

図1 虚血後の ABR 閾値の推移

虚血前の ABR 閾値を基準 (0 dB) とした閾値変化を示す。虚血-PDP 2.0 mg/kg 投与群では、虚血-生食群や虚血-PDP 0.2mg/kg 投与群に比べ有意に閾値上昇が抑制された。

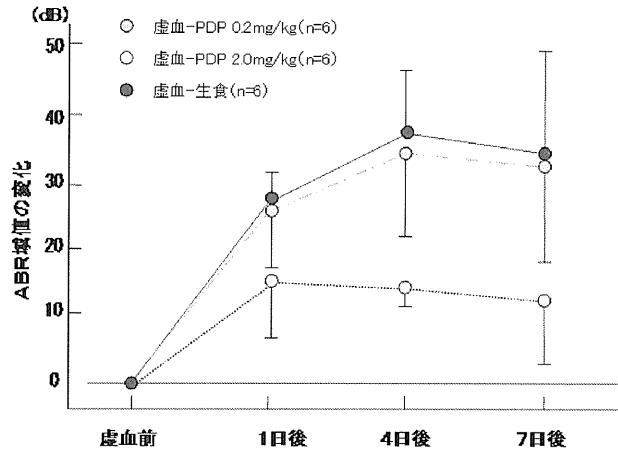


図2 虚血7日後における内毛細胞の脱落率

虚血-PDP 2.0 mg/kg 投与群では虚血-生食群と比較して有意に内毛細胞脱落が抑制された。

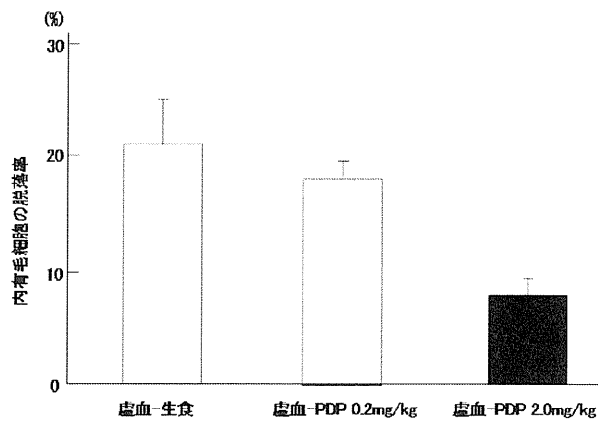
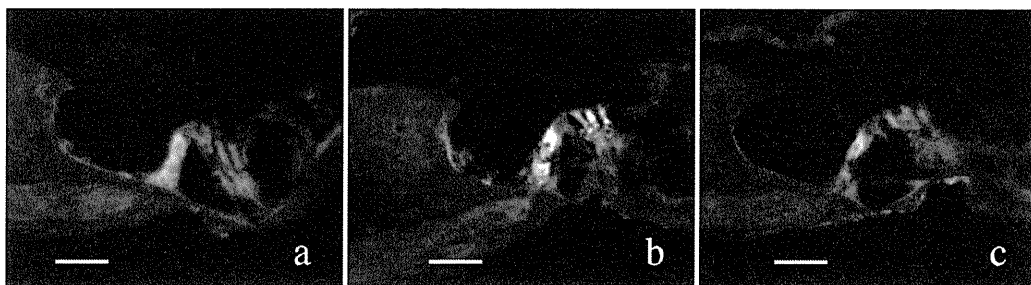


図3 コルチ器における Bcl-2 の免疫染色像

内毛細胞や外毛細胞、ダイテルス細胞に免疫反応が認められた。(a) sham-op 群、(b) 虚血-PDP 2.0 mg/kg 投与群、(c) 虚血-生食群。(bars=50μm)



## デキサメタゾン鼓室内投与によるマウス蝸牛での *Fkbp5* 誘導

研究分担者 福島 邦博 岡山大学耳鼻咽喉科 講師  
研究協力者 前田 幸英 岡山大学耳鼻咽喉科 助教  
研究協力者 平井美紗都 岡山大学耳鼻咽喉科

### 研究要旨

急性高度感音難聴の治療にはグルココルチコイドが頻用されるが、その作用機序は明らかではない。*Fkbp5*はin vitroの実験系でグルココルチコイド存在下の蝸牛組織で発現が増強する遺伝子である。マウスにてグルココルチコイド鼓室内投与を行い、広い範囲の蝸牛組織に*Fkbp5*発現が誘導されることを示した。

### 研究目的

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るが、蝸牛におけるその作用機序は不明である。一般にグルココルチコイドレセプターは細胞核に存在し、転写因子として作用して遺伝子発現を制御する。我々は平成22年度までに、マウス胎児蝸牛の器官培養で、グルココルチコイドの一種であるデキサメタゾン投与により発現が制御される遺伝子を同定した。平成23年度にはデキサメタゾンの生体内耳での作用機序を明らかにするため、成体マウスへの鼓室内投与後に聴覚関連遺伝子*Fkbp5*発現量の変化を検討した。

### 研究方法

6週齢の雌C57/B16マウスの鼓室内に24mg/mlのデキサメタゾン (n=6) および生食 (コントロール、n=6) を投与し、12時間後に蝸牛を摘出してRNA抽出した。*Fkbp5*mRNAおよび内部標準の18SrRNAをリアルタイムRT-PCRで定量した。また免疫染色で蝸牛内の*Fkbp5*の分布を検討した。

### (倫理面への配慮)

岡山大学動物実験委員会の倫理規程に基づき、委員会の承認を得て行った。動物の操作は適切な麻酔のもとに行った。

### 研究結果

*Fkbp5*発現量はデキサメタゾン投与群 ( $244.8 \pm 155.5$ , n=5) でコントロール群 ( $100 \pm 3.0$ , n=6) に比べて有意に増加していた。免疫染色ではコルチ器、螺旋板縁、螺旋靱帯、血管条等で*Fkbp5*発現をみとめた。

### 考察

*Fkbp5*は、そもそもFK506との結合タンパクとして同定され、その作用発現や効果のコントロールに関与している事が推測されているが、詳細な機能は不明である。*Fkbp5*遺伝子の転写調節領域にはグルココルチコイドレセプターが結合し、発現を制御する配列が12個存在する。我々は昨年までの研究でin vitroの蝸牛培養組織にてデキサメタゾン添加すると発現が増加する各種の遺伝子の一つとしてピッ

クアップしてきた。今回の検討では、in vivoにおける鼓室内投与でも同様に、蝸牛での遺伝子発現が増加し、また蝸牛におけるタンパクレベルで広範に発現していることを明らかにした。さらにその機構は、蝸牛内の広い領域で存在することが明らかになった。各種のFkbpないしはFK506の蝸牛における生理は明らかになっていないが、デキサメサゾンの効果を検討する際の作用機序確認の一つの方法として、あるいは蝸牛におけるデキサメサゾン作用のバイオマーカーとして有益であることが推測される。

#### 結論

急性感音難聴の治療に頻用されるグルココルチコイドの投与により生体内の内耳でも遺伝子発現が転写レベルで制御される事が示唆された。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Expression analysis of microRNAs in murine cochlear explants. Hirai M, Maeda Y, Fukushima K, et al. Neuroreport. 2011 ;22(13):652-4

2) Intratympanic dexamethasone up-regulates Fkbp5 in the cochleae of mice in vivo. Maeda Y, Fukushima K, et al. Acta Otolaryngol. 2012 ;132(1):4-9

##### 2. 学会発表

日本耳鼻咽喉科学会総会  
平成23年5月19日、京都

#### 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

## モデル動物を用いた急性感音難聴の進行メカニズムの解明に関する研究

分担研究者 原 晃 筑波大学医学医療系耳鼻咽喉科  
共同研究者 田淵 経司 筑波大学医学医療系耳鼻咽喉科

### 研究要旨

耳毒性物質による内耳障害に関するモデル動物を用い、障害を軽減する可能性のある因子として Nrf2 (NF-E2-related factor 2) 及びニューロステロイドについて検討を加えた。本障害の進行の抑制に Nrf2 による抗酸化応答が重要な役割を果たすことが判明した。また、エストロゲン、デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone: DHEA) は内耳保護効果を有することが示された。

### 研究目的

アミノグリコシド系抗生剤は有害効果として内耳性急性感音難聴が問題となる。NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は塩基性ロイシンジッパー構造を有する転写因子であり、各種抗酸化酵素の誘導により、酸化ストレス応答を制御する。本研究ではゲンタマイシン (GM) による内耳障害における Nrf2 の関与を検討した。また、近年中枢神経障害に対する保護作用が注目されているニューロステロイドの内耳保護効果についても併せて検討した。

### 研究方法

実験にはマウス、またはラットを用いた。基底回転コルチ器を摘出し、GM 投与下に器官培養した。GM 負荷による各種抗酸化酵素の発現、有毛細胞の消失率を検討した。

(倫理面への配慮)

筑波大学動物実験取扱規定に従った。

### 研究結果

GM 負荷により、蝸牛に SOD1、NQO1

等の抗酸化酵素が誘導された。Nrf2 抑制により抗酸化酵素の誘導が抑制され、外有毛細胞消失率が増加した。

GM 負荷に惹起される外有毛細胞死をエストロゲン、DHEA は減少させた。

### 考察

活性酸素は様々な内耳性急性難聴において、その障害進行に関与することが報告されている。Nrf2 は抗酸化酵素誘導を制御することが知られるが、Nrf2 が蝸牛内 SOD、HQO1 等の抗酸化酵素の転写制にも強く関与し、内耳障害の進行を抑制する働きを有することが示された。

エストロゲン、DHEA は GM による内耳障害においても保護作用を認めた。エストロゲン受容体拮抗薬による検討からはエストロゲンの保護効果はエストロゲン受容体を介する作用と考えられた。

