀、新田清一、岡野 James 洋尚、神崎晶、松永達雄、岡野栄之、小川郁

内耳エネルギー不全モデル蝸牛外側壁における炎症性サイトカインの発現に関する検討

第15回日本耳科学会総会学術講演会、大阪、2005年10月20-22日

藤波義明、神谷和作、藤井正人、松永達雄

急性内耳エネルギー不全による蝸牛外側壁での小胞体ストレス関連因子 GADD153/CHOP の発現増強  
第15回日本耳科学会総会学術講演会, 大阪, 2005年10月20-22日

神谷和作、藤波義明、藤井正人、松永達雄  
内耳エネルギー不全ラットにおける蝸牛線維細胞再生および骨髄間葉系幹細胞移植  
第15回日本耳科学会総会学術講演会, 大阪, 2005年10月20-22日

水足邦雄、神谷和作、藤井正人、松永達雄  
急性エネルギー不全ラットにおけるカスパーゼ阻害薬による難聴阻止効果  
第15回日本耳科学会総会学術講演会, 大阪, 2005年10月20-22日

新田清一、松永達雄、岡本康秀、神谷和作、水足邦雄、滝口洋一郎、藤波義明、南修司郎、藤井正人、小川郁  
内耳急性エネルギー不全における一過性閾値上昇モデルにおける内耳保護分子の発現  
第15回日本耳科学会総会学術講演会, 大阪, 2005年10月20-22日

Fujinami Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T  
Expression of GADD153/CHOP in the lateral wall of the cochlea following acute mitochondrial dysfunction. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005年10月19-22日

水足邦雄、岡本康秀、小川郁、藤井正人、松永達雄

急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞特異的变化  
第64回日本めまい平衡医学会総会, 東京, 2005年11月24-25日

松永達雄  
内耳液恒常性の障害に対する再生治療  
第1回感覚器シンポジウム「内耳再生医療に向けてー基礎研究から治療戦略へー」, 東京, 2006年3月24日

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

内耳ミトコンドリア機能不全による蝸牛外側壁の細胞死に小胞体ストレスが関与した

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

内耳一過性虚血による突発性難聴のモデルを当研究室で作成した。急性内耳エネルギー不全による高度難聴では、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。また、蝸牛外側壁線維細胞の細胞死にはアポトーシスが関与していることが明らかとなっている。近年、多種類の細胞で虚血・低酸素モデルにおいてアポトーシスと小胞体ストレスの関連を示す報告が数多く出ている。本研究では我々の開発した突発性難聴モデル動物における蝸牛外側壁の傷害部位での小胞体ストレス関連分子の発現を観察し、アポトーシスとの関与について検討を行った。

内耳一過性虚血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。昨年行った半定量的reverse transcription PCRの結果、転写増強の見られたC/EBP homologous protein (CHOP) および Activating transcription factor-4 (ATF-4) について定量的Real-Time PCRを行った結果、3-nitropropionic acid (3-NP) 投与直後に両分子が有意に上昇していた。続いて、組織切片上で小胞体ストレス由来のアポトーシスに関連するCHOPの発現を見たところ、傷害部位に局在が認められた。この結果からエネルギー不全により内耳に引き起こされた小胞体ストレスが、本モデルの主な傷害部位である蝸牛外側壁のアポトーシスの一部に関与していると考えられた。

