音響外傷急性期における蝸牛内炎症性サイトカインの発現とその機能
－インターロイキン6を中心に－

分担研究者：小川　　郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：増田　正次（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：藤岡　正人（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：岡本　康秀（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：神崎　　晶（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：岸本　忠三（大阪大学）
共同研究者：岡野　栄之（慶應義塾大学生理学）

研究要旨

近年の国内外の実験的検討から、音響外傷性難聴の機序のひとつとして蝸牛内の炎症細胞浸潤が指摘されている。また、これまで *in vivo, in vitro* 双方のアプローチで、多種の蝸牛障害において外側壁を中心に炎症性メディエータ産生能に関する報告がなされている。以上の知見に鑑み、我々は音響外傷急性期における蝸牛における炎症関連メディエータの産生とそのメカニズムを検討した。その結果、1)炎症性サイトカイン複数種が音響外傷急性期において蝸牛外側壁に一過性に上昇する、2)それに先だち、炎症関連遺伝子の発現調節を司る転写因子 NF-κB が蝸牛外側壁において活性化し DNA 結合能が上昇している、3) 1)において確認されたサイトカインの一つである IL-6 シグナルの阻害剤を投与により、部分的に聴覚閾値上昇が軽減される、ことが明らかになった。以上より、音響外傷蝸牛外側壁において NF-κB を介した何らかの炎症反応調節機構が推察されると同時に、音響外傷性難聴急性期におけるサイトカイン阻害療法の可能性が示唆された。

研究目的

音響外傷性難聴急性期における炎症反応の寄与とそのメカニズムを解明し、臨床応用の可能性を探る。

研究方法および倫理面への配慮

4kHz 中心の 1 オクターブバンドノイズ(124dB SPL)を 2 時間曝露した。曝露前、0、2、3、6、12、24 時間後、3、5、7、14、28 日後に蝸牛を摘出し、以下の項目を検討した。

a) 炎症反応関連サイトカインに関して RT-PCR 法での発現スクリーニングと定量 RT-PCR
b) NF-κB/DNA 結合能の変化に関してゲルシフトアッセイを用いた検討
c) a)のうち一過性の上昇を呈していたインターロイキン 6(以下 IL-6)と、

NF-κB p50、p65の局在に関して免疫組織染色を用いた検討

d) IL-6 レセプター特異的中和抗体であるMR16-1(大阪大学、中外製薬より供与)の音響曝露後投与が、tone-burst ABR上の聴覚閾値変化に与える影響

なお、実験に際しては当大学動物実験倫理委員会の規定事項を遵守した。

研究結果

ゲルシフトアッセイにより音響曝露後2時間をピークにNF-κB/DNA結合能の上昇を認め、それに遅れて3時間後にIL-1β、IL-6のRNAレベルでの発現上昇が確認された。免疫組織染色ではNF-κBが蝸牛外側壁で広範に核内移行を示し、またIL-6の蝸牛外側壁での幅広い分布を認めた。さらに、IL-6シグナルの阻害剤であるMR16-1の音響曝露直後の腹腔内投与により、対照群と比べ4kHzにおいて有意な聴覚閾値上昇の軽減を認めた。

考　察

過去の他臓器における *in vitro, in vivo* の検討から、NF-κBは炎症、細胞死等に関わるさまざまな遺伝子の発現を調整することが知られている。今回の検討から音響外傷急性期の蝸牛外側壁におけるNF-κBの活性上昇が明らかになり、何らかの調節機構を担っている可能性が示唆された。

NF-κBの活性化により炎症性サイトカインが転写誘導されるという諸家の報告があるが、今回の検討においても、以下の2点の理由により内耳障害でもNF-κBとサイトカインが関与していると考えられた。

1) 時間的整合性：IL-6などの炎症性サイトカインがNF-κB活性上昇から数時間遅れて発現を認めたこと
2) 空間的整合性:炎症性サイトカインとNF-κBともに蝸牛外側壁で認められたこと

以上から音響外傷蝸牛外側壁でもNF-κBを介した炎症反応誘導の可能性が示唆された。今後も、音響外傷蝸牛外側壁における炎症誘導・調節に関する、さらなる転写因子の研究が必要と考える。

他方、中外製薬より近日上梓されたIL-6レセプター中和抗体であるMR16-1の音響曝露後の投与によって聴力悪化度が軽減された。このことは、音響外傷性難聴の病態生理に炎症反応が寄与することを示唆するとともに、サイトカイン阻害療法という新しい急性感音難聴に対する治療戦略の可能性を示唆するものである。内耳障害の病態メカニズムは組織学的検討を中心に行われてきたが、今回の実験では、転写因子や遺伝子発現の変化を追うことにより、新たな知見が生みだされ、創薬治療に有用なデータにつながったものと考えられる。今後は臨床応用を念頭に、その作用機序、病態生理との関連を含めたさらなる検討を要すると思われた。

結　論

音響外傷性難聴急性期において、蝸牛外側壁でIL-6産生をはじめとしたNF-κBを介した何らかの炎症反応調節がなされて

いる可能性が推察された。また IL-6 阻害により聴覚閾値上昇が軽減され、音響外傷性難聴急性期におけるサイトカイン阻害療法の可能性が示唆された。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

1) Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Fujioka M, Ogita K, Ogawa K. : Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. Brain Res 1068 : 237-247, 2006.
2) Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. : Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. J Neurosci Res 83 : 575-583, 2006.

2. 学会発表

1) 藤岡正人, 神崎　晶, 井上泰宏, 小川　郁:音響外傷モデルラット蝸牛における炎症性サイトカインの発現に関する検討. 日本耳鼻咽喉科学会(平成 17 年)
2) 増田正次, 長嶋玲子, 神崎　晶, 藤岡正人, 荻田喜代一, 小川　郁 : 音響外傷によるマウス蝸牛内 Nuclear factor kappa B の発現変化. 日本耳鼻咽喉科学会(平成 17 年)
3) 藤岡正人, 神崎　晶, 岡野 James 洋尚, 増田正次, 吉崎和幸, 岸本忠三, 岡野栄之, 小川　郁:音響外傷蝸牛における炎症性サイトカインの発現とその機能に関する検討. 日本聴覚医学会(平成 17 年)

知的財産権出願・登録情報

1) 「IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する内耳障害治療剤」
特願2004-087270　平成16年2月　慶應義塾大学、中外製薬
藤岡正人, 岡野栄之, 小川　郁, 神崎　晶, 岡野 James 洋尚

急性感音難聴の治療への試み
－基礎的アプローチから－

分担研究者：小川　郁（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：山下　大介（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：神崎　晶（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：斉藤　秀行（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：佐藤美奈子（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

音響外傷による内耳有毛細胞の障害メカニズムには、強大音そのものによる直接的・機械的障害と種々の代謝的障害がある。代謝的障害としては活性酸素やフリーラジカルが内耳における細胞死に重要な役割を担っていると考えられているが、一般的にフリーラジカルの反応は生体内においては数ミリ秒と極めて速いものであり、音響暴露後に持続して生じる遅発性の蝸牛障害は説明できない。本研究では、有色モルモットに音響負荷による急性感音難聴を作成し、その後の聴覚機能および細胞死の形態変化を経時的に観察した。さらにフリーラジカルの発現を活性酸素のマーカー（4-HNE）および 活性窒素のマーカー（nitrotyrosine）を用いて免疫組織学的に検討した。

研究目的

急性音響外傷性難聴の内耳障害メカニズムを解明し、臨床応用の可能性を探る。

研究方法および倫理面への配慮

動　物：

プライエル反射正常の有色モルモット（オス、250～300g；Elm Hill Breeding Labs）45 匹を用いた。

音響曝露：

換気された防音箱内で、4kHz に中心域を持つ 1 オクターブバンドノイズを、120dB SPL の強さで 5 時間曝露した。音響負荷中は、動物の頭上においたマイクロフォンを用いて音響レベルをモニターした。

Auditory brainstem response（ABR）：

ABR を用いて、各 time point（音響負荷前、負荷後 1、3、7、10、14、21 日目）に聴覚機能を評価した。動物を深麻酔後（キシラジン 10mg/kg およびケタミン 40mg/kg 筋注）、顕微鏡下に外耳道、鼓膜を観察し異常がないことを確認した。その後、関電極を測定耳下部皮下に、不関電極を頭頂皮下に、接地電極を反対側耳下部皮下に挿入した。音刺激はトーンバースト（rise-fall time：1ms、plateau time：15ms）を用いて、4、8、16kHz の

3周波数の聴覚閾値を測定した。

Hair cell count：

内耳の形態評価を音響負荷直後、1、3、7、10、14日目にHair cell countの手技を用いて行った。上記と同様に動物を深麻酔後、側頭骨蝸牛を摘出し、顕微鏡下に、正円窓・卵円窓・蝸牛頂を開放し、4% paraformaldehydeを灌流、一晩固定した。その後、骨胞を取り除き、コルチ器を含む蝸牛軸を側頭骨から外し、0.3% TritonX-100で5分間処理後、surface preparation法によりコルチ器を摘出した。次いで、1% rhodamin phalloidinを用いて細胞骨格を染色した。蝸牛頂より残存する有毛細胞数を数え、縦軸を有毛細胞の消失の割合(%)、横軸を蝸牛頂からの距離(mm)としてcytocochleagramを作成した。

4-HNEとnitrotyrosineの免疫染色：

活性酸素のマーカーとして4-HNEを、活性窒素のマーカーとしてnitrotyrosine(NT)を用いて免疫組織学的に検討した。コントロール群(音響負荷しない群)と音響負荷群でそれぞれ音響負荷直後、1、3、7、10、14日目に観察した。上記と同様に動物を深麻酔後、蝸牛を摘出し、顕微鏡下に正円窓・卵円窓・蝸牛頂を開放し、4% paraformaldehydeを灌流、一晩固定した。その後、8% EDTAで約2週間脱灰し、クライオスタットを用いて9μmの凍結切片を作製した。1次抗体としてanti-4-HNE抗体(1:500；CALBIOCHEM)、anti-nitrotyrosine (1：200；BIOMOL Res)を、2次抗体としてAlexa Flour 488-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG(1：200；Molecular Probes)を用いて染色した。免疫学的評価を行った部位は4kHz領域よりやや蝸牛頂側とした。

実験に際しては当大学動物実験倫理委員会の規定事項を遵守した。

研究結果

1) ABR

音響負荷前は各周波数(4、8、16kHz)ともコントロール群と音響負荷群の聴覚閾値に有意差を認めなかった。音響負荷群では音響負荷後1日目に閾値が最大値を示し、その後徐々に減少し統計学的には負荷後7日目に固定した。この音響負荷条件(4kHz OBN、120dB SPL、5h)では、4kHzで22.0dB、8kHzで43.3dB、16kHzで49.0dBの閾値上昇が認められ、難聴が残存するPTS(permanent threshold shift：永続的閾値上昇)モデルを呈していた。

2) Hair cell count

音響負荷直後には、外有毛細胞において4kHzの周波数領域に一致する蝸牛頂から約10から12mmのところに最大約47.8%の障害を認めた。その後、同部位から頂回転、基底回転に拡大する障害が認められ、統計学的には7日から10日目に固定した。また、蝸牛頂側(約2～10mm)に音響負荷直後から不特定の障害がみられた。外有毛細胞の3列を分けて調べてみると4kHz領域より蝸牛頂側のダメージは2、3列目によるものであった。一方、内有毛細胞はいずれの計測時においてもごく少数の障害を認めるのみであった。

3) 4-HNEとnitrotyrosineの免疫染色

4kHzよりやや頂回転(蝸牛頂より約8〜10mm)の部位を観察では、1次抗体を除いた染色(negative control)では発現は確認されなかった。4-HNEではコントロール群で発現が見られなかったが、音響負荷群では音響負荷直後から外有毛細胞を中心に支持細胞や内有毛細胞も含め軽度の発現がみられ、約7日から10日目に発現が最大となった。コントロール群でもみられるテクトリア膜の発現は非特異的なものと考えられた。NTでは、4-HNEと違いコントロール群でもHensen細胞やClaudius細胞などの支持細胞や一部の内有毛細胞に発現が見られた。一方、外有毛細胞やDeiter細胞では音響負荷後7日から10日目に発現のピークを認めた。血管条やラセン神経節では、各群間で発現の差を認めなかった。

考　察

今回我々は、強大音響負荷後に、4kHz領域よりやや蝸牛頂側に遅発性の活性酸素及び活性窒素の発現を確認した。この発現は同部位において、聴覚機能及び形態的な細胞死の経時変化と一致した結果であった。この結果から我々は、音響曝露後の持続する代謝的障害にフリーラジカルが関与するものと考えた。

音響曝露後、形態的には徐々に障害が増加・拡大するのに対し、機能的には音響負荷後に聴覚閾値が最大値を示し、その後、徐々に減少し、7日目に固定した。この最初の閾値上昇は、様々な蝸牛における可逆的な構造の変化によるものと考えられる。例えば、基底膜の機械的なコンプライアンスの変化や、有毛細胞の感覚毛のスティッフネスの減少、求心性神経終末の興奮毒性などである。最終的な内耳組織障害の程度は、この遅発性に生じるフリーラジカルの負の要素と可逆的な構造変化の正の要素のバランスにより決定されていると考えられた。

動物種や音響条件によって程度の差はあるが、音響曝露後に増加・拡大する障害は、従来から報告されている明白な現象である。近年、音響外傷によるアポトーシスやネクローシスの関与に関する報告が散見されるが、音響曝露後の遅発性に拡大する障害に関する報告はない。今回の実験ではこの遅発性障害のメカニズムを解明することに焦点を絞った。遅発性のフリーラジカルの発現のメカニズムとして、最初に障害を受けた部位(4kHz 領域)より種々のケミカルメディエータ(これには活性酸素やフリーラジカルも含まれる)が放出され、周囲の隣接細胞に影響を及ぼし、その隣接細胞内でまた種々の反応により細胞死が誘導され、またその隣の細胞に、障害が空間的・時間的に拡大する可能性が考えられた。

結　論

音響曝露後の聴覚機能及び細胞死の経時的変化に一致してフリーラジカルの遅発性の発現を確認した。この結果は曝露後に持続する代謝的障害にフリーラジカルが関与するものと考えられた。また、この結果に基づき音響曝露後から、種々のスカベンジャーの投与によって音響外傷性難聴を防御できる可能性が示唆された。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

1) Yamashita D, Jiang H-Y, Le Prell CG, Schacht J, Miller JM. : Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. Neuroscience 2005 ; **134**(2) : 633-642

2. 学会発表

1) Yamashita D, Minami S, Ogawa K, Miller JM. : Bcl-2 genes regulate noise-induced hearing loss : ARO(平成 17 年)

2) Minami S, Matsunaga T, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM. : Creatine attenuates noise-induced hearing loss : ARO(平成 17 年)

3) 山下大介, 南修司郎, 小川　郁：音響外傷における Caspase 非依存的アポトーシス：日本耳鼻咽喉科学会(平成 17 年)

4) 南修司郎, 山下大介, 小川　郁：新しいシスプラチン難聴動物モデルと蝸牛内酸化ストレス：日本耳鼻咽喉科学会(平成 17 年)

5) 山下大介, 塩谷彰浩, 神崎　晶, 小川　郁：音響外傷性難聴に対する T-817MA の内耳神経保護効果：日本耳科学会(平成 17 年)

6) 南修司郎, 山下大介, 新田清一, 小川　郁:音響外傷性難聴におけるクレアチンとテンポールの有効性の検討:日本耳科学会(平成 17 年)

知的財産権出願・登録情報

なし

正円窓経由遺伝子投与法による遺伝子治療の可能性について

分担研究者：福島　邦博（岡山大学　耳鼻咽喉科頭頸部外科）
研究協力者：前田　幸英（岡山大学　耳鼻咽喉科頭頸部外科）

研究要旨

リポソーム封入したベクターを用いて遺伝子を内耳内に投与し、その聴力の経時的な検討を行ったので報告する。昨年度までの報告で用いたものと同様の *GJB2*R75W 変異遺伝子と GFP の融合蛋白を発現する発現ベクターを作成し、これをリポソーム封入して中耳正円窓付近に留置した。聴性脳幹反応検査ではこの遺伝子投与による聴力低下は1日後からすでに確認され、3日後までは有意な聴力低下が認められた。シャム手術によって生じた聴力低下はごく軽度であり、この手法自体によって生じる内耳の機能異常はごく軽度であることが推測された。12日後の聴力はコントロール群と変わらず、この実験系による遺伝子投与は、一時的な聴力低下のみを引き起こすことが確認された。経正円窓的リポソーム封入遺伝子投与は、内耳の遺伝子治療の方法として有効であり、今後遺伝子の選定とその手法の選択が検討されるべきであると考える。

研究目的

昨年までの研究で、我々は、ヒトで常染色体優性遺伝性難聴の原因遺伝子である *GJB2*R75W 変異遺伝子と GFP の融合蛋白を発現する発現ベクターを作成し、これをリポソーム封入して中耳正円窓付近に留置する手段について報告した。このベクターに由来する GFP の発現は、形態学的にはコルチ器とラセン板縁、ラセン靭帯に認められることを報告してきた。また、聴性脳幹反応検査ではこうした動物での聴力は低下していることが確認された。今回の検討では、こうした遺伝子投与後の聴力が経時的にどのような変化を示すかについて検討した。経時的な変化を見ることによって、1) 遺伝子投与の効果発現の時間的変化を見ること、2) 効果が一過性のものであるのか、永続するものであるのかを検討すること、3) 効果が消失した後での聴力の状態を検討することが可能であり、遺伝子治療のための基礎的な情報を得ることを目標として研究を行った。

