

本邦におけるアッシャー症候群タイプ1患者の遺伝子解析

分担研究者：水田邦博（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：中西 啓（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：瀧澤義徳（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：大坪正史（浜松医科大学光量子医学研究センター）

共同研究者：蓑島伸生（浜松医科大学光量子医学研究センター）

共同研究者：堀田喜裕（浜松医科大学眼科）

研究要旨

アッシャー症候群の早期診断に有効な遺伝子診断システムの構築を目指し、臨床症状よりタイプ1と診断した患者5人を対象として、*MYO7A*、*CDH23*の遺伝子解析を行った。5人中4人の患者において、*MYO7A*に3種、*CDH23*に2種の疾患原因と考えられる変異を同定した。その中で、*MYO7A*の1種(p. Ala771Ser)、*CDH23*の1種(p. Tyr1942SerfsX23)は新規であった。p. Tyr1942SerfsX23は、*CDH23*のエキソン44-46を含む5078塩基が欠失する巨大欠失変異であった。

研究目的

アッシャー症候群(USH)は、感音難聴に網膜色素変性症を合併する常染色体劣性遺伝性疾患である。現在までに、難聴に視覚障害を合併する疾患は約40種類知られているが、本疾患は其中で全患者数の約半数(5/10万人)を占める最多の疾患である。

USHは、難聴の程度と前庭機能障害の有無などの臨床症状により、タイプ1-3の3つのタイプに分類され、それぞれのタイプにより難聴に対する治療法が異なっている。タイプ1は、難聴が高度であるため言語獲得には人工内耳埋込術が必要であるのに対し、タイプ2、3では、補聴器装用で十分であることが多い。難聴を主訴に医療機関を受診した際に、USHの早期診断およびタイプ分類が可能であれば、視覚・聴覚に対して効果的な治療が可能

になると思われる。そこで、USHの早期診断に有効な遺伝子診断システムの構築を目指し、本邦患者における高頻度変異の探索と変異スペクトラムの検討を行った。

研究方法

臨床症状よりアッシャー症候群タイプ1と診断した患者5人を対象として、タイプ1B、1Dの原因遺伝子である*MYO7A*、*CDH23*の遺伝子解析を行った。遺伝子解析は、白血球より抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、原因遺伝子の全エクソン(*MYO7A*:エクソン1-49、*CDH23*:エクソン1-69)をPCRダイレクトシーケンス法にて解析した。現在までに報告されていない塩基変化については、日本人正常コントロール135人の検体を用いて、当該塩基変化の存否の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本遺伝子解析研究は、浜松医科大学「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」および「医の倫理委員会」にて審査・承認されている。

本研究に参加する患者には、文書を用いて十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得た後、検体として血

液を採取した。解析を開始する前に検体は全て連結可能匿名化し、匿名化した符号と患者を結びつける対応表は個人情報分担管理者を設け別に保管した。遺伝子解析は全て匿名化した符号を用いて行った。

研究結果

臨床症状よりアッシャー症候群タイプ1と診断した5人の患者を対象として、*MYO7A*、*CDH23*の遺伝子解析を行い、4人の患者において5種の疾患原因と考えられる変異を同定した(表1)。5種の変異の内訳は、ナンセンス変異2種、欠失変異1種、ミスセンス変異2種であり、全ての変異は日本人の正常コントロールにおいて1例にも認められなかった(表2)。*MYO7A*の1種(p. Ala771Ser)、*CDH23*の1種(p. Tyr1942SerfsX23)は現在までに報告されていない新規の変異であった。

p. Tyr1942SerfsX23は、エキソン44～46を含む5078塩基が欠失する巨大欠失変異であった。

遺伝子変異を同定することができた4人の患者は、2～3歳(平均±標準偏差: 2.3±0.5歳)で難聴と診断され、3～27歳(13.0±10.1歳)で網膜色素変性症と診断されていた。

オージオグラムは、4人とも重度感音難聴を示していた。4人全員とも歩行開始は1歳6カ月以降であり、カロリックテスト(4℃、5ml)で無反応であった。

表1 *MYO7A*、*CDH23*に遺伝子変異を同定することができた4人の患者における変異の種類と臨床症状

患者	原因遺伝子	疾患原因変異		年齢 ¹			難聴の程度	カロリックテスト
		アリル1	アリル2	歩行	難聴	色変		
ホモ接合体								
C517	<i>CDH23</i>	p.Tyr1942SerfsX23	p.Tyr1942SerfsX23	22	2	3	重度	半規管麻痺
C720	<i>CDH23</i>	p.Arg2107X	p.Arg2107X	24	2	12	重度	半規管麻痺
複合ヘテロ接合体								
C312	<i>MYO7A</i>	p.Arg150X	p.Arg1883Gln	24	2	10	重度	半規管麻痺
ヘテロ接合体 ²								
C103	<i>MYO7A</i>	p.Ala771Ser	Unknown	18	3	27	重度	半規管麻痺

¹歩行を開始した年齢(月)、難聴と診断された年齢(年)、色変(網膜色素変性症)と診断された年齢(年)を示す。

²C103では、家族の検体を用いて変異と発症の対応解析を行ったが、片側アリル上にある変異しか同定できなかった。

表2 4人のアッシャー症候群タイプ1患者に同定した変異

原因遺伝子	ヌクレオチドの変化	産物蛋白質への影響	変異の種類	エキソン/イントロン番号	報告
CDH23	c.5821-?_6253+?del5078	p.Tyr1942SerfsX23	欠失変異	エキソン44-46	無
	c.6319C>T	p.Arg2107X	ナンセンス変異	エキソン47	有
MYO7A	c.448C>T	p.Arg150X	ナンセンス変異	エキソン5	有
	c.2311G>T	p.Ala771Ser	ミスセンス変異	エキソン20	無
	c.5648G>A	p.Arg1883Gln	ミスセンス変異	エキソン41	有