A. 研究目的

突発性難聴は、日本で年間約25,000人が発症する比較的発症頻度の高い内耳性難聴

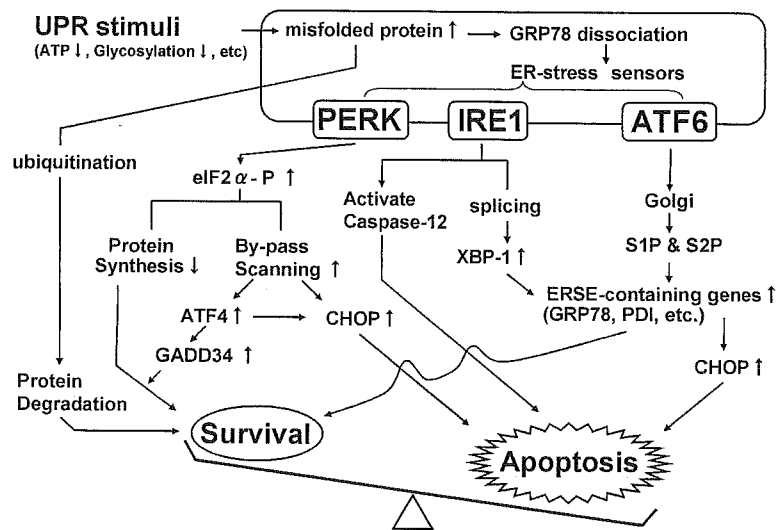
である。しかしながら、いまだその病態は原因が解明されていない。現在では、その主たる原因として内耳循環障害とウイルス

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難聴の病態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。当研究室では内耳エネルギー不全モデル動物を作成し、内耳循環障害による突発性難聴の病態について解析してきた。本モデルを用いたこれまでの結果より、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。また、蝸牛外側壁線維細胞の細胞死にはアポトーシスが関与している事が明らかとなっている。

近年、多種類の細胞で虚血・低酸素モデルにおけるアポトーシスと小胞体ストレスの関連を示す報告が数多く出ている。小胞体では合成されたタンパク質が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つの現象は小胞体の恒常性維持に働く。つまり、PERKを介した新規タンパク質の合成停止や glucose-regulated protein 78 (GRP78) 等の小胞体内分子シャペロンによる不良タンパク質の再折りたたみを行って小胞体へのタンパク質の蓄積を抑制し、細胞の生存・恒常性保持へと働く。他方では、同時に CHOP と呼ばれるアポトーシスに関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、細胞をアポトーシスへと誘導する。小胞体ストレス応答時の細胞の生死はこれらの Survival と Death のシグナルバランスにより決定される。

Diagram of the UPR network



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、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、特に C/EBP homologous protein (CHOP)の発現について生化学的・分子生物学的手法を用いて解析した。

## 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 (temporary threshold shift model (TTS), 0.9  $\mu$ moles 投与) および永続性難聴モデル (permanent threshold shift model (PTS), 1.5  $\mu$ moles 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。
- 2) 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。昨年行った rt-PCR で変化の見られた分子 (CHOP、Activating transcription factor-4 (ATF-4)) について定量的 Real-Time PCR (RT-PCR) を行った。プライマーはタカラバイオ株式会社にて市販されているものを使用し

た。SYBR Premix Ex Taq を用い付属のプロトコルに従って、RT-PCR を行った。

- 3) 1)と同様にして作成したモデルラットを各時間経過後に 4% パラホルムアルデヒドで還流固定を行い、蝸牛を採取した。一晚同溶液で後固定した後、EDTA による脱灰を行いパラフィンに包埋した。これらを薄切して切片とし、適当な抗原賦活化を行って、CHOP の免疫組織化学的染色を行った。また、同切片について TUNEL 染色を ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit を用いて付属のプロトコルに従って行った。CHOP の発現が最も顕著だった PTS モデルの 3-NP 投与 1 日後において、CHOP・TUNEL の二重染色を行った。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 投与直後に CHOP、ATF-4 の転写が一過性難聴モデルおよび永続性難聴モデルでともに有意に増強されていた(\* $p < 0.05$ )。両分子ともにピークは投与 6 時間後にあり、1 日後からは未処置と同程度あるいはそれより低い発現量で推移した。未処置に対するピーク時のそれぞれの値は、CHOP: PTS 595  $\pm$  262%、TTS 390  $\pm$  91%、ATF-4: PTS 252  $\pm$  38%、TTS 230  $\pm$  40%であった。

免疫組織化学的解析の結果、CHOP の発現は PTS、TTS 両モデルとも 3-NP 投与 6 時間後ではまだ未処置あるいは生理食塩水投与 1 日後と変わらなかった。その後、3-NP 投与 1 日後より外側壁 II 型線維細胞から外側壁全体にかけて発現が見られ始めた。TUNEL 陽性細胞は TTS では 2 日目から、PTS では 1 日目から出現した。これらも既報告通り、II 型線維細胞から陽性細胞が出現し始め、PTS においては細胞脱落領域の周囲に広がっていった。

CHOP が最も強く発現していた PTS 1 d と対照としての未処置について CHOP と TUNEL の二重染色を行った結果、単染色の場合と同様の結果を得た。しかし、完全に重なる像は得られなかった。また、TUNEL 染色のための抗原賦活化処理によるものと考えられるが、単染色では CHOP 陽性とならなかった血管条に陽性反応が出た。

#### D. 考察

内耳エネルギー不全による突発性難聴モデルで、小胞体ストレス由来のアポトーシスに注目して実施した昨年の rt-PCR によるスクリーニングの結果を基に、2 つの遺伝子を選んだ。1 つはアポトーシスに関与し小胞体ストレスのマーカーとしても使用される CHOP、もう 1 つは CHOP の転写にも関与する ATF-4 を選択し、これらを定量的に解析した。ATF-4 に関しては PTS、TTS 両モデルの各時間経過後における転写レベルに差は見られなかった。しかしながら、ピーク時の CHOP の転写レベルには PTS が TTS の約 1.5 倍の転写量となる差が

見られた。ピーク時以後は両モデルとも未処置レベル以下にまで減少し、そのまま同レベルの発現が持続した。それぞれの mRNA 量がタンパク質量に反映されているならば、ピーク時の両モデルでの CHOP 発現には PERK を介する経路以外の経路、すなわち IRE-1 および ATF-6 を介する経路の関与が大きい可能性がある。また、蝸牛外側壁には I ~ IV 型線維細胞が存在し、本モデルでは主に II 型細胞が傷害を受ける。免疫組織化学的解析から CHOP の発現は本モデルにおいて最も傷害を受ける II 型線維細胞から発現することが明らかとなった。TUNEL 染色と完全に一致する像は得られなかったものの、CHOP 発現範囲内にほとんどの TUNEL 陽性細胞が存在した。これらの結果は本モデルにおける蝸牛外側壁の細胞傷害に小胞体ストレスが関与している可能性を示唆していると考えられる。また、一致する像が得られなかった理由としては、CHOP がアポトーシス経路の上流にあるため時間的な差が生じ、両陽性細胞が観察されなかった可能性が考えられる。RT-PCR の結果で、3-NP 投与 1 日後以降に両遺伝子の転写が少ないが、その理由は各線維細胞によって小胞体ストレス感受性の差が推測される。3-NP に対して最も脆弱な II 型細胞が小胞体ストレスに対しても感受性が高く、また定常時にも両遺伝子の発現が多い場合、本細胞が減少することにより外側壁全体としての両遺伝子の転写量が低く推移している可能性がある。

#### E. 結論

本難聴モデルの主たる傷害部位である蝸

牛外側壁の細胞死に、CHOP を介した小胞体ストレス由来のアポトーシス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

Yoshiaki Fujinami, Kazusaku Kamiya, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga  
Expression of GADD153/CHOP in the Lateral Wall of the Cochlea following acute Mitochondrial Dysfunction 第78回日本生化学会大会、神戸、2005年10月19-22日

藤波義明、神谷和作、藤井正人、松永達雄  
急性内耳エネルギー不全による蝸牛外側壁での小胞体ストレス関連因子GADD153/CHOPの発現増強第14回日本耳科学会総会、大阪、2005年10月20-22日

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし



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
分担研究者	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反応を検討した。炎症性サイトカインのうち IL-1 $\beta$ , IL-6 の産生亢進を認めた。IL-6 の発現は III 型線維細胞が主体であり、その産生量は聴力回復群で有意に高かった。ミクログリアや単球系の炎症細胞の浸潤像を外側壁のらせん靭帯、血管条に認めた。これらの細胞は突起伸張を伴い、形態上活性型を呈していた。以上の結果は、急性のエネルギー不全に陥った蝸牛では炎症反応が強く誘導されることを示唆する。今後、突発性難聴患者への臨床応用に向け、当モデルにおける炎症反応の寄与や役割に関する更なる検討が必要と考えられる。

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反応である。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り得る。炎症反応を惹起する障害は多岐にわたり、他臓器では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、実験的内耳炎や音響外傷で、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おり、これら現象は蝸牛外側壁に特に顕著であることが明らかになっている。

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、我々の用いているミトコンドリア複合体の非可逆的阻害剤、3-nitro-propionic acid (3NP) を局所投与することで作成される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いる。興味深いことに過去の検討からこのモデルでの蝸牛障害は外側壁から生じることが明らかにされている (Okamoto, 2005)。過去の蝸牛内炎症に関す

る報告が外側壁に多いことと考えあわせ、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。

以上のように、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

昨年度の検討を通して、我々は急性の細胞内呼吸障害を来した蝸牛では、複数種の炎症性サイトカインが転写誘導され、とくに IL-6 の発現量が高いことを報告してきた (summarized in Fig.1,2)。今年度、我々は蝸牛内での IL-6 産生細胞の同定を、免疫組織学的に検討した。また、このサイ

トカイン産生が、浸潤・活性化を経た免疫細胞によるものなのか、蝸牛本体の細胞によるものなのかを検討すべく、活性型免疫細胞のマーカーである Iba-1 の免疫組織染色を施行した。

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

抗体染色から、当モデルでの IL-6 の発現を外側壁の III 型線維細胞に強く認めた。他方、Iba-1 陽性細胞はらせん靭帯と血管条内に著明に認められた。形態的には多極性であり、これらの細胞は活性化を経ていることが示唆された。両者は重なっておらず、IL-6 産生は蝸牛本体の、おそらく外側壁線維細胞から生じていることが強く示唆された。

Fig.1. 急性ミトコンドリア障害蝸牛における炎症性サイトカイン産生

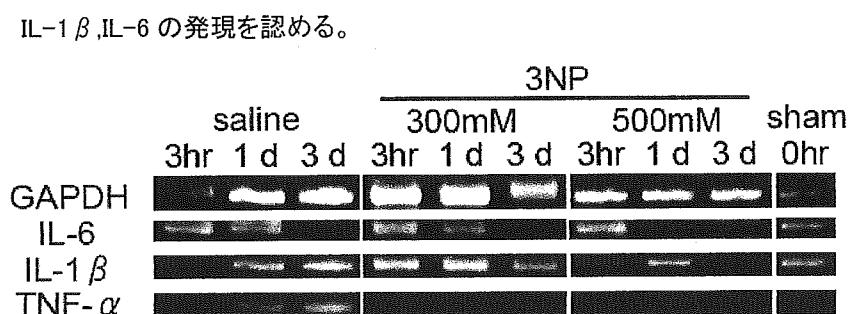


Fig.2 定量 RT-PCR 法によるサイトカイン産生の経時的変化  
 コントロール群では急性期のみ一過性に産生される IL-6 は、内耳エネルギー障害下では  
 転写レベルで産生誘導が維持される。またその産生量は聴力回復モデルで有意に高い。

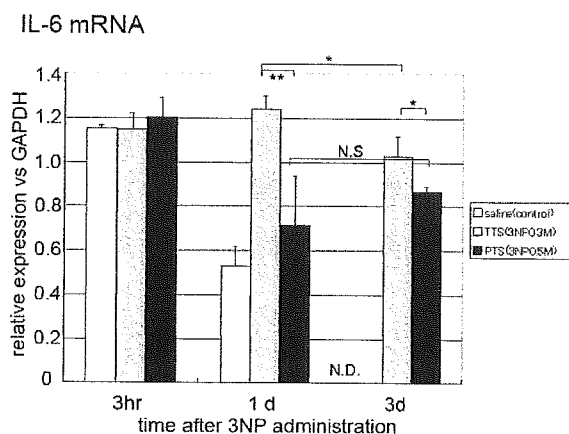
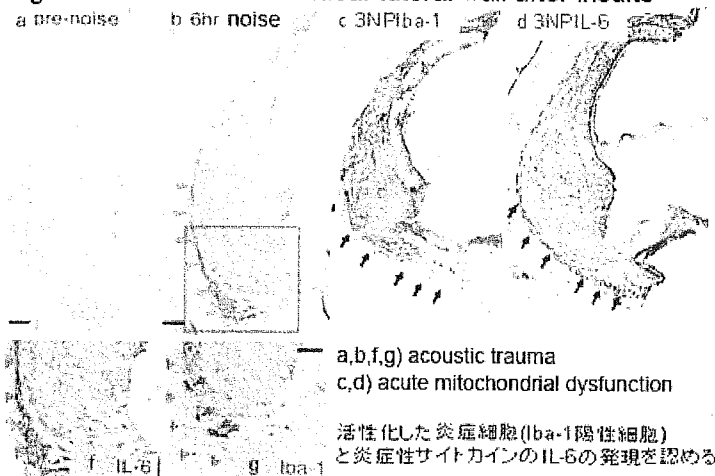


Fig.3. Inflammation in cochlear lateral wall after insults



#### D. 考察

昨今、我々は音響外傷蝸牛において外側壁線維細胞における IL-6 産生と、炎症細胞浸潤を報告した (Fujioka et al. 2006: Fig.3a, b, f, g)。今回我々はミトコンドリア障害による内耳エネルギー不全モデルで同様の検討をしたが、IL-6 の発現部位は音響外傷と極めて類似していた (Fig.3d)。他方、活性化型炎症細胞のマーカーである Iba-1 の分布は大きく異なっていた。すなわち、Iba-1 陽性細胞は音響外傷モデルとは異なって形態上多極性であると同時に、血管条

にもその発現を認めた (Fig.3c)。これらの現象は音響外傷では見られなかったことであり、内耳エネルギー不全モデルでの炎症細胞の強い活性化が示唆された。

以上のように、障害蝸牛での IL-6 発現は音響外傷・内耳エネルギー不全モデルともに類似しており、産生に関しては、障害種を超えた共通の転写・発現誘導メカニズムの存在が示唆された。しかしその病態生理への関与について、両者は異なる可能性がある。実際、過去の中枢神経系の報告から、物理的外傷モデルにおいて IL-6 は障害を

憎悪させるのに対し、虚血や細胞内呼吸障害モデルにおいて IL-6 は臓器保護的に働くことが示されている (Okada S. 2004; Yamashita T.2005)。今回の検討結果でも、IL-6 は恒久的聴力低下群よりも一過性聴力低下群で有意に産生が維持されており、細胞内呼吸障害モデルにあたる当モデルでは、IL-6 は蝸牛保護因子として作用している可能性があるが、他方、音響外傷では IL-6 受容体を選択的に阻害することで聴力悪化を軽減することが示されている (Fujioka M, in preparation, 特許出願中 : PCT/JP2005/006202)。これらの結果をふまえて、今後は、障害モデル間での作用の相違を検討し、疾病ごとの機能や意義を明らかにすることが、臨床応用へ向けた必要不可欠な基礎的検討事項であると考えられた。

#### E. 結論

内耳エネルギー不全モデル蝸牛における IL-6 産生は III 型線維細胞が主体であること、炎症細胞の浸潤・活性化はらせん靭帯のみならず血管条にも認められることが明らかになり、当モデルにおける外側壁障害 (既報) には、著明な炎症反応が関与している可能性が強く示唆された。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炎症反応の寄与や役割に関する更なる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

内耳急性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に関する検討  
藤岡 正人, 岡本康秀, 新田清一, 岡野 James 洋尚, 神崎晶, 松永達雄, 岡野栄之, 小川郁, 第15回 耳科学会 2005年10月大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし