

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

内耳エネルギー不全の病態解析に基づいた突発性難聴の新規治療法開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松永 達雄

平成19（2007）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
内耳エネルギー不全の病態解析に基づいた突発性難聴の新規治療法開発.....1	
松永 達雄	
II. 分担研究報告	
1. 蝸牛線維細胞の発生分化の解明.....7	
務台 英樹、藤井 正人、松永 達雄	
2. 蝸牛小胞体ストレス誘導による聴覚障害の病態の解明.....10	
藤波 義明、藤井 正人、松永 達雄	
3. 内耳エネルギー不全に続発する蝸牛外側壁の炎症反応・免疫反応の検討.....14	
藤岡 正人、松永 達雄、小川 郁	
4. 蝸牛感覚上皮細胞の再生メカニズムの解明.....20	
務台 英樹、藤井 正人、松永 達雄	
5. 急性内耳エネルギー不全におけるカスパーゼの役割と平衡障害の検討.....22	
水足 邦雄、松永 達雄、小川 郁	
6. 内耳エネルギー不全モデルに対するアポトーシス阻害剤の内耳保護効果の検討....25	
瀧口 洋一郎、小川 郁、松永 達雄	
7. 蝸牛線維細胞と骨髄間葉系幹細胞の相互作用の解明.....29	
孫 廣煒、幸池 浩子、藤井 正人、松永 達雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....34	
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....35	

内耳エネルギー不全の病態解析に基づいた突発性難聴の新規治療法開発

主任研究者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター  
臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

突発性難聴の聴覚・平衡覚障害の病態を分子レベルから解明し、新規治療法を開発することを目的として、内耳急性エネルギー不全の動物モデルを用いて研究を行った。この結果、1) 蝸牛線維細胞の発生・分化の様式を解明し、2) 蝸牛小胞体ストレス誘導による聴覚障害の病態を解明し、3) 内耳エネルギー不全に続発する蝸牛外側壁の炎症反応・免疫反応を解明し、4) 蝸牛感覚上皮細胞の発生、再生に関係する可能性がある分子を同定し、5) 急性内耳エネルギー不全におけるカスパーゼの役割と平衡障害の病態を解明し、6) 内耳エネルギー不全モデルに対するアポトーシス阻害剤の治療効果を確認し、7) 蝸牛線維細胞と骨髄間葉系幹細胞の相互作用を解明した。以上の成果は、突発性難聴の病態解明と新規治療開発に役立つと考えられた。

分担研究者 藤井 正人  
国立病院機構東京医療センター  
臨床研究センター聴覚平衡覚研究部長  
分担研究者 小川 郁  
慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室  
教授

皮細胞腫張から結果的に内耳循環障害を生じる可能性が指摘されている。突発性難聴の有効な治療法がない理由として、直接患者の内耳を採取できないこと、動物モデルがないため病態の研究ができなかった点が挙げられる。我々の施設では化学的に内耳エネルギーの欠乏を起こすことにより世界で初めて急性内耳エネルギー不全による突発性難聴モデル動物を開発した。本研究の目的は、この動物モデルを用いて、これまで不明であった急性内耳エネルギー不全の聴覚・平衡障害の病態を分子レベルから初めて解明し、その結果に基づいて有効な治療法を新規に開発することである。

A. 研究目的

突発性難聴は国内で年間約 25000 人発症する比較的発症頻度の高い難聴である。その病態は不明であり、高度の内耳性難聴が持続あるいは徐々に回復するが、発症後 1 ヶ月を過ぎて回復しない場合には治療法がない。また、平衡障害を合併する頻度も高い。原因は不明であるが、内耳循環障害とウイルス感染が多いと考えられており、ウイルス感染の場合でも蝸牛内毛細血管の内

B. 研究方法

平成 18 年度は急性内耳エネルギー不全の

動物モデルを用いて以下の研究を実施した。

- 1) 蝸牛線維細胞の発生分化の解明
- 2) 蝸牛小胞体ストレス誘導による聴覚障害の病態の解明
- 3) 内耳エネルギー不全に続発する蝸牛外側壁の炎症反応・免疫反応の検討
- 4) 蝸牛感覚上皮細胞の再生メカニズムの解明
- 5) 急性内耳エネルギー不全におけるカスパーゼの役割と平衡障害の検討
- 6) 内耳エネルギー不全モデルに対するアポトーシス阻害剤の内耳保護効果の検討
- 7) 蝸牛線維細胞と骨髄間葉系幹細胞の相互作用の解明。

方法の詳細は各分担研究報告に記した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、動物実験を行なうため、「ヘルシンキ宣言」、「大学等における動物実験について」、「国立病院機構東京医療センター動物実験指針」を遵守して進める。本研究は、事前に国立病院機構東京医療センター動物実験委員会の審査、承認による研究の適正性の確保を得て実施された。

#### C. 研究結果

研究方法の項目に対応して以下に記した。

- 1) 2型細胞分化様式を解析することにより、外側壁線維細胞の再生分化に重要な知見をもたらすことができると考え、細胞タイプ特異的のマーカーおよび細胞増殖マーカーBrdU 標識を用いて生後の外側壁細胞分化様式を解析した。まず2型線維細胞は聴覚発現期とほぼ同時期に分化することを明らかにした。また、1型と2型線維細胞は共通の前駆細胞を持ち、血球

系幹細胞などの関与なしに細胞分化がおきることを強く示唆した。

- 2) TM モデルラットの聴力閾値上昇は投与後2日から7日かけて比較的緩徐に進行した。その後の聴力閾値は各周波数ともほぼ変わらなかった。TM200ng 投与群については一部、引き続き30日後まで経過を観察したが回復は見られなかった。組織学的解析では、TM投与7日後では外有毛細胞の一部脱落を含む変性が見られた。投与量依存的に傷害部位が拡大し、TMによる小胞体ストレスに対する感受性に差が見られた。
- 3) DNAアレイを用いた全ゲノムレベルでの網羅的解析から、エネルギー不全蝸牛1日目では8倍以上の上昇を認めた74遺伝子中36遺伝子が、3日目では30遺伝子中18遺伝子が炎症関連分子であることが明らかになり、当モデルにおける炎症反応の強い関与が改めて示唆された。対照群と比べ発現上昇比が大きかった遺伝子には、炎症性サイトカインに加えて多数の炎症細胞惹起物質(chemoattractants)が含まれていた。各遺伝子の経時的検討では、炎症性サイトカインが数時間単位で上昇するのに対して、炎症細胞惹起物質の上昇は24時間後から数日間持続していた。傷害量との関連では、IL-6, MCP-1が恒久的聴力障害モデルにおいて有意に上昇していた。
- 4) 生後1日から14日齢にかけて蝸牛上皮中の前駆細胞数が著しく低下することから、これと同時期に遺伝子転写が負に調節される遺伝子Pou3f3/Brn1を蝸牛上皮中に見出した。同遺伝子欠損動物の詳細な解析より、本遺伝子は感覚細胞へ分化転換