### 結論

Nrf2 は蝸牛内抗酸化酵素の転写を制御し、GM による急性感音難聴の進行を抑制した。エストロゲン、DHEA は GM 耳毒性

に対し、保護的に作用した。

健康危険情報

#### 研究発表

- 1) Hoshino T, Tabuchi K, Nishimura B  
Tanaka S, Nakayama M, Ishi T,  
Warabi E, Yanagawa T, Shimizu  
R, Yamamoto M, Hara A. Protective role  
Of Nrf2 in age-related hearing loss and  
gentamicin ototoxicity. BBRC 2011;  
415: 94-8.
- 2) Nakamagoe M, Tabuchi K,  
Nishimura, B, Hara A. Effects of  
neuroactive  
steroids on cochlear hair cell death  
induced by gentamicin.  
Steroids 2011; 76: 1443-50.
- 3) Tabuchi K, Nishimura B,  
Nakamagoe, M, Hayashi K, Nakayama  
M, Hara A.  
Ototoxicity: mechanisms of cochlear  
Impairment and its prevention. Curr  
Med Chem 2011 Epub ahead of print.

#### 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

難治性内耳疾患の遺伝子バンク構築  
突発性難聴の遺伝子相関解析

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：西尾 信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

突発性難聴は特定疾患（難病）に含まれ、患者のQOLを著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。従来から種々のアプローチにより研究がなされているが、未だにメカニズムをはじめ不明な点が多いのが現状である。

本研究では、「急性高度難聴に関する調査研究班」および「前庭機能異常に関する調査研究班」の各施設との共同研究として難治性内耳疾患について遺伝子バンク構築を行うとともに、過去に突発性難聴との関連が報告された遺伝子、脳梗塞・循環器障害への関与が報告されている遺伝子等との遺伝子関連解析を実施した。その結果、*SOD1* 遺伝子の関与が示唆される結果が得られた。

### 研究目的

突発性難聴は特定疾患（難病）に含まれ、患者のQOLを著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。

これらの疾患に関して、従来から種々のアプローチで研究されているにもかかわらず、未だ発症メカニズムは不明である。本研究では、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫に加え、急性低音障害型感音難聴および良性発作性頭位めまい症を対象に、原因の特定、発症メカニズムの解明等の基礎研究の推進に必要不可欠な遺伝子バ

ンクを構築し、それらの疾患の発症メカニズムを解明することを目的としている。今回我々は、上記遺伝子バンクプロジェクトで集積されたサンプルをもとに、分譲手法（特に全ゲノム増幅法の有効性）に関する検討を実施した。

また、予備的解析として、分譲用のサンプルが解析に十分なクオリティを有することを確認することを目的に、過去に突発性難聴との関連が報告された遺伝子、脳梗塞・循環器障害への関与が報告されている遺伝子等との遺伝子関連解析を実施した。

## 研究方法

### (1) 遺伝子バンク構築

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「急性高度難聴に関する調査研究班」、「前庭機能障害に関する調査研究班」の研究代表者および研究分担者の所属する機関（全国 23 施設）との共同研究により、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫に加え、急性低音障害型感音難聴および良性発作性頭位めまい症患者の遺伝子および臨床データの収集を行った。収集された遺伝子は GenomiPhi v2 (GE healthcare bio) を用いて全ゲノム増幅を行いサンプル分譲に備えた。

#### (倫理面への配慮)

患者選定基準を満たす患者を対象に、十分な説明の上、書面で同意を得て臨床情報調査項目の調査・採血を行った。各研究機関においては、採血時に匿名化を行い個人情報保護に配慮を行った。

### (2) 遺伝子相関解析

分譲用のサンプルが解析に十分なクオリティを有することを確認することを目的に、集積されたサンプルの一部を用いて、過去に突発性難聴との関連が報告された遺伝子、脳梗塞・循環器障害への関与が報告されている遺伝子多型 (SNP) との遺伝子関連解析を実施した。SNP の解析には Applide Biosystems 社の Taq Man Genotyping Assays および Step One Plus 装

置を用いた。また解析にはアレル頻度を基に  $\chi^2$  検定を用いた。

## 研究結果

### ① 遺伝子相関解析

予備的解析として実際に集積されたサンプルの一部を利用して、突発性難聴患者 96 名を対象に候補遺伝子相関解析を行った。コントロールとしては Hap Map JPT (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) および GWAS Database (<https://gwas.lifesciencedb.jp/cgi-bin/gwasdb/startJ.cg>) のアレル頻度との比較を行った。

その結果 SOD1 遺伝子、PRKCH 遺伝子、GSTP-1 遺伝子で有意差を認めた。一方、過去に突発性難聴との関連が報告されていた MTHFR、NOS3、LTA 遺伝子では差を認めなかった。2 次解析として、SOD1、PRKCH、GSTP-1 遺伝子に関してはサンプル数を 192 サンプルに増加して解析を行ったところ、SOD1 遺伝子のみ有意差を認めた。しかしながら、現時点では解析サンプル数が少ないため、統計学的に意味のある適切な解析を行うためには、遺伝子バンクの構築を継続して行い大規模サンプルで解析を行うことが重要であると考えられる。

## 考察

SOD1 (Superoxide dismutase 1) 遺伝子は酸化ストレス応答の遺伝子として報告されており、主に、活性酸素の処理に関

連する遺伝子として報告されている。しかしながら、突発性難聴との関連に関する報告はないため、更なる解析が必要だと考えられる。

## **結論**

難治性内耳疾患のメカニズムの解明を目的に遺伝子バンクの構築を継続して実施しするとともに、収集された遺伝子を基に予備的な遺伝子解析を実施した。今後の継続により更なるサンプルの収集と遺伝子解析の成果が期待される。

## **健康危険情報**

なし

## **研究発表**

なし

## **知的財産権の出願・登録状況**

なし



表 1 遺伝子相関解析の結果 (ケース 96 名)

遺伝子名	rs number	アレル頻度 (症例)	アレル頻度 (コントロール)	P 値	オッズ比
GSTP1	1695	163 ( 84.9 % ) :29 (15.1%)	206 (91.2%) :20 (8.8%)	0.04	1.83 (1.01-3.34)
SOD1	4998557	82 ( 42.7 % ) :110 (57.3%)	123 ( 54.4 % ) : 103 (45.6%)	0.02	1.6 (1.09-2.36)
	1041740	135 ( 70.3 % ) : 57 (29.7%)	137 ( 60.6 % ) : 89 (39.4%)	0.04	1.54 (1.02-2.31)
PRKCH	2230500	154 ( 84.6 % ) :28 (15.4%)	221 (98.7%) :3 (1.3%)	0.01 <	13.4 (5.13-34.97)

## 内耳薬剤投与に関する動物モデルの開発研究

研究代表者：小川 郁（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：藤岡 正人（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：渡部 高久（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：本村 朋子（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：稲垣 洋三（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

内耳に薬液濃度がどのように到達するかを GFAP とルシフェラーゼを共発現させるマウスモデルを使って、薬物動態について解析した。局所投与で到達速度が早く、濃度が高いことから局所投与の有用性を示唆した。

### 研究目的

われわれは、薬液が全身投与と鼓室内投与法によって内耳到達への効果を比較検討するため、マウスを用いて比較検討した。（背景）内耳性難聴に対して治療薬が全身投与あるいは鼓室内投与法によって、治療が試みられる。しかしながら、生体内の薬物動態を生きたまま体外から可視化してモニタリングすることはこれまで不可能だった。しかしながら、新しい解析システムと遺伝子改変マウスを用いて、生きた動物個体（しかも同一個体）の内耳における薬物動態を非侵襲的にリアルタイムで観察することができるようになった。

### 研究方法

上記の新しいシステムを用いてそれぞれの投与法において内耳へ薬物が到達できる時間、消去されるまでの時間をそれぞれ検討した。供与された遺伝子改変マウ

スは下記の通りである。ルシフェラーゼは、器質であるルシフェリンを分解する際に化学発光を誘導する酵素である。今回我々は GFAP（グリア線維酸性タンパク質）プロモータ下に同酵素を発現する GFAP-Luc で酵素である。今回我々は GFAP（グリア線維酸性タンパク質）プロモータ下に同酵素を発現する GFAP-Luc トランスジェニックマウスを用いた。GFAP は蝸牛神経を中心に強く発現する遺伝子である。まず予備実験で我々は、GFAP-Luc マウスを用いてこの発現を *in vivo* でトレースできることを CT との重ね合わせで確認した。このマウスに対して、ルシフェリンの投与を行い、ルシフェリンが内耳グリア細胞に到達するとルシフェラーゼと酵素反応し発色する。この発色が個体の骨・皮膚を透過し超高感度発光・蛍光 *in vivo* イメージングシステム IVIS Imaging System で解析できるようになっ

た。すなわち、同一個体においてリアルタイムに dynamic に *in vivo* で薬物移行を観察することが可能である。このトランスジェニックマウスを用いて、われわれはルシフェリンの腹腔内投与あるいは鼓室内投与を行い、リアルタイムで薬物動態を観察した（本研究は慶応義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て施行された）。

### 結論

鼓室内投与と腹腔内投与では内耳の薬物動態には大きな違いがあった。鼓室内投与では注入後 5 分経過の時点で発色し、20 分でピークを迎えて、それ以降は減衰した。一方腹腔内投与群において、発色は 30 分経過してから上昇を始めた。

### 考察

鼓室内投与と腹腔内投与では異なっていた。鼓室内投与では薬剤到達時間が早かったが、消失する時間も早かった。また、鼓室内投与法の動物群では内耳の薬物濃度にばらつきが認められた。おそらく中耳から耳管経由で排出されるためではないかと推測している。両者の投与方法による薬物動態の違いから、内耳に早期にさらに継続的に投与されるためには、鼓室内投与と全身投与法の併用が、内耳の薬剤濃度を維持するために必要であると考えられた。今回の検討は、ルシフェリンの薬物動態を観察したが、薬物によって動態が異なることが予想されるため、今後薬物とルシフェリンを結合させて薬物動態の差異を確認できるようなツールの開発に向けた検討も

必要であると考えている。（本研究は、慶応義塾大学医学部 生理学教室 岡野栄之教授、ジェームス岡野洋尚先生、芝田晋介先生、整形外科学教室 中村雅也先生、安田明正先生との共同研究である。

### 健康危険情報

なし

### 研究発表

#### 1. 論文発表

#### 2. 学会発表

Sho Kanzaki, Masato Fujioka, Kaoru Ogawa ; Novel *in vivo* imaging analysis of inner ear drug delivery system: Comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections.

English session 日本耳科学会  
2011年11月24日

Sho Kanzaki, Masato Fujioka, Kaoru Ogawa ; Novel *in vivo* imaging analysis of inner ear drug delivery system: Comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections. poster Association research in otolaryngology meeting 2012 Feb 28

### 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

## 内耳培養細胞を用いた細胞死に関するオートファジーのメカニズムの解明

研究代表者：小川 郁（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：本村 朋子（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：土橋 奈々（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：林 賢（新川クリニック）  
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：五島 史行（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：渡部 高久（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：稲垣 洋三（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：若林 聡子（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：斎藤 秀行（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）

### 研究要旨

高度難聴の原因解明と新規治療標的を探索に向け、内耳培養細胞を用いて、オートファジーを焦点とした酸化ストレス下での内耳細胞生死メカニズムを検討した。

#### 研究目的

酸化ストレスは、様々な内耳疾患の発症において、重要な働きをしていることが報告されている（Hayashi K, et al. Bioscience Trends.）。一方、酸化ストレス下での細胞生死に、オートファジーが重要な役割をはたしていることが報告されているが、内耳感覚細胞におけるオートファジーの分子メカニズムは明らかではない。今回、内耳培養細胞（HEI-0C1）を用いて、酸化ストレス下でのオートファジーシグナル伝達機構について検討したので報告する。

#### 研究方法

今回の研究では、House Ear Research

InstituteのDr. Limより譲渡された内耳培養細胞 HEI-0C1 を用いた。酸化ストレスとしては活性酸素 ( $H_2O_2$ ) を、オートファジー誘導剤としてラパマイシンを用いた。内耳培養細胞におけるオートファジーの検出方法は、まず、オートファジーのモニタリングマーカーである GFP-LC3 発現ベクターをエレクトロポレーション法により HEI-0C1 に遺伝子導入し、LC3 を視覚的に評価する。次に、western blot 法により LC3-II の発現を定量化する。最後に、電子顕微鏡により、autophagic vacuoles を確認するという3段階の方法をとった。また、細胞生死判定には Cell viability assay、細胞死がアポトーシスかネクロトーシスのいずれによるものかを

判定するために PI と Annexin V を用いた FACscan analysis、細胞内 ATP 濃度をルシフェラーゼ活性による ATP 測定キットを用い測定した。

### 研究結果

H2O2 処理後 1 時間の段階で、HEI-0C1 細胞質内には GFP-LC3 の発現を認め、Western blot 方にて LC3-II の発現増加を認め、電子顕微鏡下に autophagic vacuoles を確認した。H2O2 処理後細胞生存率は時間依存性、濃度依存性に低下し、FACscan analysis においては、ネクローシス細胞のみの増加を、細胞内 ATP 濃度は時間依存性に低下した。ラパマイシンと H2O2 同時投与後細胞生存率は、H2O2 単独投与群と比較して有意差を持って回復した。

### 考察

酸化ストレス下での内耳培養細胞 (HEI-0C1) は、ネクローシスとオートファジーを同時に起こすが、オートファジーを誘導することによって内耳細胞死を防ぐことが可能になることを実験的に確認した。すなわち、Rapamycin は内耳細胞保護効果を持っていること可能性があることを示唆している。今後は、小胞体ストレス下での細胞死シグナル伝達機構についても検討予定である。

### 結論

酸化ストレス下での内耳細胞において、オートファジーは細胞生存に重要な役割を果たしている。

### 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

Ken Hayashi, Katsuaki Dan, Fumiyuki Goto, Sho Kanzaki and Kaoru Ogawa. Dept. of Otolaryngology, Shinkawa Clinic, The molecular mechanism of autophagy in auditory cells under oxidative stress. The 114<sup>th</sup> American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO EXPO, Boston, MA, USA, September 26-29, 2010. (ポスター賞)

Ken Hayashi, Katsuaki Dan, Fumiyuki Goto, Sho Kanzaki and Kaoru Ogawa. Dept. of Otolaryngology, Shinkawa Clinic, A crosstalk between Nrf2/Keap1 pathway in auditory cells. The 115<sup>th</sup> American Academy Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO EXPO, San Francisco, CA, USA, September 11-14, 2011.

Ken Hayashi, Fumiyuki Goto, Tomoko Hommura, Nana Tsuchihashi, Yasuyuki Nomura, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa. A molecular crosstalk between Nrf2/Keap1 pathway in auditory cells. English Session 日本耳科学会、2011 年 11 月 24 日

### 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

## 難治性内耳疾患の遺伝子バンク構築 データベースの構築と臨床情報の検討

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：西尾 信哉（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：工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫は特定疾患（難病）に含まれ、患者の QOL を著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。従来から種々のアプローチにより研究がなされているが、未だにメカニズムをはじめ不明な点が多いのが現状である。

本研究では、「急性高度難聴に関する調査研究班」および「前庭機能異常に関する調査研究班」の各施設との共同研究として難治性内耳疾患について遺伝子バンク構築を行っている。今回は上記遺伝子バンクを用いて、突発性難聴の臨床的特徴について検討を行った。

### 研究目的

突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫は特定疾患（難病）に含まれ、患者の QOL を著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。

本研究では、突発性難聴を対象に、原因の特定、発症メカニズムの解明等の基礎研究の推進に必要な遺伝子バンクを構築するとともに、臨床情報のデータベース化を進めている。

今回我々は、上記遺伝子バンクプロジェクトで集積されたサンプルの臨床情報を

基に臨床情報の検討を行い、臨床調査における有用性を検討した。

### 研究方法

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「急性高度難聴に関する調査研究班」、「前庭機能障害に関する調査研究班」の研究代表者および研究分担者の所属する機関（全国 23 施設）との共同研究により、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫に加え、急性低音障害型感音難聴および良性発作性頭位めまい症の遺伝子バ

ンク構築を実施している。

(倫理面への配慮)

各研究班で策定した患者選定基準を満たす患者を対象に、十分な説明の上、書面で同意を得て臨床情報調査項目の調査・採血を行った。各研究機関においては、採血時に匿名化を行い個人情報保護に配慮を行った。

## 研究結果と考察

### ①突発性難聴の臨床像：

「急性高度難聴に関する調査研究班」および「前庭機能障害に関する調査研究班」の各施設から集積されたサンプル数のうち、データベースへの入力完了した合計 209 例を対象にその臨床的特徴のとりまとめを行った。209 例の内訳は男性 97 名、女性 110 名で男女差は認められなかった。発症年齢の平均は 56.6 歳であった。

治療前（初診時）の聴力（5 周波数平均）は 73.1dB であり、重症度分類に従うと、Grade 1 が 15 例(8%)、Grade 2 が 39 例(20.7%)、Grade 3 が 83 例(44.1%)、Grade 4 が 51 例(27.1%)で Grade3 が約半数を占めた。

治療後（固定時）の聴力は 53.1dB であり、平均の治療効果は 20.8dB であった。治療効果判定に従うと、治癒が 20 例(11%)、著明回復が 42 例(23.1%)、回復が 43 例(23.6%)、不変が 77 例(42.3%)であった。

### ②合併症・問診調査項目に関して：

合併症および問診調査項目に関しては、めまいが 78 例(41%)、耳鳴が 174 例(89%)に認められた。

また、家族歴は 9 例(7%)、糖尿病は 27 例(13%)、高脂血症は 30 例(15%)、腎疾患は 5 例(3%)、脳梗塞は 2 例(1%)、心疾患は 19 例(10%)で合併を認めた。

また、喫煙の習慣ありと答えたのは 52 例(30%)、飲酒は 61 例(36%)であった。

今回、これらの合併症のうち、めまいと耳鳴に関してさらに聴力等の比較検討を行った。(図 1・図 2)

その結果、めまいを合併する例では、治療前聴力が 83.7dB、めまい無し群では 66.9dB と有意にめまい合併例のほうが重症であった。また、治療後の聴力はめまい合併例で 63.4dB、めまい無し群では 44.7dB であった。治療効果に関しては、めまい合併例では 20.2dB、めまい無し群では 22.3dB と大きな差は認められなかった。

めまいを合併する症例では、より重症であることが示されたことより、めまい合併例のほうがより広範に内耳障害が起こっていることを反映しているものと考えられる。しかしながら治療効果に関しては大きな違いが認められなかったことより、めまいの有無で病態の重症度以外の差異は無い可能性が示唆される。

一方、耳鳴に関しては、耳鳴を合併する例では、治療前聴力が 72.1dB、耳鳴無し群では 82.4dB と有意に耳鳴合併例のほ

うが軽度であった。また、治療後の聴力は耳鳴合併例で 51.4dB、耳鳴無し群で 65.8dB であった。治療効果に関しては、耳鳴合併例では 20.7dB、耳鳴無し群では 16.5dB と大きな差は認められ、耳鳴合併例のほうがやや治療効果が高い結果であった。

従って、耳鳴を合併する例のほうが、軽度かつ改善率が高いことが明らかであり、耳鳴を伴う突発性難聴では急性期である可能性が示唆された。

しかしながら、いずれも症例数が少ないため結果の解釈には注意が必要である。今後症例数が増加する事でより臨床像を明らかにする事が可能であると期待できる。

## 結論

難治性内耳疾患のメカニズムの解明を目的に遺伝子バンクの構築を継続して実施している。収集された 209 例の臨床情報のとりまとめを行ったところ、めまいの合併では重症例が多いこと、耳鳴の合併例では難聴の程度が軽度であり、改善率が高いことが示された。

今回の予備的検討により、臨床情報調査として本データベースの有用性が確認された。今後の継続により更なるサンプルの収集と臨床情報の収集がおこなわれることでさらなる成果が期待できる。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

なし



図1 めまいの有無と聴力像

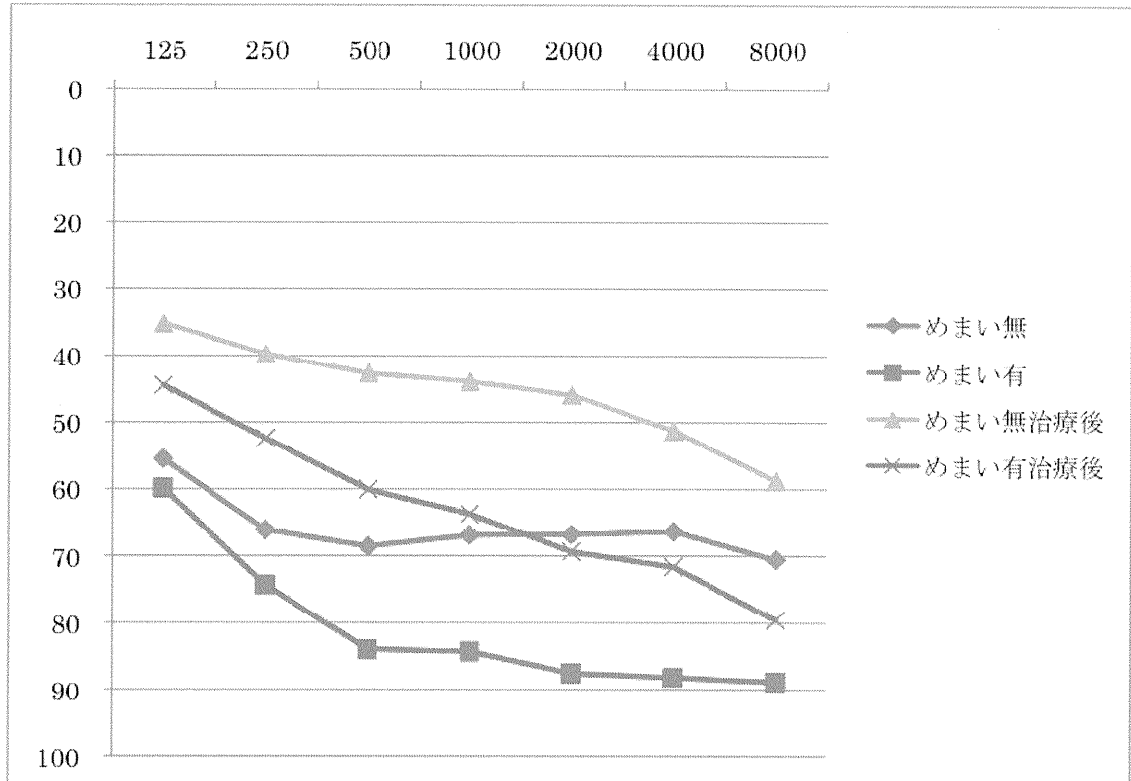
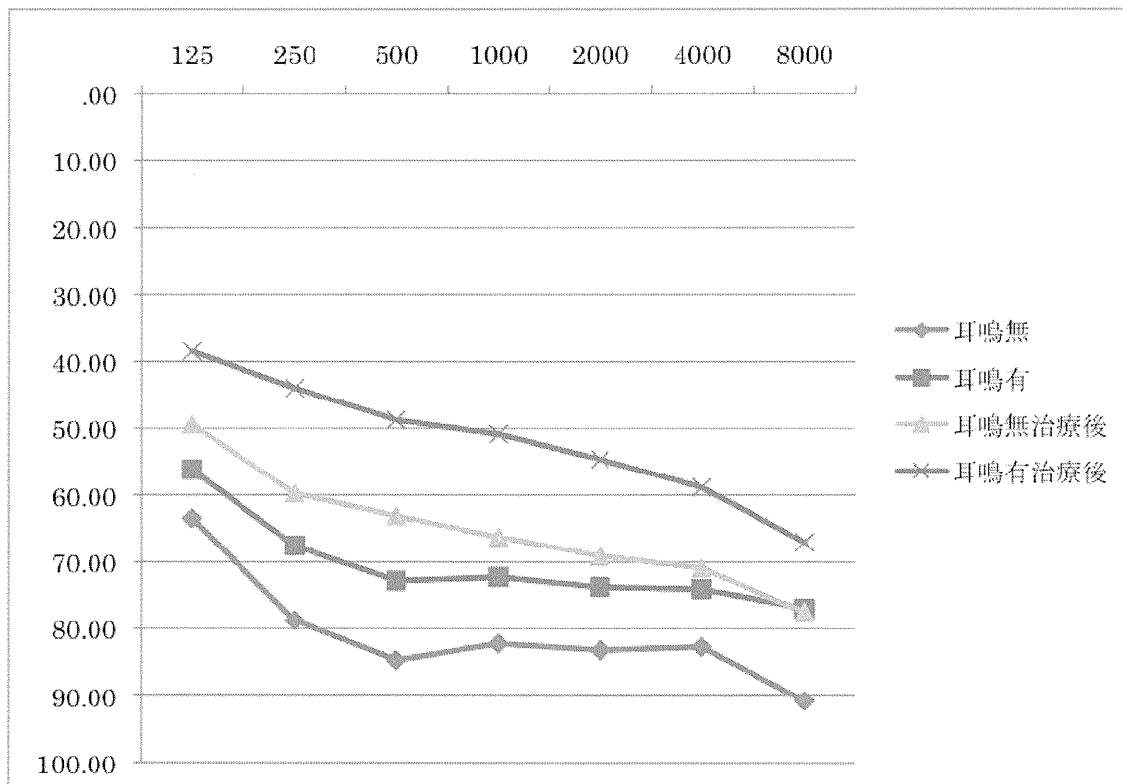


図2 耳鳴の有無と聴力像



## 老人性難聴における Sirt3 遺伝子多型の検索

分担研究者： 佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者： 大塚尚志（岩手医科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者： 嶋本記里人（岩手医科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者： 桑島 秀（岩手医科大学耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

160 名（老人性難聴者 78 名、健聴高齢者 82 名）を対象とし Sirt3 遺伝子の SNPs 解析を行った。Sirt3 の 13 か所の SNPs について解析した。その結果、3 SNPs (rs12226402, rs12226687, rs4758633) が老人性難聴に有意に多いことが分かった。

### 研究目的

Sirt3 遺伝子多型の聴力との関連について、65 歳以上の難聴者と健聴者を対象に Sirt3 遺伝子多型を解析し、特異的な遺伝子多型の検討を行った。

### 研究方法

65 歳以上の高齢者、男性 67 名、女性 93 名、計 160 名、平均年齢 75.8 歳（65-92 歳）を対象として、聴力検査、ならびに末梢血液検体から遺伝子を抽出し解析した。

（倫理面への配慮）

岩手医科大学倫理委員会の承認を得た文書を用い、本研究に同意を得られた方を対象とした。

### 研究結果

健聴群に比し難聴群に有意に多く認められた Sirt3 遺伝子多型は 3 か所認められた (rs12226402, rs12226697, rs4758633)。また既存のミトコンドリア遺伝子データを含めて解析したところ、重回帰分析、多重ロジスティック解析にて、高音部領域で Sirt3 遺伝子多型の 1 つに、また低音部領域ではミトコ

ンドリア遺伝子の A3434G と 961insC に統計学的に有意差を認めた。

### 結論

本研究は初めてヒトにおける老人性難聴と Sirt3 遺伝子多型を検索したものである。Sirt3 遺伝子の rs4758633 多型が高音域の聴力障害と関連していることが示唆された。

### 考察

今回我々は老人性難聴者において Sirt3 遺伝子多型を検出した (rs12226402, rs12226687, rs4758633)。その中で rs12226402 と rs12226687 はコード領域に位置し、また Sirt3 遺伝子の先端部に存在するため、Sirt3 遺伝子のメチル化および活性化に関連する可能性が考えられた。

一方、臨床像を併せた解析では、重回帰分析、多重ロジスティック解析にて Sirt3 遺伝子の rs4758633 に統計学的有意差を認めた。このことは野生型の rs4758633 症例では有意に高音部聴力閾値の上昇がみられることを示唆し、変異型では閾値上昇を抑

制する働きがある可能性が考えられた。また低音部領域では、ミトコンドリア遺伝子の 961insC と A3434G に有意差を認め、水平型、山型の難聴と関連する可能性が考えられた。

## 結論

本報告は初めてヒトにおける老人性難聴と Sirt3 関連遺伝子多型を検索した研究である。Sirt3 遺伝子の rs4758633 多型が高音域の聴力障害と関連していることが示唆された。

## 研究発表健康危険情報

なし

## 研究発表

### 1. 論文発表

1 ) Shimamoto K, Ohtsuka H, Nakayashiki N: Sequence variation at position 961 of the mitochondrial 12S rRNA gene in patients with presbycusis. Iwate Med Assoc 63(5):263-269, 2011

### 2. 学会発表

1) Ohtsuka H, Shimamoto, K Shiga K, Sato H: Polymorphic analysis of Sirt3 gene in Presbycusis. 2011. The 8th Asia pacific symposium on cochlear implant and related sciences, Daegu, Korea.

2) Shimamoto K, Ohtsuka H, Sato H: Sequence variation at position 961 of the mitochondrial 12SrRNA gene in patients with presbycusis. The 8<sup>th</sup> Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences, Daegu, Korea, October 25-28, 2011

## 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 |