考察

USHは難聴の程度と前庭機能障害の有無などの臨床症状により、タイプ1～3に分類され、さらに原因遺伝子がマップまたはクローニングされたものはサブタイプに分類されている。現在までに、タイプ1B～1H、2A、2C、2D、3A、3Bの12のサブタイプが知られており、*MYO7A*(タイプ1Bの原因遺伝子)、*USH1C*(タイプ1C)、*CDH23*(タイプ1D)、*PCDH15*(タイプ1F)、*USH1G*(タイプ1G)、*USH2A*(タイプ2A)、*GPR98*(タイプ2C)、*DFNB31*(タイプ2D)、*CLRN1*(タイプ3A)の9種の原因遺伝子が同定されている。欧米におけるアッシャー症候群タイプ1患者の遺伝子解析では、約70～80%の患者が*MYO7A*または*CDH23*に遺伝子変異を持つことが報告されている。本邦患者でも、5人中4人(80%)において*MYO7A*または*CDH23*に遺伝子変異が同定されており、欧米人と同様にこの2種の遺伝子変異によってUSHを発症する患者が多いと思われる。

*CDH23*においては、エキソンが欠失するような巨大欠失変異の報告はなく、我々が同定したp.Tyr1942SerfsX23が初めてである。

タイプ1患者を対象とした*CDH23*遺伝子解析では、片側アレルのみに変異が同定されている症例が散見される。そのような症例では、我々が同定したような巨大欠失変異が見逃されている可能性がある。巨大欠失変異がヘテロ接合体で存在するときには、PCRダイレクトシーケンス法では同定が困難であるので、定量PCR法等をおこない評価する必要があると思われる。

結論

臨床症状よりアッシャー症候群タイプ1と診断した5人の患者を対象として、*MYO7A*、*CDH23*遺伝子解析を行い、4人の患者において5種の疾患原因変異を同定した。5種の疾患原因変異のうち、*MYO7A*の1種(p.Ala771Ser)、*CDH23*の1種(p.Tyr1942SerfsX23)は新規であった。p.Tyr1942SerfsX23は、*CDH23*のエキソン44～46を含む5078塩基が欠失する巨大欠失変異であった。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta Y, Minoshima S. Hair roots as an mRNA source for mutation analysis of Usher syndrome-causing genes. *J Hum Genet* 55:701-703, 2010.
- 2) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Takizawa Y, Hosono K, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Mutation analysis of the MYO7A and CDH23 genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. *J Hum Genet* 55:796-800, 2010.
- 3) 中西啓、岩崎聡、瀧澤義徳、橋本泰幸、水田邦博、峯田周幸. 非典型的臨床症状を示した *USH2A* 遺伝子変異例. *耳鼻臨床* 103:413-419, 2010.

2. 学会発表

- 1) 中西啓、大坪正史、岩崎聡、堀田喜裕、水田邦博、峯田周幸、蓑島伸生：本邦におけるアッシャー症候群患者の遺伝子変異解析：本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析. 第2回浜松医科学シンポジウム：2010, 12, 17

知的財産権の出願・登録情報

なし

分担研究者：中島 務 (名古屋大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：曾根三千彦 (名古屋大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：寺西正明 (名古屋大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：吉田忠雄 (名古屋大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：岩田知之 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

研究要旨

Slc26a4-null mutant mice における内耳の形態を μ -CT を用いて撮影し、内耳画像と内耳 HE 標本の比較検討を行った。また、甲状腺の形態と機能においてヨード欠損食の影響を評価した。 μ -CT は内耳形態の正確な評価が可能であり、今後の内耳障害の病態把握に有用と考えられた。また、甲状腺の形態と機能についてヨード欠損食の影響は、ホモ、ヘテロ、野生型間で差が認められなかった。

研究目的

ペンドレッド症候群は難聴、ペルオキシダーゼによるヨード有機化障害に伴う甲状腺機能低下、甲状腺腫を特徴とする疾患である。PDS 遺伝子とその原因遺伝子として報告されている。Slc26a4-null mutant mice は前庭障害を伴う高度難聴を認める疾患モデル動物であり、内耳の形態は前庭水管拡大が特徴的で、内リンパ水腫を伴う。また本マウスではヒトでの PDS 遺伝子異常で認められる甲状腺腫は認められない。Slc26a4-null mutant mice の内耳について μ -CT を用いた画像評価、さらにヨード欠損食を与え食餌による甲状腺の形態と機能の変化について検討を行った。

研究方法

Slc26a4 (ホモ、ヘテロ) マウスの内耳を採取し、脱灰前、脱灰後の標本を用いて内耳 μ -CT の撮影を行い、内耳 HE 標本と

の比較検討を行った。また、Slc26a4-null マウスホモ (Pds -/-)、ヘテロ (Pds +/-)、野生型 (Pds +/+) にヨード欠損食を与えた群とコントロール食(通常食)を与えた群に分け、それぞれの群で甲状腺機能、および甲状腺腫の有無を比較した。ヨード欠損食群のマウスには交配時より母体にヨード欠損食を与え、生後も 8 週間以上投与した。血清総 T3 (TT3) 値、総 T4 (TT4) 値を測定し、甲状腺腫は三次元再構築ソフトウェア (Zed View) を用いて病理切片を立体構築し、体積測定を行うことで評価した (図 1)。また、甲状腺組織の光学顕微鏡および透過電顕写真撮影を行い、組織学的変化についても検討を行った。

研究結果

Slc26a4 ヘテロマウスは難聴がなく、内耳は正常構造であり内耳形態は HE 標本と一致していた (図 2)。また、ライスネル膜の撮像も可能であった。Slc26a4 ホモマウ