能をもつ支持細胞特異的に発現していた。

- 5) カスパーゼ阻害薬の予防的投与は急性内耳エネルギー不全モデルにおいて蝸牛外側壁を組織学的に保護し、さらに低音から中音域の難聴をほぼ完全に予防することができた。また同モデルでは眼振により観察可能な平衡障害を呈し、その平衡障害の責任病巣は感覚上皮の感覚毛であることが明らかになった。
- 6) 内耳エネルギー不全による永久的聴力閾値上昇モデルに対しアポトーシス阻害剤 z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone(z-VAD-fmk)の治療的投与効果を検討した。8kHz では聴力改善効果が得られたが20kHz では改善効果をもとめなかった。病理組織学的には、蝸牛外側壁線維細胞の障害の顕著な改善をみとめたが基底回転基底側では障害が残存した。
- 7) 骨髄 MSC の Conditioned Medium (CM) の添加により、蝸牛線維細胞の増殖を促進し、蝸牛線維細胞の特異的マーカー (S-100、NKCC1) の発現を減少し、間葉系幹細胞のマーカー (Vimentin) 陽性細胞を増加した。一方、蝸牛線維細胞培養上清は、骨髄 MSC の Na-K-ATPase 陽性細胞への分化を促進したことが確認された。この結果により、骨髄 MSC と蝸牛線維細胞の間で分化と増殖への相互作用が示唆される。

#### D. 考察

研究方法の項目に対応して以下に記した。

- 1) 今回の研究で蝸牛線維細胞の発生分化機構が明らかとなり、この結果を基に 2 型線維細胞の再生分化の機構の解明が進むと考えられる。この結果、外側壁障害を

原因とする難聴疾患の新規治療法開発へと発展することが強く期待される。

- 2) TM による小胞体ストレスでの聴力閾値の上昇および聴力の固定は外有毛細胞の傷害に起因する事が示唆された。また、小胞体ストレスは様々な外因性刺激により引き起こされることから、内耳小胞体ストレスは急性内耳エネルギー不全を含む急性あるいは亜急性に発症し回復しない難聴の一部の病態に関与している可能性が推察される。
- 3) 内耳エネルギー不全時の炎症反応誘導に対する炎症性サイトカインや炎症細胞惹起物質の関与が強く示唆された。ステロイド療法による抗炎症が臨床的に有用である現状を鑑みると、これらの炎症細胞惹起物質はより副作用の小さい新規治療標的としての可能性を秘めている。今後、突発性難聴患者への臨床応用に向け、当モデルにおける炎症反応の寄与や役割に関する更なる検討が必要と考えられる。
- 4) Pou3f3/Brn1 は感覚細胞へ分化転換能をもつ支持細胞機能の再生との関連が示唆された。今後、本分子の有毛細胞の発生および再生における働きを解明することにより、内耳エネルギー不全で生じる感覚細胞の再生治療に応用できる可能性がある。
- 5) 内耳エネルギー不全の病態にカスパーゼが深く関与していることが解明され、今後の治療標的になりうると考えられた。急性感音難聴に随伴する平衡障害に関する研究はあまり報告されていないが、本研究により平衡障害は、蝸牛の障害とは異なるメカニズムで生じており、蝸牛における治療戦略とは異なる方法が必要で

あることが示唆された。

- 6) 永久的聴力閾値上昇の発現には蝸牛外側壁線維細胞の関与が大きいことが示唆された。カスパーゼ阻害薬の発症後の投与が聴覚回復効果を呈することから、本薬剤の突発性難聴に対する新たな治療法としての可能性が示された。
- 7) 骨髄 MSC 移植による蝸牛の機能的な回復は、骨髄 MSC から蝸牛線維細胞への分化による作用機序以外にも、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が考えられた。今後、本相互作用の分子機構を解明すること、および骨髄 MSC が分泌する線維細胞に働く因子を同定することすることで、より効果的な内耳への骨髄 MSC 移植治療あるいは新規薬剤による難聴治療の臨床応用が可能になると考えられる。

## E. 結論

研究方法の項目に対応して以下に記した。

- 1) 生後発達期の期蝸牛外側壁の詳細な免疫組織化学解析より、外側壁線維細胞は少なくとも 1・2 型について、共通の前駆細胞から分化したものであることを示唆する結果を得た。
- 2) TM 投与による内耳局所の小胞体ストレスで難聴が引き起こされ、小胞体ストレスが難聴の原因となり得ることが明らかとなった。
- 3) DNA アレイを用いた全ゲノムレベルでの検討から、エネルギー不全蝸牛における炎症反応の強い関与が示唆された。対照群と比べ発現上昇比が大きかった遺伝子には、炎症性サイトカインに加えて多数の炎症細胞惹起物質(chemoattractants)

が多数含まれていた。傷害量との関連では、IL-6, MCP-1 が恒久的聴力障害モデルで有意に上昇していた。

- 4) 発達期ラット蝸牛から、支持細胞および間葉系細胞に局限して発現し、発達経時的に発現が減少する転写因子 Pou3f3 を同定した。
- 5) カスパーゼ阻害薬の予防的投与にて急性内耳エネルギー不全モデルにおける低音から中音域の難聴をほぼ完全に予防することができた。また平衡障害の責任病巣は感覚上皮の感覚毛であることが明らかになった。
- 6) 内耳エネルギー不全による永久的聴力閾値上昇モデルに対しアポトーシス阻害剤の治療効果を示した。
- 7) 骨髄 MSC 培養上清は、蝸牛線維細胞の増殖を促進し、S-100、NKCC1 陽性細胞の率を減少し、Vimentin 陽性細胞を増加した。蝸牛線維細胞培養上清は、骨髄 MSC の Na-K-ATPase 陽性細胞への分化を促進した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1 論文発表

