

200500619B

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15年度～平成17年度 総合研究報告書

主任研究者 山 唄 達 也

平成18 (2006) 年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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

山唄 達也 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 8

III. 研究成果の刊行物・別刷 12

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、Wolfram症候群の一症状である糖尿病を来すことを確認した。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た。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。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、エネルギー代謝の障害からアポトーシスが生じ、聴覚機能・神経伝達・イオン代謝の障害が生じることを明らかにした。
- 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) を作成した。アポトーシスの亢進により早期に老化症状を示すこと、A B Rにて後天性に早期に難聴が出現すること、ラセン神経節・コルチ器に変性が生じることを観察した。また蝸牛のDNAマイクロアレイ解析を行った。
- 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。MIDASの発現は、ミトコンドリアDNA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。
- 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 tip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) 音響外傷後に対するebselen、iNOS inhibitor、caspase inhibitorの治療効果を確認した。音響外傷直後の蝸牛組織を調べ、ebselenがexcitotoxicityを抑制することを確認した。
- 8) bcl2が細胞内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。
- 9) モルモットにエタクリン酸・カナマイシンで内耳障害を来たし、ラセン靭帯の fibrocyte や蝸牛神経間の glia に増殖能があること、蝸牛コルチ器支持細胞(ダイテルス細胞)にも増殖能があること、増殖は障害後3-5日後にピークになることを見出した。
- 10) アデノウイルスベクター投与による内耳障害がステロイドにより予防できることを示した。また蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する、新しい内耳遺伝子導入法を開発した。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。
- 11) モルモット蝸牛にAtoh1組み込みアデノウイルスベクターを投与し、支持細胞が有毛細胞に形態変化することを見出した。
- 12) 有毛細胞障害後のモルモット蝸牛にp27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与したところ、支持細胞が増殖し、有毛細胞様の細胞に変化(再生)することを見出した。
- 13) ミトコンドリア遺伝子1555位点変異の大家系において、アミノ配糖体抗菌剤曝露なしでも難聴が生じること、同世代では難聴の程度が類似するが世代間で差があること、他のミトコンドリア遺伝子に異常は無いことを見出した。
- 14) 突発性難聴においてマニトールとステロイドホルモンの併用療法の治療効果について検討した。

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 代謝生理化学 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ジカル産生が関与し、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)は岡芳知(東北大学)が作成した。その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。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。さらに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。

2) Glut5のノックアウトマウスを通常の手法で作成した。

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、pol y 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。

6) ミトコンドリア遺伝子1555位点変異の大家系において、アミノ配糖体抗菌剤曝露なしでも難聴が生じるか、同世代では難聴の程度が類似するが世代間で差があるか、他のミトコンドリア遺伝子に異常は無いのか、検討した。

②内耳障害の予防・治療

1) 音響外傷や耳毒性薬剤に対する種々の薬剤の予防・治療効果については、ABRを前後で測定し、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。用いた薬剤はEbselenなどのフリーラジカルスカベンジャー、iNOS inhibitor、およびcaspase inhibitorである。Ebselenによるtemporary threshold shiftの予防効果の検討では、透過電顕による観察も加えた。アポトーシスの評価としてホルマウントによるTUNEL法の導入を行い、耳毒性薬剤後のアポトーシス出現時期・割合について定量的に評価した。

2) 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。

3) 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Gene Chips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

蝸牛窓膜経路のベクター投与方法の検討を行った。LacZを組み込んだアデノウイルスベクターを用い、その内耳内分布を調べた。また内耳障害の程度についてはABR計測と有毛細胞のカウントを行った。

2) 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・脱灰後エポキシ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・脱灰後エポキシ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。

3) 支持細胞から有毛細胞への変換

Atoh1を組み込んだ改良型アデノウイルスベクターの作成を行った。また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。

4) 支持細胞の増殖能の検討

カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットおよびラットに難聴を作成し、BrdUを連日投与して細胞増殖能について検討した。surface preparationを用いた検討で、この細胞がどの細胞であるか検討した。

④突発性難聴の治療

東京大学附属病院を発症後1週間以内に受診した突発性難聴症例に対し、従来行っていた副腎皮質ホルモン治療に加え、マニトールを10日間付加投与し、その効果を検討した。

C. 研究結果

①遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

1) 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では血糖値、血中インシュリンの測定、糖負荷試験などの検討、および膵臓の組織学検討から後天的に糖尿病が発症することを確認した。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WFS1欠損膵島では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) ミトコンドリア脳筋症のモデル動物の O. 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) を作成した。これは野生型では3年生存するのに比し、1年半しか生存できず、早期に白髪、脱毛、筋肉萎縮などの老化現象を生じ、アポトーシスが亢進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upregulate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。

6) ミトコンドリア遺伝子1555位点変異の大家系において、アミノ配糖体抗菌剤曝露なしでも難聴が生じること、同世代では難聴の程度が類似するが世代間で差があること、他のミトコンドリア遺伝子に異常は無いことを見出した。

②内耳障害の予防・治療

1) ebselenはtemporary threshold shiftを抑制し、透過電顕の観察からこれはexcitotoxicityを予防したためであることが判明した。

2) iNOS inhibitor、およびcaspase inhibitorも著明に音響外傷を軽減した。またこれらの薬剤は音響外傷後の蝸牛内のcaspase発現を抑制していた。

3) アミノ配糖体による蝸牛有毛細胞のアポトーシス発現は、投与数時間以内に生じ、2-3日でピークとなった。このTUNEL陽性細胞の出現は組織学的に有毛細胞が破壊されるずっと以前に生じていた。

4) 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。

5) 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。

6) 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) 蝸牛窓に鼓膜麻酔液を置いてからベクターを投与する方法で内耳に幅広く遺伝子導入でき、ほとんど内耳障害を来さないことが判明した。

2) 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。

3) カナマイシンとエタクリン酸によりモルモットおよびラットに難聴を作成したところ、蝸牛コルチ器にもわずかながら増殖能がみられ、これはダイテルス細胞であることが判明した。増殖のタイミングは難聴作成後3-5日後がピークであった。

4) 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の細胞に変化することを見出した。これらの細胞はミオシンも発現していた。カナマイシンおよびエタクリン酸でモルモットに難聴を作成した後、内耳にこのベクターを投与したところ、支持細胞が増殖し、一部モザイク状に有毛細胞様細胞が出現(再生)していた。

④突発性難聴の治療

症例数は少ないが、マニトール併用投与群において低音域の聴力改善がより良好な結果が得られた。

D. 考察

①遺伝性難聴モデルの作成・病態の精査

WFS1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。難聴の発現は遅く軽度であったが、これは人の臨床像に類似している。

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DN

A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

ebselenは音響外傷を予防したが、この薬剤はNOおよびONOOを除去する効果とグルタチオン類似の効果があり、強大音響によって生じるreactive oxygen metaboliteの除去が蝸牛障害軽減に有効であることが示された。また音圧を下げた場合のtemporary threshold shiftの抑制はexcitotoxicityを予防するためであり、NOおよびONOO除去に密接な関係があることが示唆された。またiNOS inhibitor、およびcaspase inhibitorも著明に音響外傷を軽減したが、これらの薬剤は音響外傷後の蝸牛内のcaspase発現を抑制しており、アポトーシスを引き起こすシグナルの活性化予防が重要と思われた。

細胞死を抑制する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

蝸牛窓経路のベクター投与方法は、内耳に直接投与する方法に比べて内耳障害の危険性が極めて小さく、臨床応用にむけてまた一つ進歩が得られた。

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。

は乳類蝸牛には増殖能がないとずっと信じられていたが、我々は少ないながらも存在することを明らかにした。またp27siRNA組み込みアデノウイルスベクターを投与すると、支持細胞が有毛細胞様細胞に変化するところを見出した。難聴モルモットにこのベクターを投与したところ、有毛細胞が部分的に再生することも見出した。Atoh1の導入では支持細胞の増殖はなく、支持細胞の形質転換のみ誘導できたが、本方法を組み合わせることで、より確実に有効な有毛細胞の再生が期待できる。

④突発性難聴の治療

これまで突発性難聴の治療に本邦では副腎皮質ホルモンが使用されてきた。それ以外の薬剤の効果は否定されている。マニトールはフリーラジカルスカベンジャーであり、かつ弱い鉄キレーターであり、強力な抗酸化効果が期待される。実際動物実験で、音響外傷、アミノ配糖体やシスプラチンの耳毒性、虚血などから蝸牛を保護することが示されている。今回の結果は人の突発性難聴においてもマニトールが有効な可能性を示しており、今後症例を増やして検討したい。

E. 結論

WFS 欠損(ノックアウト)マウスの検討により、ヒトにおけるWolfram症候群の症状発現機序が検討できるようになった。ノックアウトなどの遺伝的に修飾したマウスモデルを用いた病態解析は有効な手法である。POLGマウス、ゲルマニウム投与マウスもミトコンドリア機能障害の難聴モデルとして用いることができた。音響外傷においてはアポトーシス誘導を抑制することが重要であると判明した。これをターゲットにした治療法の開発が必要であるが、今回FNK-PTDという細胞内のアポトーシスシグナルに作用する蛋白を全身投与して蝸牛有毛細胞障害を予防することができ、新しい創薬の可能性を示唆できた。またDNAtipを用いて蝸牛から多数の遺伝子を検索できるOligonucleotide array解析法を確立した。老人性難聴モデルでは難聴発症前後の遺伝子を比較検討し、発現の減少・増加している遺伝子を同定できた。この手法を用い、急性難聴発症時やscar形成時の遺伝子を調べることで、急性期の治療に結びつけることが期待できる。アデノウイルスベクターのより安全な内耳投与方法を確立したが、この手法は臨床応用できると思われる。p27siRNA導入により支持細胞を有毛細胞様細胞に変化させることができた。またこれまで増殖能が無いとされていたは乳類蝸牛支持細胞に増殖能があることを見いだした。これらの組み合わせにより、有毛細胞再生の研究は新たな段階に入ったといえる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishimoto S, Kawamoto K, Stover T, Kanzaki S, Yamasoba T, Raphael Y. A glucocorticoid reduces adverse effects of adenovirus vectors in the cochlea. *Audiol Neurotol* 2003;8:70-79.
- 2) Pourbakht A, Yamasoba T. Cochlear damage caused by a continuous and intermittent noise exposure. *Hear Res* 2003;178:70-78.
- 3) Suzuki M, Yamasoba T, Suzukawa K, Kaga K Adenoviral vector gene delivery via the round window membrane in guinea pigs. *Neuroreport* 14:1951-1955,2003
- 4) Yamasoba T, Kondo K, Miyajima C, Suzuki M. Changes in cell proliferation in rat and guinea pig cochlea after aminoglycoside-induced damage. *Neuroscience Letter* 347:171-174, 2003.
- 5) Pourbakht A, Yamasoba T. Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hear Res* 2003;181:100-108.
- 6) Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. *Mafk1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 23:4395-4400,2003
- 7) Fujishiro M, Ogihara T, Tsukuda K, Shojima N, Fukushima Y, Kimura S, Oka Y, Asano T. A case showing an association between type 1 diabetes

- mellitus and Kabuki syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 60:25-31, 2003
- 8) Cryns K, Thys S, Van Laer L, Oka Y, Pfister M, Van Nassauw L, Timmermans JP, Smith RJH, Van Camp G. The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells. *Histochem Cell Biol*. 119:247-256, 2003
- 9) Suzuki Y, Suzuki S, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, Oka Y, Atsumi Y, Matsuoka K. Multiple cranial mononeuropathies with acetylcholine receptor antibody in mitochondrial diabetes. *Diabetes Care* 13:18, 2003
- 10) Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, Goto Y. A novel mtDNA C1177A mutation in Leigh syndrom. *Mitochondrion* 2:293-304,2003
- 11) ミトコンドリア脳筋症の病因・病態解析. *遺伝子医学* 7:78-83,2003
- 12) 後藤雄一. 核遺伝子変異によるミトコンドリア異常症. *脳の科学* 25:321-328, 2003
- 13) Yamasoba T, Tsukuda K. Ototoxicity after use of neomycin ear drops is unrelated to A1555G point mutation in mitochondrial DNA. *J Otol Laryngol* 118:546-550, 2004
- 14) Karino S, Hayashi N, Aoki S, Ohtomo K, Yamasoba T. New method of reconstructed images for assessment of patency of intra-cochlear spaces for cochlear implant candidates. *Laryngoscope* 114:1253-1258, 2004
- 15) Ito K, Momose T, Oku S, Ishimoto SI, Yamasoba T, Sugasawa M, Kaga K. Cortical activation shortly after cochlear implantation. *Audiol Neurootol* 9:282-293, 2004
- 16) Ishimoto S, Ito K, Kondo K, Yamasoba T, Kaga K. The role of the external auditory canal in the development of the malleal manubrium in humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:913-916, 2004
- 17) 石本晋一、山唄達也. 難聴の遺伝子治療. 加我君孝編:新生児聴覚スクリーニング. 金原出版 127-132, 2004
- 18) Sakamoto T, Kondo K, Yamasoba T, Suzuki M, Sugasawa M, Kaga K. Overexpression of ErbB-2 protein in human middle ear cholesteatomas. *Laryngoscope*. 114:1988-1991, 2004
- 19) Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13: 1159-1170, 2004
- 20) Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, Oka Y. Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 325:250-256, 2004
- 21) Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S. Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114:153-160, 2005.
- 22) 後藤雄一: ミトコンドリア機能異常と変性性痴呆との関連. *日本臨床*. 62巻増刊号 pp. 220-223, 2004
- 23) 後藤雄一: ミトコンドリア病の分子メカニズム. *Molecular Medicine*. 41巻 pp266-268, 2004
- 24) 後藤雄一: ミトコンドリア脳筋症の病態と治療への展望. *神経治療学*. 21巻5号 pp. 521-528, 2004
- 25) 後藤雄一: ミトコンドリア病の組織診断-ゴモリ染色、活性染色、免疫染色. *臨床検査*. 49巻1号 pp45-49, 2004
- 26) Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M. Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett* 2005;380:234-238.
- 27) 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.
- 28) Yamasoba T, Yu-ichi Goto, Hirofumi Komaki, Masakazu Mimaki, Akira Sudo, Mitsuya Suzuki. Cochlear damage due to germanium-induced mitochondrial dysfunction in guinea pigs *Neurosci Lett* 2006;395:18-22.
- 29) Yamasoba T, Kenji Kondo. Evidence of supporting cell proliferation in vivo in mature mammalian cochlea. *Cell Tissue Res in press*
- 30) 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. *J Cell Sci* 118:5357-5367, 2005
- 31) 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
- 32) 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* 50巻14号: 1760-1764、2005
- 33) 後藤雄一: ミトコンドリア遺伝病. *日本臨床* 63巻増刊12号: 75-80、2005
- 34) Ito K, Suzuki S, Murofushi T, Ishimoto S, Iwasaki S, Karino S. Neuro-otologic findings in unilateral isolated narrow internal auditory meatus. *Otol Neurotol* 26:767-72, 2005
- 35) 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. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 131:326-9, 2005
- 36) 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* 115:2074-5, 2005
- 37) 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
- 38) 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 9) 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

(書籍)

4 0) 後藤雄一: ミトコンドリア脳筋症. 今日の治療指針. 医学書院 pp.657, 2004

4 1) 山岨達也: 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.

4 2) 染谷慎一、山岨達也、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. p. 110-113 先端医療技術研究社, 2005

2. 学会発表

1) 山岨達也、宮島千絵、近藤健二、鈴木光也. モルモット・ラット蝸牛におけるカナマイシン・エタクリン酸による障害後の細胞増殖能の変化. 第13回日本耳科学学会 (2003.10.16-18.幕張)

2) Tatsuya Yamasoba, Mitsuya Suzuki, Kenji Kondo. Evidence of mitosis in sensory epithelium of the mature cochlea in the deafened guinea pig. 27th ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

3) Shin-ichi Ishimoto, Kenji Kondo, Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba. Apoptotic hair cell death after direct inoculation of adenovirus vectors to the scala media of the guinea pig. 27th ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

4) Munetaka Ushio, Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba, Kimitaka Kaga. Apoptotic cell changes precede to manifestation of structural and functional damage in cochlear hair cells of gentamicin-poisoned guinea pig. 27th ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

5) Goto, Y., H, Mimaki, M., Sudo, A., Akanuma, J., Komaki, H., Nishino, I., Nonaka, I.: Overview of 200 patients. 5th Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies, Tokyo, 6.13, 2003

6) 後藤雄一: ミトコンドリア病の治療. 第46回日本小児神経学会総会イブニングトーク、5.23、2003

7) 鈴木光也、山岨達也、鈴木佳吾、加我君孝. モルモット蝸牛窓膜経路による遺伝子導入の可能性. 第104回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2003.5.22-24. 東京)

8) Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba, Akinori Kashio. Morphological and functional changes in the inner ear hair cells following adenoviral vector gene delivery via the round window membrane treated with phenol. 27th ARO Mid-Winter Meeting (2004.2.22-26. Florida, USA)

9) 田村明 石原寿光 et al. ウォルフラム症候群原因遺伝子産物 (WFS1 蛋白) の解析: 組織特異的発現とノックアウトマウスでの病変. 平成 15 年度日本糖尿病学会総会

10) 石原寿光 田村明 et al. ウォルフラム症候群原因遺伝子 WFS1 ノックアウトマウスの樹立. 平成 15 年度日本糖尿病学会総会

11) Ishihara H, Tamura A et al. Disruption of the WFS1 gene causes diabetes in mice due to progressive loss of islet b cells. *Diabetes* 52 suppl 1, A42, 2003 第 63 回 (2003 年) 米国糖尿病学会

12) 山岨達也、近藤健二、石本晋一、牛尾宗貴、鈴木光也. 哺乳類蝸牛支持細胞の分裂能誘導. 第105回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2004.5.13-15. 広島)

13) 鈴木光也、樫尾明憲、山岨達也、石本晋一: 鼓膜麻酔液による経蝸牛窓膜的内耳遺伝子導入の検討 第105回日本耳鼻咽喉科学会総会 2004. 5. 13-15 (広島)

14) Yamasoba T, Miyajima C, Kondo K, Okano H. Expression of musashi in guinea pig cochleae and vestibular endorgans. 5th Molecular Biology of Hearing & Deafness Meeting (2004.9.30-10.4 Washington DC)

15) Someya S, Yamasoba T, Prolla TA, Tanokura M. Gene expression profile of age-related hearing loss in cochlea of DBA/2j mice. 5th Molecular Biology of Hearing & Deafness Meeting (2004.9.30-10.4 Washington DC)

16) 山岨達也、加我君孝. Ebselenによる temporary threshold shiftの予防. 第49回日本聴覚医学学会 (2004.10.14-15.福岡)

17) 山岨達也、染谷慎一、田之倉優. 老人性難聴モデルマウスの難聴発症予防: カロリー制限の効果. 第14回日本耳科学会 (2004.10.21-23. 京都)

18) 染谷慎一、山岨達也、田之倉優. 老人性難聴モデルマウスにおける蝸牛の遺伝子発現解析. 第14回日本耳科学会 (2004.10.21-23. 京都)

19) 石本晋一、近藤健二、山岨達也、鈴木光也、加我君孝. モルモット中央階へのアデノウイルスベクター注入によるアポトーシスについて. 第14回日本耳科学会 (2004.10.21-23. 京都)

20) 宮島千絵、近藤健二、山岨達也、岡野栄之. モルモット内耳障害時における Musashi 1 蛋白の発現分布. 第14回日本耳科学会 (2004.10.21-23. 京都)

21) 鳥海早矢佳、石本晋一、伊藤健、山岨達也. 突発性難聴に対する PGE 1 の併用効果について. 第14回日本耳科学会 2004.10.21-23. 京都)

22) 山岨達也、宮島千絵、鈴木光也. モルモット前庭・半規管における Musashi I の発現. 第63回日本めまい平衡医学会 (2004.11.17-19. 前橋)

23) Tatsuya Yamasoba, Chie Miyajima, Kenji Kondo, Hideyuki Okano. Changes in Expression of Musashi 1 in Guinea Pig Vestibular Endorgans Following Gentamicin-Induced Damage. 28th ARO Mid-Winter Meeting (2005.2.19-24. New Orleans, USA)

24) Chie Miyajima, Tatsuya Yamasoba, Kenji Kondo, Hideyuki Okano. Alteration of the Expression Patterns of Musashi-1 in the Guinea Pig Cochlea Following Hair Cell Injury Induced by Ototoxic Agents. 28th ARO Mid-Winter Meeting (2005.2.19-24. New Orleans, USA)

25) Mitsuya Suzuki, Tatsuya Yamasoba, Akinori Kashio. Effect of adenoviral vector gene delivery via the round window membrane treated with phenol. 28th ARO Mid-Winter Meeting (2005.2.19-24. New Orleans, USA)

26) 田村明、石原寿光、高橋累、山口賢、山田高弘、武井大祐、檜尾好徳、鈴木進、荻原健英、

- 片桐秀樹、佐藤讓、岡芳知. WFS1欠損マウスの解析:系統差とアポトーシスの亢進. 第47回日本糖尿病学会年次学術集会, 2004年5月13-15日、東京
- 27)Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Novel mtDNA G3242A and G3244A mutations adjacent to a common A3243G mutation. The 52th Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Canada, 10.27, 2004
- 28)石本晋一、伊藤健、近藤健二、山嵜達也、加我君孝. 小耳症外耳道狭窄・閉鎖症における中耳奇形の側頭骨CTの解析. 第105回日本耳鼻咽喉科学会総会 2004年5月13-15日
- 29)田村明、石原寿光、高橋累、山口賢、山田高弘、武井大祐、檜尾好徳、鈴木進、荻原健英、片桐秀樹、佐藤讓、岡芳知. WFS1欠損マウスの解析:系統差とアポトーシスの亢進. 第47回日本糖尿病学会年次学術集会, 2004年5月13-15日、東京
- 30)山嵜達也、石本晋一、岩崎真一. 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. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005. 5. 19-21. 大阪)
- 31)山嵜達也、石本晋一. 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. 第50回日本聴覚医学会 (2005. 9. 22-24. 東京)
- 32) Tatsuya Yamasoba, Shinichi Someya, Tomas A Prolla, Masaru Tanokura. Invited speaker. Mitochondrial dysfunction, decreased energy metabolism, and apoptosis in age-related hearing loss. International Symposium, Pharmacologic Strategies for Prevention and Treatment of Hearing Loss and Tinnitus (2005,10.9-12, Niagara Falls, Canada)
- 33)山嵜達也. 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」第14回日本耳科学会 (2005. 10. 20-22. 大阪)
- 34) 染谷慎一、山嵜達也、田之倉優. 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. 第14回日本耳科学会 (2005. 10. 20-22. 大阪)
- 35)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
- 36)Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Clinical, pathological and genetic study on 223 patients with the mtDNA A3243G mutation. The 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research, 11.25, 2005, Tokyo, Japan
- 37)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
- 38)石本晋一、伊藤健、山嵜達也、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
- 39)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β細胞における小胞体ストレス下の代謝分泌連関. 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
- 40)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欠損膵島における小胞体ストレス応答の検討. 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
- 41)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. 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
- 42)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. WFS1蛋白による細胞内カルシウム動態制御機構の解析. 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
- 43)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. 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. 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
- 44)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. 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. 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
- 45) Ogihara T, Katagiri H, Hasegawa Y, Oka Y. Role of eNOS in Beta Cell Regeneration after Bone Marrow Transplantation in STZ-Diabetic Mouse Models (Oral presentation). Keystone Symposia: Diabetes Mellitus and the Control of Cellular Energy Metabolism. Jan.21-26, 2006 Vancouver, British Columbia, Canada

G. 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 |

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
Ishimoto S, Kawamoto K, Stover T, Kanzaki S, <u>Yamasoba T</u> , Raphael Y	A glucocorticoid reduces adverse effects of adenovirus vectors in the cochlea	Audiology and Neurootology	8	70-79	2003
Pourbakht A, <u>Yamasoba T</u>	Cochlear damage caused by a continuous and intermittent noise exposure	Hearing Research	178	70-78	2003
<u>Suzuki M</u> , <u>Yamasoba T</u> , Suzukawa K, Kaga K	Adenoviral vector gene delivery via the round window membrane in guinea pigs	Neuroreport	14	1951-1955	2003
<u>Yamasoba T</u> , Kondo K, Miyajima C, <u>Suzuki M</u>	Changes in cell proliferation in rat and guinea pig cochlea after aminoglycoside-induced damage	Neuroscience Letter	347	171-174	2003
Pourbakht A, <u>Yamasoba T</u>	Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma	Hearing Research	181	100-108	2003
Kawamoto K, <u>Ishimoto S</u> , Minoda R, Brough DE, Raphael Y	<i>Math1</i> gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs <i>in vivo</i>	The Journal of Neuroscience	23	4395-4400	2003
Fujishiro M, Ogihara T, Tsukuda K, Shojima N, Fukushima Y, Kimura S, <u>Oka Y</u> , <u>Asano T</u>	A case showing an association between type 1 diabetes mellitus and Kabuki syndrome	Diabetes Research and Clinical Practice	60	25-31	2003
K.Cryns, S. Thys, L.Van Laer, , <u>Y.Oka</u> , M Pfister, L.Van Nassauw, J.-P.Timmermans R.J.H.Smith, G. Van Camp	The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells	Histochem Cell Biol	119	247-256	2003
Suzuki Y, Suzuki S, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, <u>Oka Y</u> , Atsumi Y, Matsuoka K	Multiple cranial mononeuropathies with acetylcholine receptor antibody in mitochondrial diabetes	Diabetes Care	13	18	2003
Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, <u>GotoY</u>	A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome	Mitochondrion	2	293-304	2003
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア脳筋症の病因・病態解析	遺伝子医学	7	78-83	2003
<u>後藤雄一</u>	核遺伝子変異によるミトコンドリア異常症	脳の科学	25	321-328	2003

<u>Yamasoba T, Tsukuda K.</u>	Ototoxicity after use of neomycin ear drops is unrelated to A1555G point mutation in mitochondrial DNA.	J Otol Laryngol	118	546-550	2004
Karino S, Hayashi N, Aoki S, Ohtomo K, <u>Yamasoba T</u>	New method of reconstructed images for assessment of patency of intracochlear spaces for cochlear implant candidates.	Laryngoscope	114	1253-1258	2004
Ito K, Momose T, Oku S, <u>Ishimoto SI, Yamasoba T, Sugasawa M, Kaga K.</u>	Cortical activation shortly after cochlear implantation.	Audiol Neurootol	9	282-293	2004
<u>Ishimoto S, Ito K, Kondo K, Yamasoba T, Kaga K.</u>	The role of the external auditory canal in the development of the malleal manubrium in humans.	Arch Otolaryngol Head Neck Surg	130	913-916	2004
<u>石本晋一、山岨達也</u>	難聴の遺伝子治療	加我君孝編：新生児聴覚スクリーニング. 金原出版		127-132	2004
Sakamoto T, Kondo K, <u>Yamasoba T, Suzuki M, Sugasawa M, Kaga K</u>	Overexpression of ErbB-2 protein in human middle ear cholesteatomas	Laryngoscope	114	1988-1991	2004
Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, <u>Oka Y.</u>	Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion.	Hum Mol Genet	13	1159-1170	2004
Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, <u>Oka Y.</u>	Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein.	Biochem Biophys Res Commun	325	250-256	2004
Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, <u>Goto Y, Usami S.</u>	Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside.	Ann Otol Rhinol Laryngol	114	153-160	2005
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア機能異常と変性性痴呆との関連	日本臨床	62 巻 増 刊 号	220-223	2004
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア病の分子メカニズム	Molecular Medicine	41 巻	266-268	2004
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア脳筋症の病態と治療への展望	神経治療学	21 巻 5号	521-528	2004

<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア病の組織診断-ゴモリ染色、活性染色、免疫染色	臨床検査	49 巻 1号	45-49	2005
<u>Yamasoba T</u> , Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki. M	Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift.	Neurosci Lett	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	Neurosci Lett	395	18-22	2006
<u>Yamasoba T</u> , Kondo K.	Evidence of supporting cell proliferation in vivo in mature mammalian cochlea.	Cell Tissue Res		in press	
Nakashima-Kamimura N, Asoh S, Ishibashi Y, Mukai Y, Shimara Y, Oda H, Munakata K, <u>Goto Y</u> , <u>Ohta S</u>	MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction	Journal of Cell Science	118 巻	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 巻	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.	Otol Neurotol	26	767-72	2005
<u>Ishimoto S</u> . 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.	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.	Eur J Endocrinol	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.	Am J Physiol Endocrinol Metab.	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.	Hum Mol Genet.		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
後藤雄一	ミトコンドリア脳筋症	山口徹、北原光夫 (総編集)	今日の治療指針	医学書院	東京	2004	657
山嵜達也	ミトコンドリア遺伝子異常による感音難聴	加我君孝、小宗静男 (編集主幹)	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> 、 <u>田之倉優</u>	老人性難聴の予防	加我君孝、小宗静男 (編集主幹)	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

A Glucocorticoid Reduces Adverse Effects of Adenovirus Vectors in the Cochlea

Shin-ichi Ishimoto Kohei Kawamoto Timo Stöver Sho Kanzaki
Tatsuya Yamasoba Yehoash Raphael

Kresge Hearing Research Institute, University of Michigan, Ann Arbor, Mich., USA

Key Words

Gene therapy · Adenovirus · Immune response ·
Dexamethasone · Guinea pig

Abstract

Gene transfer using a recombinant adenovirus is a powerful tool for research and clinical applications, but its cytotoxicity and immune response limit its use, especially when repeated application of the vector is necessary. This study investigated the effects of dexamethasone (DEX)-induced immunosuppression on the outcome of adenovirus gene transfer in guinea pig inner ears. Animals received DEX for 29 days. Their inner ear was inoculated with 5 μ l of adenovirus vector twice, on days 5 and 26. Auditory brainstem response was measured on days 1, 8 and 29. The animals were sacrificed on day 29, and reporter gene expression was evaluated. In control animals that received no DEX, postinoculation threshold shifts and lesions in the organ of Corti were observed and reporter gene expression was absent. In contrast, DEX-treated ears were largely protected, and transduction of inner ear cells was readily apparent. These data demonstrate that immunosuppressive treatment can reduce the negative consequences of repeated adenovirus-mediated gene therapy.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Introduction

Gene transfer is an attractive tool for neurobiological research and for the treatment of a variety of human diseases [Rosenberg et al., 1996; Nabel, 1998; Benihoud et al., 1999; Nabel, 1999]. Several types of vectors are available to deliver transgenes into cells and tissues. Nonviral vectors are nontoxic and pose little or no risk of immune response. However, their transduction efficiency is low. In contrast, viral vectors have been shown to be efficient gene transfer vehicles. The use of adenovirus vectors results in medium-term gene expression, namely several weeks to several months. Compared with other viral vectors, adenovirus vectors can be produced in high titers and lead to efficient gene transfer. Unfortunately, all viral vectors, and adenoviruses in particular, can potentially generate a cytotoxic or immune response. It is also difficult to perform readministration using a vector of the same adenovirus serotype. This difficulty is related to the neutralizing antibodies and/or cytotoxic T cells produced as an immune response to the viral load in the first inoculation.

Current therapies for most inner ear diseases are limited. In some cases, it is likely that the introduction of transgenes with therapeutic potential can prevent or cure the disease. Technically, the inner ear is an attractive tar-

KARGER

Fax + 41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel
1420-3030/03/0082-0070\$19.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/aud

Yehoash Raphael
Kresge Hearing Research Institute
University of Michigan, 1301 E. Ann Street
Ann Arbor, MI 48109-0506 (USA)
Tel. +1 734 936 6386, Fax +1 734 647 2563, E-Mail yoash@umich.edu

get organ for gene therapy. It is surrounded by the bony otic capsule, which reduces the spread of viral vectors to adjacent tissues. Limited spread of viral particles is possible via the cochlear aqueduct to the CSF [Stöver et al., 2000]. The presence of the perilymphatic and endolymphatic fluid space allows for rapid and efficient diffusion of delivered vectors following inoculation. The feasibility of virus-mediated gene transfer into the inner ear has been reported [Raphael et al., 1996; Dazert et al., 1997; Lalwani et al., 1998; Derby et al., 1999; Lalwani and Mhatre, 2000; Suzuki et al., 2000; Luebke et al., 2001]. In addition to reporter gene studies that have characterized the methods available for inner ear gene transfer, genes with biological significance have been tested for their therapeutic effects. For instance, the protective effects of neurotrophic factors such as BDNF and GDNF have been demonstrated at the level of the vestibular epithelium [Suzuki et al., 2000], the organ of Corti [Yagi et al., 1999; Suzuki et al., 2000] and the spiral ganglion [Yagi et al., 2000; Staecker et al., 1998]. To optimize these treatments and to prepare the technology for clinical application, it is necessary to reduce the side effects, especially the negative effects associated with immune response.

There are several clinical conditions of the inner ear that may necessitate more than one administration of adenovirus vectors. For instance, it may be necessary to intervene more than once in order to preserve the spiral ganglion, for enhancing the benefits of a cochlear implant. It may also be necessary to use a sequential treatment involving overexpression of several genes to induce hair cell (HC) regeneration. Specifically, a first set of genes may serve as mitogens, followed later by genes that encode differentiation into the HC phenotype, and then other genes that enhance innervation. However, a repeated inoculation of the vector is likely to elicit a severe immune response and therefore may not be feasible. Mild immune response has been documented following a single inoculation of adenovirus vector into the inner ear [Raphael et al., 1996]. Moreover, in many cases the inner ear host is preimmunized to the adenovirus type 5 as a result of previous infections [Kuriyama et al., 1999], thereby complicating even a first inoculation of the replication-deficient vector.

Cell-mediated immunity involves the destruction of infected cells by the major histocompatibility complex class-I-restricted cytotoxic T lymphocytes or the destruction of intracellular pathogens by macrophages, which are activated by inflammatory CD4+ T cells (Th1). The virus-infected cells are recognized and killed directly by the cytotoxic T lymphocytes. Macrophages are activated

by Th1 to kill the intercellular viruses. As for humoral immunity, it depends on the production of B cells, which are activated by helper CD4+ T cells (Th2). Signals from the bound antigen and from the helper T cells induce the B cells to proliferate and differentiate into B cells that secrete specific antibodies. There are three main ways in which these antibodies protect the host from viral infection: neutralization, opsonization (antibody-mediated phagocytosis) and complement activation [Tortorella et al., 2000].

The inflammation resulting from the immune response can cause two problems that are detrimental to virus-mediated gene transfer. First, there will be a decrease in the transgene expression, and, second, there may be cytotoxic injury to the tissue. To facilitate successful and beneficial repeated inoculation of vectors, it is necessary to reduce the immune response. Agents that suppress the immune response include steroids such as glucocorticoid and antitumoral agents such as cyclosporin. While immunosuppression has not been used along with viral vectors in the inner ear, virus-mediated transgene expression in rat lung was prolonged by treatment with glucocorticoids and cyclosporin [Zsengeller et al., 1995]. Use of immunosuppressive agents in the inner ear has been shown to reduce the lesions caused by a primary infection of replication-competent viruses such as cytomegalovirus (CMV) [Darmstadt et al., 1990]. Glucocorticoids have been used effectively as potent immunosuppressive agents in inflammatory disease.

The goal of this work was to determine the influence of immune suppression by the steroid dexamethasone (DEX) on the extent of side effects produced by single and repeated applications of replication-deficient adenovirus vector inoculated into the inner ears of guinea pigs. The data show that animals pretreated with DEX developed a reduced threshold shift and cochlear lesions in response to a repeated application of the adenovirus, compared with control animals.

Materials and Methods

Animals and Experimental Groups

Thirty-one pigmented male guinea pigs were used. Animals were outbred by Elm Hill Breeding Laboratories (Chelmsford, Mass., USA). The animals weighed 250–300 g and demonstrated a normal Preyer's reflex. Of the 31 guinea pigs that underwent left ear surgery, 7 developed a middle ear infection and were removed from the study. All animal care and handling procedures were approved by the University of Michigan Institutional Committee on the Use and Care of Animals. Experiments were performed using accepted veterinary standards.

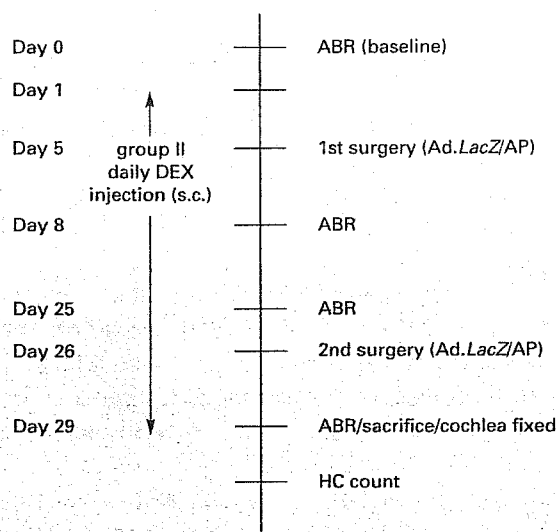


Fig. 1. Experimental protocol for group II animals (experimental group) that received DEX for 29 days (first day of DEX injection designated as day 1). The animals received adenovirus (vector Ad.LacZ) on day 5. Group I (control group) animals did not receive DEX. Group III animals (control group) received artificial perilymph (AP) instead of the adenovirus and no DEX. All animals had baseline auditory brainstem response (ABR) testing on day 0. Groups II and III had 3 additional ABR tests. Group I had 2 additional ABRs, on days 8 and 29.

The animals were divided into three groups: group I = 11 animals; group II = 10 animals; group III = 3 animals. The experimental group (group II) received DEX (1 mg/kg s.c.) for 29 days, with the first day of DEX injection designated as day 1. The animals were inoculated twice with 5 μ l of the adenovirus expressing bacterial *lacZ* gene driven by a CMV promoter in the left ear. The first inoculation was on day 5 and the second inoculation on day 26. The animals were sacrificed on day 29.

There were 2 control groups, I and III. Group I animals were inoculated with the viral vector twice but did not receive DEX. This control group allowed us to determine the effects of a repeated adenovirus inoculation in the absence of DEX-mediated immune suppression. Group III animals (surgery control) received no DEX, and the vector was replaced with 2 inoculations of artificial perilymph (5 μ l, pH 7.34, osmotic pressure 285 mosm/l, NaCl 145 mM, KCl 2.7 mM, MgSO₄ 2.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM and HEPES, C₈H₁₈N₂O₄S, 5.0 mM). Group III animals allowed us to assess the influence of the repeated surgical procedure (perilymphatic inoculation). The experimental protocol is summarized in figure 1.

All animals were sacrificed for histological evaluation after the last auditory brainstem response (ABR) examination. Upon opening the middle ear bulla, the condition of the middle ear was evaluated. Several animals (of all 3 groups) were found to have active middle ear infections. These animals were excluded from the study, as men-

tioned earlier. All but 6 animals (see below) were histologically processed as whole mounts for HC counts. Six animals (group I and group II, 3 animals each) had their inner ear tissues processed for histological assessment of transgene expression. These ears were cryosectioned and stained with antibodies to the reporter gene product, β -galactosidase.

Adenoviral Vector

The adenovirus vector was based on the human adenovirus serotype 5 in which the transcriptional regions E1 and E3 had been deleted. The CMV immediate promoter drove the reporter gene insert. The vectors were purchased from the University of Iowa Gene Transfer Vector Core. The experimental vector contained *Escherichia coli* β -galactosidase cDNA and was designated Ad.lacZ. The vector was prepared according to standard procedure. The viral suspension contained 3% sucrose. The stock Ad.lacZ solution had a concentration of 2.4×10^{12} PFU/ml. It was stored at -80°C until thawed for use. The stock was thawed immediately prior to inoculation into the left ear of group I and II animals. Once thawed, the stock solution was diluted 1:3 in artificial perilymph (pH = 7.42, osmotic pressure = 290 mosm/l) to a final concentration of 0.8×10^{12} PFU/ml.

Surgical Procedure

To prepare the animals for vector inoculation, they were anesthetized with Rompun (xylazine, 10 mg/kg i.m.; Bayer, Shawnee Mission, Kans., USA) and Ketalar (ketamine HCl, 40 mg/kg i.m.; Parke Davis, Morris Plains, N.J., USA). Chloramphenicol sodium succinate (30 mg/kg, i.m.) was administered as prophylaxis, and 0.5 ml of 1% lidocaine HCl was injected subcutaneously for local anesthesia.

The animals were placed in a prone position on a thermoregulated heated pad. A posterior tympanostomy was performed after retroauricular incision on the left side. The bulla was exposed and an opening (approximately 3 \times 3 mm) in the bulla bone was made with forceps, to visualize the basal turn and round window membrane. A cochleostomy was performed at the basal turn of the scala tympani by using a fine needle. The size of the cochleostomy hole was approximately 0.5 mm in diameter.

A polyethylene tube (inner diameter 0.28 mm, outer diameter 0.61 mm, Becton Dickinson, Sparks, Md., USA) was connected to a fine polyimide tube (inner diameter 0.0039", outer diameter 0.0049"; Microlumen, Tampa, Fla., USA) and filled with artificial perilymph or Ad.lacZ solution. The end of the polyethylene tube was connected by a 30-gauge needle to a 10- μ l Hamilton syringe (Hamilton, Reno, Nebr., USA) filled with sterile normal saline. Infusion speed was controlled by a syringe pump (Harvard Apparatus Inc., Holliston, Mass., USA). Five microliters of vector solution were injected over 5 min. A ball was made with cyanoacrylate glue (Quick Bond, Aron Alpha, Ohio, USA) 0.5 mm from the tip of the cannula to improve the seal and prevent leakage. To prevent backflow of the viral suspension, the cannula was left in place for 10 min following the inoculation. After removal of the cannula, the cochleostomy was covered with connective tissue and carboxylate cement (Durelon). The defect in the bulla was sealed with carboxylate cement. The incision was closed in 3 layers. The procedure for the second inoculation surgery was identical to the first.

ABR Measurement

In all animals, ABR thresholds were measured to determine baseline hearing thresholds and to assess the influence of the surgical pro-

cedures and treatments on the hearing of the animals. ABR audiometry was performed in the left ear using tone burst stimuli at 4, 12 and 20 kHz, gated with 15 ms duration with a rise/fall time of 1 ms and presented at a repetition rate of 10/s. ABR examination in group I animals was performed 4 times: baseline thresholds (day 0), 3 days after the first surgery (day 8), 1 day before the second surgery (day 25) and 3 days after the second surgery (day 29). The test performed on day 25 was designed to establish the thresholds after allowing a recovery time for possible surgery-related temporary threshold shifts. The animals in groups II and III were examined 3 times: baseline thresholds (day 0), 3 days after the first surgery (day 8) and 3 days after the second surgery (day 29).

The animals were anesthetized with a mixture of xylazine (10 mg/kg i.m.) and ketamine (40 mg/kg i.m.) prior to ABR measurement. The body temperature was maintained by placing the animal on a temperature-controlled water-heating pad. A needle electrode was placed subcutaneously below the test ear, and a reference electrode was placed at the vertex. The ground electrode was positioned below the opposite ear. The sound intensity was varied in 5-dB intervals. The threshold was determined by visual inspection of the responses and defined as the lowest intensity level at which clear waveforms (P3 and P4) of the ABR could be detected.

Tissue Preparation and HC Counts

All animals were sacrificed after the last ABR test. Following decapitation under deep anesthesia, both temporal bones were removed and the inner ear was perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). The samples were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS. After permeabilization with 0.3% Triton X-100 for 10 min, the organ of Corti was stained for F actin with rhodamine phalloidin (Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA; diluted 1:100 in PBS) for 30 min and processed for whole-mount (surface preparation) analysis. The whole mounts were examined using a fluorescence microscope (Leica DMRB) equipped with $\times 10$, $\times 40$ and $\times 100$ lenses. Samples were photographed using Kodak Ektachrome 320T film. The number of missing (or present) inner HCs (IHCs) and outer HCs (OHCs) was counted from the apex to the basal turn with a 0.19-mm reticule. Percentages of missing HC in each 0.19-mm length of tissue were plotted along the cochlear length as a cytochochleogram. Ears prepared for HC counts were: group I = 8, group II = 7 and group III = 3.

Six ears were decalcified and prepared for cryosectioning from group I (3) and group II (3). These ears were decalcified for 10 days in 5% EDTA and cryoprotected in 30% sucrose for 24 h. The samples were transferred into a cryomold (10 \times 10 \times 5 mm; Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, Pa., USA) filled with OCT embedding compound (Electron Microscopy Sciences). A gentle vacuum was drawn for 10 min to remove trapped air bubbles [Whitlon et al., 2001]. The tissues were kept in OCT at 4°C for 24 h, then aligned for sectioning, frozen in a dry ice/ethyl alcohol bath and kept at -80°C until sectioning.

Sections (5 μ m thick) were cut on a CM 3000 cryostat (Leica, Heidelberg, Germany). A series of sections were collected (approx. 200 sections per ear) onto electrostatic glass slides (Fisherbrand, Pittsburgh, Pa., USA) and stored at -80°C. For immunohistochemistry, the slides were washed twice with PBS for 10 min. The tissues were then permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 10 min. The specimens were reacted with a β -galactosidase-specific rabbit polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, Calif., USA) diluted 1:1000 in PBS for 60 min and then washed with PBS. Tissues were

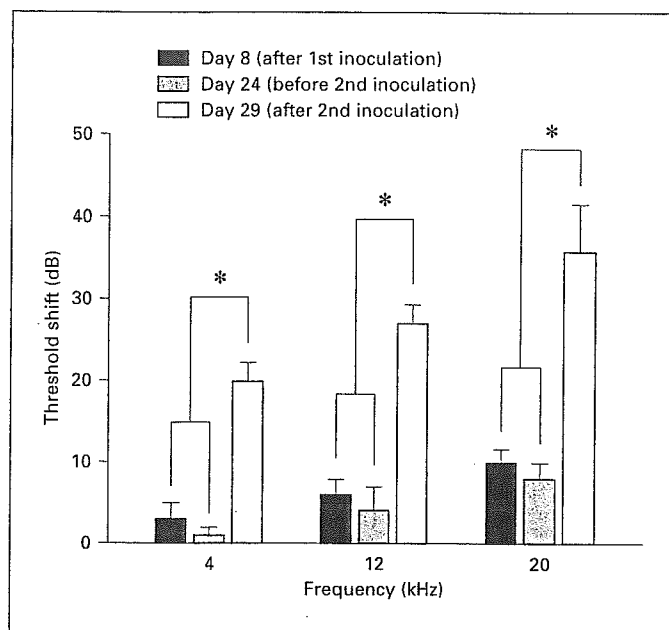


Fig. 2. Average ABR threshold shifts from baseline values (zero) at 3 frequencies (4, 12 and 20 kHz) for group I animals ($n = 5$, Ad.LacZ, no DEX) measured on day 8 (after the first inoculation), day 24 (just before the second inoculation) and on day 29 (after the second inoculation). * $p < 0.05$.

then reacted with TRITC-conjugated goat antirabbit secondary antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pa., USA) diluted 1:500 in PBS for 30 min.

Statistical Data Analysis

The hearing thresholds and the percent mean HC loss data were analyzed by Sigma Stat statistical software (Jandel; SPSS, Chicago, Ill., USA). The variance of the ABR threshold shift and the percent mean HC loss were analyzed using Student's *t* test.

Results

Body weight gain in group I was 6.2 ± 0.99 g/day and in group II 6.38 ± 0.61 g/day. There was no significant difference in the body weight gain per day between groups I and II. During this experiment, the animals appeared healthy.

The average ABR threshold shift from baseline values is shown in figure 2 for the three frequencies tested. After the recovery period following the first inoculation, the threshold shift was minimal. The thresholds returned to nearly normal (baseline) levels immediately prior to the second inoculation. In contrast, following the second adenovirus inoculation, a marked threshold shift was recorded.

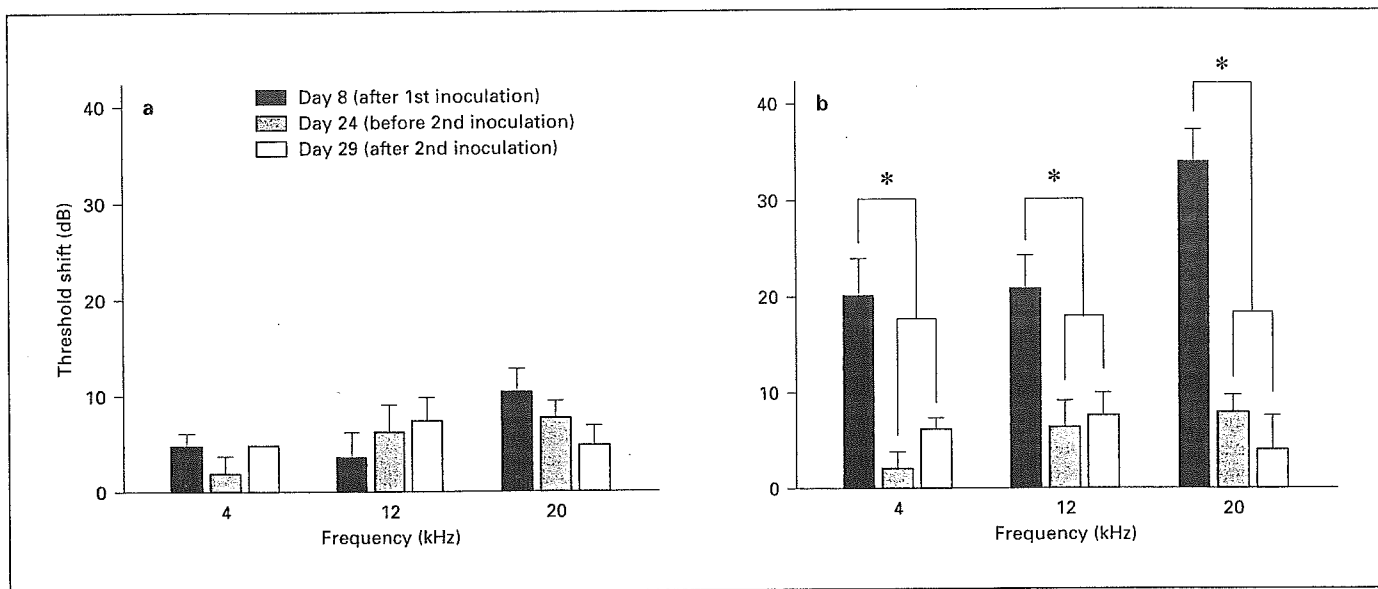


Fig. 3. Average ABR threshold shifts (means \pm SEM) at 3 frequencies for the 3 groups measured on day 8 after surgery (a) and day 29 after surgery (b). * $p < 0.05$.

ed in group I. The most severe physiological deterioration was noted in the high-frequency region of the cochlea. There were significant differences ($p < 0.05$) in ABR thresholds between measurements after the second surgery and prior recordings of the thresholds, at all 3 tested frequencies. No significant differences were found in threshold shifts in all frequencies between values after first surgery and before second surgery. These data demonstrate that one inoculation of the adenovirus was not detrimental to the hearing of these animals, whereas the second viral application resulted in a significant threshold shift.

Threshold shifts after first surgery are plotted in figure 3a. The data show similar threshold shifts in all 3 groups at the 3 frequencies studied, and suggest that the combined effect of the surgical procedure, the presence of a reporter gene vector (1 inoculation) and the DEX treatment do not pose any risks to cochlear function. In testing the influence of a second inoculation on cochlear function, it became clear that the *lacZ* vector reinoculation leads to a significant threshold shift (fig. 3b). In contrast, animals that were treated with DEX had significantly less threshold shift compared to animals not treated with DEX, in all 3 frequencies measured (fig. 3b). The differences in threshold shift were statistically significant ($p < 0.01$) at the 3 frequencies between group I and the other groups. In group I, the threshold shift at 20 kHz was sig-

nificantly greater than at 4 and 12 kHz ($p < 0.05$). In group II, the threshold shift at 20 kHz was significantly greater than at 12 and 4 kHz ($p < 0.05$). In group III, there was no significant difference among the 3 frequencies.

The pattern and extent of transgene expression in group II was similar to that described in several publications using the identical route of inoculation and viral vector [Stöver et al., 1999, Suzuki et al., 2000]. Briefly, in group II, mesothelial cells lining the scala tympani were efficiently transduced (data not shown). No transduction with the vector was detected in the organ of Corti. In contrast to the data of group II, group I, having received no DEX, exhibited no transduced cells in the cochlea (data not shown).

Fluorescence microscopy examination of whole mounts of the organ of Corti revealed a moderate to severe HC loss in the basal turn of the cochleae obtained from group I (fig. 4a, b). In animals with severe lesions, IHCs and several pillar cells were missing, in addition to OHCs (fig. 4b). In the higher cochlear turns, group I also exhibited a significant HC loss; however, its extent was less than in the base (data not shown). In all cochlear turns, the OHCs appeared much more susceptible to the insult of the second viral inoculation than the IHCs. In contrast to group I, the organ of Corti in group II and III animals (fig. 4c and d, respectively) had little or no HC loss.

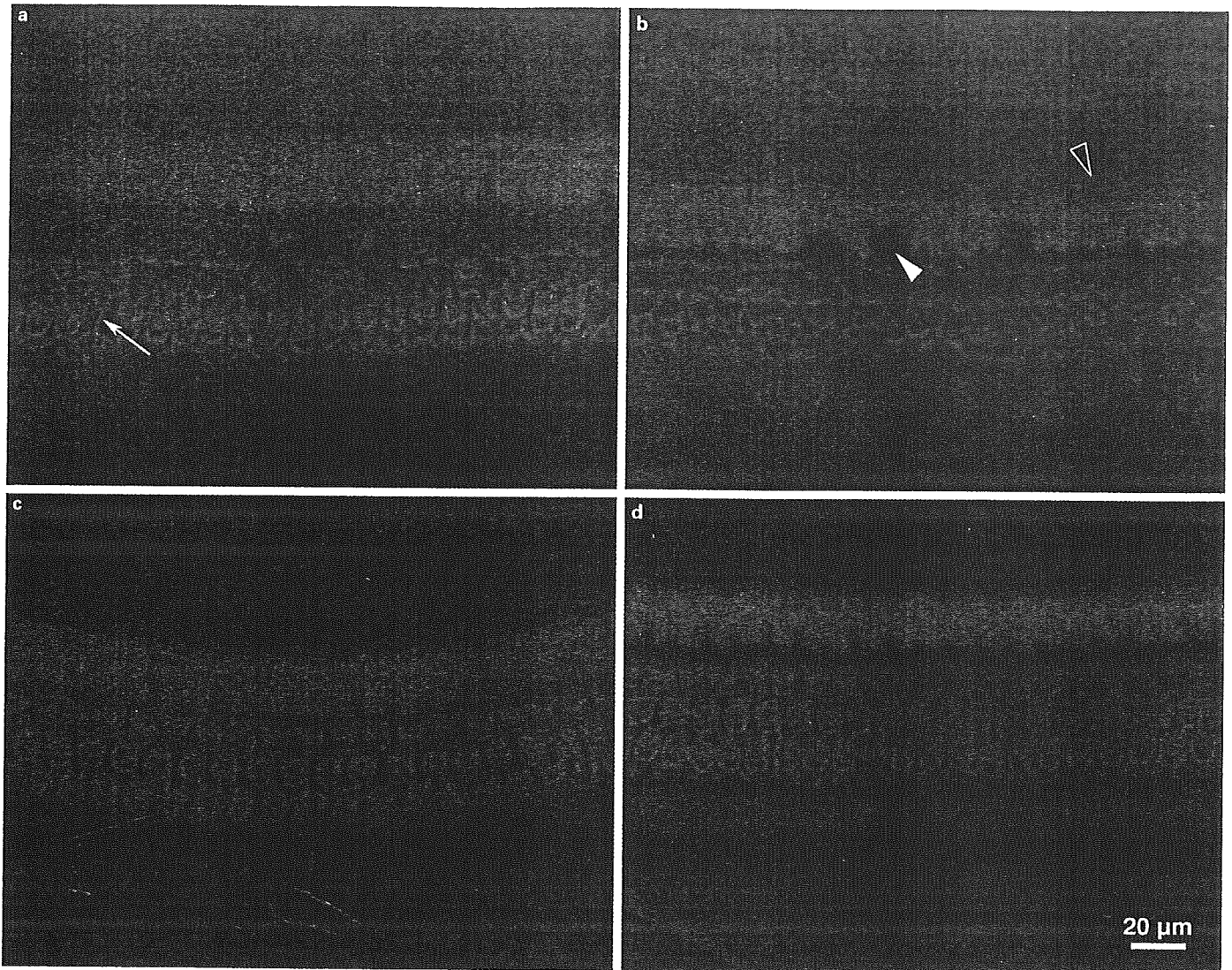


Fig. 4. Whole mounts of the basal turn of the organ of Corti stained with rhodamine phalloidin: group I (**a**, **b**), group II (**c**) and group III (**d**). **a** Several OHCs are missing (arrow) in all 3 rows of OHCs. No IHC loss is seen in this region. **b** In another group I animal, the lesion in the basal turn is severe. Most OHCs are missing (white arrowhead). Some IHCs are also missing (black arrowhead). The lesion includes loss of pillar cells. **c** The organ of Corti of a group III animal is nearly normal. **d** No pathology is found in the basal turn of a group III organ of Corti. Magnification bar = 25 μ m.

HC counts were performed in 18 ears. Group I animals displayed a minimal variability in the extent of HC loss, with the exception of 1 animal within this group, in which the cochlear lesion extended all the way to the apical turn (fig. 5). This single animal is the sole contributor to the HC loss seen in figure 5 between 0 and 10 mm from the apex. The average cytochochleogram of group I (fig. 5) demonstrates the higher susceptibility of basal OHCs to reinoculation of the adenovirus vector. Group II animals

were typically without significant HC loss (fig. 5). Similarly, group III animals demonstrated that inoculation with artificial perilymph does not lead to HC loss (fig. 5). The lesion was restricted to the basal half of the cochlea (high-frequency region) and was more pronounced in the OHC area than the IHC area.

The mean IHC and OHC loss in all 3 groups is depicted in figure 6. The percentage of OHC loss was $31.2 \pm 3.1\%$ in group I, $1.6 \pm 0.4\%$ in group II and $0.4 \pm$

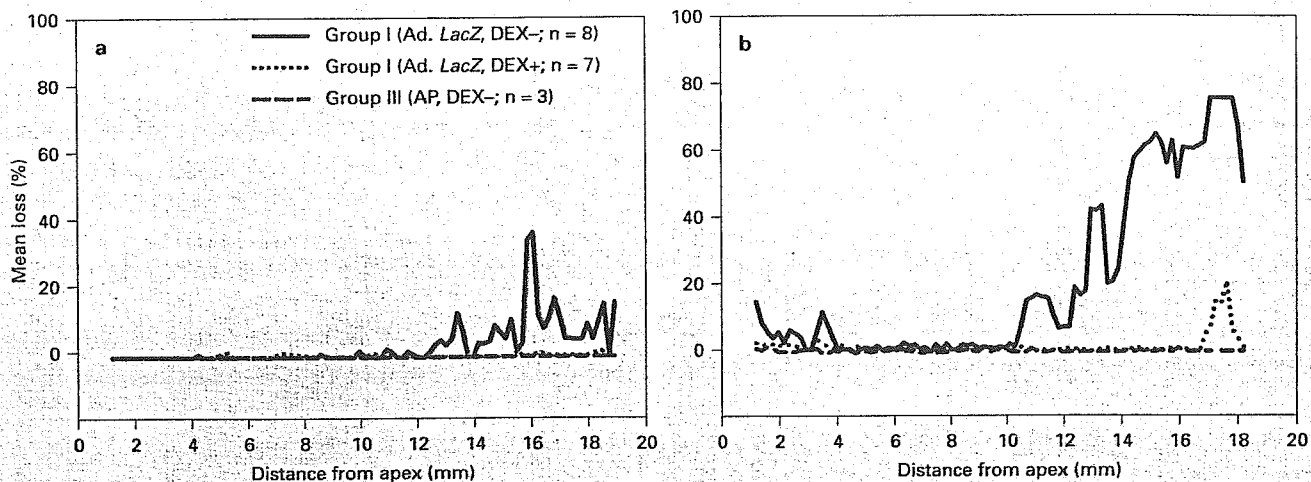


Fig. 5. Cytocochleograms depicting the percentage of HC loss (means \pm SEM) along the cochlear duct. The lines represent an average for each group. Group II and III cochleae have a normal HC count. AP = Artificial perilymph. **a** Mean IHC loss. **b** Mean OHC loss.

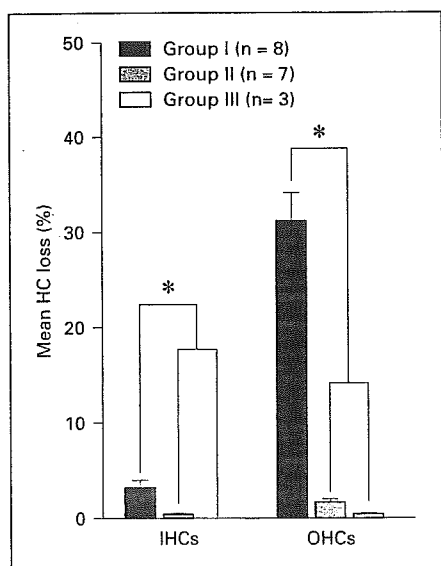


Fig. 6. Mean IHC and OHC loss \pm SEM in all 3 groups. * $p < 0.01$.

0.1% in group III. The loss of OHCs was significantly different ($p < 0.01$) between groups I and II or I and III. The percent IHC loss was $7.2 \pm 0.7\%$ in group I, $0.4 \pm 0.1\%$ in group II and 0% in group III. The difference of IHC loss in group I was statistically significant ($p < 0.01$), as compared to that of groups II and III.

Discussion

The results demonstrate that the second inoculation of an adenovirus vector expressing the reporter gene *lacZ* causes significant threshold shift and HC loss in the cochlea in guinea pigs, and that pretreatment with DEX can prevent threshold shift and HC loss.

The basal turn of the cochlea appeared to sustain more pathological changes than the apical turns due to the second inoculation of the vector. The findings that transgene expression is most efficient in the basal turn [Raphael et al., 1996; Stöver et al., 1999; Yagi et al., 1999] suggest that there is a correlation between the location of the virally transduced cells (the base of the cochlea) and the lesion.

There are two possible explanations for the HC pathology. One is that HCs degenerate due to a cytotoxic response to the presence of the virus in the inner ear. Alternatively, it is possible that HC loss is caused by the immune response of the inner ear. We speculate that the latter possibility is correct, based on the fact that one application of the adenovirus does not lead to threshold shift or to HC loss [Stöver et al., 1999; Yagi et al., 1999]. It takes a repeated inoculation, along with the resulting immune response, to cause a lesion in the inner ear. The infiltration of T cells into the perilymph, which was found in the basal turn after 1 virus inoculation [Raphael et al., 1996], suggests a relationship between the pathology and the immune response.