スの内耳形態は正常構造とは大きく異なり、骨形成不全や内リンパ水腫また前庭水管の拡大を認めた (図 3)。前庭水管は正常に比し直径は約 6 倍に拡大していた。

(図 4)

ホモ、ヘテロ、野生型ともヨード欠損食群マウスは通常食群に比べ、TT3 値には変化を認めなかったが、TT4 値が減少していた (図 5)。甲状腺体積は、ヨード欠損食群と通常食群に有意差を認めなかった。しかしながら、組織学的所見では通常食群と比較して、ヨード欠損食群の甲状腺はコロイド領域が小さく上皮細胞の高さが上昇していた。

考察

μ -CT の使用により組織のスライス時の手技的なアーチファクトなしで内耳組織の詳細な観察やコンピュータ上で 3D 化も可能であり、ライスネル膜、内リンパ水腫、前庭水管の拡大所見を HE 組織標本と同様に認めた。しかしながら、 μ -CT は放射線被曝量の多いこと、撮影時間のかかることが問題点である。また、高解像度を得るためには組織切片を使用しなければならないことも問題点の一つとして挙げられる。

また、コントロール食群、ヨード欠損食群とも、同じ食餌群内の遺伝子型における甲状腺ホルモン・体積・組織像の差異は認めなかった。コントロール食群と比較した場合、ヨード欠損食群は遺伝子型に関係なく TT4 値の低下を認め、ペンドリンの機能異常があるホモでも、他の遺伝子型と同等に甲状腺機能が維持されていると考えられた。PDS 遺伝子の産物で

あるペンドリンは、陰イオンとヨードの輸送に関連しており、ペンドリン以外のヨード輸送機構により、効率的にヨードを取り込んでいる可能性が示唆された。甲状腺の組織学的変化について、ヒマラヤ地方などでみられる地方性甲状腺腫ではヨード欠乏が主な原因であり、肉眼的にも組織学的にも多様性があり、新生児から就学前の小児では、コロイド成分の少ないびまん性甲状腺腫となる。今回のヨード欠損食マウスでは甲状腺腫は認めなかったが、コロイド領域の減少や上皮細胞の変化を認め、ヨード欠損状態における適応現象と考えられた。ペンドレッド症候群においては今回の研究では遺伝子間の差異は認めず、ヨード欠乏のみでは甲状腺腫を発症しなかった。種の違いや他の環境因子、遺伝的要因により甲状腺腫が発現するものと考えられた。

結論

μ -CT は病理切片にみられるような手技的なアーチファクトなしで組織内の詳細な観察が可能であり、内リンパ水腫や内耳奇形などの観察に適している。今後の技術の向上によりより大きな組織や生体でも撮影可能となれば内耳形態の評価に役に立つ可能性がある。Slc26a4-null mutant mice において、ヨード欠損食の影響による機能変化や甲状腺腫脹は認めなかった。遺伝子間でも甲状腺組織に差異を認めず、ペンドレッド症候群の甲状腺腫脹の原因はヨード欠乏以外の関連因子が存在すると考えられた。

健康危惧情報

なし

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録情報

なし

In vivo イメージングを用いた、薬剤の内耳への到達のリアルタイム可視化の試み
—GFAP-Luc マウスを用いた、内耳神経への薬剤到達の可視化—

主任研究者：小川 郁	(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：藤岡 正人	(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：井上 泰宏	(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：齊藤 秀行	(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：渡部 高久	(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：渡邊 麗子	(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：和佐野浩一郎	(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：岡野 James 洋尚	(慶應義塾大学医学部生理学教室)
共同研究者：芝田 晋介	(慶應義塾大学医学部生理学教室)

研究要旨

近年の内耳傷害に対する治療は薬剤の局所投与へとシフトしつつあるが、効率の良い薬剤分布を考えた際には、内耳局所への各種ドラッグデリバリー法(DDS)の定量的な比較検討が重要と考えられる。そこで今回我々は、ホタルの光の発光原理でもある Luciferase を介した酵素反応を定量する Xenogen 社の IVIS (In vivo imaging system) に注目し、内耳神経に Luciferase を発現する遺伝子改変動物を用いて、個体を殺すことなく薬剤の内耳への到達をリアルタイムに可視化することに成功した。今後はこの知見を生かして様々な網羅的 DDS スクリーニングツールの樹立を目指したい。

研究目的

近年の内耳傷害に対する治療は薬剤の局所投与へとシフトしつつあるが、効率の良い薬剤分布を考えた際には、その予備実験として内耳局所への特異的ドラッグデリバリー(DDS)の定量的検討が重要と考えられる。

この命題に対し我々は本年度、遺伝子改変動物を用いて薬剤の内耳への到達を、*in vivo*で個体を殺すことなく、リアルタイムに可視化することを目指した。

研究方法

ルシフェラーゼ(luciferase)は生物発光における酵素の総称で、各生物・各酵素毎に特異的な器質(=ルシフェリン:luciferin)を分解する作用を有し、この酸化反応に際して発光を伴う。ホタルの発光におけるルシフェラーゼである firefly-Luc では、同反応により波長556nm と比較的長波長の光を安定して放射することから、多くの *in vitro* の生物学的

実験において頻用されている。Xenogen 社の IVIS (In vivo imaging system) はホタルルシフェラーゼの発光が長波長であることを利用した観察系で、小暗室において同波長における光子量(光子カウント)を時空間的に定量せしめる機器である。この実験系は培養細胞をはじめ様々な用途に応用可能で、個体レベルでも予め臓器/細胞特異的に酵素を発現させる遺伝子改変動物を樹立し、1) 標的細胞が生きていて 2) 標的細胞にルシフェリンが到達したことを時空間的に定量することが可能である。

GFAPは内耳神経の中核側(Transitional Zoneより中核側)において内耳神経を被覆するグリア細胞に特異的に強発現する遺伝子である(図1)。今回我々は Caliper lifescience 社より購入した トラン

