

20050061PA

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

分子生物学的知識に基づいた感音難聴の
新しい治療法の確立

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 唄 達 也

平成18 (2006) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

分子生物学的知識に基づいた感音難聴の新しい治療法の確立

山嵜 達也 1

II. 分担研究報告書

1. ミトコンドリア遺伝子変異と感音難聴 6

後藤 雄一

2. 蝸牛窓経由のベクター投与方法の確立 8

鈴木 光也

3. 内耳遺伝子導入による有毛細胞再生の研究 10

石本 晋一

4. 感音難聴における GLUT5 の関与について 13

浅野 知一郎

5. 感音難聴における WFS1 蛋白の関与 14

岡 芳知

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 18

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

分子生物学的知識に基づいた感音難聴の新しい治療法の確立

主任研究者:山嵜 達也 東京大学医学部耳鼻咽喉科助教授

研究要旨

- 1) WFS KOマウスを作成し、WFS1欠損により小胞体ストレス応答が亢進し、PERKリン酸化の亢進、XBP1 mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が出現することを観察した。これに伴いCHOPの発現およびcaspase-3の切断の亢進も認められ、アポトーシスシグナルが活性化されていることが明らかとなった。さらにWFS1欠損豚島ではBrdUの取り込みが減少しており、細胞の増殖障害が認められ、小胞体カルシウム動態の異常も認められた。難聴も後天性に出現することを観察し、内耳の組織変化について検討した。
- 2) Glut5 KOマウスを作成し、聴覚機能解析を開始した。
- 3) ミトコンドリア脳筋症の難聴モデル動物としてゲルマニウム過剰投与マウスを作成し、DNAマイクロアレイを用いて蝸牛内の遺伝子発現の変化について検討した。
- 4) mitochondrial DNA polymerase γ に点変異を来たし、mitochondrial DNAのproof-readingが障害されるマウス(POLGマウス)を作成し、アポトーシスの亢進により早期に老化症状を示すこと、難聴も早期に出現すること、ラセン神経節・コルチ器に変性が生じることを報告した。さらに蝸牛内の遺伝子発現の変化についてDNAマイクロアレイを用いて解析した。
- 5) ミトコンドリアDNAが欠乏することによって発現が上昇し、ミトコンドリアに特異的に存在する脂質、カルジオオリピンの量を調節することで、細胞内ミトコンドリア体積を調節する働きをもつ分子、MIDAS/GPP34を見いだした。この分子の内耳での発現を観察している。
- 6) 老人性難聴モデルマウスとしてDBAマウス、C57BLマウス、POLGマウスの難聴発症前後の遺伝子をDNA chipにより検討し、発現の増加・減少する遺伝子を同定した。またC57BLマウスではカロリー制限が老人性難聴発症を抑制することを見出し、エネルギー代謝に関与する遺伝子群の発現が亢進していることを論文にまとめた。
- 7) bcl2が細胞内のミトコンドリアに作用するように修飾した物質(FNK-PTD)をモルモットに投与し、蝸牛内に取り込まれること、およびエタクリン酸・カナマイシンによる内耳障害が予防できることを観察した。
- 8) アデノウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入を蝸牛窓膜経由で行う際に用いられる鼓膜麻酔液の蝸牛窓膜処理時間の違いによる変化と蝸牛窓膜の術後の回復に関して形態学的に検討を行った。鼓膜麻酔液によって7分以上処置した動物において蝸牛窓膜のouter epitheliumの変性と有毛細胞の消失といった組織学的変化が確認された。鼓膜麻酔液処理後24時間経過した蝸牛窓膜では、光学顕微鏡下にouter epitheliumの変性は残存していたが、再鼓膜麻酔液処理後2週間経過した蝸牛窓膜では光学顕微鏡下にouter epitheliumの再生が確認された。
- 9) モルモットの蝸牛有毛細胞障害後に支持細胞がわずかながら増殖すること、これが障害後3-5日後にピークになることを報告した。今回、蝸牛にp27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与し、支持細胞が増殖し、有毛細胞様の細胞に変化することを見出した。

分担研究者

鈴木 光也 東京警察病院耳鼻咽喉科部長
浅野 知一郎 東京大学分子細胞生物学専攻
代謝生理学 助教授
石本 晋一 社会保険中央病院耳鼻咽喉科
部長
岡 芳知 東北大学糖尿病代謝内科教授
後藤 雄一 国立精神神経センター部長

A. 研究目的

目的は感音難聴の新しい治療法の確立であり、①遺伝性難聴への遺伝子治療法の開発、②急性期の感音難聴に対する薬物治療の拡大、③有毛細胞の再生による慢性期感音難聴の治療法の開発、と大きく三つに分けられる。①では分子生物学的手法に基づいて種々のモデル動物を作成し、その病態解析、遺伝子導入などの治療法の開発を検討する。②急性期感音難聴の治療法の開発は基礎と臨床の両面で行う。急性感音難聴では主に副腎皮質ホルモンが用いられ、他の薬剤については広く使用されているものの、有効性は定かでない。また副腎皮質ホルモンの作用機序も明らかではない。動物実験レベルではフリーラ

ヂカル産生が関与し、アポトーシスなど細胞死を誘導するpathwayを賦活化することが明らかになってきている。これらの知見をさらに深めるとともに、種々の動物でその治療効果、至適濃度、副作用などの検討を行い、臨床応用につなげる。
③内耳、特に蝸牛の有毛細胞再生は従来不可能とされてきた。有毛細胞が再生しないため、障害の固定した感音難聴に対する治療法はなかった。有毛細胞を再生することで感音難聴でも聴力が回復できるようになる。

B. 研究方法

①遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

1) 難聴・糖尿病・視神経萎縮を引き起こすWolfram症候群のモデル動物(WFS1欠損マウス)より単離した豚島を用い、小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導、小胞体ストレス応答の詳細を検討した。さらに、このWFS1欠損単離豚島ならびにアデノウイルスベクターによりWFS1蛋白を過剰発現させた豚島を用いて、細胞内カルシウム動態も検討した。また、ドキシサイクリン誘導性にWFS1蛋白を過剰発現あるいはノックダウンするHEK293細胞を

作製し、この細胞でも解析した。糖尿病の発現機序について、血糖値、血中インシュリンの測定、糖負荷試験、および膵臓の組織学検討を行った。このマウスの難聴の発現については生後2ヶ月おきにABRを計測し、1年経った時点で断頭し、蝸牛の断面を光顕、および透過電顕で観察した。

2) Glut5欠損マウスはキメラから作成した。このマウスの難聴の発現について生後2ヶ月おきにABRの計測を開始した。

3) マウスに0.15%ゲルマニウムを投与し、ABRによる聴力測定、蝸牛の断面の光顕および透過電顕での観察、心臓、腎臓、筋肉の組織学的検討、蝸牛のOligonucleotide array解析を行った。

4) ミトコンドリアDNAの変異が加齢とともに集積するマウス(POLG)を作成し、難聴についてABRによる聴力測定、蝸牛の断面の光顕および透過電顕での観察、TUNELによるアポトーシスの観察、蝸牛のOligonucleotide array解析を行った。

5) ミトコンドリアDNA欠乏による難聴治療の基盤とする目的で、ミトコンドリアDNA欠乏により発現上昇する新たな分子を探索した。rho-zero 細胞(ミトコンドリアDNA欠乏細胞)とそれに野生型のミトコンドリアDNAを細胞融合で導入した細胞のそれぞれから、poly Aを有するRNAを調整した。蛍光ラベルを付けたプライマーで増幅したPCR産物をゲル電気泳動を行い、両者で発現が明らかに異なるバンドを切り出して、MIDASを同定した。この分子の抗体を作製し、CPEO(4.9kbの欠失を有する症例)、MELAS(3243変異を有する症例)の骨格筋を用いて、その発現を調べた。

②内耳障害の予防・治療

1) アポトーシスを予防するBcl2をFNKに改変し、PTDをつけて細胞内のミトコンドリア内に導入するという全く新しい治療法(蛋白治療)の、蝸牛有毛細胞障害に対する応用を検討した。カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットを難聴にした。聴力はABRで測定し、蝸牛の感覚上皮をsurface preparation法により観察して有毛細胞死を定量的に評価した。