神崎仁、佐藤美奈子、松永達雄、熊埜御堂浩、神崎晶、小川郁 突発性難聴の可逆性について、Audiology Japan, 49 (6) 782-788, 2006

松永達雄 メニエール病と蝸牛線維細胞障害、Equilibrium Res., 65 (2) 129, 2006

## 2 学会発表

Tatsuo Matsunaga, Kazusaku Kamiya, Yoshiaki Fujinami, Masato Fujii, Hiroko Kouike, Guangwei Sun, Rie Komatsuzaki, Ritsuko Kusano, Repair of injured cochlear lateral wall by mesenchymal stem cell transplantation, The second Shanghai International Conference on Physiological Biophysics –audition and vision-, 2006年11月3-7日, Shanghai, China

Fujioka M, Fujinami Y, Hosoya M, Matsunaga T, Okano HJ, Ogawa K, Okano H., Inflammation and immune response in lateral wall of damaged cochleae, The second Shanghai International Conference on Physiological Biophysics –audition and vision-, 2006年11月3-7日, Shanghai, China

Mizutari K, Fujioka M, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T., Acute inner ear Energy Failure Causes Vestibular Hair Cell Damage and Balance Disorder, Thirtieth ARO Midwinter Meeting, 2006年2月10-15日, Denver, Colorado, USA

務台英樹、孫コウイ、藤井正人、松永達雄  
蝸牛外側壁線維細胞の生後発達に伴うタイプ特異的マーカーの出現、第51回日本聴覚医学学会総会、2006年9月28-29日、山形

藤岡正人、藤波義明、水足邦雄、岡本康秀、

岡野 James 洋尚、小川郁、岡野栄之、松永達雄、蝸牛外側壁において細胞内呼吸障害に続発する炎症反応・免疫応答の検討、第16回日本耳科学会総会学術講演会、2006年10月19-21日、青森

瀧口洋一郎、松永達雄、水足邦雄、藤波義明、藤井正人、小川郁、急性内耳エネルギー不全による永久的聴力閾値上昇に対するアポトーシス阻害剤の聴力改善効果、第16回日本耳科学会総会学術講演会、2006年10月19-21日、青森

藤波義明、水足邦雄、藤井正人、松永達雄  
内耳局所的な急性小胞体ストレスによる難聴動物モデルの開発、第16回日本耳科学会総会学術講演会、2006年10月19-21日、青森

孫コウイ、藤井正人、松永達雄、骨髄間葉系幹細胞の蝸牛線維細胞への影響に関する研究、第16回日本耳科学会総会学術講演会、2006年10月19-21日、青森

水足邦雄、藤岡正人、藤井正人、小川郁、松永達雄、急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞の微細構造変化、第16回日本耳科学会総会学術講演会、2006年10月19-21日、青森

務台英樹、藤井正人、松永達雄、転写因子 Pou3f3/Brn1 の内耳発達における発現解析、第16回日本耳科学会総会学術講演会、2006年10月19-21日、青森

松永達雄、内耳の再生治療、第2回感覚器

- |   |  |
|---|--|
| <p>シンポジウム、シンポジウム I 感覚器医学<br/>最近の進歩、2007 年 2 月 24 日、東京</p>   | <p>2 実用新案登録<br/>なし</p>   |
| <p>藤波義明、神谷和作、水足邦雄、中川進、<br/>長嶋玲子、小松崎理絵、草野律子、松永達<br/>雄、「急性内耳小胞体ストレスによる難聴<br/>モデル動物の開発と病態」日本薬学会 第<br/>127 年会、2007 年 3 月 28-30 日、富山</p> | <p>3 その他<br/>特許出願中（国際特許）：1 件<br/>IL-6 アンタゴニストを有効成分として<br/>含有する内耳障害治療剤<br/>PCT/JP2005/006202<br/>2005 年（H17 年）3 月 24 日<br/>発明者：藤岡正人、他 4 名<br/>権利者：慶応大学・中外製薬</p> |
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許取得  
なし



蝸牛線維細胞の発生分化の解明

研究協力者	務台英樹	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員 長寿科学振興財団リサーチレジデント
研究分担者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚平衡覚研究部長
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

当研究室において確立されたミトコンドリア毒 3NP 投与による急性難聴モデルの病態解析より、蝸牛外側壁に存在する 2 型線維細胞の傷害が、内耳エネルギー不全難聴の主要な原因と判明している。2 型細胞分化様式を解析することにより、外側壁線維細胞の再生分化に重要な知見をもたらすことができると考え、細胞タイプ特異的マーカーおよび細胞増殖マーカー BrdU 標識を用いて生後の外側壁細胞分化様式を解析した。まず 2 型線維細胞は聴覚発現期とほぼ同時期に分化することを明らかにした。また、1 型と 2 型線維細胞は共通の前駆細胞を持ち、血球系幹細胞などの関与なしに細胞分化がおきることを強く示唆した。2 型線維細胞の速やかな再生分化の機構の解明が、外側壁障害を原因とする難聴疾患の新規治療法開発へと発展することが強く期待される。

A. 研究目的

本研究は、急性内耳エネルギー不全突発性難聴動物モデルにおける蝸牛外側壁再生の分子機構の解明を目的とする。

当研究室では 3NP 難聴モデルを用い、急性内耳エネルギー不全刺激が外側壁線維細胞のアポトーシスを引き起こすこと、主要な傷害は 2 型線維細胞にみられること、またエネルギー不全刺激により、アポトーシスとともに細胞増殖が活性化されること、さらに本細胞の再生に伴って聴覚の回復がおこることも示してきた。本研究は、3NP 難聴モデ

ルで主に障害される 2 型線維細胞の生後分化様式を詳細に解析することにより、本細胞の損傷部位における速やかな再生分化法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

外側壁線維細胞分化様式の解析：Wistar-Imamichi ラットを生後 4 % paraformaldehyde にて還流固定後脱灰およびパラフィン包埋し、切片を用いて組織免疫染色に供した。2 型線維細胞マーカーとして NaK-ATPase alpha および  $\beta 1$  を用い、1 型

線維細胞マーカーS100または1, 2, 4型マーカーCAIIと共染色した。各マーカーの生後発達にともなうタンパク質発現量変化をウェスタンブロットにて解析した。また、生後4(P4)–7またはP7–10に連続BrdU投与を行ない、P10、12、14における標識細胞の分布と変化について一定の条件により複数の切片を共染色し画像解析した。細胞数の計測にはImageJを用いた。以上を用い線維細胞の分化系列について考察した。

(倫理的面への配慮)

動物実験はヘルシンキ宣言、東京医療センター動物実験指針などを遵守し、動物愛護上の諸規定に十分配慮し行なった。

### C. 研究結果

蝸牛外側壁の線維細胞マーカーCAIIとS100は生後初期より発現がウェスタンブロットで検出されるが、免疫染色法ではP7より血管条境界領域で観察される。P10ではCAIIシグナルに大きな変化がないのに対し、S100シグナルは外側壁ほぼ全域へ広がっていた。P14では成熟個体と同様の分布となった。Na,K-ATPase $\alpha$ および $\beta$ 1サブユニットは、らせん靭帯でP14で初めて発現が見られた。BrdU標識細胞の分布にP10-14間における変動は有意差がみられず、組織内および組織間細胞移動や侵入の可能性は低いと考えられた(図1参照)。また、P10外側壁線維細胞の初代培養を行なったところ、初代培養一週間後にS100またはATPase $\alpha$ 陽性の細胞が観察された。

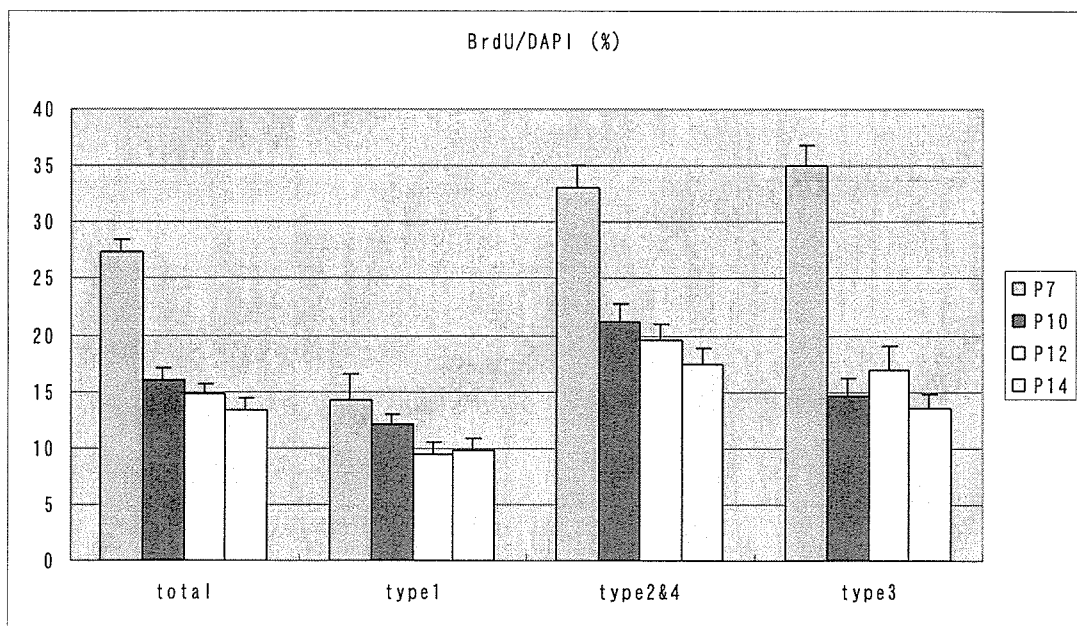


図1 BrdU標識細胞の、蝸牛外側壁各領域における頻度と変化(P7-14)。BrdUはP4-7ラット腹腔中に投与した。P7-10間でBrdUの割合が減少するのは細胞分裂によるものと考えられる。細胞タイプ別マーカーの発現するP10-14間に標識細胞の割合には、どの領域でも見かけ上の有意な変化はなく、細胞が外側壁内で激しく移動したり外部から細胞が侵入して特定の細胞を形成するのではなく、各領域の細胞が各々の細胞に分化することを支持する結果である。

#### D. 考察

蝸牛外側壁線維細胞は大別して 5 種類が存在するが、それらの生後発達における分化様式は現時点でまったく不明である。本結果は、生後聴覚発現にともない細胞分化が急速に更新する時期を標的とし、標識細胞の分布を経時的に観察することで、1・2 型線維細胞が共通の前駆細胞が P10 の時点でらせん靭帯内に存在し、両者へと分化することを示唆しており、例えば 3NP 難聴モデルに前駆細胞に分化させた幹細胞を移植することにより、2 型線維細胞の速やかな分化と効果的な外側壁機能の再生が可能になると考えられる。現在投稿論文を執筆中である。

#### E. 結論

今回、生後発達期の期蝸牛外側壁の詳細な免疫組織化学解析より、外側壁線維細胞は少なくとも 1・2 型について、共通の前駆細胞から分化したものであることを示唆する結果を得た。2 型線維細胞の増殖分化機構を解明することにより、効果的かつ迅速な外側壁

再生法が開発され、外側壁傷害性難聴の治療法へとつながると期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

なし（現在 2 報執筆中）

##### 2 学会発表

務台英樹、孫コウイ、藤井正人、松永達雄：  
蝸牛外側壁線維細胞の生後発達に伴うタイプ特異的マーカーの出現、第 51 回聴覚医学学会総会

務台英樹、藤井正人、松永達雄：転写因子 Pou3f3/Brn1 の内耳発達における発現解析、第 16 回日本耳科学学会総会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

蝸牛小胞体ストレス誘導による聴覚障害の病態の解明

研究協力者	藤波義明	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚平衡覚研究部長
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

小胞体ストレスは細胞死に関わる一般的なストレスの1つであり、アルツハイマー病やパーキンソン病、脳虚血などの虚血性疾患に関与しているとして解明が進んでいる。また、*wfs1* 遺伝子変異を原因とする低音障害型感音難聴（DFNA6/14/38）と Wolfram 症候群は小胞体ストレスが関連する難聴として報告されている。しかし、内耳で生じる小胞体ストレスが引き起こす感音難聴とその詳細な病態についてはほとんど明らかにされていない。内耳局所に N 型糖鎖修飾阻害剤 Tunicamycin（TM）を投与し、難聴を示すモデル動物を作成した。この難聴モデル動物を用いて TM 投与による急性内耳小胞体ストレス難聴の特性と組織傷害について検討した。

TM を 6-8 週齢の雄性 SD ラットの水平あるいは後半規管から投与した。ABR（聴性脳幹反応）により聴力閾値を経時的に測定した。蝸牛を還流固定・脱灰後、パラフィン切片とし、HE 染色により各部位の組織学的観察を行った。

TM モデルラットの聴力閾値上昇は投与後 2 日から 7 日かけて比較的緩徐に進行した。その後の聴力閾値は各周波数ともほぼ変わらなかった。TM200ng 投与群については一部、引き続き 30 日後まで経過を観察したが回復は見られなかった。組織学的解析では、TM 投与 7 日後では外有毛細胞の一部脱落を含む変性が見られた。投与量依存的に傷害部位が拡大し、TM による小胞体ストレスに対する感受性に差が見られた。以上の結果より、TM による小胞体ストレスでの聴力閾値の上昇および聴力の固定は外有毛細胞の傷害に起因する事が示唆された。また、小胞体ストレスは様々な外因性刺激により引き起こされることから、内耳小胞体ストレスは急性あるいは亜急性に発症し回復しない難聴の一部の病態に関与している可能性が推察される。

- A. 研究目的  
これまでの研究成果から 3-nitropropionic acid (3-NP) を用いた急性内耳エネルギー不全モデルでも蝸牛外側壁の細胞死に ER

ストレスが関与していることが示唆された。そこで、内耳では報告されておらず、また細胞死に関わる一般的なストレスとして小胞体 (ER) ストレスに着目した。ER ストレスはアルツハイマー病やパーキンソン病、脳虚血などの虚血性疾患に関与しているとして解明が進んでいる。臨床でも ER ストレスが関与しているであろう難聴も明らかになりつつある。低音障害型感音難聴 (DFNA6/14/38) は *wfs1* の遺伝子変異を原因としている。また同遺伝子の変異を原因とする Wolfram 症候群は若年性糖尿病や進行性両側性視神経萎縮、躁うつ病様精神症状を主徴とする疾患であり加齢と共に高音障害型感音難聴、尿崩症など多彩な症状を呈する。上記疾患のように ER ストレスの関与が明らかとなりつつある難聴もあるが、感音難聴にはまだまだ不明な点も多い。より詳細に難聴に対する ER ストレスの影響について解析するため、N 型糖鎖修飾阻害により ER ストレスを惹起する Tunicamycin (TM) を内耳局所に投与し難聴モデル動物を作成する事に成功した。TM 難聴モデル動物の聴力閾値の時間的推移や投与量依存的な傷害部位の拡大の比較により内耳細胞の脆弱性や難聴への関わりを解析し、小胞体ストレスの感音難聴および内耳傷害への関与を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

6-8 週齢 SD ラット雄をイソフルラン吸入麻酔により麻酔し、後・水平半規管に穴をあけて、そのいずれかより TM を還流的に投与した。TM 投与は流速 0.30 mL/hr を 8 分間、総量 40  $\mu$ L を投与し、これを TM モデルラットとした。作成した TM モデルラットにつ

いて、8、20、40 kHz の聴力閾値を TM 投与前および投与後経時的に ABR (聴性脳幹反応) により測定した。

TM モデルラットを投与 7 日後に 4 % パラホルムアルデヒドで還流固定を行い、蝸牛を採取した。一晚同溶液で後固定した後、約 2 週間 EDTA 溶液により脱灰し、パラフィンに包埋した。これらを薄切して切片とし、Hematoxylin-Eosin 染色を行い、形態観察を行った。

## (倫理面への配慮)

本研究では動物実験を行うにあたり、「大学等における動物実験について (昭和 62 年 5 月 25 日 文部省国際學術局長通知 文学情第 141 号)」、および「国立病院機構 東京医療センター動物実験指針」を遵守して研究を行った。

## C. 研究結果

高濃度の TM 投与 (20,000ng、2,000ng) では数日をかけて全周波数の聴力が徐々に低下した。どの周波数も 3 日後にはほぼスケールアウトにまで達した。TM200 ng 投与では低周波数になるほど聴力閾値が緩やかに上昇し、数日から一週間ほどかけて中程度から高度難聴に達した。どの投与量のモデルにおいても、投与 7 日後で全く回復していなかった (図 1)。

組織学的な観察から TM 投与量の寡多により内耳の障害範囲が異なることが明らかとなった。TM 投与 7 日後での観察では、TM20,000ng 投与は外側壁、外有毛細胞、らせん神経節が傷害されており、TM2,000ng では外側壁、外有毛細胞が傷害されていた。TM200ng 投与は外有毛細胞のみが傷害され

ており、それは 28 日後の組織でも変わらなかった。

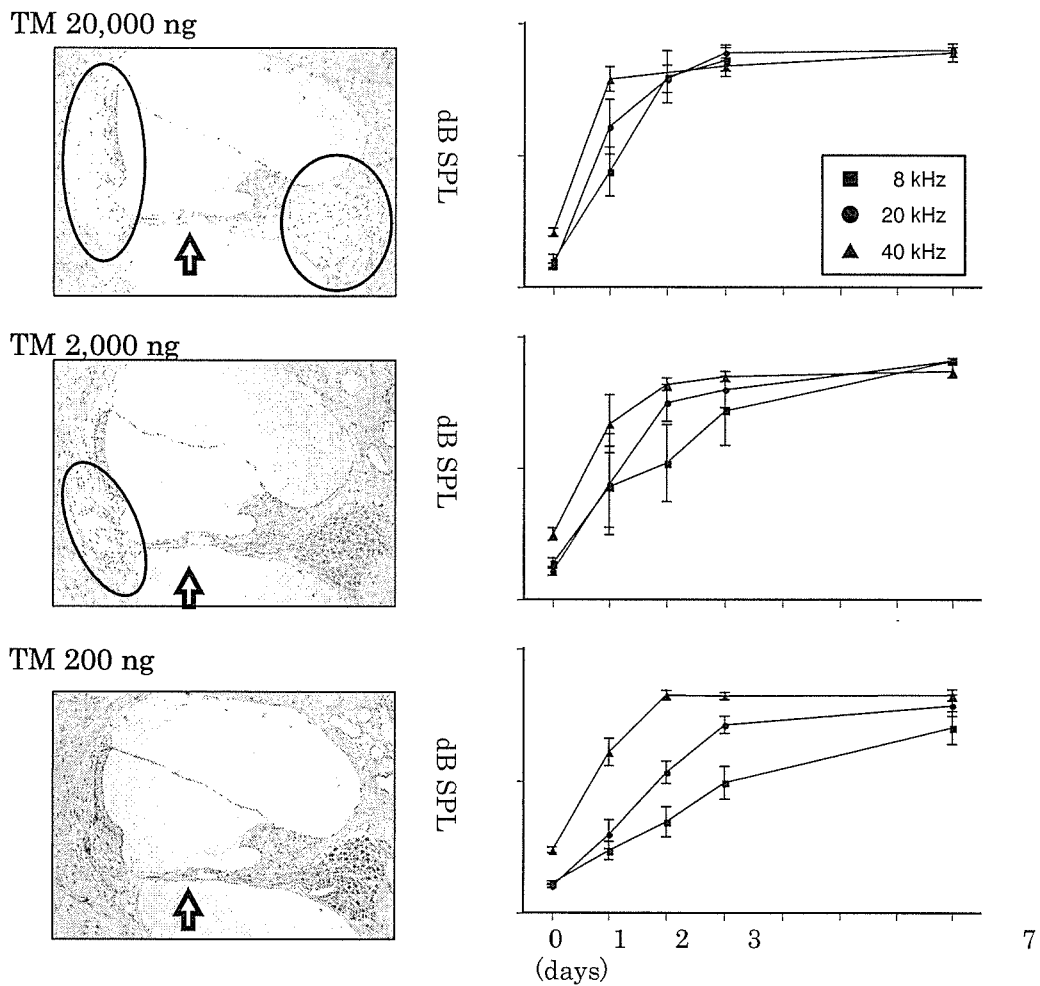


図 1

#### D. 考察

3-NP 投与による酸化ストレスと TM 投与による小胞体ストレスでは感受性の違いから最小単位での傷害部位が異なり、聴力閾値の推移も異なった。3-NP 投与モデルではエネルギー不全のため急激な聴力閾値の上昇が認められた。しかし、TM の投与では急激に細胞機能が停止、細胞死に至るのではなく、内耳細胞で折りたたみ不良タンパク質の蓄

積が起こり、徐々に細胞機能が低下していたため、数日かけての聴力閾値上昇に至るのであろう事が明らかとなった。また、細胞によって TM による小胞体ストレスに対する感受性が異なることが判明した。TM 感受性は外有毛細胞が最も高く、外側壁、神経節の順に感受性が高かった (図 2)。

## 小胞体ストレス

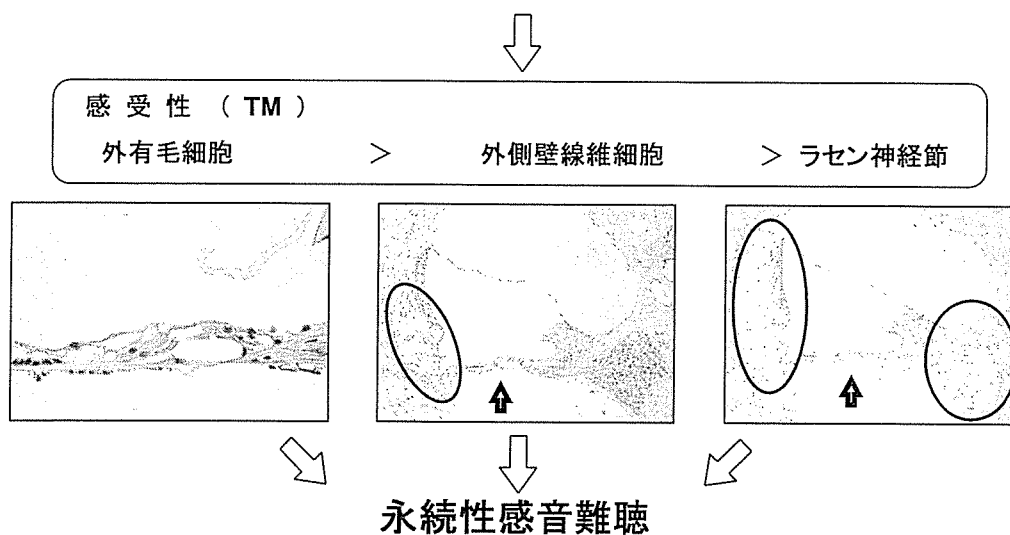


図 2

### E. 結論

TM 投与による内耳局所の小胞体ストレスで難聴が引き起こされ、小胞体ストレスが難聴の原因となり得ることが明らかとなった。本研究結果より小胞体ストレスのコントロールが感音難聴の治療ターゲットとなり得る可能性がある。現在行われている治療では奏効しない感音難聴が多く存在し、このような原因不明とされる感音難聴の病態に小胞体ストレスが関与している可能性があるとして新たな光明を示すことができた。本研究成果に基づいた感音難聴の新規治療法開発あるいは新規予防法の開発に多大なる貢献をもたらすと考えられ、難聴患者の QOL 向上に貢献するものとする。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1 論文発表

なし

### 2 学会発表

藤波義明、水足邦雄、藤井正人、松永達雄、「内耳局所的な急性小胞体ストレスによる難聴動物モデルの開発」第 16 回日本耳科学会総会、青森、2006 年 10 月 19-21 日

藤波義明、神谷和作、水足邦雄、中川進、長嶋玲子、小松崎理絵、草野律子、松永達雄、「急性内耳小胞体ストレスによる難聴モデル動物の開発と病態」日本薬学会 第 127 年会、富山、2007 年 3 月 28-30 日

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

内耳エネルギー不全に続発する蝸牛外側壁の炎症反応・免疫反応の検討

研究協力者	藤岡正人	慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長
分担研究者	小川 郁	慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

研究要旨

内耳エネルギー不全モデル蝸牛における炎症反応について昨年度に引き続き検討した。DNA アレイを用いた全ゲノムレベルでの網羅的解析から、エネルギー不全蝸牛 1 日目では 8 倍以上の上昇を認めた 74 遺伝子中 36 遺伝子が、3 日目では 30 遺伝子中 18 遺伝子が炎症関連分子であることが明らかになり、当モデルにおける炎症反応の強い関与が改めて示唆された。対照群と比べ発現上昇比が大きかった遺伝子には、炎症性サイトカインに加えて多数の炎症細胞惹起物質(chemoattractants)が含まれていた。各遺伝子の経時的検討では、炎症性サイトカインが数時間単位で上昇するのに対して、炎症細胞惹起物質の上昇は 24 時間後から数日間持続していた。傷害量との関連では、IL-6, MCP-1 が恒久的聴力障害モデルにおいて有意に上昇していた。

以上の結果から、内耳エネルギー不全時の炎症反応誘導に対する炎症性サイトカインや炎症細胞惹起物質の関与が強く示唆された。ステロイド療法による抗炎症が臨床的に有用である現状を鑑みると、これらの炎症細胞惹起物質はより副作用の小さい新規治療標的としての可能性を秘めている。今後、突発性難聴患者への臨床応用に向け、当モデルにおける炎症反応の寄与や役割に関する更なる検討が必要と考えられる。

A. 研究目的

炎症反応は臓器を超えて普遍的に存在する生体防御に必須の生理反応である。しかし、過度の炎症は逆に生体にとって有害な場合が多く、種々の炎症性疾患の原因となり得る。炎症反応を惹起する臓器傷害は多岐にわたり、他臓器では免疫疾患や虚血から外傷にまで及ぶが、蝸牛傷害における炎症反応の関与はいまだ未検討の事項が多い。しかしながらここ数年来の研究から、蝸牛傷害時には外側

壁、らせん隆起を中心に炎症反応が引き起こされることが多数のモデルで報告されるようになってきた。また並行して、非傷害時における炎症細胞・免疫担当細胞の蝸牛内における動態も徐々に明らかにされてきており、これらの細胞は骨髄から 1-2 週間の単位で供給される、非増殖型の細胞群であることが報告されてきている。他方、一般診療における突発性難聴の治療には複数の薬剤が用いられるが、なかでもステロイドホルモンを用



いた治療は広く受け入れられており、局所投与で著しく効果を上げるとの報告もある。このことから考えて、突発性難聴の病態生理にはその背景に何らかの炎症反応を含む免疫学的機序が含まれている可能性が推察されるが、基礎実験を含め、検討は未だ十分とは言いがたい。他方、我々の用いているミトコンドリア複合体の非可逆的阻害剤、3-nitro-propionic acid (3NP)を局所投与することで作成される内耳エネルギー不全モデルは、その症状推移から突発性難聴の動物モデルになりうると考えられている。興味深いことに過去の検討からこのモデルでの蝸牛障害は外側壁から生じることが明らかにされている(Okamoto, 2005)。過去の蝸牛内炎症に関する報告が外側壁に多いことと考えあわせ、当モデルにおける炎症反応・局所免疫応答の病態解析は、突発性難聴の新規治療法を探索するひとつの大きなブレイクスルーとなる可能性がある。

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

## B. 研究方法

### 1. 内耳エネルギー不全モデル作成と外側壁からの cDNA 合成

既報の手技により、系正円窓的に 3NP300mM/ 500mM/ 生理食塩水を投与し、モデルを作成した。その後、経時的に外側壁 RNA を抽出して、oligo-dT primer で cDNA 系列を作成した。

### 2. DNA マイクロアレイを用いた発現解析

このうちで 300mM 投与後 1 日目、3 日目に絞ってマイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的解析を行った。(rat whole genome gene array: Affimetrix 社)

### 3. 定量 RT-PCR を用いた炎症関連分子の経時的発現量の変化に関する検討

1)で上昇が示唆された炎症関連分子のうち、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL-2(MCP-1), CCL-4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL-5 (RANTES)について、全てのタイムポイントで定量 RT-PCR 法を用いて炎症関連遺伝子の発現量を定量した。

### (倫理的面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. DNA マイクロアレイ

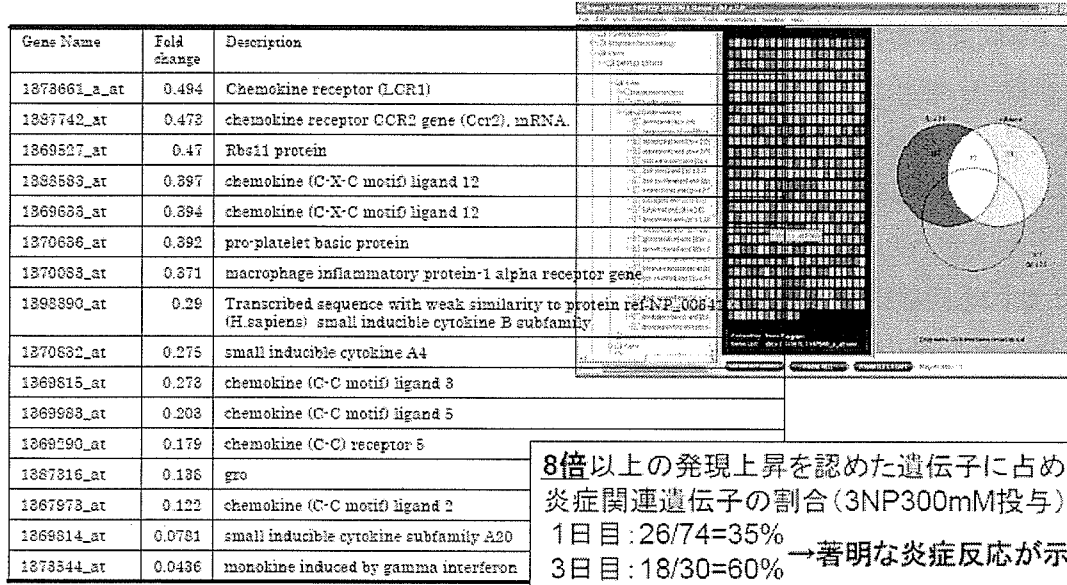
3NP300mM 投与によって、対照群と比し 8 倍以上の転写上昇を示した遺伝子は全体で、投与 1 日目で 74 個、3 日目で 30 個だった。このうち炎症関連遺伝子は 1 日目が 26 個、3 日目が 18 個だった。

### 2. 定量 RT-PCR

炎症性サイトカインが数時間単位で上昇するのに対して、炎症細胞惹起物質の上昇は 24 時間後から数日間持続していた。傷害量との関連では、IL-6, MCP-1 が恒久的聴力障害モデルにおいて有意に上昇していた。

結果①:

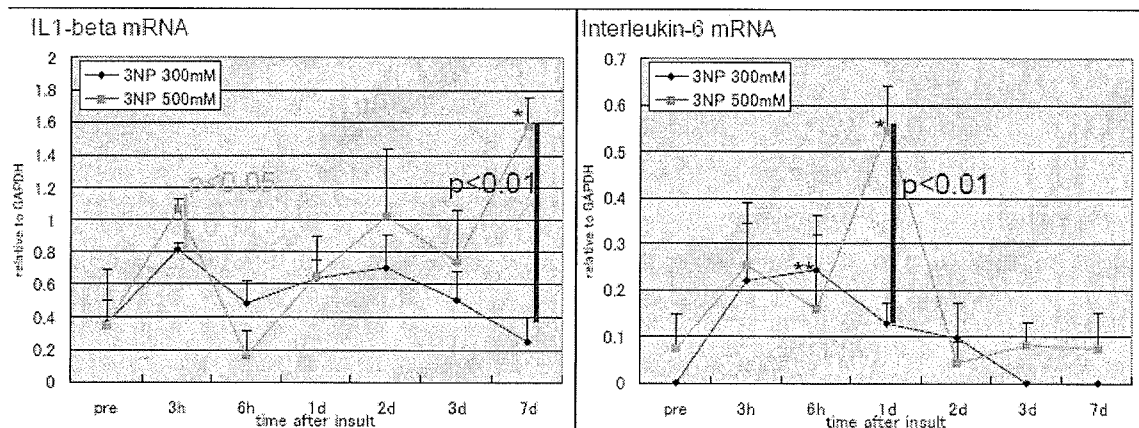
細胞内呼吸障害細胞内呼吸障害により、  
蝸牛外側壁で炎症反応関連遺伝子の発現が著明に誘導される



結果②:

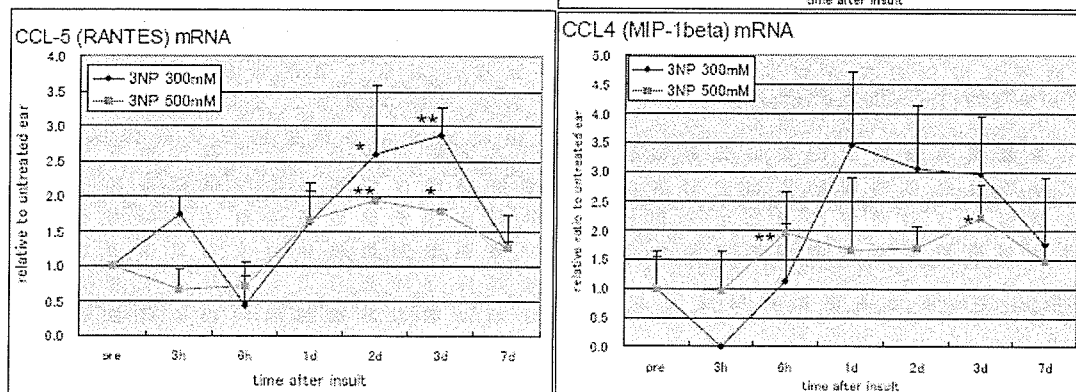
細胞内呼吸障害により、蝸牛外側壁で複数種の  
炎症性サイトカイン産生が誘導される

\* : p<0.05 compared to untreated ear  
 \*\* : p<0.01 compared to untreated ear



結果③:  
細胞内呼吸障害により、  
蝸牛外側壁で複数種の  
ケモカイン産生が誘導される

\* : p<0.05 compared to untreated ear  
\*\* : p<0.01 compared to untreated ear



#### D. 考察

昨年までに我々は、エネルギー不全蝸牛の急性期における炎症性サイトカインの局所発現誘導と、傷害 24 時間後以降の外側壁らせん靭帯および血管条における活性型炎症細胞の浸潤を報告してきた。今回我々は、DNA アレイを用いて全ゲノムレベルで検討することで、多数の炎症関連分子を同時に検出することに成功した。エネルギー不全蝸牛 1 日目では 8 倍以上の上昇を認めた 74 遺伝子中 36 遺伝子が、3 日目では 30 遺伝子中 18 遺伝子が炎症関連分子であることが明らかになり、当モデルにおける炎症反応の強い関与が示唆された。

対照群と比べ発現上昇比が大きかった遺伝子に炎症性サイトカインに加えて多数の炎症細胞惹起物質 (chemoattractants) が多数含まれていたこと、また、炎症性サイトカインが数時間単位で上昇するのに対し、炎症

細胞惹起物質の上昇は 24 時間後から数日間持続していることは、局所傷害に続発する炎症細胞惹起とその活性化という観点から極めて興味深い。蝸牛への免疫担当細胞の動員には 1-2 週間を要するとされる過去の報告から考えると、局所への炎症細胞惹起にこれらの炎症細胞惹起物質が関与している可能性が強く示唆される。病態生理への関与について、今後更なる検討を重ねていきたい。傷害量との関連では、IL-6, MCP-1 が恒久的聴力障害モデルにおいて有意に上昇していた。前述のよう我々は傷害 1 日後以降の外側壁らせん靭帯および血管条における炎症細胞浸潤することを報告したが、これらは形態上および細胞表面マーカー上、活性型を呈していた。活性型炎症細胞の蝸牛内における役割は未だ明らかではないが、中枢神経系を含めた他臓器の傷害モデルにおける報告では、細胞障害に対する保護的役割と局所の傷害

憎悪・リモデリングとの相反する役割が報告されており、局所の微小環境におけるさまざまなシグナルの伝達がこれらの二律背反する機能のうちどちらに向かうかを運命づけていると考えられる。IL-6, MCP-1 はともに細胞間情報伝達分子で、レセプターを持つ細胞に対し、前者は JAK-STAT 経路や PI3 キナーゼを、後者は G タンパクを介してさまざまな生理学的機能を発揮する。その意味でもこれらの分子が恒久的聴力障害モデルにおいて有意に上昇していたことは大変興味深い。もしかすると分子は内耳エネルギー不全における活性型炎症細胞の機能に何らかの影響を与えているかもしれない。とくに恒久的聴力障害で有意な発現上昇をしていたことから、これらの分子の傷害憎悪因子としての可能性示唆される。今後、治療標的としての可能性について更なる検討を進めたい。

#### E. 結論

1. DNA アレイを用いた全ゲノムレベルでの検討から、エネルギー不全蝸牛における炎症反応の強い関与が示唆された。
2. 対照群と比べ発現上昇比が大きかった遺伝子には、炎症性サイトカインに加えて多数の炎症細胞惹起物質 (chemoattractants) が多数含まれていた。
3. 炎症性サイトカインが数時間単位で上昇するのに対し、炎症細胞惹起物質の上昇は 24 時間後から数日間持続していることが明らかになった。
4. 傷害量との関連では、IL-6, MCP-1 が恒久的聴力障害モデルで有意に上昇していた。
5. 以上の結果は、内耳エネルギー不全における強い炎症反応の誘導を意味すると同

時に、活性型炎症細胞による細胞傷害を誘導する可能性を示唆する。新規治療開発の観点から、今後更なる検討が望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 蝸牛外側壁において細胞内呼吸障害に続発する炎症反応・免疫応答の検討

藤岡正人、藤波義明、水足邦雄、岡本康秀、岡野 James 洋尚、小川郁、岡野栄之、松永達雄、第 16 回 耳科学会 2006 年 10 月青森

- 2) Inflammation and immune response in lateral wall of damaged cochleae

Fujioka M, Fujinami Y, Hosoya M, Matsunaga T, Okano HJ, Ogawa K, Okano H.

The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics- Audition and Vision, Nov. 5, 2006

#### 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

特許出願中 (国際特許) : 1 件

IL-6 アンタゴニストを有効成分として