スジェニックマウス FVB/N-Tg(Gfap-luc)-Xen (通称GFAP-luc) を ICR 系統に戻し交配し、実験に用いた。このマウスでは本来GFAPが発現する細胞において fir

efly-luc (ホタルの発光酵素) が発現しており、生体内耳神経に luciferin が到達すると、同神経から発光が生じる。そこで今回は以下の3条件の経路でルシフェリンを投与し、投与から5分おきに35～45分間、発光を *in vivo* で測定した

- 条件1) 腹腔内投与 500 μ l
- 条件2) 鼓室内投与 100 μ l
- 条件3) 予め手術的に正円窓を閉鎖した上で
鼓室内投与 100 μ l

(倫理面への配慮)

本大学動物実験委員会(NIHガイドラインに準拠)によって厳格な審査を受け受理されている

研究結果

腹腔内投与群では両耳に発光を、鼓室内投与群および正円窓閉塞後鼓室内投与群では投与側のみに発光を認めた。発光量を最大値と比較すると鼓室内投与群は腹腔内投与群の1/5量の投与であるにも関わらず、光子カウント値で150%と高い値を示していた。正円窓閉塞群では発光量のピークは他の2群より低く、非閉塞局所投与の約3分の1、腹腔内投与と比較しても約半分であった。他方ピークに到達するまでの所要時間は鼓室内投与群で10分であり、腹腔内投与の30分、閉塞群鼓室内投与の20分前後と比べて極めて速やかであった。

考察

近年耳鼻咽喉科実地臨床において、急性高度感音難聴に対し国内外でステロイドなどの薬剤の鼓室内投与が施行されているが、その際一定の割合で存在する内耳窓上の偽膜が、薬剤の内耳到達に妨げになる可能性が指摘されている。今回の正円窓閉塞モデルでは閉塞材料に軟骨膜を用いており偽膜を再現するモデ

ルとしては必ずしも理想的ではないが、当該結果より、内耳神経内での薬剤の局所濃度と、局所移行に要する所要時間の双方が低下することが示された。薬剤の局所投与の際にはやはり中耳内視鏡下で内耳窓を確認し、偽膜があれば開放するのが望ましいと思われた。

3つの異なる投与条件で内耳への薬剤動態が異なることをこのように観察せしめられたことは、IVISを用いて内耳への薬剤動態を検討することが現実的選択肢であることを示唆する。初の検討として今回はホタルルシフェリンそのものの動態を可視化することを試みたが、今後は当結果を元に、実際臨床で使用する薬剤の動態についてを、luciferin加薬剤を用いることで検討したい。

結論

内耳への薬剤動態を *in vivo* でリアルタイムに可視化する実験系の構築に成功した。今後は実地臨床で使用する各種薬剤を luciferin 加することで、内耳障害に対する治療薬の DDS の最適化を検討する系を構築したい。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

なし(投稿準備中)

2. 学会発表

第20回日本耳科学会総会・学

術講演会

パネルディスカッション1

「鼓室内注入療法で感音難聴は治るか？」

2010.10.7 神崎晶

図1 GFAP(緑)の蝸牛神経中枢側における発現

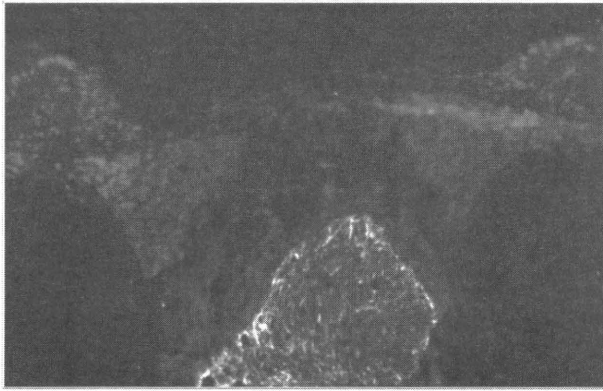


図2 luciferin 局所投与による発光
(右:局所投与のみ 左:正円窓閉塞後投与)

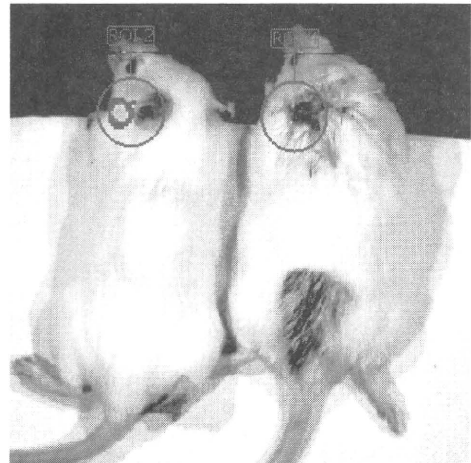


図3 CTとの重ね合わせにより、発光部位が側頭骨内に位置していることが判る

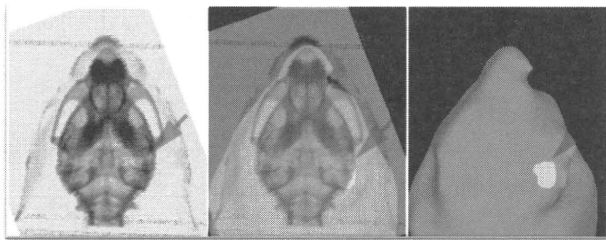
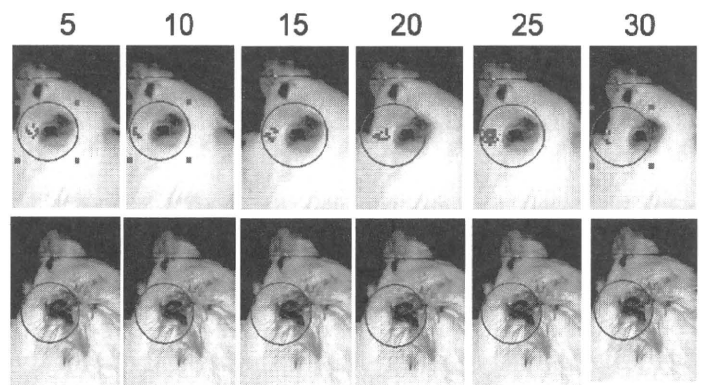