2) 老人性難聴のモデル動物(マウス)における遺伝子の検討ではDBA/2J mouse、C57/BL6、およびPOLGマウスを用いた。Oligonucleotide array解析では蝸牛組織を低温室で摘出し、素早く液体窒素で凍結し保管した。Total RNAはTRIZOL法で抽出し、SuperScript Choice Systemを用いてcDNAを合成し、Biotin-labeled cRNAを合成した。Hybridization後GeneChipsの洗浄、染色をおこない、シグナルの検出後、各試料のデータ収集を行った。統計処理後、正常とモデル動物間で発現差のある遺伝子リストを作成した。また26%カロリー制限により難聴の出現、遺伝子変化が抑制されるかどうか検討した。

③内耳有毛細胞の再生

1) 遺伝子導入方法

アデノウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入を蝸牛窓膜経路で行う際に用いられる鼓

膜麻酔液の蝸牛窓膜処理時間の違いによる変化と蝸牛窓膜の術後の回復に関して形態学的に検討した。蝸牛窓膜上に鼓膜麻酔液(フェノールおよび4%キシロカイン)を滴下し3、7、15分間放置した後、側頭骨を摘出し、固定・脱灰後エポン包埋し切片を作成し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。次に蝸牛窓膜上に鼓膜麻酔液を滴下し15分間放置した後24時間後または2週間後に側頭骨を摘出し、固定・脱灰後エポン包埋し切片を作成して光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

2) 支持細胞から有毛細胞への変換

p27siRNAおよびGFPを組み込んだアデノウイルスベクターをモルモットに投与し、支持細胞の分裂を誘導できるか、BrdUを浸透圧ポンプで連続投与し、免疫染色により観察した。このベクター投与により支持細胞が有毛細胞に変化するかどうかについてはエタクリン酸・カナマイシンで有毛細胞を破壊したモルモットに投与し、2ヵ月後に断頭してsurface preparationおよび走査電顕で観察した。

C. 研究結果

①遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

1) WFS1欠損により小胞体ストレス応答が亢進し、PERKリン酸化の亢進、XBP1mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が認められた。これに伴いCHOPの発現およびcaspase-3の切断の亢進も認められ、アポトーシスシグナルが活性化されていることが明らかとなった。さらにWF S1欠損豚島ではBrdUの取り込みが減少し、細胞の増殖障害が認められた。また、小胞体カルシウム動態の異常も認められた。難聴については後天的に出現するが軽度であった。

2) Glut5欠損マウスの難聴は解析中である。

3) ミトコンドリア脳筋症のモデル動物の0.15%ゲルマニウム投与マウスでは4ヶ月までに高度難聴が生じ、血管条・コルチ器・ラセン神経節に変性が生じることを観察した。蝸牛のOligonucleotide array解析では聴覚関連、イオン代謝、神経伝達に関する遺伝子群の発現低下、アポトーシスやエネルギー代謝、DNA合成・修復に関する遺伝子群の発現低下が見られた。

4) POLGマウスではアポトーシスが亢進して早死することがわかった。難聴についても野生型より早期に出現し、有毛細胞、らせん神経節が基底回転から変性を来していた。蝸牛のOligonucleotide array解析では聴覚関連遺伝子、神経伝達物質、エネルギー代謝などの遺伝子群がdownregulateし、アポトーシスや炎症に関連した遺伝子群がup regulateしていた。

5) MIDASの発現は、欠失例でも3243点変異例でも形態異常を示すragged-red fiberにおいて発現上昇が認められた。

②内耳障害の予防・治療

1) PTD-FNKは投与約3時間後をピークに蝸牛内

の有毛細胞、蝸牛側壁、ラセン神経節に発現し、予防投与により音響外傷およびアミノ配糖体による有毛細胞死を著明に抑制した。

2) 老人性難聴のモデル動物 (C57BL/6マウス、DBA/2Jマウス、POLGマウス) における遺伝子の検討では聴覚関連遺伝子、神経伝達物質、エネルギー代謝などの遺伝子群がdownregulateし、アポトーシスや炎症に関連した遺伝子群がupregulateしていた。26%カロリー制限ではC57BL/6マウスの難聴は完全に予防でき、上記遺伝子変化は抑制され、寿命延長に関与する*Sirt1*が蝸牛内で発現亢進していた。

③内耳有毛細胞の再生

1) 鼓膜麻酔液によって7分間以上処置した動物において蝸牛窓膜のouter epitheliumの変性と有毛細胞の消失といった組織学的変化が確認された。鼓膜麻酔液処理後24時間経過した蝸牛窓膜では、光学顕微鏡下にouter epitheliumの変性は残存していたが、再鼓膜麻酔液処理後2週間経過した蝸牛窓膜では光学顕微鏡下にouter epitheliumの再生が確認された。

2) カナマイシンとエタクリン酸により聾にしたモルモットの蝸牛にp27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与すると、支持細胞が聴毛様の形態を持つ有毛細胞様細胞に変化した。これらの細胞はBrdU陽性であった。

D. 考察

①遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

WFS欠損マウスではWolfram症候群のphenotypeの一つである糖尿病の発症が確認できた。WFS1蛋白は、小胞体カルシウムの恒常性の維持に重要な役割を果たしており、ウオルフラム症候群では、WFS1蛋白の欠損が小胞体の機能異常を来しインスリン分泌低下をもたらすとともに、小胞体ストレスによる細胞の増殖抑制・アポトーシスの亢進をきたすと考えられる。

ゲルマニウム投与によりモルモットのみでなくマウスにもミトコンドリア障害による難聴を生じさせることができた。このモデルではミトコンドリアDNAコピー数の減少が生じるとされているが、DNAマイクロアレイの結果ではミトコンドリア機能低下によるエネルギー代謝の障害によりアポトーシスが亢進して難聴が生じることが示唆された。

POLGマウスはミトコンドリア遺伝子変異が加速的に蓄積するモデルであり、これにより早老症となった。酸化ストレスは亢進しておらず、ミトコンドリアDNAの障害自体が単独で老化を引き起こす可能性が示唆された。

MIDASを強制発現させた細胞ではミトコンドリア体積の上昇とカルジオリピン量の増加が生じる。したがって、ミトコンドリア機能が低下しているragged-red fiberにおいてMIDAS発現の上昇が認められたことは、これらの筋細胞においてミトコンドリア容積を増大させる代償的反応が働いていると考えられる。

②内耳障害の予防・治療

PTD-FNKが腹腔内投与で蝸牛内に発現す

ることから、全身投与により蝸牛内にある標的蛋白を投与できることが示唆された。エタクリン酸とカナマイシンの投与では蝸牛有毛細胞がアポトーシスを起こすことが知られるが、その細胞内シグナルを抑制する蛋白を投与することでアポトーシスが予防できることをはじめて証明した。この方法は蝸牛障害の新しい治療(蛋白治療)として創薬に結びつくことが期待される。

老人性難聴動物の遺伝子スクリーニングでは多くの遺伝子の発現が減少または増加を示した。個々の遺伝子の解釈も必要であるが、クラスター解析からは、エネルギー代謝の低下からp53を介したアポトーシスが誘導されて老人性の蝸牛障害が生じる可能性が示唆された。カロリー制限ではこれらの遺伝子変化が抑制され、難聴は出現しなかった。またカロリー制限により*Sirt1*が蝸牛において亢進することも明らかとなった。今後はカロリー制限と同様に*Sirt1*亢進作用のあるトコフェロールなどの投与により、老人性難聴が予防できるか調べることにより、ヒトにおける老人性難聴予防法を検討する必要がある。また蝸牛のOligonucleotide array解析法を確立したことで、今後種々の動物モデルや種々の内耳障害において本方法を用いることが可能と思われる。

③内耳有毛細胞の再生

鼓膜麻酔液で蝸牛窓膜を確実にかつ安全に処理するためには、鼓膜麻酔液によって7分間処理された蝸牛窓膜は24時間以上透過性が高まった状態にあることが示唆された。この特性を生かし、蝸牛窓膜経路でのより有効な遺伝子導入ができると思われる。

ほ乳類蝸牛には再生能がないとずっと信じられていた。我々は少ないながらも支持細胞は分裂能を有することを明らかにしたが、今回p27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与することで支持細胞が有毛細胞様細胞に変化することを見出した。Atoh1遺伝子の導入では支持細胞の形質転換は誘導できるが増殖は起こらず、蝸牛感覚上皮の完全な再生はできない。p27siRNAとAtoh1を組み合わせることで、より多くの有毛細胞再生が期待できると考えられる。

E. 結論

遺伝子工学的および分子生物学的手法により、種々の遺伝性難聴の病態が解析できた。急性感音難聴に対して蛋白治療という新しい治療法を開発した。老人性難聴の発症機序について分子レベルで初めて明らかにし、予防法の戦略を提唱することができた。蝸牛有毛細胞の再生について、少なくとも実験レベルでは可能であることを証明した。これらの成果により、感音難聴の根本的治療が近いうちに可能になると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T,

Suzuki M. Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neuroscience Letters* 2005;380:234-238.

2) Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgenuth S, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005;309:481-484.

3) Yamasoba T, Goto Y, Komaki H, Mimaki M, Sudo A, Suzuki M. Cochlear damage due to germanium-induced mitochondrial dysfunction in guinea pigs. *Neuroscience Letters* 2006;395:18-22.

4) Yamasoba T, Kondo K. Evidence of supporting cell proliferation in vivo in mature mammalian cochlea. *Cell Tissue Res in press*

5) 山嵜達也: ミトコンドリア遺伝子異常による感音難聴. 先端医療シリーズ35 加我君孝・小宗静男編 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の最新医療. pp.105-109 先端医療技術研究社、2005.

6) 染谷慎一、山嵜達也、田之倉優. 老人性難聴の予防. 先端医療シリーズ35 加我君孝・小宗静男編 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の最新医療. pp.110-113 先端医療技術研究社、2005

7) Nakashima-Kamimura N, Asoh S, Ishibashi Y, Mukai Y, Shimara Y, Oda H, Munakata K, Goto Y, Ohta S. MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *Journal of Cell Science* 2005;118: 5357-5367.

8) Takahashi N, Shimada T, Murakami Y, Katoh H, Oyake N, Ishibashi Y, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Vascular involvement in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *The American Journal of the Medical Sciences* 2005;329:265-266.

9) 後藤雄一: ミトコンドリアDNA異常によるヒト疾患. 蛋白核酸酵素 2005;50:1760-1764

10) 後藤雄一: ミトコンドリア遺伝病. 日本臨床 2005;63:75-80.

11) Ito K, Suzuki S, Murofushi T, Ishimoto S, Iwasaki S, Karino S. Neuro-otologic findings in unilateral isolated narrow internal auditory meatus. *Otology and Neurotology* 2005;26: 767-772.

12) Ishimoto S, Ito K, Yamasoba T, Kondo K, Karino S, Takegoshi H, Kaga K. Correlation between microtia and temporal bone malformation evaluated using grading systems.

Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery 2005;131:326-329.

13) Tsunoda K, Ishimoto S, Aikawa J, Shinogami M, Murakami R, Saigusa H, Kondo K, Bitou S. Bent (head-down) posture and aberrant common carotid arteries of the neck: another new risk factor for stroke? *Laryngoscope* 2005;115:2074-2075.

14) Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153: 167-176.

15) Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, Katagiri H, Endou H, Oka Y. Cell-type specific activation of metabolism reveals that α -cell secretion suppresses glucagon release from β -cells in rat pancreatic islets. *American Journal of Physiology- Endocrinology & Metabolism* 2005; 290:308-316.

16) Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-I, Oka Y. WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic β -cells. *Human Molecular Genetics* in press

2. 学会発表

第105回日本耳鼻咽喉科学会総会(2005.5.19-21. 大阪)

「真珠腫性中耳炎に対する乳突腔充填術の術後経過について」

山嵜達也、石本晋一、岩崎真一

「小耳症外耳道狭窄・閉鎖症における聴力像と側頭骨CTの解析」

石本晋一、伊藤健、山嵜達也、加我君孝.

第50回日本聴覚医学会 (2005.9.22-24.東京)

「有毛細胞障害モルモット蝸牛におけるp27kip1抑制による聴毛類似構造物の出現」

山嵜達也、石本晋一

International Symposium, Pharmacologic Strategies for Prevention and Treatment of Hearing Loss and Tinnitus (2005,10.9-12, Niagara Falls, Canada)

「Mitochondrial dysfunction, decreased energy metabolism, and apoptosis in age-related hearing loss」

Tatsuya Yamasoba, Shinichi Someya, Tomas A Prolla, Masaru Tanokura

第14回日本耳科学会 (2005.10.20-22. 大阪)

シンポジウム 「内耳障害改善への戦略. 基礎

的アプローチ. 老人性難聴の発症機序の研究.
予防法の確立に向けて」

山嵜達也

「ミトコンドリアDNA変異の蓄積の老人性難聴発症
機構への関与」

染谷慎一、山嵜達也、田之倉優

第48回日本糖尿病学会年次学術集会(2005.5.12-14, 神戸市)

「WFS1欠損膵β細胞における小胞体ストレス下の代謝分泌連関」

石原寿光、田村明、高橋累、山田高弘、山口賢、鴫田 藍、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原健英、鈴木 進、片桐 秀樹、宮崎 純一、岡芳知

「WFS1欠損膵島における小胞体ストレス応答の検討」

山田高弘、石原寿光、鴫田藍、山口賢、高橋累、田村明、武井大祐、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知

「WFS1欠損マウスにおける小胞体ストレス応答ならびにβ細胞脱落への遺伝的背景の関与」

高橋累、石原寿光、田村明、山田高弘、山口賢、鴫田藍、武井大祐、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知

「WFS1蛋白による細胞内カルシウム動態制御機構の解析」

武井大祐、石原寿光、田村明、高橋累、山田高弘、山口賢、鴫田藍、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知

「急性の高インスリン血症は血中アディポネクチン濃度を低下させる」

平井完史、石垣泰、野々垣勝則、檜尾好徳、山田高弘、善積信介、沖本久志、高橋和眞、石原寿光、荻原健英、片桐秀樹、鈴木進、岡芳知

「骨髄移植によるWFS1遺伝子欠損マウスにおける慢性β細胞障害の改善」

長谷川豊、片桐秀樹、荻原健英、石原寿光、石垣泰、山田哲也、今井淳太、宇野健司、高俊弘、檜尾好徳、鈴木進、岡芳知

Keystone Symposia: Diabetes Mellitus and the Control of Cellular Energy Metabolism. Jan. 21-26, 2006 Vancouver, British Columbia, Canada

「Role of eNOS in Beta Cell Regeneration after Bone Marrow Transplantation in STZ-Diabetic Mouse Models」

Ogihara T, Katagiri H, Hasegawa Y, Oka Y.

The 2006 Annual Meeting of American Society of Human Genetics, (10.26-28, 2005, Salt Lake City, USA)

「The mitochondrial DNA point mutation at the discriminator base of tRNA-Glutamate is necessary to cause benign infantile cytochrome c oxidase deficiency」

Mimaki M, Komaki H, Kirino Y, Suzuki T, Goto Y.

The 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research (11.25, 2005, Tokyo, Japan)

「Clinical, pathological and genetic study on 223 patients with the mtDNA A3243G mutation」

Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y.

「Direct repeats at the break points of deleted mitochondrial DNA in 142 myopathic patients」
Yamashita S, Murayama K, Nonaka I, Goto Y.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
研究報告書

ミトコンドリア遺伝子変異と感音難聴

分担研究者：後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨

感音性難聴はミトコンドリア病において頻度の高い臓器症状であるが、その分子病理については不明な点が多い。今年度は、ミトコンドリアDNAが欠乏することによって発現が上昇し、ミトコンドリアに特異的に存在する脂質、カルジオリピンの量を調節することで、細胞内ミトコンドリア体積を調節する働きをもつ分子、MIDAS/GPP34を見いだした。この分子はミトコンドリアとゴルジ装置に局在し、ミトコンドリア病患者骨格筋では障害を受けている細胞だけに発現していた。この分子の病態への関わり、特に内耳での発現をみることで、難聴に対する新たな治療法に結びつく知見が得られる可能性がある。

A. 研究目的

ミトコンドリア病は多彩な臨床症状を呈するが、その中でも感音難聴は頻度の高い臓器症状である。ミトコンドリア病の原因は、ミトコンドリアDNAの質的、量的異常と核DNA上の種々の遺伝子変異があるが、特にミトコンドリアDNA異常による場合に難聴を伴うことが多い。

新たな治療法を開発するには、分子生物学的なアプローチから病態に迫り、分子病理や細胞病理を理解することが重要である。今年度は、ミトコンドリアDNA欠乏によって発現上昇する新たな分子を見だし、その機能を解析し、難聴治療の基盤とする。

B. 研究方法

rho-zero 細胞（ミトコンドリアDNA欠く細胞）とそれに野生型のミトコンドリアDNAを細胞融合で導入した細胞のそれぞれから、poly Aを有するRNAを調整した。蛍光ラベルを付けたプライマーで増幅したPCR産物をゲル電気泳動を行い、両者で発現が明らかに異なるバンドを切り出して、MIDASを同定した。この分子の抗体を作製し、CPEO（4.9kbの欠失を有する症例）、MELAS（3243変異を有する症例）の骨格筋を用いて、その発現を調べた。

C. 研究結果

欠失例でも、3243点変異例でも、形態異常を示すragged-red fiberにおいて、発現上昇が認められた。

D. 考察

MIDASを強制発現させた細胞では、明らかにミ

トコンドリア体積の上昇とカルジオリピンの増加を確認している。

したがって、ミトコンドリア機能が低下しているragged-red fiberにおいて発現上昇が認められたことは、これらの筋細胞においてミトコンドリア容積を増大させる代償的反応が働いていると考えられる。

E. 結論

機能が低下しているミトコンドリアの機能をMIDASによるミトコンドリア容積の増大によって、機能回復を図ることが可能になる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Nakashima-Kamimura N, Asoh S, Ishibashi Y, Mukai Y, Shimara Y, Oda H, Munakata K, Goto Y, Ohta S: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *Journal of Cell Science* 118: 5357-5367, 2005.