研究方法

生後35～45日の雌C57Bl6マウス（各群につき n=8-10）をケタミン麻酔し、リポソーム/プラスミドベクター p*GJB2*R75W-*eGFP* の正円窓投与を行った。投与後3日後に投与抗eGFPモノクローナル抗体を用いた免疫染色法で変異遺伝子発現の検出を行い、1、2、3、5、および12日後に聴性脳幹反応で聴力閾値を測定した。聴性脳幹反応で

はクリック音を用いた。頭頂部および耳後部の電極で測定した反応を 500 回加算し、非術側の反応閾値をコントロールとして、術側の反応閾値の変化を検討した。

結　果

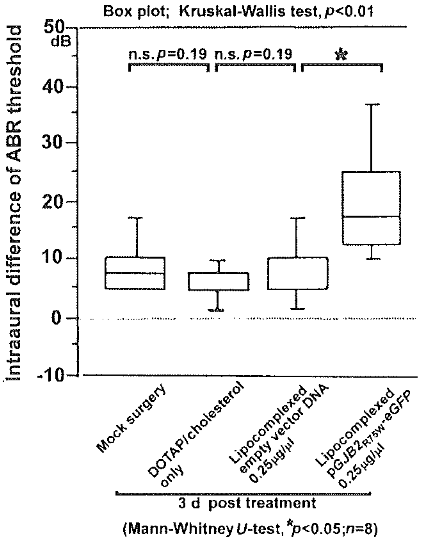
リポソーム封入ベクター投与後 3 日後に内および外柱細胞、外有毛細胞、クラウディウス細胞、ラセン板縁、ラセン靭帯といった部位での遺伝子発現を免疫染色で検出した。投与 3 日後ではシャム手術、リポソームのみの投与、および *GJB2*$_{R75W}$ のインサートを含まないベクターの各コントロール群では有意な聴力閾値の変動は認めず、*GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子ベクター投与群でのみ聴力閾値の有意な上昇を認めた。したがって、検出された聴力変動が、*GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子の影響によるものであることが示された。

さらに 1、2、3、5、および 12 日後に聴力閾値の変動を検討したところ *GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子ベクター投与群では投与後 1、2、3 日後に優意な聴力閾値の上昇をみとめたが、5、12 日後にはコントロール群と同様のレベルであった。

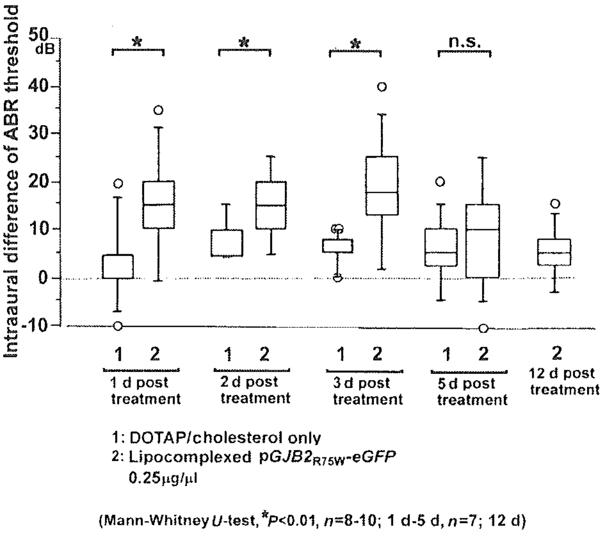
考　察

ベクター投与による聴力低下の影響は、投与後 24 時間ですでに有意な聴力レベルの違いとして確認できる。その効果は、3 日間ほぼ同じレベルで持続し、5 日目の時点ではばらつきはあるものの、平均値ではシャム手術例と変わらないレベルまで改善している。さらに、投与 12 日目では完全にシャム手術例と同じレベルまで改善しており、このベクターを用いた遺伝子の効果は、聴力レベルの点では一過性のものであることが確認できた。

こうした事実からは、経正円窓投与による遺伝子投与による効果はごく一過性のものであり、持続的な遺伝子発現による長期的な毒性や副作用の危険性は低いと考えら



ベクター投与 72 時間後の聴力変動



ベクター投与後の聴力の計時的変化

れる。この事実は、この方法で投与した遺伝子は通常の薬剤と同じように、pharmacokineticsに基づいて、投薬管理を行う必要があり、またそれが可能であることを示している。たとえば、癌遺伝子の増幅を行う、あるいは癌抑制遺伝子の抑制を行うことによって細胞周期に直接的な働きかけを行うような遺伝子治療を想定した場合、その効果があまり長い時間持続しすぎると、癌化の危険性が生じる。このような場合、むしろ作用時間に限界のあるこの投与法でより安全に遺伝子治療が行える可能性がある。

GJB2$_{R75W}$の投与では、投与後 1 日程度ですでに聴力の有意な悪化が確認されている。*GJB2*$_{R75W}$は、dominant negative 効果を持つ遺伝子であるため、おそらく発現量がそれほど多くなくても生理学的なギャップ結合の機能を大幅に低下させ、結果として聴力低下が生じやすかった可能性がある。逆に言えば、たとえば同じ*GJB2*でも、変異ごとに異なるタンパクレベルでの機能異常の程度が、同じような手法で確認できる可能性がある。今後、検討する遺伝子の種類や変異の種類による聴力に与える影響の違いについても検討していきたい。