図4 経時的な発光変化の代表例
(上:局所投与个体下:正円窓閉塞後投与个体)



AM-111 投与による虚血性内耳障害の防御—組織学的検討

分担研究者：暁 清文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：表原慶典 (愛媛大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：白馬伸洋 (愛媛大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：羽藤直人 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

研究要旨

アポトーシス抑制ペプチドである AM-111 を一過性内耳虚血の動物モデル (スナネズミ) に投与し、その内耳保護効果を生理学的ならびに組織学的に検討した。AM-111 はスイスの Auris Medical 社から提供を受けた。両側椎骨動脈を 15 分間遮断した後、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ の AM-111 含有ゲル (gel, ゼラチン)、もしくはコントロールとして PBS 含有ゲルを正円窓上に留置した。処置後 4 日目と 7 日目に ABR を測定して聴力変化への影響を検討するとともに、生理学的実験終了後、蝸牛を採取して内有毛細胞の脱落率をカウントした。組織学的には AM-111 投与群の内有毛細胞脱落率はコントロール群と比べて有意に軽減されていた。昨年報告した ABR の結果でも AM-111 には聴力障害防御効果が示されているので、AM-111 はアポトーシスを抑制することで、一過性内耳虚血による有毛細胞障害を阻止する効果のあることが生理学的にも組織学的にも証明された。

研究目的

当科ではこれまでスナネズミに一過性内耳虚血を負荷し、それによって惹起される内耳障害のメカニズム解明と、その予防法、治療法開発をめざし研究を進めてきた。その結果、一過性内耳虚血が内耳組織のエネルギー不足をもたらすだけでなく、内耳毒性を有するグルタミン酸の遊離を促進することや、フリーラジカルの産生増加をもたらすことでアポトーシスを誘導していることが分かってきた。今回の研究ではアポトーシス抑制ペプチドである AM-111 を虚血後に正円窓上に投与し、内耳障害が防御されるか否かを検討した。

研究方法

実験動物には 6 週齢のスナネズミを用いた。これら無作為に 4 群に分け、PBS 投与群 ($n=6$)、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ の AM-111 投与群 (各群とも $n=6$) の計 24 匹について以下の実験を行った。いずれも薬効を長時間持続させるため、 $10\mu\text{L}$ のゲル (gel, ゼラチン) に含ませて投与した。動物を仰臥位にしてハロセン吸入麻酔後、頸部に横切開を加えて両側の椎骨

動脈を露出、絹糸と 5g の重りを使用して 15 分間牽引し、椎骨動脈の血流を一過性に遮断した (図 1)。スナネズミは成熟すると Willis 動脈輪が閉塞するため、椎骨動脈の遮断は迷路動脈の血流低下をもたらす。椎骨動脈の血流再開後に動物を腹臥位にし、耳後部に皮膚切開を加えて耳胞を開放、明視下にゲル状の薬剤を正円窓上に投与した。

虚血前 (投薬前)、虚血後 4 日目、7 日目に ABR を測定して聴力を評価した。刺激音は 8kHz のトーンバースト (立ち上がり—立ち下がり時間、各 0.5ms、持続時間 10ms) を用い、ビニール製チューブイヤホンを直接外耳道に密着させることで音響刺激を行った。虚血後 7 日目に深麻酔下に断頭して耳胞を摘出、surface preparation 法にてコルチ器を採取し、Rhodamine-phalloidin と Hoechst33342 による二重染色を行って蝸牛基底回転の内有毛細胞の脱落割合を算出した。この実験モデルでは外有毛細胞よりも内有毛細胞の障害が顕著に表れる。

倫理的配慮: 実験は常に十分な麻酔下に行

い、動物に苦痛を与えないよう断頭も十分な麻酔薬を投与し、深麻酔下に行った。

研究結果

AM-111 投与群では PBS 投与群に比べて有意に ABR の閾値上昇は抑制された。この抑制効果は AM-111 の濃度が高いほど顕著であった。組織学的な所見も同様で、高濃度の AM-111 を投与ほど内有毛細胞の脱落率は低かった。図 2 に基底回転における有毛細胞の組織像を示す。虚血による細胞の脱落は外有毛細胞よりも内有毛細胞に顕著にみられ、高濃度の AM-111 を投与した群では内有毛細胞の脱落は軽微であった(図 3)。

考察

虚血性内耳障害に関するこれまでの研究により、スナネズミでは虚血後、主に内有毛細胞がアポトーシスに陥り脱落する。アポトーシスには MAPK-JNK 経路が関与していることから、JNK binding domain (JBD) と TAT 配列を有する人工ペプチドである AM-111 を投与して JNK のリン酸化を抑制することで、内有毛細胞のアポトーシスが回避できる。

AM-111 の薬効については、多くの動物実験により薬剤性難聴や騒音性難聴、迷路炎による難聴が防御できることが報告されている。AM-111 にはさらに人工内耳電極挿入時の内耳障害を予防する効果があることも示されている。今回の内耳虚血モデルでも同様の結果が得られたことから、AM-111 はアポトーシスを抑制