・Takahashi N, Shimada T, Murakami Y, Katoh H, Oyake N, Ishibashi Y, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Vascular involvement in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *The American Journal of the Medical Sciences* 329: 265-266, 2005.

・後藤雄一：ミトコンドリアDNA異常によるヒト疾患．蛋白質核酸酵素 50: 1760-1764, 2005.

・後藤雄一：ミトコンドリア遺伝病．日本臨床 63 (増刊号12) : 75-80, 2005

2. 学会発表

(国際学会)

・Mimaki M, Komaki H, Kirino Y, Suzuki T, Goto Y. The mitochondrial DNA point mutation at the discriminator base of tRNA-Glutamate is necessary to cause benign infantile cytochrome c oxidase deficiency.

The 2006 Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 10.26-28, 2005, Salt Lake City, USA

・Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Clinical, pathological and genetic study on 23 patients with the mtDNA A3243G mutation. The 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research, 11.25, 2005, Tokyo, Japan

tric Research, 11.25, 2005, Tokyo, Japan

・Yamashita S, Murayama K, Nonaka I, Goto Y. Direct repeats at the break points of deleted mitochondrial DNA in 142 myopathic patients.

The 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research, 11.25, 2005, Tokyo, Japan

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
研究報告書

蝸牛窓経由のベクター投与法の確立

分担研究者：鈴木光也 東京警察病院耳鼻咽喉科部長

研究要旨

アデノウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入を蝸牛窓膜経由で行う際に用いられる鼓膜麻酔液の蝸牛窓膜処理時間の違いによる変化と蝸牛窓膜の術後の回復に関して形態学的に検討を行った。蝸牛窓膜上に鼓膜麻酔液（フェノールおよび4% キシロカイン）を滴下し3、7または15分間放置した後、側頭骨を摘出し、固定・脱灰後エポン包埋し切片を作成し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。次に蝸牛窓膜上に鼓膜麻酔液を滴下し15分間放置した後24時間後または2週間後に側頭骨を摘出し、固定・脱灰後エポン包埋し切片を作成して光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。鼓膜麻酔液によって7分間以上処置した動物において蝸牛窓膜の outer epithelium の変性と有毛細胞の消失といった組織学的変化が確認された。鼓膜麻酔液処理後24時間経過した蝸牛窓膜では、光学顕微鏡下に outer epithelium の変性は残存していたが、再鼓膜麻酔液処理後2週間経過した蝸牛窓膜では光学顕微鏡下に outer epithelium の再生が確認された。以上の結果から、鼓膜麻酔液で蝸牛窓膜を確実に安全に処理するためには、鼓膜麻酔液によって7分間処理された蝸牛窓膜は24時間以上透過性が高まった状態にあり、注意を要することが示唆された。

A. 研究目的

1) 内耳感覚細胞および支持細胞に安全に遺伝子導入する方法の確立
内耳障害に対する遺伝子治療の研究は内耳障害の予防や治療から始まり内耳有毛細胞の再生にと発展してきている。内耳には血液-内耳関門が存在するためウイルスベクターを全身投与しても内耳に到達しないため、遺伝子導入の手法としてこれまで内耳にウイルスベクターを直接投与する方法がとられてきた。有毛細胞の再生には支持細胞への遺伝子導入が必要であり、その方法としては内リンパ腔内に直接ベクターを投与する方法と外リンパ腔経由で投与する方法がある。これまで報告されたベクターの投与方法としては、蝸牛窓膜経由による鼓室階内への直接投与、蝸牛側壁に作成した小孔（cochleostomy）から鼓室階内への直接投与、蝸牛側壁に作成した小孔（cochleostomy）から前庭階内への直接投与、蝸牛側壁に作成した小孔（cochleostomy）から中央階内への直接投与、内リンパ腔内投与、鼓膜麻酔液（フェノールおよび4% キシロカイン）にて処置後の蝸牛窓膜経由投与などがある。蝸牛側壁に作成した小孔（cochleostomy）から中央階内への直接投与や内リンパ腔内投与など内リンパ腔に直接ベクターを投与する方法は、内耳への機械的障害が強く臨床応用には適していない。外リンパ腔に直接投与する方法ではコルチ器の障害は認められず難聴も出現しないが、支持細胞への遺伝子導入は難しい。鼓膜麻酔液にて処置後の蝸牛窓膜経由での投与では有毛細胞の障害を抑えつつコルチ器に遺伝子導入できる優れた方法であるが、鼓膜麻酔液による処置時間について安全性の検討が必要である。我々は、蝸牛窓膜を鼓膜麻酔液によって

処理する時間が蝸牛にどのように影響するかについて生理学的および形態学的検討を行い、7-15分間の鼓膜麻酔液処理時間で内耳へ遺伝子導入することが可能なこと、またコルチ器に遺伝子導入された例では蝸牛基底回転した1/2の有毛細胞の消失が観察されることを証明した。鼓膜麻酔液で処理された蝸牛窓膜の組織を観察すると outer epithelium が損傷されており、これにより蝸牛窓膜のバリア機能が低下してウイルスベクターなど高分子が内耳内に容易に移行するものと思われる。本研究では、鼓膜麻酔液で蝸牛窓膜を処理する方法の確実性と安全性を検討する目的として1)組織学的に outer epithelium の損傷を引き起こすのに必要な時間 2) 損傷を受けた outer epithelium が回復するかどうかの二点について検討を行った。

B. 研究方法

1) 全身麻酔下に、蝸牛窓膜上に鼓膜麻酔液（フェノールおよび4% キシロカイン）を50 μ l滴下し3 (n=5)、7 (n=5)または15 (n=5)分間放置し、次いで生理食塩水にて洗浄した後それらを完全にふき取り、断頭した。側頭骨を摘出し、直ちに2.5% glutaraldehydeによって固定した。脱灰後エポン包埋し、4 - 7 μ mの切片を作成して光学顕微鏡で観察した。組織学的に変化の見られた箇所を超薄切片を作成し、微細構造の変化を透過型電子顕微鏡で観察した。
2) 全身麻酔下に、蝸牛窓膜上に鼓膜麻酔液（フェノールおよび4% キシロカイン）を50 μ l滴下し15分間放置した。生理食塩水にて洗浄した後それらを完全にふき取り、24時間後 (n=3)または2週間後 (n=3)に断頭した。側頭骨を摘出し、直ちに2.5% glutaraldehydeによって固

定した。脱灰後エポキシ包埋し、4 - 7 μ mの切片を作成して光学顕微鏡で観察し組織学的に変化の見られた箇所を超薄切片を作成し、微細構造の変化を透過型電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1) 蝸牛窓膜を人工外リンパ液で処置した動物または鼓膜麻酔液で3分間処置では、蝸牛窓膜にまったく変化は認められず、有毛細胞の障害も観察されなかった。一方7分間以上鼓膜麻酔液で処置した全動物の蝸牛窓膜において outer epithelium の変性が確認された。7分間処理した動物では5匹中3匹に有毛細胞の消失が確認された。また15分間処理した動物では全例に有毛細胞の消失が確認された。現在、損傷を受けた蝸牛窓膜の微細構造の変化を透過型電子顕微鏡で観察中である。

2) 鼓膜麻酔液処理後24時間経過した蝸牛窓膜では、光学顕微鏡下に outer epithelium の変性は残存し再生は認められなかった。一方鼓膜麻酔液処理後2週間経過した蝸牛窓膜では、全動物において光学顕微鏡下に outer epithelium の再生が確認された。今後、鼓膜麻酔液処理後2週間経過した蝸牛窓膜の微細構造の変化を透過型電子顕微鏡で観察予定である。

D. 考察

1) 蝸牛窓膜の outer epithelium は物質の透過性に関するバリア機能の主体となる層として知られている。outer epithelium が鼓膜麻酔液に含まれているフェノールによって障害されることにより蝸牛層膜の透過性が高まり、アデノウイルスが蝸牛膜を通過すると考えられている。鼓膜麻酔液が外リンパ腔へ浸透することにより、鼓室階の外リンパの pH が低下して有毛細胞が消失したと思われるが、この外リンパの pH の低下は外リンパ-内リンパ関門の透過性の亢進をもたらし、それによってアデノウイルスが容易に内リンパ腔へ侵入できると推察されている。本研究において、蝸牛窓膜の outer epithelium の変性と蝸牛基底回転下 1/2 の有毛細胞の障害が15分間鼓膜麻酔液で処置した動物において全例認められたことからこの方法によってアデノウイルスベクターを用いて内耳への遺伝子導入を確実にを行うためには、15分間鼓膜麻酔液で処置する必要があると思われた。一方7分間鼓膜麻酔液で処置した蝸牛窓膜においてすでに outer epithelium の変性が認められたことから、7分間鼓膜麻酔液で処置することで蝸牛窓膜のバリア機能が傷害されることが考えられる。蝸牛窓膜が7分間以上鼓膜麻酔液にさらされた場合には、さまざまな耳毒性物質が中耳から内耳へ容易に移行できる状態になるといえる。本研究において、このバリア機能が傷害された状態は鼓膜麻酔液処理24時間経過しても残存すること

が判明した。このことは、この方法を臨床応用する場合のみならず、今日行われている手術を行う場合にも重大な意義をもつ。鼓膜麻酔液は鼓膜切開術、鼓膜換気チューブ留置術や鼓膜形成術（接着法）の際に使用される薬剤であり、鼓膜切開孔から中耳内に漏れてめまいを生じる例がときにあるといわれている。もしある程度の時間に蝸牛窓膜が鼓膜麻酔液にさらされた場合には、まず内耳障害の有無をチェックし少なくとも24時間以上は中耳炎の予防や中耳内への異物の侵入阻止に注意を払う必要があると思われる、本研究によって安全な鼓膜麻酔液の取り扱い方がより具体的になったといえる。

E. 結論

1) 鼓膜麻酔液によって処置した蝸牛窓膜の組織学的変化を継時的に観察した。鼓膜麻酔液によって15分間処置した場合、蝸牛窓膜の outer epithelium の変性と有毛細胞の消失が確認された。

2) 鼓膜麻酔液処理後24時間経過した蝸牛窓膜では、光学顕微鏡下に outer epithelium の変性は残存し再生は認められなかったが、鼓膜麻酔液処理後2週間経過した蝸牛窓膜では、光学顕微鏡下に outer epithelium の再生が確認された。

今回の研究によって、鼓膜麻酔液で蝸牛窓膜を確実に安全に処理する方法が明らかとなった。今後 Math1 や P27 の発現を down-regulation する遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを今回の方法を用いて投与し、有毛細胞の再生を機能と形態の両面から分析することにより、安全な有毛細胞再生手術が近い将来実現されることを期待する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- | | |
|---------|----|
| 1. 論文発表 | なし |
| 2. 学会発表 | なし |

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

内耳遺伝子導入による有毛細胞再生の研究

分担研究者：石本晋一 社会保険中央総合病院耳鼻咽喉科部長

研究要旨

1) 有毛細胞障害モルモット蝸牛におけるp27(Kip1)抑制による聴毛類似構造物の出現

A. 研究目的

情報化社会が急速に発展し、耳や眼からさまざまな情報が入るようになってきた。そして急速に高齢化が進行している中、難聴は大きな問題のひとつであると考えられる。難聴の多くは感音難聴で、その殆どはさまざまな理由で起こる有毛細胞の消失による。その原因としては加齢による変化、騒音や爆発音による音響暴露による障害、抗癌剤のシスプラチンやカナマイシンなどの抗生物質による原疾患の治療に有効である薬物の耳毒性によるものである。しかしながら現在のところ有毛細胞の消失に対する有効な感音難聴の治療はなく、補聴器による音響増幅効果に期待する以外に方法はない。そのため新しい治療法の確立が必要である。

近年の分子生物学的手法の進歩により蝸牛有毛細胞の再生にも新しい手法による治療法が動物実験において検討され、試みられている。これらの方法を用いる蝸牛の有毛細胞再生を誘導するためには大きく①有毛細胞に分化する幹細胞の移植、②支持細胞自体の有毛細胞への形質転換 (Math1 遺伝子の導入)、③支持細胞の分裂誘導 (分裂した) を促し分裂した細胞の有毛細胞への形質転換が考えられる。この中で我々は②、③の支持細胞自体の有毛細胞の形質転換、支持細胞の分裂誘導を惹起して有毛細胞への形質転換を誘導することに注目してきた。そして支持細胞から有毛細胞への形質転換を惹起するために適切な遺伝子を導入して形質転換を進める方法に取り組んできた。

今回は Math1 遺伝子組み込みアデノウイルスベクターの作成が遅くなり実験を遂行する計画中に他施設から Math1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを内耳 (蝸牛) へ導入することで薬物によって傷害を受けて聾になったモルモットの聴力がある程度回復できたという論文が Nature Medicine に掲載され、我々の研究課題として検証しようとしていた内容と類似して驚嘆した。Math1 遺伝子組み込みアデノウイルスベクターを蝸牛のコルチ器へ注入することでコルチ器の支持細胞から有毛細胞の再生が可能であることが証明されたが、機能改善は不十分なものであり臨床応用するには新たな取り組みが必要であると考えられた。そのため効率よく有毛細胞の再生を惹起させて聴力の回復させるため、本年の実験は昨年からはじめたばかりの再生遺伝子の組み込まれたアデノウイルスを用いて実験に取り組んだ。それは細胞増殖の調節因子である p27Kip1 である。

p27Kip1 は蝸牛の支持細胞に選択的に発現し、細胞増殖において細胞周期のインヒビターとして働くことが知られている。p27Kip1 をノックアウトしたマウスのコルチでは成熟後も細胞増殖が起こり外有毛細胞は 3 列ではなく、多数の

有毛細胞を認めることができたと報告されている。そのため p27Kip1 を抑制することで蝸牛支持細胞が増殖して有毛細胞へ形質転換する可能性があると考えた。そのため p27Kip1 siRNA アデノウイルスベクターを有する Jonathan Kill (Sound Pharmaceutical Inc) と共同研究をおこなうこととしてアデノウイルスベクターを提供してもらい実験を遂行した。本年は p27Kip1 遺伝子を導入することで有毛細胞の再生が起こることの再現性を確認して走査電子顕微鏡で再生した有毛細胞の確認を行った。

B. 研究方法

① targeting p27Kip1 siRNA 組み込みアデノウイルスベクターの蝸牛への投与

細胞周期を抑制している遺伝子である p27Kip1 遺伝子を選択的に抑制する方法としては p27Kip1 遺伝子の 2 本鎖 RNA である siRNA を蝸牛のコルチへ導入して相同な p27Kip1 遺伝子の mRNA を破壊し、その蛋白発現を抑制するという方法が考えられる。このような siRNA を組み込んだアデノウイルスベクターを手術的に蝸牛を開窓してコルチの支持細胞内へ導入して支持細胞の細胞周期を抑制している p27Kip1 遺伝子を働かないようにして細胞増殖を惹起して有毛細胞の再生を試みる実験を行った。

動物には ABR 正常 (聴力正常) の白色モルモットを用いた。プロトコールはいままでどおり Math1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを投与して有毛細胞の再生に成功した時のプロトコールを参考にしてはじめにカナマイシン (KM) とエタクリンサン (EA) を経静脈的に投与して有毛細胞を消失させて聾にした後、5 日目に右耳の手術を行い、アデノウイルスベクター (targeting p27Kip1 siRNA) を右耳の蝸牛の中央階へ投与した。投与量は $5 \mu\text{l}$ でウイルス量は 6.7×10^9 であった。またコントロールとしては random sense siRNA を投与した。そして 60 日後に動物を断頭して走査電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

① 内耳有毛細胞の再生

targeting p27Kip1 siRNA を投与したものでは蝸牛の全回転においてカナマイシンとエタクリン酸を投与して有毛細胞傷害モデルを作成した場合では、通常観察することができない内有毛細胞領域、外有毛細胞領域に聴毛様のものが観察できた。また、これはコントロール群 (random sense siRNA) を投与した群およびでは観察できなかった。聴毛は正常の内・外有毛細胞のような聴毛とは異なっていた。また通常内・外有毛細胞は 1 列、外有毛細胞は 3 列あるがそのような配列の形成は観察できなかった。この聴毛様の細胞増殖は再現性あり、数回に分けた実験を遂行したが同一の結果を得ることができた。

この結果から有毛細胞障害後に内耳蝸牛の支持細胞のp27Kip1遺伝子を抑制することができれば支持細胞が増殖して聴毛様構造物を呈する細胞に形質転換する可能性を示唆された。この細胞は主に支持細胞領域に認めることができたが、聴毛は正常のものよりも短く、束になっていた。さらに聴力として機能する以外の部位にも認めることができ、実際の機能回復がどの程度おこるか、この有毛細胞類似細胞の機能に関しては今後の検討課題である。

D. 考察

高齢化社会になり、さらに情報化社会を迎えている昨今、人の感覚器への機能回復への要求は強くなっている。難聴の原因は薬物、騒音や加齢などさまざまな要因があるが感音難聴は現代の医学で治療できない疾患の1つに挙げられる。それは有毛細胞の形態学的特長から哺乳類に於ては再生が不可能のためである。そのためさまざまな薬剤治療が試されたが回復することはできなかった。現在では難聴に対しては補聴器を使用する以外には方法がないのが現状である。しかしながら補聴器では自然のような音色にはならず、さらにハウリングなどにより不満が強く適応できない場合も多く認められる。今後も現在の治療法（突発性難聴に対するステロイド治療など）では聴力の回復は望めないために新しい治療法が必要であり、研究が進められている。その治療法は分子生物学的手法を用いる方法で遺伝子導入方法や幹細胞移植術という手法で研究が進められている。

我々は以前シシガン大学で研究を行いMath1遺伝子導入アデノウイルスベクターを蝸牛のコルチに投与することで薬物で有毛細胞を処理した動物実験（モルモット）で有毛細胞の再生を確認した。その事実は哺乳類においても *in vivo* で支持細胞から有毛細胞の再生が可能であることが証明した。しかし、感音難聴を治療するためには有毛細胞を効率よく適切な部位に再生させなければいけない。本年は薬物で処理して聾したモルモットの内耳に Math1 遺伝子の導入を行い、ある程度聴力が回復できたという論文が *Nature Medicine* に掲載された。しかし聴力の回復は十分なものではなく、Math1 遺伝子導入による有毛細胞の再生には限界があり更なる研究が必要であると考へた。それには Math1 遺伝子以外の遺伝子の研究が必要不可欠であると考へられた。そのため本年は Math1 遺伝子ではなく違う方向から有毛細胞の再生に力を入れて実験を遂行した。

その1つの考へてとしてコルチに存在する支持細胞から有毛細胞への形質転換ではなく支持細胞の分裂増殖を誘導することで有毛細胞の再生も起こるのではないかと推測した。細胞増殖を調整する遺伝子には CDK とよばれ細胞増殖を抑制する遺伝子がある。その中の1つ p27Kip1 遺伝子が内耳で重要な役割をしていることが以前から報告されていた。たとえば p27Kip1 遺伝子を down regulation したノックアウトマウスでは外有毛細胞が4列や5列になるものが以前に報告されている。また p27Kip1 遺伝子抑制蛋白の内耳への導入で支持細胞の分裂が誘導されることが報告されている。今回この事実に着目して p27Kip1 遺伝子を down regulation する方法として p27Kip1 遺伝子の siRNA の組み込んだアデノウイルスベクターを中央階からコルチ器に投与した結果 Math1 以外の遺伝子に於ても有毛細胞の再生が起こることがわかった。再

現性がありコントロール群で異なった聴毛を有する有毛細胞が出現しないことより p27Kip1 遺伝子が支持細胞誘導する非常に重要な遺伝子であると推測できた。

今回観察された聴毛は正常のものとは異なっていた。一昨年 Minoda らは Math1 遺伝子と skip2 遺伝子 (CDK の1つ) をアデノウイルスに組み込んでモルモットの蝸牛へ注入した結果を報告した。その結果は Math1 遺伝子単独で再生した有毛細胞とは異なる聴毛を有した有毛細胞様の細胞が再生した。しかしながら、その際は skip 2 遺伝子単独では有毛細胞様の聴毛の再生は認めることができず Math1 遺伝子で再生したものが何らかの修飾を受けて再生したものと考えられた。今回は p27Kip1 遺伝子単独で有毛細胞様の聴毛を有した細胞の再生を確認した。これは支持細胞の分裂を停止させている遺伝子調節に p27Kip1 遺伝子が強く関与していることが示唆できる。単独でも細胞の分裂を誘導する潜在能力を有する p27Kip1 遺伝子と Math1 遺伝子を組み合わせて蝸牛へ注入した場合どのような結果がでるか検討の必要があり、実験を遂行中である。

E. 結論

siRNA法を用いて p27Kip1 遺伝子を down regulation する targeting p27Kip1 siRNA を組み込んだアデノウイルスベクターを直接コルチ器へ投与することで有毛細胞類似細胞を観察できた。この結果から Math1 遺伝子以外の遺伝子でも蝸牛有毛細胞の再生の可能性があることが示唆された。このことで有毛細胞再生の研究は、また一歩新たな段階に入ったといえる。Math1 遺伝子単独では有毛細胞の再生には限界があるため Math1 遺伝子単独ではなく有毛細胞再生の可能性のある遺伝子を組み合わせることで有毛細胞再生という段階から聴力回復という段階へ応用できる可能性があるのではないかと考へる。

特に Math1 遺伝子と p27Kip1 遺伝子を組み合わせることで支持細胞からの形質転換および支持細胞増殖による支持細胞の形質転換を結びつけることで有毛細胞再生から聴力回復という課題を解決する可能性があると考えられる。また増殖因子の投与やアデノウイルスベクターをから支持細胞内への導入を効率よく行うために免疫抑制剤などの使用も必要である可能性がある。今後更なる検討で動物実験において内耳有毛細胞の再生から聴力回復という機能改善が解決して、ヒトへの臨床応用に結びつけることができる日が近いと信じている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito K, Suzuki S, Murofushi T, Ishimoto S, Iwasaki S, Karino S. Neuro-otologic findings in unilateral isolated narrow internal auditory meatus. *Otol Neurotol*. 2005 Jul;26(4):767-72.
- 2) Ishimoto S, Ito K, Yamasoba T, Kondo K, Karino S, Takegoshi H, Kaga K. Correlation between microtia and temporal bone

malformation evaluated using grading systems. Archives of Otolaryngol Head Neck Surg. 2005;131:326-9

3) Tsunoda K, Ishimoto S, Aikawa J, Shinogami M, Murakami R, Saigusa H, Kondou K, Bitou S Bent (head-down) posture and aberrant common carotid arteries of the neck: another new risk factor for stroke? Laryngoscope. 2005 Nov;115(11):2074-5.

2. 学会発表

1) 山唄達也、石本晋一.有毛細胞障害モルモット蝸牛におけるp27(Kip1)抑制による聴毛類似構造物の出現.第 50 回日本聴覚医学会,2005年9月22-24日

2) 石本晋一、伊藤健、山唄達也、加我君孝.小耳症外耳道狭窄・閉鎖症における聴力像と側頭骨 CT の解析. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 2005年5月19-21日。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
研究報告書

感音難聴におけるGLUT5の関与について

分担研究者 浅野 知一郎

東京大学医学部分子細胞生物学専攻生化学・分子生物学講座
代謝生理化学 助教授

研究要旨

GLUT5蛋白は小腸においてフルクトースの取り込みに重要な役割を果たしている。最近、GLUT5が内耳において発現し、これが外有毛細胞において発現しており、モーター蛋白としての役割を担うことで聴覚に重要であるとの報告がなされた。難聴の成因には未だ不明の部分が多く残されており、我々はGLUT5ノックアウトマウスを作製し、GLUT5の聴覚における役割を解明し、難聴に対する新たな治療方法への開発に結びつけたい。GLUT5をノックアウトしたES細胞の樹立に成功し、GLUT5欠損マウスを作成した。現在機能解析中である。

A. 研究目的

糖輸送担体は12回膜貫通蛋白であり、グルコース及びフルクトースの輸送に関わっている。我々は、糖輸送担体を糖尿病との関わりにおいて研究を進めてきたが、最近、GLUT5に糖を輸送する機能のみでなくモーター蛋白としての機能が報告された。これは外有毛細胞の機能に影響する可能性が高い。そこで、GLUT5ノックアウトマウスの作製を行った。

B. 研究方法

胚性幹細胞（ES細胞）は、マウスのブラストシスト（約3日胚）から確立された細胞で、マウスの胚に戻すと個体を形成するほぼすべての細胞に分化する能力をもつ。生殖細胞にも分化することができるため、ES細胞由来のマウス個体を作出することが可能である。このES細胞を遺伝的に操作することにより、GLUT5ノックアウトマウスを作成できた。

GLUT5ノックアウトのためのベクターのコンストラクトは、exon2の翻訳開始部位の200塩基対を欠損させたexon1からexon4までのゲノム配列を含む。exon2の欠損部位には、LacZ遺伝子が挿入されており、GLUT5のプロモーター下に発現するLacZを観察することで、生体でのGLUT5の発現をモニターできる。その他、neomycin耐性遺伝子（neo）、tyrosin kinase遺伝子（TK）を含む。さらに、lox配列を有しており、Creリコンビナーゼを発現させることにより、GLUT5のプロモーター下に種々の遺伝子（X）をノックインさせ、その蛋白を発現させることが可能である。

作成したベクターを、エレクトロポレーション法を用いてES細胞に導入した。相同組換えによって遺伝子を導入されたES細胞を2種の薬剤を用いて選択した。まず、ネオマイシン耐性遺伝子を遺伝子もつES細胞を、培地中へのネオマイシン投与により選択した。そして、相同組換えをおこなったチロシンキナーゼ遺伝子をもつES細胞を、ガンシクロビルの投与により排除した。相同組換えをおこなったES細胞をサザンプロットにより確認し、4クローン得た。

C. D. E. 研究結果・結論・考察

ES細胞からマウスを作成するために二つの方法を用いた。そのひとつがインジェクション法で、これはマウスのブラストシスト（胚胎）にES細胞を入れて内部細胞塊と一緒に発生させる方法である。もうひとつがアグリゲーション法（細胞凝集法）である。これはマウス2日胚（8細胞）の透明帯を取り除きES細胞と一緒に培養し凝集塊を作らせる。この凝集塊を一日培養すると一個のブラストシストになる。インジェクション法またはアグリゲーション法により得られたブラストシストを仮親の子宮に移植し発生させる。現在、総数454個の胚を移植し、キメラマウス4匹を得た。これらキメラマウスを交配させることでGLUT5ヘテロ欠損マウスを作成し、さらにノックアウトを作成した。現在機能解析を行っている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

感音難聴におけるWFS1蛋白の関与

分担研究者：岡 芳知 東北大学分子代謝病態学分野 教授

研究要旨

若年発症糖尿病をきたすウオルフラム症候群患者は、WFS1遺伝子異常のホモ接合体であり感音難聴もしばしば合併する。さらに、このWFS1遺伝子異常のヘテロ接合体でも、低音域感音難聴（LFSNHL）をきたすことが明らかにされ、WFS1と難聴との関わりはさらに注目を浴びることになった。すなわち、我々がクローニングしたWFS1の機能解明は感音難聴の発症機序の解明と治療法の開発にも重要である。そこで、WFS1ノックアウトマウスを作製してWFS1機能の解析を進めた。WFS1欠損により小胞体ストレス応答が亢進し、PERKリン酸化の亢進、XBP1mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が認められた。これに伴いCHOPの発現およびcaspase-3の切断の亢進も認められ、アポトーシスシグナルが活性化されていることが明らかとなった。さらに、興味深いことに、WFS1欠損膵島ではBrdUの取り込みが減少しており、細胞の増殖障害が認められた。また、小胞体カルシウム動態の異常も認められた。WFS1発現の多い内耳の細胞でも同様の障害が生じていることが推測される。

A. 研究目的

インスリン治療を必要とする若年発症糖尿病と視神経萎縮を主徴とするWolfram症候群は、感音難聴もしばしば合併する常染色体劣性遺伝疾患である。我々は、日本人3家系を主要な解析家系としたpositional cloningにより、この原因遺伝子を世界に先駆けて同定し、WFS1と名付けた（Inoue H, Tanizawa Y et al. Nature Genetics 1998）。この遺伝子異常のヘテロ接合体でも、低音域感音難聴（LFSNHL）をきたすことが2001年に発表され、WFS1と難聴との関わりはさらに注目を浴びることになった。本研究の目的はWFS1機能の解明である。

B. 研究方法

WFS1欠損マウスより単離した膵島を用い、小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導、小胞体ストレス応答の詳細を検討した。さらに、このWFS1欠損単離膵島ならびにアデノウイルスベクターによりWFS1蛋白を過剰発現させた膵島を用いて、細胞内カルシウム動態も検討した。また、ドキシサイクリン誘導性にWFS1蛋白を過剰発現あるいはノックダウンするHEK293細胞を作製し、この細胞でも解析した。

C. 研究結果

WFS1が、小胞体ストレス応答のコンポーネントのひとつであり、小胞体ストレスから細胞を守る働きを担う可能性が示唆されていたので、WFS1欠損膵島での小胞体ストレス応答の詳細を検討した。小胞体ストレス応答では、PERKのリン酸化を起点とする翻訳抑制、ATF6の活性化やIRE1によるXBP1の活性化に始まるシャペロン蛋白の発現誘導が惹起されるが、WFS1欠損膵島では、PERKリン酸化の亢進、XBP1mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が認められ、小胞体ストレス応答が亢進していることが観察された。また、小胞体ストレス応答の亢進に伴ってCHOPの発現およびcaspase-3の切断の亢進も認められ、アポトーシスシグナルが活性化されていることも明らかにした。さらに、興味深いことに、WFS1欠損膵島ではBrdUの取り込みが減少しており、β細胞の増殖障害が認められることが明らかとなった。その分子機構に関与するものとして、p21cip1の発現亢進を見出し、また、単離膵島およびMIN6細胞を用いた検討から、小胞体ストレスがp21cip1の発現を転写レベルで増強することを明らかにした。

さらに、小胞体からのカルシウム放出を介してインスリン分泌を惹起するカルバコールおよびグルコー

スでWFS1欠損膵島を刺激すると、インスリン分泌は約30%低下し、細胞質のカルシウム濃度変化は、どちらの刺激に対してもWFS1欠損β細胞において30-40%の低下を認めた。一方、WFS1蛋白を過剰発現させた膵島では、インスリン分泌が両刺激に対し35-50%増加した。そこで、細胞内カルシウム動態制御におけるWFS1蛋白の役割を解析するため、ドキシサイクリン誘導性にWFS1蛋白を過剰発現あるいはノックダウンするHEK293細胞を作製し解析した。その結果、過剰発現細胞では小胞体カルシウム濃度が増加し、さらに小胞体カルシウム枯渇により惹起される容量性カルシウム流入の増加が認められた。対照的に、WFS1蛋白をノックダウンするHEK293細胞では、小胞体カルシウム濃度および容量性カルシウム流入の減少が認められた。

D. E 結論・考察

WFS1蛋白は、小胞体カルシウムの恒常性の維持に重要な役割を果たしており、ウオルフラム症候群では、WFS1蛋白の欠損が小胞体の機能異常を来しインスリン分泌低下をもたらすとともに、小胞体ストレスによる細胞の増殖抑制・アポトーシスの亢進をきたすと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic β-cells via transcriptional activation. *Eur J Endocrinol.* 153: 167-176, 2005
2. Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, Katagiri H, Endou H, Oka Y. Cell-type specific activation of metabolism reveals that β-cell secretion suppresses glucagon release from α-cells in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290: 308-316, 2006
3. Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-I, Oka Y. WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum

stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic β -cells. Hum Mol Genet. in press 2006

2. 学会発表

第48回日本糖尿病学会年次学術集会 2005年5月12日-14日, 神戸市

WFS1欠損膵 β 細胞における小胞体ストレス下の代謝分泌連関

- 石原 寿光、田村 明、高橋 累、山田 高弘、山口 賢、鵜田 藍、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、宮崎 純一、岡 芳知
- WFS1欠損膵島における小胞体ストレス応答の検討
山田 高弘、石原 寿光、鵜田 藍、山口 賢、高橋 累、田村 明、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知
- WFS1欠損マウスにおける小胞体ストレス応答ならびに β 細胞脱落への遺伝的背景の関与
高橋 累、石原 寿光、田村 明、山田 高弘、山口 賢、鵜田 藍、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知
- WFS1蛋白による細胞内カルシウム動態制御機構の解析
武井 大祐、石原 寿光、田村 明、高橋 累、山田 高弘、山口 賢、鵜田 藍、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知

- 急性の高インスリン血症は血中アディポネクチン濃度を低下させる
平井 完史、石垣 泰、野々垣勝則、檜尾 好徳、山田 高弘、善積 信介、沖本 久志、高橋 和眞、石原 寿光、荻原 健英、片桐 秀樹、鈴木 進、岡 芳知
- 骨髄移植によるWFS1遺伝子欠損maマウスにおける慢性 β 細胞障害の改善
長谷川 豊、片桐 秀樹、荻原 健英、石原 寿光、石垣 泰、山田 哲也、今井 淳太、宇野 健司、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

Keystone Symposia: Diabetes Mellitus and the Control of Cellular Energy Metabolism. Jan.21-26, 2006 Vancouver, British Columbia, Canada

- Role of eNOS in Beta Cell Regeneration after Bone Marrow Transplantation in STZ-Diabetic Mouse Models (Oral presentation)
Ogihara T, Katagiri H, Hasegawa Y, Oka Y.

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|--|--------------------|-----------|------|
| <u>Yamasoba T</u> , Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M | Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. | Neuroscience Letters | 380 | 234-238 | 2005 |
| Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth S, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, <u>Yamasoba T</u> , Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. | Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. | Science | 309 | 481-484 | 2005 |
| <u>Yamasoba T</u> , Goto Y, Komaki H, Mimaki M, Sudo A, Suzuki M. | Cochlear damage due to germanium-induced mitochondrial dysfunction in guinea pigs | Neuroscience Letters | 395 | 18-22 | 2006 |
| <u>Yamasoba T</u> , Kondo K. | Evidence of supporting cell proliferation in vivo in mature mammalian cochlea. | Cell and Tissue Research | | in press | |
| Nakashima-Kamimura N, Asoh S, Ishibashi Y, Mukai Y, Shimara Y, Oda H, Munakata K, <u>Goto Y</u> , Ohta S | MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction | Journal of Cell Science | 118 | 5357-5367 | 2005 |
| Takahashi N, Shimada T, Murakami Y, Katoh H, Oyake N, Ishibashi Y, Nishino I, Nonaka I, <u>Goto Y</u> | Vascular involvement in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes | The American Journal of the Medical Sciences | 329 | 265-266 | 2005 |
| <u>後藤雄一</u> | ミトコンドリア DNA 異常によるヒト疾患 | 蛋白核酸酵素 | 50 巻 14 号 | 1760-1764 | 2005 |
| <u>後藤雄一</u> | ミトコンドリア遺伝病 | 日本臨床 | 63 巻 増刊 12 号 | 75-80 | 2005 |

| | | | | | |
|---|---|---|-----|----------|------|
| Ito K, Suzuki S. Murofushi T, <u>Ishimoto S</u> . Iwasaki S, karino S. | Neuro-otologic findings in unilateral isolated narrow internal auditory meatus. | Otology and Neurotology | 26 | 767-72 | 2005 |
| <u>Ishimoto S</u> , Ito K, <u>Yamasoba T</u> , Kondo K, Karino S, Takegoshi H, Kaga K. | Correlation between microtia and temporal bone malformation evaluated using grading systems. | Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery | 131 | 326-9 | 2005 |
| Tsunoda K, <u>Ishimoto S</u> , Aikawa J, Shinogami M, Murakami R, Saigusa H, Kondo K, Bitou S | Bent (head-down) posture and aberrant common carotid arteries of the neck: another new risk factor for stroke? | Laryngoscope | 115 | 2074-5 | 2005 |
| Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, <u>Oka Y</u> , Tanizawa Y. | Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic β -cells via transcriptional activation. | European Journal of Endocrinology | 153 | 167-176 | 2005 |
| Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, Katagiri H, Endou H, <u>Oka Y</u> | Cell-type specific activation of metabolism reveals that β -cell secretion suppresses glucagon release from α -cells in rat pancreatic islets. | American Journal of Physiology-Endocrinology & Metabolism | 290 | 308-316 | 2006 |
| Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-I, <u>Oka Y</u> . | WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic β -cells. | Human Molecular Genetics | | in press | 2006 |

書籍

| 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 |
|-------------------------|---------------------|-----------|-------------------|-----------|-----|------|---------|
| <u>山嵜達也</u> | ミトコンドリア遺伝子異常による感音難聴 | 加我君孝・小宗静雄 | 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の最新医療 | 先端医療技術研究所 | 東京 | 2005 | 105-109 |
| 染谷慎一、 <u>山嵜達也</u> 、田之倉優 | 老人性難聴の予防 | 加我君孝・小宗静雄 | 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の最新医療 | 先端医療技術研究所 | 東京 | 2005 | 110-113 |



Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift

Tatsuya Yamasoba*, Akram Pourbakht, Takashi Sakamoto, Mitsuya Suzuki

Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Received 13 October 2004; received in revised form 12 January 2005; accepted 15 January 2005

Abstract

This investigation tested the hypothesis that a noise-induced temporary threshold shift (TTS) can be attenuated by a peroxynitrite scavenger, ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoxazol-3(2H)-one). Guinea pigs received an oral dose of the vehicle or 10 mg/kg ebselen 1 h before exposure to 115 dB SPL 4-kHz octave band noise for 3 h. In controls, auditory brainstem response (ABR) thresholds increased by 25–45 dB immediately after noise and returned to pre-exposure baseline thresholds 7 days later. Ebselen eliminated this ABR threshold shift following noise exposure. In controls, swelling of the afferent dendrites beneath the inner hair cells was evident immediately after noise, whereas ebselen significantly reduced this pathology. These findings suggest that scavenging peroxynitrite can attenuate noise-induced excitotoxicity and, thereby, TTS. © 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Guinea pig; Noise-induced hearing loss; Nitric oxide; Peroxynitrite

After exposure to intense sound, auditory thresholds can be elevated permanently, or temporarily for minutes, hours or days, depending on the parameters of acoustic overstimulation. These two phenomena, permanent (PTS) and temporary threshold shift (TTS), are dependent on mechanisms not fully understood [1,9,18]. At least two different mechanisms have been proposed for PTS: a direct mechanical trauma and a metabolic overstimulation of the cellular elements of the organ of Corti (OC). Direct mechanical trauma may damage the delicate stereocilia of the sensory hair cells or, with higher stimulation intensity, the structural integrity of the OC and basilar membrane. Intense noise exposure may also override the pathways that are responsible for maintaining OC homeostasis, thus leading to metabolic changes that compromise the system. Metabolic overstimulation may be associated with biochemical traumatic processes, most notably the generation of reactive oxygen species (ROS), which may serve as triggers for necrosis or apoptosis [4,10].

Several mechanisms proposed for TTS include synaptic fatigue, metabolic fatigue of either stria vascularis or the hair

cells, and changes in cochlear blood flow. Histopathological changes reported in TTS include disarrayed, splayed, fused, collapsed, or floppy stereocilia of the hair cells, buckling of the pillar bodies, and swelling of the afferent nerve terminals [9,16,17]. Postsynaptic damage in the afferent dendrites beneath the inner hair cells (IHCs) is an important component of noise-induced hearing loss [15–17], and synaptic repair mechanisms are thought to be involved in restoring function after acoustic trauma [15,17].

It has been shown that the IHCs release glutamate as a neurotransmitter activating the afferent dendrites [11] and that excess release of glutamate due to intense noise exposure causes excitotoxicity in the afferent dendrites [14]. Excess synthesis of nitric oxide (NO), which can react with $O_2^{\bullet-}$ to form highly aggressive peroxynitrite ($ONOO^-$) radicals, is known to play an important role in glutamate excitotoxicity [3,6]. Glutamate and NO can act independently or sequentially to cause excitotoxicity. NO may induce glutamate release by neurons, which then stimulates NMDA receptors and triggers excitotoxicity [8]. Conversely, when NMDA receptors are activated, Ca^{2+} influx stimulates NO production through calcium- and calmodulin-dependent neuronal nitric oxide synthase, potentially leading to neuronal death [3]. The

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5800 8926; fax: +81 3 3814 9486.
E-mail address: tyamasoba-ky@umin.ac.jp (T. Yamasoba).