ベクターを封入したリポソームを正円窓に置くという操作は、実際の手術手技に置き換えて考えるときわめて容易かつ実現可能な方法である。現在の医学水準から考えると、この投与法は手術操作による副損傷の危険性が少なく、長期的な遺伝子発現に伴う副作用の危険性も乏しい、安全な手法であると考える。このため臨床応用には最も適した投与法であるために今後も検討を深めていく必要がある。

結　論

リポソーム封入したベクターを用いて遺伝子を経正円窓的に内耳内に投与し、その聴力の経時的な検討を行った。免疫染色でコルチ器、ラセン板縁、ラセン靭帯で遺伝子発現が確認された投与後 3 日後に、*GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子ベクター投与群でのみ、聴力閾値の有意な上昇を認めた。

GJB2$_{R75W}$ 変異遺伝子ベクター投与群では投与後 1、2, 3 日後に優意な聴力閾値の上昇をみとめたが、5, 12 日後にはコントロール群と同様のレベルであった。したがって、経正円窓的に投与された *GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子による聴力変動は一時的なものであって、不可逆的な内耳機能の低下を引き起こさず、手術操作等による侵襲も小さなものであることが示された。

健康危険情報

該当無し

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

該当無し

病態遺伝子を用いた進行性難聴モデルマウスの作成

分担研究者：福島　邦博（岡山大学　耳鼻咽喉科頭頸部外科）
共同研究協力者：前田　幸英（岡山大学　耳鼻咽喉科頭頸部外科）

研究要旨

特発性難聴などに代表される両側進行性感音難聴は、患者のコミュニケーション能力を著しく障害する重篤な疾患である。

*GJB2*R75W変異は、ヒトの常染色体優性遺伝性難聴家系（DFNA3）から発見された遺伝子変異であり、正常なGJB2遺伝子機能を阻害する、dominant negativeの働きを有することが知られている。今回我々は、このGJB2R75W変異タンパクを薬剤投与による発現調節によって成熟後のマウス内耳に発現させ、進行性難聴マウスを作成することを行っているので、その経過を報告する。

研究目的

特発性難聴などに代表される両側進行性感音難聴は、患者のコミュニケーション能力を著しく障害する重篤な疾患である。ことに、人生の途中で急激に聴力を失う進行性難聴のケースでは、転職や転籍を余儀なくされ、コミュニケーション方法を変えなければならなくなる、など、QOLに対する重大な問題を抱えることになる。現在では人工内耳を用いてコミュニケーション能力を再獲得する方法はあるが、これとても根本的な治療法ではありえず、治療法の確立が望まれている分野の一つである。

*GJB2*R75W変異は、ヒトの常染色体優性遺伝性難聴家系（DFNA3）から発見された遺伝子変異であり、Xenopus ocyteの実験系では、正常な*GJB2*機能を阻害する、dominant negative効果を有することが知られている。この遺伝子のトランスジェニックマウスでは、成熟期のマウス蝸牛において不可逆的なコルチ器の変性と高度難聴を引き起こすことがすでに知られている。

たとえばこうしたトランスジェニックマウスの場合、成熟した段階ではすでに内耳の変性が完成しているので、そこに何らかの介入手段、すなわち薬剤投与や遺伝子投与による介入を行う対象とはなりにくい。すなわち、進行性難聴のどの段階での薬剤投与を行うべきであるのか、あるいは遺伝子投与を行うべきであるのかという課題に答えるためには、難聴の進行を統制して生じさせることができる進行性難聴の治療モデルを作成することが必須である。しかし難聴を伴うことがすでに知られている遺伝子改変マウスでは、多くの場合生下時にはすでに難聴が存在しているか、老化が進んで難聴が進行してくるために難聴の進行ポイントが明確でなく、薬剤投与の時点が特定しにくい。このような理由から、こうした既存のマウスモデルでは難聴治療モデル

動物とはなりえず、新しいシステムが必要であるといえる。

今回我々は、すでにマウスに不可逆的な難聴を生じさせることが判明している*GJB2*$_{R75W}$変異を、タモキシフェンの存在下に時間特異的に発現をコントロールできる系を用いて、遺伝性・進行性難聴の治療モデルを作成中であるので、報告する。

研究方法

1) マウス胚への*GJB2*$_{R75W}$の挿入

まずC57Bl6系マウスの胚細胞に図１に示す変異遺伝子の導入をおこなった。

具体的には下に示すベクター(pCCALL2)のクローニングサイトに*GJB2*$_{R75W}$変異遺伝子をクローニングし、直鎖状にした後マウス受精卵への打ち込みを行った。

2) Cre ERによるダブルトランスジェニックマウス

*CreER*遺伝子産物はloxP siteでの遺伝

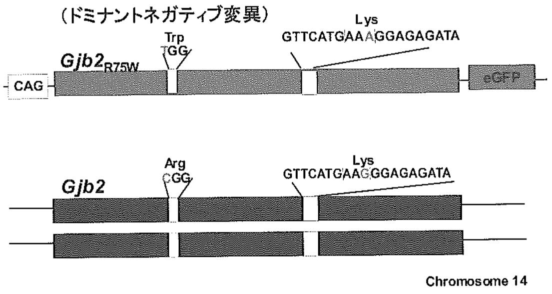
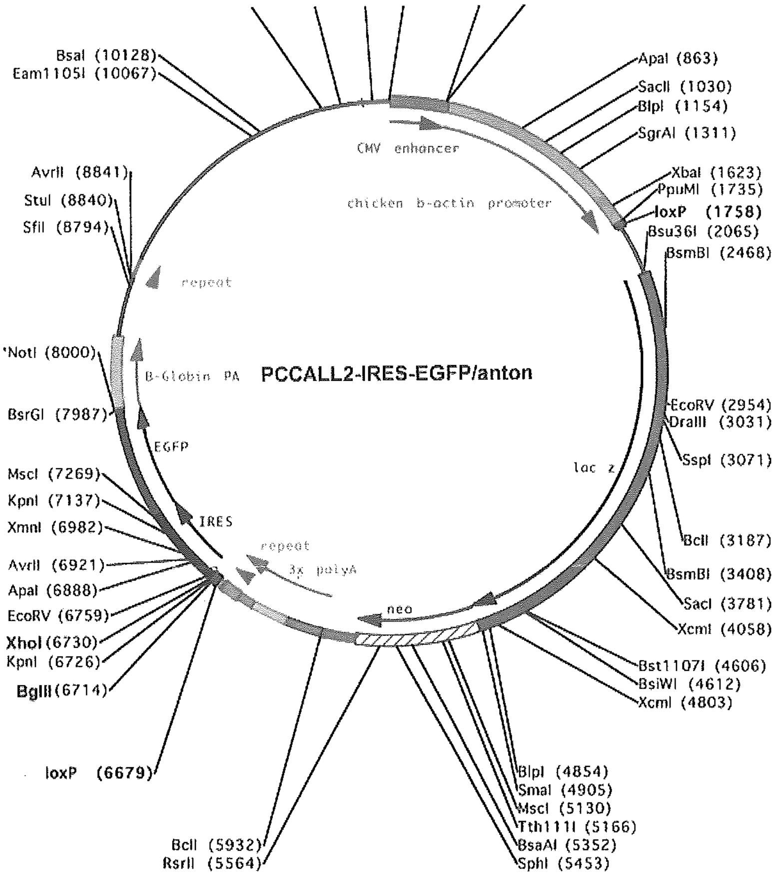


図１　マウス胚への*GJB2*$_{R75W}$の導入

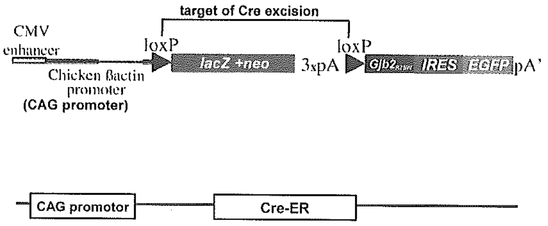


マウス受精卵への*GJB2*$_{R75W}$の導入

子組み換えを起こす組み換え酵素で、通常は細胞質に存在している。タモキシフェンと結合することによりこれは核内へ移行し、遺伝子組み換えを引きおこす。

我々の用いた *GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子は loxP site での遺伝子組み換えの後に始めて変異遺伝の発現が生じるようにデザインされている。

この二つを組み合わせることによって、タモキシフェン投与によって *GJB2*$_{R75W}$ 発現が誘導されるモデルを作成することができる。



ダブルトランスジェニックマウスでの
GJB2$_{R75W}$ 変異遺伝子のコントロール

3) CreER 系の内耳での発現について

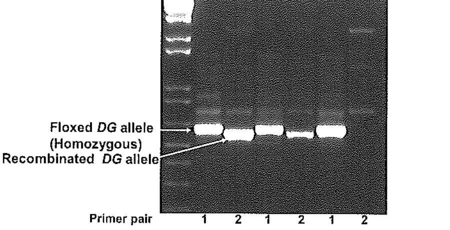
マウス内耳組織で、タモキシフェン投与により遺伝子組み換えが起こることを確認するため、*loxP-dystroglycan* 遺伝子と *CreER* 遺伝子を有するダブルトランスジェニックマウスに、タモキシフェンを投与し、内耳組織から抽出した DNA を用いて、*loxP-dystroglycan* 遺伝子の変化を PCR で検討した。

結　果

現在、*GJB2*$_{R75W}$ 変異遺伝子を有する F1 世代のマウスが得られたので、これを *CreER* 遺伝子を有するマウスと交配中である。また、3) でタモキシフェンを投与したマウス内耳では遺伝子組み換え後の *loxP-dystroglycan* 遺伝子が検出されたが、タモキシフェンを投与しない場合にはその様な組み換え遺伝子は検出されなかった。以上により、我々の用いている系のマウス内耳組織では、タモキシフェン投与により, *loxP site* での遺伝子組み換えが起こると考えられる。

考　察

今回の検討で、タモキシフェンを使った我々の実験系では、内耳での遺伝子発現を有効にコントロールできる double transgenic mouse が作成可能であることが示された。現在この系を用いて、*GJB2*$_{R75W}$ 遺伝子を発現させる系を作成中である。これによって、dominant negative 変異を持った遺伝子を実験計画の中で任意の時点に発現させることが可能であるというデータを確立することができた。現在、このシステムを用いて任意の時間経過の中で難聴を引き起こすことができる遺伝性・進行性感音難聴のモデル動物を作成中であり、すでに報告した siRNA などによる治療モデルを今後作成していく予定である。



薬剤誘導性 Cre recombination（マウス蝸牛）

結　論

我々は現在、タモキシフェンをもちいた実験系で、内耳での *GJB2*R75W 遺伝子発現を有効にコントロールできる double transgenic mouse を作成中である。*loxP-dystroglycan* 遺伝子を用いた予備実験では、薬剤投与により内耳組織で遺伝子組み換えを誘導することは可能であると示された。

健康危険情報

該当無し

研究発表

1. 論文発表

未

2. 学会発表

未

知的財産権の出願・登録状況

該当無し

マウス内耳における Ubiquitin A-52 の局在の検討

分担研究者：宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：鬼頭　良輔（信州大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：大島　　章（信州大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：鈴木　伸嘉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）
共同研究者：工　　　穣（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

ヒト内耳（蝸牛・前庭）に特異的に高発現を示す遺伝子の一つである、Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product（以下 UbA52）遺伝子の、タンパク質レベルでの局在を免疫組織学的手法を用いて検討した。UbA52 の陽性所見は、蝸牛血管条辺縁細胞と前庭暗細胞において確認された。また、マウスの発達過程における UbA52 の発現時期は、内リンパのカリウムイオン濃度の上昇の時期と一致していた。これらの結果から、内耳において UbA52 がイオン輸送に関連した機能的役割を担っている可能性が示唆された。

研究目的

現在までに cDNA マイクロアレイを用いた発現解析により、ヒト内耳（蝸牛・前庭）に特異的に高発現を示す遺伝子群が明らかにされており（Abe et al. 2003）、それらのうちのいくつかは既に難聴の原因遺伝子であることが示されている。Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product（以下 UbA52）遺伝子は、内耳において高発現を報告された遺伝子の一つであるが、現在までに内耳における機能的役割、あるいは難聴との関連性については報告されていない。本研究では、内耳における UbA52 のタンパク質レベルでの局在と、そこから推測される機能的役割についての検討を行った。

研究方法

対象には生後 0 日目（P0）から 28 日目（P28）までのマウス（C57BL/6J）を用い、免疫組織学的に検討を行った。マウス UbA52 ペプチドをモルモットへ皮下注射して免疫し、抗 UbA52 ポリクローナル抗体を作製。抗体の特異性についてはウエスタンブロット法等を用いて確認した。4%パラホルムアルデヒドにて経鼓膜及び経心還流固定を行って側頭骨を固定後、蝸牛及び末梢前庭器を摘出して凍結切片を作製。上記抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

研究結果及び考察

蝸牛では血管条の辺縁細胞に陽性反応が認められ（図 1）、末梢前庭器においては暗細胞で同様に局在が認められた（図 2）。

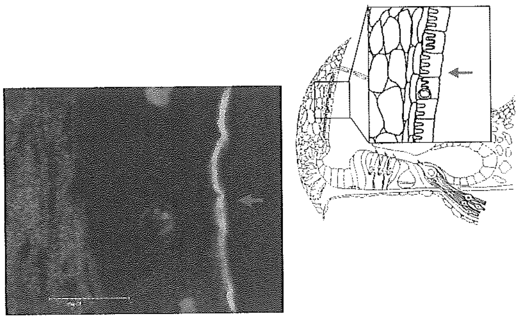


図１　蝸牛血管条の強拡大図
辺縁細胞の apical membrane 部分（青矢印）に陽性所見を認める。

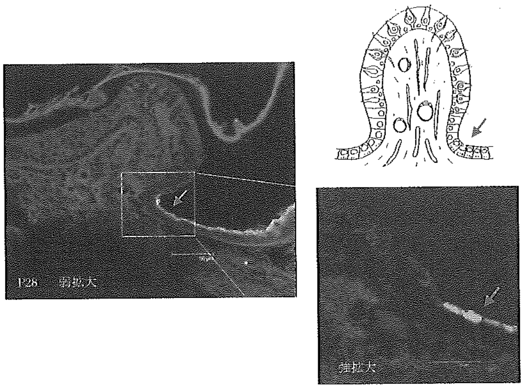


図２　半期管膨大部の弱拡大（左）と強拡大（右下）図
暗細胞部分に陽性所見を認める。

UbA52については、過去に腎臓の尿細管上皮における発現が報告されている（Lin Sun et al. 2002）。血管条辺縁細胞と腎尿細管上皮細胞は機能的にイオン輸送の面で共通しており、また暗細胞についてもミトコンドリアや粗面小胞体を多数含み、構造的にイオン輸送上皮との類似性が見られることが知られている。このことから血管条や暗細胞での高発現は、UbA52が内耳において、イオン輸送に関わる機能的役割を持っている可能性が推測された。また、マウスの発達過程における蝸牛でのUBA52タンパク質の発現の検討では、P0からP3においては辺縁細胞に陽性所見を認めず、P6

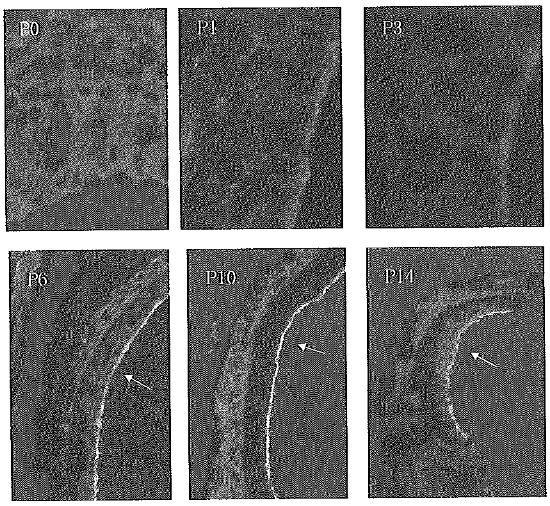


図３　マウスの日齢と発現の関係
P0～P3では、明らかな陽性所見を認めない（上段）が、P6以降では成熟マウス同様の陽性所見を認める（下段）。

以降では成熟マウスとほぼ同等の陽性所見を認めた（図 3）。哺乳動物の内リンパのカリウムイオン濃度はP3以降急激に増加し、P8 前後で成熟マウスと同等のレベルに達することが報告されており（Nicolas M et al. 2001）、このカリウムイオン濃度の上昇と UbA52 の陽性所見の発現が時期的に一致していたことから、UbA52 のイオン輸送の調節への関与の可能性が推測された。近年では Ubiquitin あるいは Ubiquitin 関連分子と様々な疾患発症との関連性が報告されており、今後内耳における Ubiquitin の機能的な解析は、難聴などの新たな疾患発症メカニズムの解明につながるのではないかと考えられた。

結　論

内耳におけるUbA52タンパクの局在の検討から、内耳でのイオン輸送に関する機能的な役割を担っている可能性が推測された。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 鬼頭良輔, 大島　章, 鈴木伸嘉, 工　穣, 宇佐美真一：マウス内耳における Ubiquitin A-52 の局在の検討. 第15回耳科学会(2005年10月　大阪)

知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Cochlinの蝸牛管における局在：電顕による検討

分担研究者：岩崎　聡　(浜松医科大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：水田邦博(浜松医大)
共同研究者：池園　哲郎(日本医大)
共同研究者：荒井　真木(社会保険浜松病院)
共同研究者：橋本　泰幸(浜松医大)
共同研究者：渡邉　高弘(浜松医大)

研究要旨

Cochlinは DFNA9 の原因遺伝子産物で内耳に広く分布している。今回その局在を免疫電顕で検討した。spiral limbus, spiral ligament, basilar membrane でcochlinの反応はcollagen type Ⅱの存在するところにみられた。cochlinはcollagen type Ⅱと共同して蝸牛管の構造維持に働いているものと考えられた。

研究目的

Cochlinは細胞外マトリックスとして内耳に存在するが、その機能はいまだ不明である。今回電顕レベルで局在を解明しその機能を推察した。

研究方法

Wistar系ラットを用い、麻酔下に経心潅流固定した。固定液は4%パラホルムアルデヒド＋0.1%グルタールアルデヒド in 0.1M リン酸バッファー(PB)を用いた。50mM塩化アンモニウム液(in PB)に2時間浸けたあと、PBにてovernightとした。通常の方法でLowicryl K4Mに低温包埋し、超薄切片をニッケルグリッドにひろった。まず切片を1% BSA/PBSに浸し、cochlinの von Willebrand factor type A like domains 1：163-181に対するpolyclonalウサギ抗体[1]にovernight、4℃で反応させ、洗浄の後、二次抗体(15nm 金コロイド標識抗ウサギIgGロバ抗体）を1時間室温で反応させた。さらに一次抗体に抗ラット collagen type Ⅱウサギ抗体も用いた。ウラン鉛二重染色のあと電顕下に観察した。コントロールは一次抗体の代わりに正常ウサギ抗体を同濃度で用いた。

研究結果

Cochlinの反応は spiral limbus, spiral ligament, basilar membrane(図1)の細胞外マトリックスの繊維状構造物に認められた。この繊維状構造物はcollagen type Ⅱであることが報告されており[2]、さらに今回の実験でもcollagen type Ⅱ(図2)であることが確認された。よって cochlin と collagen type Ⅱは同じ部位に存在していると判断された。コルチ器の感覚細胞や支持細胞、spiral ligamentの線維細胞には反

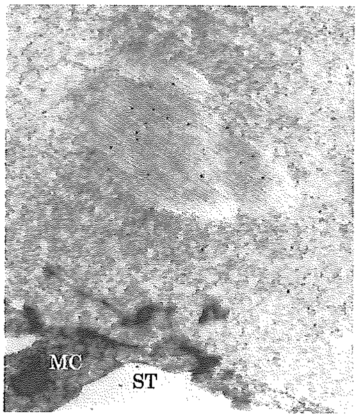


図 1

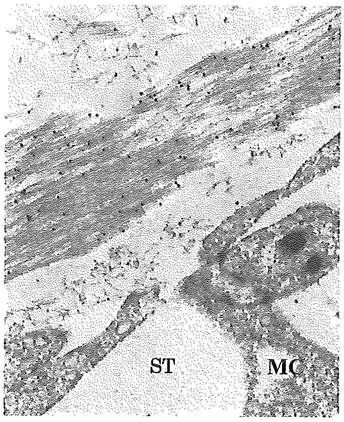


図 2

basilar membrane における cochlin (図 1) と collagen type Ⅱ (図 2) の局在。ともに繊維状構造物に反応が認められている。MC : mesothelial cell. ST : scala tynpani

応は全くなかった。コントロールには反応を認めなかった。

考　察

DFNA9 の症状は高音障害型から徐々に進行する感音難聴であり、めまいを伴うことがある[3~8)]。その病理では collagen type Ⅱ bundle の消失、neuroepithelial element の消失が報告されている[5,9,10)]。collagen type Ⅱは内耳に存在する主要な collagen で、蝸牛ではコルチ器の強固さとしなやかさを担っていると考えられる。病理で collagen type Ⅱ bundle が消失することから、cochlin は collagen type Ⅱの機能に欠かせない存在で、その変異は collagen type Ⅱのゆるやかな消失をもたらし、徐々に進行する難聴をきたすものと推察された。

参考文献

1) Ikezono T, Shindo S, Li L, Omori A, Ichinose S, Ishizaki M, Watanabe A, Kobayashi T, Pawankar R and Yagi T. : Biochem Biophys Res Commun 2004 ; **314** : 440-446.

2) Dreiling FJ, Henson MM and Henson Jr. OW. : Hear Res **166** : 166-180, 2002.

3) Robertson NG, Lu L, Heller S, Merchant SN, Eavey RD, McKenna M, Nadol JB Jr, Miyamoto RT, Linthicum FH Jr, Lubianca Neto JF, Hudspeth AJ, Seidman CE, Morton CC, Seidman JG. : Nature Genet 1998 ; **20** : 299-303.

4) Verhagen WI, Huygen PL, Joosten EM. : Arch Neurol 1988 ; **45** : 766-8.

5) Khetarpal U, Schuknecht HF, Gacek RR, Holmes LG. : Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991 ; **117** : 1032-1042.

6) Verhagen WI, Huygen PL, Bles W. : Acta Otolaryngol 1992 ; **112** : 899-906.

7) Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB Jr, Eavey RD, McKenna M, Rosenbaum

S, Khetarpal U, Halpin C, Merchant SN, Duyk GM, MacRae C, Seidman CE, Seidman JG. : Hum Mol Genet 1996 ; **5** : 1047-50.
8) de Kok YJ, Bom SJ, Brunt TM, Kemperman MH, van Beusekom E, van der Velde-Visser SD, Robertson NG, Morton CC, Huygen PL, Verhagen WI, Brunner HG, Cremers CW, Cremers FP. : Hum Mol Genet 1999 ; **8** : 361-6.
9) Khetarpal U. : Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993 ; **119** : 106-108.
10) Khetarpal U. : Laryngoscope **110** : 1379-1384, 2000.

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

知的財産権の出願、登録状況

なし

3. その他

なし