することで非特異的に内耳障害防御効果を示すものと思われる。AM-111 は正円窓投与後、速やかに内耳に取り込まれることが証明されている。内耳において MAPK-JNK 経路に作用し、JNK のリン酸化を抑制することで、そこから先のアポトーシス経路を遮断する。また JNK はカスパーゼ経路において Bcl-2 を抑制する。JNK のリン酸化抑制は Bcl-2 活性上昇をもたらす、カスパーゼ経路を介してのアポトーシスを抑制する。このように AM-111 はアポトーシスを二重の過程で抑制することから、今回のような高い保護効果を示すことができたものと思われる。

結論

ジェルに含ませた AM-111 を正円窓上に置くことにより、一過性内耳虚血後の内耳障害を防御することができた。AM-111 は JNK のリン酸化を抑制することで有毛細胞のアポトーシスを防御する効果があることから、虚血をはじめ様々なメカニズムによる内耳障害の治療に有用であると思われた。

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. Omotehara Y, et al. AM-111 protects

against hearing loss and inner hair cells after transient cochlear ischemia. 47th Inner Ear Biology Workshop, Czech, August 29-September 1, 2010.

2. 表原慶典、他。一過性内耳虚血モデル

に対するアポトーシス抑制タンパク AM-111 の保護効果. 第 28 回頭頸部自律神経研究会. 大阪、2010, 9. 11.

知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 椎骨動脈操作による一過性内耳虚血の惹起

A) 頸部を切開して両側の椎骨動脈を露出、B) 椎骨動脈に糸をかけ牽引することで内耳虚血を誘導、C) 糸をはずし虚血を解除する。

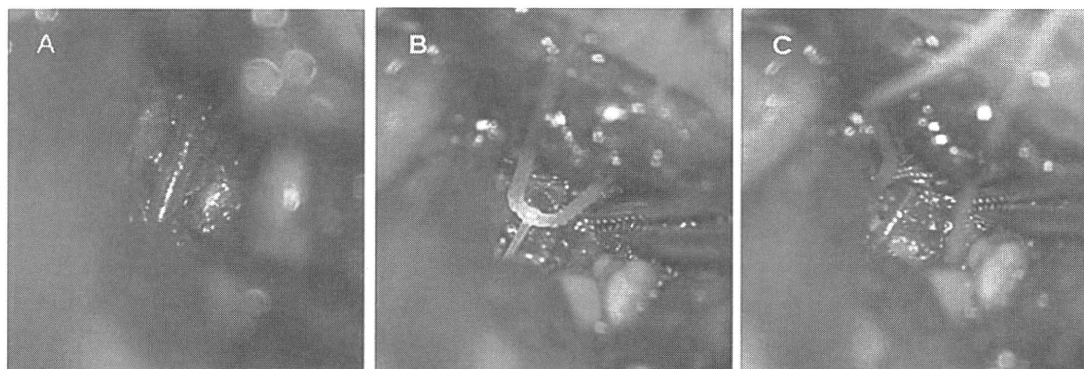


図2 AM-111 投与後の蝸牛組織像 (基底回転)

Control (PBS)

100 μ M of AM111

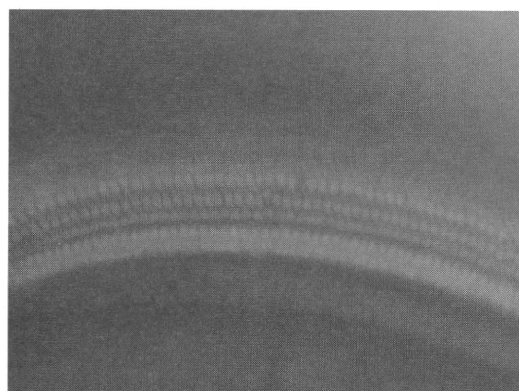


図3 蝸牛回転ごとの AM-111 投与効果

	Percentage of inner hair cell loss (%)		
	Basal turn	Middle turn	Apical turn
Control (PBS)	13.3 \pm 2.7	8.5 \pm 1.5	3.5 \pm 0.6
100 μ M of AM-111	3.1 \pm 0.6	8.4 \pm 1.1	3.2 \pm 1.0
10 μ M of AM-111	5.5 \pm 0.7	4.1 \pm 0.9	2.7 \pm 0.4
1 μ M of AM-111	9.9 \pm 1.2	3.0 \pm 0.5	1.8 \pm 0.5

内耳虚血・再灌流障害に対する人工酸素運搬体の有用性に関する研究

分担研究者：暁 清文（愛媛大学耳鼻咽喉科・教授）

共同研究者：岡田昌浩（愛媛大学耳鼻咽喉科・医員）

共同研究者：白馬伸洋（愛媛大学耳鼻咽喉科・講師）

共同研究者：竹田将一郎（愛媛大学耳鼻咽喉科・助教）

共同研究者：羽藤直人（愛媛大学耳鼻咽喉科・准教授）

共同研究者：兵頭 純（鷹の子病院耳鼻咽喉科）

共同研究者：川口 章（東海大学再生医療科学・准教授）

研究要旨

人工酸素運搬体の一つである Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH)は、輸血用赤血球の代用品として開発されたものだが、その優れた酸素運搬能のため、虚血性疾患への応用が検討されている。昨年、LEHの虚血前投与が、聴力閾値の上昇や内有毛細胞の脱落に対する保護効果を示すことを報告した。今回は、より臨床に即した検討のため、一過性内耳虚血後に LEH の投与を行い、内耳障害に対する保護効果について検討したので報告する。実験はスナネズミ一過性内耳虚血モデル（15分虚血）を用いた。虚血1時間後に生食、LEHのいずれかを2ml/kg 静注した。聴力は、虚血前、虚血1・4・7日後にABRを用いて評価した。組織学的には虚血7日後の有毛細胞の脱落割合を算出し評価した。LEH群は生食群と比較し虚血後の聴力閾値の上昇を有意に抑制した。内有毛細胞脱落割合も同様の結果であった。LEHは虚血1時間後に投与しても虚血性内耳障害に対して有効であることが示唆された。

研究目的

突発性難聴は原因不明の感音難聴であるが、内耳虚血が発症メカニズムの一つとして推察されている。過去に我々はスナネズミを用いて内耳虚血・再灌流障害モデルを作成し、内耳の一過性虚血が聴力低下を引き起こすこと、内耳の内有毛細胞（特に基底回転）の脱落が見られることを報告した。

一方、人工酸素運搬体は輸血代用品として開発されたものだが、その優れた酸素運搬能を利用して、虚血性疾患への応用が検討されている。昨年、我々は人工酸素運搬体の一つである Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) を内耳虚血前に投与し、一過性内耳虚血に対する有用性を報告した。しかし、虚血前に投与したため、内耳虚血が十分に起こらなかった可能性が否定できなかった。また、臨床応用のためには虚

血後投与の検討が必要である。今回、LEHを虚血後に投与し、一過性内耳虚血に対する保護効果について検討を行ったので、報告する。

研究方法

実験動物には12～16週齢の雄スナネズミを用いた。生食投与群として6耳、LEH投与群として6耳の計12耳について検討した。ハロセン吸入麻酔下に仰臥位にて頸部正中切開を施行し、両側の椎骨動脈を同定した。椎骨動脈に絹糸をかけ、5gの重りにて15分間牽引することで内耳一過性虚血を行った。虚血1時間後に生食、LEHのいずれかを2ml/kg静注した。

聴力は、虚血前、虚血1・4・7日後にABRを用いて評価した。ABRの音刺激はOpen Field Systemで、8kHz、16kHz、32kHzの3周波数のTone burst (rise-fall time: 1msec, duration: 5msec)を用いた。

虚血7日後に深麻酔下に断頭し、骨法を摘出し、Surface preparationにてコルチ器を採取し、Rhodamine-phalloidin、Hoechst33342による2重染色にて基底回転の有毛細胞の脱落割合を算出した。

(倫理面への配慮)

実験は十分な麻酔下に行い、断頭も深麻酔下に苦痛を与えずに行った。愛媛大学医学部動物実験指針に従い実験をおこなったため、倫理面の問題はなかった。

研究結果

ABRで測定した聴力閾値の推移を図1に

示す。LEH群は生食群と比較し虚血後の聴力閾値の上昇を有意に抑制した。また、内有毛細胞脱落割合も同様の結果であった。一方、外有毛細胞の脱落割合は各群間で有意差はなかった(図2)。

考察

人工酸素運搬体は輸血用赤血球の代用品として開発されたものであるが、その優れた酸素運搬能・供給能のため、虚血性疾患の治療薬としての応用が検討されている。今回、我々が用いた人工酸素運搬体の一つであるLEHはHbをリポソームでカプセル化したものである。大きさは赤血球の約1/30で微小な血管にも容易に到達できる。今回、LEHを虚血後に投与しても、内耳障害が抑制される結果が得られた。過去に我々は、一過性内耳虚血によりiNOSが発現し、NOが産生されることで内耳障害が引き起こされることを報告している。iNOS遺伝子のプロモーター領域にはhypoxia response element (HRE)が存在し、低酸素状態でiNOS発現が亢進すると考えられている。LEHの投与により、低酸素状態が速やかに改善されることで、iNOSの発現、NOの産生が抑制され、内耳障害を抑制したと推察できるが、今後、免疫染色を追加する予定である。

結論

虚血性内耳障害に対して、LEHは虚血後に投与しても保護効果を示すことが示された。

健康危険情報

研究報告

1. 論文発表
未発表
2. 学会発表
未発表

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

[付図説明]

図1 聴力閾値の推移

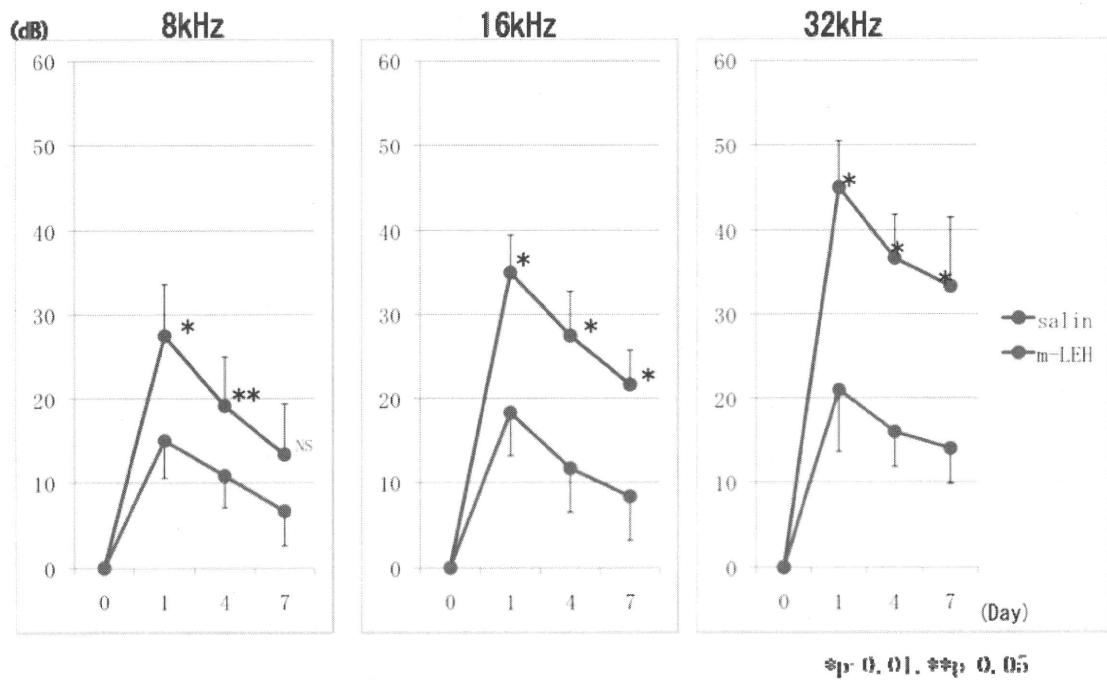
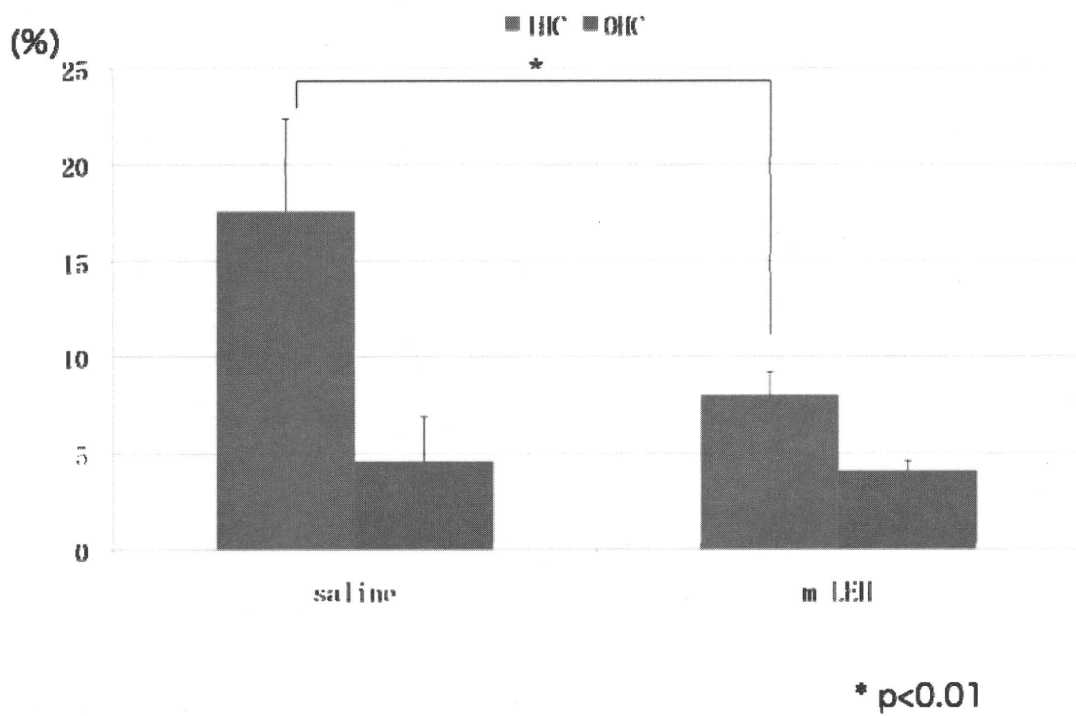


図2 有毛細胞脱落割合



内耳におけるグルココルチコイドによる遺伝子発現制御に関する研究

分担研究者：福島邦博（岡山大学耳鼻咽喉科 講師）

共同研究者：前田幸英（岡山大学耳鼻咽喉科 助教）

研究要旨

デキサメタゾンを含むグルココルチコイドは急性感音難聴の治療に用いられる。成体マウス鼓室内にデキサメタゾンを投与すると内耳で聴覚関連遺伝子 *Fkbp5* 発現が誘導される事を示した。

研究目的

デキサメタゾンを含むグルココルチコイドは急性感音難聴の治療に広く用いられ実験動物では内耳で遺伝子発現を制御して内耳保護効果を発揮することが知られている。しかしどの様な遺伝子が制御されているのか定かでない。当研究ではデキサメタゾンにより内耳で発現量が増加する遺伝子を同定した。

研究方法

我々はマウス胎児内耳の培養系における実験でデキサメタゾンにより *Fkbp5* や *Gilz* の発現量が3倍以上になることを既に明らかにした。当研究では生後45-50日の成体マウスの鼓室内にデキサメタゾンを投与して12時間後に内耳を剖出、total RNA抽出、Realtime RT-PCRをおこなって *Fkbp5*, *Gilz* の発現量をコントロール群と比較した。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認のもとに行い、動物実験は十分な麻酔下に苦痛を最小限としておこなった。

研究結果

デキサメタゾン投与後12時間で、*Fkbp5* の発現量 (2.45 ± 1.16 , $n=5$) はコントロールレベル (1 ± 0.03 , $n=6$) と比べて有意に増加していた ($p < 0.01$)。

Gilz の発現量 (1.43 ± 0.80 , $n=6$) にはコントロール群 (1 ± 0.04 , $n=6$) と比べ有意な変化を認めなかった。

考察

今回デキサメタゾン投与により内耳での *Fkbp5* 発現が増加することが示された。*Fkbp5* はグルココルチコイドがグルココルチコイドレセプターと結合して作用する際に、細胞内で複合体を形成する。また、*Fkbp5* は感音難聴を引き起こす免疫抑制剤である Fk-506 を阻害する。

Gilz については遺伝子上流に Glucocorticoid response element が存在し、実験条件によっては成体内耳でもデキサメタゾン投与により発現増加すると予想される。今後も薬剤投与後の経過時間などの検討が必要である。

結論

成体マウスの鼓室内にデキサメタゾンを投与すると、内耳で *Fkbp5* 発現が誘導される。これはデキサメタゾンが、内耳の細胞内にとりこまれて作用し、内耳保護効果を発揮することを支持する。

研究発表

1. 論文発表

Maeda Y, Fukushima K, Misato H, Kariya S, Smith RJ, Nishizaki K.
” Microarray analysis of the effect of dexamethasone on murine cochlear explants.” *Acta Otolaryngologica* 2010;
130(12):1329-34

2. 学会発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし