



24 歳 女性 コントロール

## 突発性難聴例の描出率

Patient No.	Age, y/sex	Affected Ear	Hearing Level, dB		Outcome	Days from Onset for MRI	Depiction of LA		Cardiovascular RFs			Alcohol Consumption
			Initial,R/L	Final,R/L			Gd(-),R/L	Gd(+),R/L	HT	HL	DM	
1	25/F	L	11/45	2/23	PR	18	+/+	+/+	-	-	-	No description
2	63/M	L	20/76	16/65	PR	10	+/+	+/+	+	-	-	I drink/wk
3	25/F	R	106/14	70/14	PR	44	+/+	+/+	-	-	-	No description
4	36/F	R	103/4	59/2	PR	15	+/+	+/+	-	-	-	1-5 drinks/wk
5	56/F	R	111/12	72/11	PR	28	+/+	+/+	+	-	-	I drink/wk
6	67/M	L	12/100	6/11	CR	14	+/+	+/+	-	-	-	>5 drinks/wk
7	34/M	L	10/75	2/11	CR	15	+/+	+/+	-	-	-	1-5 drinks/wk
8	65/F	L	21/111	16/77	PR	35	+/+	+/+	-	-	-	No description
9	25/M	R	48/19	17/13	CR	50	+/+	+/+	-	-	-	1-5 drinks/wk
10	64/M	R	110/22	56/21	PR	30	+/+	+/+	-	-	-	>5 drinks/wk
11	63/F	L	17/53	10/21	PR	21	+/+	+/+	-	-	-	I drink/wk
12	64/F	L	19/55	20/30	CR	7	+/+	+/+	+	+	-	I drink/wk
13	68/F	R	87/53	59/54	CR	23	+/+	+/+	-	-	-	I drink/wk
14	75/M	L	28/74	29/74	NR	39	+/+	+/+	+	-	+	1-5 drinks/wk
15	62/F	R	71/11	15/13	CR	3	+/+	+/+	-	-	-	>5 drinks/wk
16	61/M	L	29/92	32/48	PR	7	+/+	+/+	-	-	-	>5 drinks/wk
17	64/M	L	26/80	23/21	CR	7	+/+	+/+	-	-	+	>5 drinks/wk
18	41/M	L	12/24	10/17	CR	54	+/+	+/+	-	-	-	I drink/wk

## インシュリン様細胞増殖因子 1 (IGF-1) による虚血性内耳障害の防御効果

分担研究者：暁 清文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

共同研究者：藤原崇志 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

共同研究者：高木太郎 (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

一過性内耳虚血を負荷したスナネズミにインシュリン様細胞増殖因子 1 (IGF-1) を投与し、その内耳障害防御効果を検証した。IGF-1 を含浸させたゼラチンハイドロゲルを用意し、虚血負荷 30 分後に正円窓上に留置したところ、IGF-1 投与群ではコントロール群と比べ ABR の閾値上昇は有意に抑制され、組織学的にも内有毛細胞の脱落は軽微であった。この結果から、IGF-1 を含浸させたハイドロゲルの局所投与は虚血による急性内耳障害の防御に有効であると結論した。

### A 研究目的

インシュリン様細胞増殖因子 1 (IGF-1) はソマトメジン C と呼ばれる 70 個のアミノ酸からなる単鎖ポリペプチドで、アミノ酸配列がインスリンと極めて類似した細胞増殖因子である。IGF-1 は growth hormone による刺激で主に肝臓で産生されるが、内耳を含め生体のほぼ全ての細胞がレセプターを有し、内耳においては発生過程のみならず、生後も内耳の保護・再生誘導など重要な役割を担っている。

今回、一過性内耳虚血による内耳障害に対する IGF-1 の内耳保護効果について、動物モデル (スナネズミ) を用いて検討を行った。

### B 研究方法

#### 1. 実験動物

実験動物には生後 12~24 週、体重 60~80g の雄のスナネズミ 12 匹 (IGF-1 投与群 6 匹、コントロール群 6 匹) を用いた。一過性内耳虚血の誘導は、全身麻酔後、15 分間の両側椎骨動脈の血流遮断を行うことで負荷した。

#### 2. IGF-1 の投与

IGF-1 は生体内で迅速に代謝され失効するため、ゼラチンハイドロゲルに含浸させて投与することにした。ソマゾン注射液 (アステラス製薬) 10mg を生食 1 ml に溶解しておく。IGF-1 溶液 10  $\mu$ l をゼラチンハイドロゲル 1 mg に添加し、虚血 30 分後にこれをスナネズミの正円窓上に乳突洞経由で投与した。コントロール群は IGF-1 の代わりに生食をゼラチンハイドロゲルに含浸させて投与した。

#### 3. ABR の測定、組織学的評価

ABR は虚血前、虚血 1 日後、4 日後、7 日後に測定した。刺激音には 8kHz のトーンバーストを用い、10dB ステップで刺激音圧を変化させた。閾値付近では 5dB ステップで変化させ、聴力閾値を求めた。反応波形の加算は 300 回とした。虚血 7 日後に断頭し、速やかに蝸牛骨胞を摘出した。4%パラホルムアルデヒドで局所還流固定を行い、surface preparation にて基底回転のコルチ器を採取して Rhodamine-phalloidin 染色および Hoechst 33342 染色を行い、内有毛細胞の脱落程度を評価した。なお、上記研究 1~3 は愛媛大学動物

実験規則に則り行った。

## C 研究結果

### 1. ABR 閾値の変化

図1に虚血前後のABR閾値の経時的推移を示す。コントロール群では虚血1日目に50dB近くにまで閾値は上昇したが、IGF-1投与群では閾値上昇は25dB程度に抑制され、その効果は虚血4日目、7日目でも認められた。

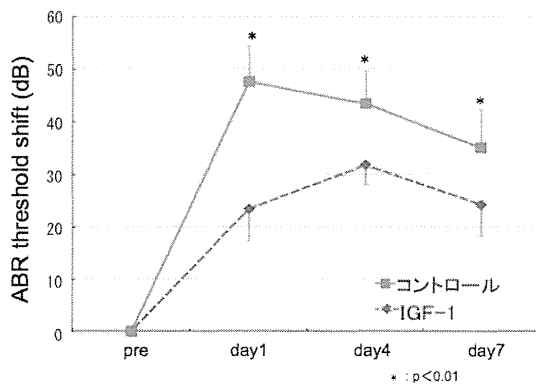
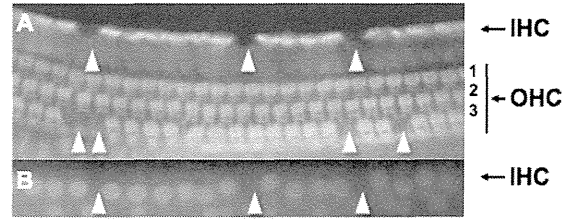


図1. ABR 閾値の経時的推移

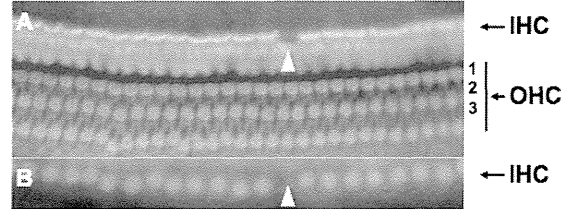
### 2. 内毛細胞の脱落

組織学的検査では、コントロール群に比し、IGF-1投与群では内毛細胞の脱落が顕著に抑制されていた。図2にその代表例の組織像を提示するが、細胞骨格が染色されるRhodamine-phalloidin染色(図2A)でも、核が染色されるHoechst 33342染色(図2B)でも、IGF-1投与群では内毛細胞の脱落はコントロール群と比べ軽微であることが分かる。

## Control



## IGF-1



A: Rhodamine-phalloidin染色, B: Hoechst 33342染色  
IHC: Inner hair cell, OHC: Outer hair cell

図2. 内耳の組織像

矢印は脱落した内毛細胞を示す。

## D 考察

本研究の結果、IGF-1には虚血性内耳障害の防御効果があることが確認された。IGF-1は既に市販薬として入手が可能であり、将来的には内耳の再生、治療への臨床応用が容易にできると考えられる。ゼラチンハイドロゲルを用いたIGF-1による突発性難聴の治療は、京都大学を中心に多施設共同ランダム化比較試験(RCT)が行われている。このRCTの中で、愛媛大学でも9例[IGF-1群:4名、コントロール群(デキサメサゾン鼓室内注入):5名]を対象に治験を行ったが、聴力の改善はIGF-1群の方がコントロール群と比べ良好であった。現在、京都大学で各施設のデータを取りまとめ解析中である。今後、このRTCの結果をふまえ、ゼラチンハイドロゲルを活用した薬剤徐放メカニズムの解明や薬効を延長するための工夫、IGF-1の効率的投与方法など基礎研究を進める予定である。

## E 結論

一過性内耳虚血の30分後にゼラチンハイドロゲルを用いてIGF-1を正円窓上に投与したところ、ABR 閾値の改善や内有毛細胞の脱落抑制が認められた。

## 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

なし

## H 知的財産権の出願・登録状況

特許所得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

## レーザーマイクロダイゼクション法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋保存側頭骨切片内 内耳細胞における mRNA 発現解析

分担研究者：喜多村 健（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：木村百合香（地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター耳鼻咽喉科）

共同研究者：久保幸穂（地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所）

共同研究者：古宇田寛子（保健医療公社大久保病院耳鼻咽喉科）

共同研究者：重本和弘（地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所）

共同研究者：沢辺元司（東京医科歯科大学保健衛生学科）

### 研究要旨

ヒト保存側頭骨からの内耳病変の分子生物学的解析には、内耳の解剖学的特性、長期にわたる固定と脱灰のため様々な障壁が存在する。しかしながら、耳科疾患の解明にはヒト内耳病態の分子病理学的解析が必要不可欠である。そこで我々はレーザーマイクロダイゼクション法（以下 LMD 法と略す）を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト内耳切片から外有毛細胞、らせん神経節細胞、血管条、らせん神経節を単離し、mRNA を抽出した。RT-PCR 法の結果、らせん靭帯と血管条における COCH が、外有毛細胞における SLC26A5 の mRNA 発現の局在が同定された。長期の脱灰・固定の影響により、COCH mRNA の最大塩基長は、98 bp~123 bp と細断されていた。本法の導入は、ヒト内耳病態の解明に有用であると考えられる。

### A 研究目的

マウスを始めとした実験動物による内耳病態の分子生物学的研究は、聴覚障害を生じる遺伝子を特定するなど、大きな成果をもたらしている。一方、ヒト保存側頭骨からの内耳病変の分子生物学的解析には、硬組織に囲まれたなかで高度に機能分化する内耳の解剖学的特性により、長期にわたる固定と脱灰を要することから、困難であるとされてきた。しかし、ヒト内耳病態の解明には、ヒトでの分子病理学的解析も必要不可欠である。そこで、本研究では、ヒト保存側頭骨標本における retrospective な分子病理学的解析方法の開発を目的とし、LMD 法により、ヒト内耳より機能単位別に組織を採取し、mRNA 発現の局在を同定する手法の開発を行う。

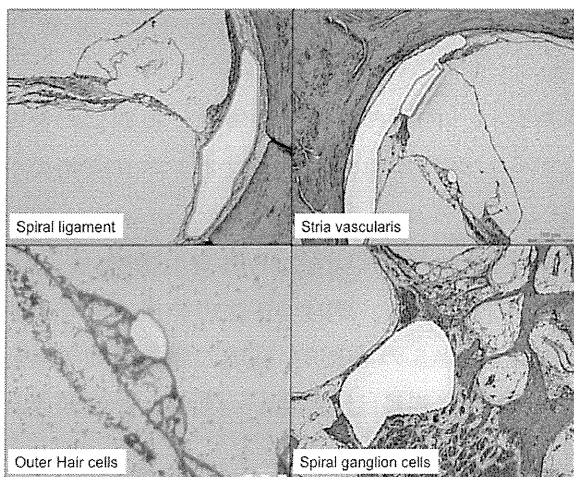
### B 研究方法

3 症例（平均 70.7 歳）のホルマリン固定パラフィン包埋側頭骨蝸牛軸切片を使用した。ホルマリン固定は 12-20 ヶ月、EDTA 脱灰に 6-9 ヶ月を要した。これらの切片より、LMD 法を用いてらせん靭帯、外有毛細胞、らせん神経節細胞と血管条を分離した。High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics) を用いて RNA を抽出し、クエン酸緩衝液(pH4.0)に熱処理を行い、ホルマリン修飾の解除を試みた。得られた RNA を用いて、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH、内耳に多く発現する cochlin をコードする COCH、外有毛細胞の motor protein である prestin をコードする SLC26A5 を semi-nested RT PCR 法で増幅し、

電気泳動法でバンドを同定した。さらに、微小サンプルにおける mRNA 検出の限界を明らかにする目的で、COCH mRNA の semi-nested PCR を 98~180 bp の塩基長で施行し、同定可能な塩基長の上限を検討した。

### C 研究結果

下図のごとく、LMD 法を用いてらせん靭帯、外有毛細胞、血管条、らせん神経節細胞を分離した。



semi-nested RT-PCR の結果は、GAPDH の発現は各組織に認められた一方、COCH はらせん靭帯、血管条に、SLC26A5 は外有毛細胞に発現が認められた。

mRNA の保存塩基長の検討では、1 例が 98bp, 2 例が 123bp まで検出が可能であった。

### D 考察

LMD 法は近年分子腫瘍学や分子神経病理学において、組織切片より顕微鏡下にレーザーにより細胞・組織を切離・採取し、得られた検体より DNA 変異や mRNA 発現を同定するのに有用なツールとして普及しつつある手法である。

内耳組織は細胞レベルで機能が高度に分化しており、LMD 法による細胞レベルでの核酸解析は有用であることが予測されていたが、

ヒト側頭骨病理組織切片の作成は、その解剖学的特性から長期の脱灰・固定を要することから、分子レベルでの変性が進み、LMD の導入に関しては方法論が議論されている段階であった。

これまでの FFPE 標本からの mRNA 解析法は、特殊処理をした標本であり、すべての標本に適応しうるものではなかったが、今回の報告では、通常のヒト保存側頭骨標本より、mRNA を抽出し、semi-nested RT-PCR 法による GAPDH, COCH, SLC26A5 mRNA の局在の同定が可能であった。

本法は、生前の聴覚プロフィール症例の保存側頭骨標本において、分子病理学的検討が出来る可能性があり、ヒト側頭骨分子病理学解析法の新たなスタンダードとなりうる。

### E 結論

我々は LMD 法によりらせん靭帯・血管条・外有毛細胞・らせん神経節細胞を採取し、GAPDH, COCH, SLC26A5 mRNA の局在の同定が可能であった。

ヒト保存側頭骨切片からも LMD 法による細胞レベルでの mRNA 解析が可能であり、今後のヒト側頭骨病理学における非常に有用な解析法となりうる。

### F 健康危険情報

保存組織切片を使用した病理学研究であるため、健康への被害は生じ得ない。

### G 研究発表

#### 1. 論文発表

Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K, Sawabe M, Kitamura K.

RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival human temporal bone section using

laser microdissection--a technical report.

Hear Res. 2013;302:26-31.

2. 学会発表

Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K,  
Sawabe M, Kitamura K.

Gene expression analysis of inner ear cells  
from formalin fixed paraffin embedded  
archival temporal bone section using laser  
microdissection

The First Asian Otology Meeting & The 3rd  
East Asian Symposium on Otology in  
Nagasaki, Japan, 2012.

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 薬剤による急性内耳障害におけるスフィンゴ脂質の関与

分担研究者：原 晃（筑波大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：田淵 経司（筑波大学耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

耳毒性物質による急性内耳障害に対する各種スフィンゴ脂質の効果について検討した。セラミド、スフィンゴシンは内耳障害を増悪し、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は内耳障害を軽減した。

#### A 研究目的

アミノグリコシド系抗菌薬、シスプラチン等の抗腫瘍薬は現在臨床的に広く使用されているが、その使用にあたっては内耳障害が問題となる。本研究では耳毒性物質による蝸牛有毛細胞障害に対するセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の関与を検討した。

#### B 研究方法

幼若ラットより蝸牛コルチ器を摘出し、インキュベータ内で器官培養を行った。ゲンタマイシン、シスプラチンを負荷することで、蝸牛有毛細胞障害を惹起した。

#### C 研究結果

セラミド、スフィンゴシンは有毛細胞障害を増悪し、S1P は障害を軽減した。スフィンゴシンキナーゼ阻害薬によっても、本障害が増悪された。S1P 受容体 (S1PR) の検討ではコルチ器には S1PR1、2、3 の発現が確認され、S1PR2 阻害薬によりゲンタマイシンによる有毛細胞障害が増悪された。また、ゲンタマイシンはスフィンゴミエリナーゼを活性化し、スフィンゴミエリナーゼ阻害薬投与により、ゲンタマイシンによる有毛細胞障害が軽減された。

#### D 考察

内耳におけるセラミド、スフィンゴシン、S1P のバランスが、耳毒性物質による内耳障害において重要であること、スフィンゴミエリナーゼにより内耳におけるセラミドは産生され、S1P の内耳保護効果は S1PR2 を介することが示唆された。

#### E 結論

耳毒性物質による蝸牛有毛細胞障害に対し、セラミド、スフィンゴシンは障害を増悪し、S1P は障害を軽減した。

#### F 健康危険情報

#### G 研究発表

Nakayama M, Tabuchi K, Hara A: The influence of sphingosine-1-phosphate receptor antagonists on gentamicin-induced hair cell loss of the rat cochlea.

Neuroscience Letters. 561, 91-95, 2014.

#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし



内リンパ嚢閉塞術と抗利尿ホルモン V2 作動薬によるメニエール病モデル動物の DPOAE に関する研究

研究分担者 山嵜 達也 東京大学耳鼻咽喉科教授  
研究協力者 柿木 章伸 東京大学耳鼻咽喉科講師

### 研究要旨

近年メニエール病の発症に抗利尿ホルモンの関与を示唆する報告がなされている。臨床的にはメニエール病患者の血漿抗利尿ホルモン値は上昇しており、動物実験では抗利尿ホルモンの投与により内リンパ水腫が形成されることが報告されている。われわれはこれまでに、内リンパ嚢閉塞術と抗利尿ホルモン V2 作動薬であるデスマプレシンを投与し、めまい発作を誘発するメニエール病モデル動物の作製に成功した。このメニエール病モデル動物の聴覚障害の有無に関し DPOAE を指標に検討した。抗利尿ホルモン V2 作用は DPOAE の出力を低下させた。特に、内リンパ嚢閉塞術後にデスマプレシンを投与すると、より高度の聴力障害を認めた。この結果は、メニエール病の発作における難聴の発現に、内リンパ嚢の機能低下と抗利尿ホルモンが関与していることを示唆している。

#### A. 研究目的

近年、メニエール病の発症に抗利尿ホルモンの関与を示唆する報告がなされている。臨床的にはメニエール病患者の血漿抗利尿ホルモン値は上昇しており、動物実験では抗利尿ホルモンの投与により内リンパ水腫が形成されることが報告されている。われわれはこれまでに、内リンパ嚢閉塞術と抗利尿ホルモン V2 作動薬であるデスマプレシンを投与し、めまい発作を誘発するメニエール病モデル動物の作製に成功した。今回は、聴覚障害の有無に関し DPOAE を指標に検討したので報告する。

#### B. 研究方法および倫理面への配慮

ハートレー系モルモット 17 匹を使用し、内リンパ嚢閉塞術+デスマプレシン投与群 5 匹、デスマプレシン投与群 7 匹、コントロール群 5 匹を用いた。内リンパ嚢閉塞術+デスマプレシン投与群は、ケタミン、キシラジンの腹腔内投与による全身麻酔下に左内リンパ嚢閉塞術を行い 1 週間飼育した後、全身麻酔下に頸静脈に留置したカテーテルよりデスマプレシン 50 $\mu$ g/kg を

静注した。デスマプレシン群は同様の手技にてデスマプレシン 50 $\mu$ g/kg を静注した。コントロール群は同様の手技にて同量のリンゲル液を静注した。DPOAE は静注直前、および静注後 5 分毎に 60-120 分間測定した。刺激音は、 $f_2/f_1 = 1.22$   $f_1 = 65$ dB SPL、 $f_2 = 55$ dB SPL、 $f_2$  を 0.5-16 kHz とし 4 点/1 オクターブの 21 周波数で測定した。各周波数における出力変化を Tukey 法にて比較し、有意水準 5% 未満を有意差ありとした。

#### C. 研究結果

図に  $f_2$  を横軸に各周波数の出力の時間経過を示す。コントロール群では、いずれの周波数においても DPOAE の出力に有意の変化を認めなかった。デスマプレシン投与群では 4、5、16kHz において静注後 5 分に有意に DPOAE の出力が低下した。この変化は一過性であり、直ちに前値に回復している。他の周波数では、DPOAE の出力に有意の変化を認めなかった。内リンパ嚢閉塞術+デスマプレシン投与群では術前と比較してモルモットにとって比較的低音と考えら

れる周波数域において有意に DPOAE の出力が低下した。この変化は最低 120 分間持続した。

#### D. 考察

デスマプレシン投与群の結果は、これまで我々が報告してきた抗利尿ホルモン投与による血管条浮腫や自発眼振の誘発が一過性であることと矛盾せず、組織学的には抗利尿ホルモン投与後 60 分経過した側頭骨組織標本では内リンパ水腫を認めないとする我々の過去の結果とも矛盾しないものであった。内リンパ嚢閉塞術+デスマプレシン投与群の結果は、内リンパ嚢機能障害を持つ動物にデスマプレシンを投与することにより、デスマプレシン単独投与と比べ、より強い傷害が内耳に引き起こされることを意味している。我々はこのメニエール病モデル動物の前庭機能障害は約 1 時間で回復することを以前報告したが、今回の結果から蝸牛障害の方がより長く持続すると考えられる。

#### E. 結論

今回の結果から、抗利尿ホルモン V2 作用はメニエール病の発作における難聴の発現に関与していることが示唆された。さらに、内リンパ嚢機能障害に抗利尿ホルモン V2 作用が加わることにより、より強い傷害が内耳に引き起こされた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

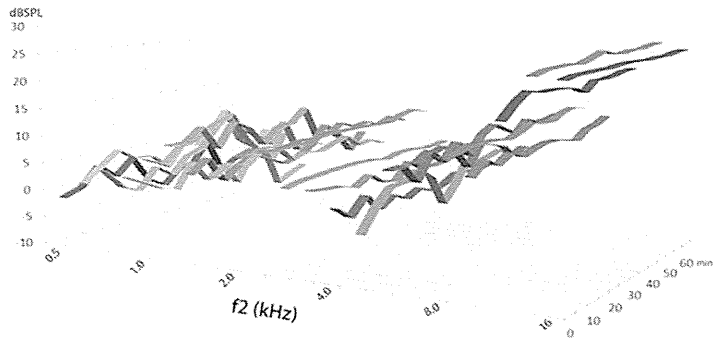
#### G. 研究発表

柿木章伸、山嵜達也. 内リンパ嚢閉塞術と抗利尿ホルモン V2 作動薬によるメニエール病モデル動物の DPOAE (第 1 報). 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会. 2013.10.24-25.

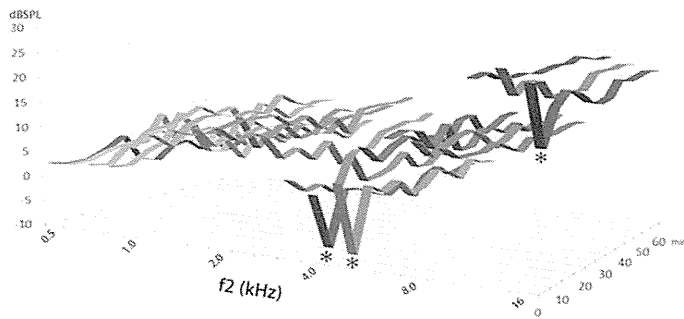
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

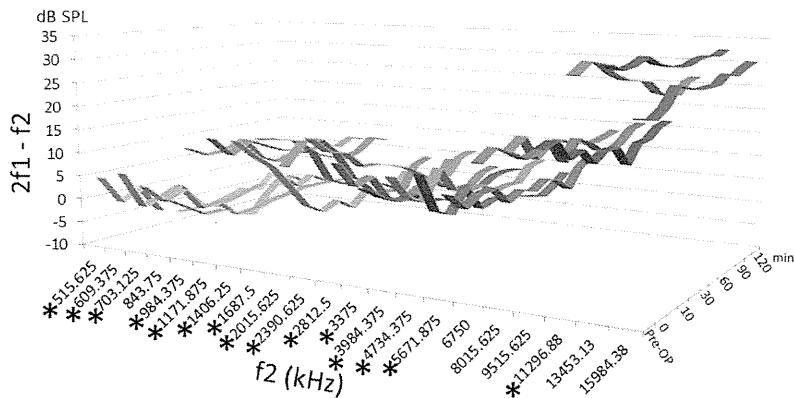
コントロール群



デスマプレシン投与群



内リンパ嚢閉塞+デスマプレシン投与群



図の説明

コントロール群(n=5)、デスマプレシン群(n=7)、内リンパ嚢閉塞術+デスマプレシン投与群 (n=5) における各周波数の出力の時間経過。

(\* :  $p < 0.05$ , Tukey 法)

## 細胞接着分子カドヘリン 11 ミュータントマウスの聴力像および側頭骨所見

研究分担者：山嵜 達也 東京大学耳鼻咽喉科教授  
研究協力者：吉川 弥生 東京大学耳鼻咽喉科臨床支援医  
木下 淳 東京大学耳鼻咽喉科大学院生  
松本 有 東京大学耳鼻咽喉科助教

### 研究要旨

カドヘリンファミリーに属する蛋白カドヘリン 11 の遺伝子改変マウス (Cad11<sup>-/-</sup>マウス) について、聴力像および側頭骨組織の解析を行った。聴力検査を行なったところ、Cad11<sup>-/-</sup>マウスでは 20-40 dB 程度の聴性脳幹反応 (ABR) 閾値上昇および歪成分耳音響放射(DPOAE) 反応の減弱・消失が観測され、中程度の難聴があることが判明した。組織解析では光学および電子顕微鏡による解析を行ったが内耳には異常は認められず、中耳の発達異常・間葉組織残存に伴う含気化の遅れが見出された。

Cad11<sup>-/-</sup>マウスはこれまで詳細が不明であった伝音性難聴や中耳奇形の原因解明のための有望なマウスモデルになり得ると考えられる。

### A 研究目的

Cadherin 11 はカドヘリンファミリーのメンバーであり、成体において海馬や扁桃体など辺縁系を含む多くの脳部位に発現する細胞接着分子である。この分子は、発生期においても、体節や間葉細胞に発現が見られることから、各種神経機能の発現に関与していることが示唆される (Kimura 1995)。本分子の機能の更なる解明を目的として、カドヘリン遺伝子欠損 (Cad11<sup>-/-</sup>) マウスを作成し一連の行動実験を行なったところ、Cad11<sup>-/-</sup>マウスでは、驚愕反応 (ASR) が顕著に減弱していた。しかし、反応の潜時には差がなかったことから、ASR を引き起こす神経回路自体は正常であると考えられた (Manabe 2000)。

カドヘリンファミリーに属する蛋白は Cadherin 23 や Protocadherin 15 などが内耳の様々な部位で聴機能の発現に関与しており、難聴は ASR の減弱の原因のひとつになり得ることから、われわれはこのミュータントマウスの聴力像および側頭骨所見の解析を行った。

### B 研究方法

カドヘリン遺伝子欠損 (Cad11<sup>-/-</sup>) マウスの聴力像を検討するため、生後 2 週齢および成体での聴性脳幹反応 (ABR) 閾値上昇および歪成分耳音響放射(DPOAE)を計測した。対照群として同腹の

野生型マウスを使用した。

側頭骨組織解析には、HE 染色を用いた中耳・内耳の光学顕微鏡観察、オスミウム染色を用いた透過型電子顕微鏡観察、金染色を用いた走査型電子顕微鏡観察、ファロイジン染色を用いた培養蝸牛観察、マイクロ CT を用いた側頭骨 3 次元再構成を使用した。

### C 研究結果

Cad11<sup>-/-</sup>マウスの聴力検査を行なったところ、本マウスでは 20-40 dB 程度の聴性脳幹反応 (ABR) 閾値上昇および歪成分耳音響放射(DPOAE) 反応の減弱・消失が観測され、中程度の難聴があることがわかった。この聴覚障害の原因を解明するために、中・内耳における組織学的解析とマイクロ CT による画像解析を行なったところ、Cad11<sup>-/-</sup>マウスでは内耳異常は認められず、中耳に mesenchymal cell (間葉系細胞) が多く残存して中耳容積が減少し、中耳の含気化が遅れている個体が見出され、これが中等度難聴の原因である可能性が示唆された。

### D 考察

RNA *in situ* hybridization 検査では、Cad11 は中耳含気化前の間葉系細胞に発現が認められた。Cad11<sup>-/-</sup>マウスは頭部・顎の短縮などの顔面奇形を

併発しているが(図)、過去の報告で Cad11 はアフリカ爪が得るの神経堤細胞の遊走に関与していることが知られており、本マウスでも Cad11 機能の消失によって神経堤細胞が正常な位置に移動できないために一連の頭部奇形が起きたものと考えられた。

#### E 結論

Cad11-/-マウスの聴力検査を行なったところ、中程度の難聴があることがわかった。組織解析では中耳の発達異常・含気化の遅れが見出されたが内耳には異常は認められなかった。

Cad11-/-マウスはこれまで詳細が不明であった伝音性難聴や中耳奇形の原因解明のための有望なマウスモデルになり得ると考えられる。

(本研究は東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野 真鍋俊也教授、城山優治博士との共同研究である。)

#### F 健康危険情報

該当せず

#### G 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

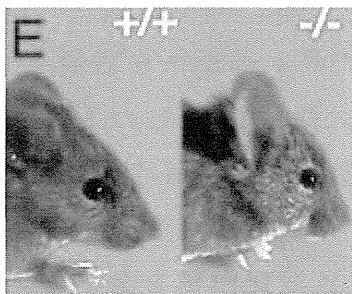
・吉川弥生、木下淳、松本有、山唄達也「細胞接着分子カドヘリン 11 は中耳の正常な発達に必須である」

第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 2013 年 11 月 24 日(日)～26 日 宮崎市

#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし

(付図) Manabe et al. *Molecular and Cellular*



*Neuroscience* 15,  
534-546 (2000)  
より

## 骨髓幹細胞の静脈内投与による虚血性内耳障害の治療-その①

分担研究者：暁 清文（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：高木太郎（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：羽藤直人（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：白馬伸洋（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：岡田昌浩（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

### 研究要旨

一過性内耳虚血を負荷したスナネズミに骨髓幹細胞（造血幹細胞）を投与し、その内耳障害防御効果を検証した。虚血直後に骨髓幹細胞を投与した動物（投与群）では、投与しなかった動物（コントロール群）に比べ、虚血による ABR 閾値上昇は軽微であった。組織学的にも内有毛細胞の脱落率は投与群ではコントロール群と比べ有意に抑制されていた。投与した骨髓幹細胞は modiolus の血管内やその周辺で認められた。ウエスタンブロット法で神経栄養因子の有無を探索したところ、投与群では栄養因子蛋白の発現が亢進していた。以上の結果から、幹細胞より分泌された神経栄養因子が内耳障害の抑制に働いたものと考えられた。

#### A. はじめに

末梢血中の骨髓由来幹細胞（CD34 陽性細胞）は、造血系細胞の起源であるだけでなく、①虚血障害部位で血管新生因子を放出する、②障害された血管内皮を修復する、などの効果がある。したがって、この細胞が減少すると血管新生が妨げられるので、一過性虚血後は脳機能や神経機能は低下する。このことは動物実験で、中大脳動脈閉塞後、骨髓由来幹細胞を静注すると虚血性脳萎縮が防御されることで証明されている。今回、一過性内耳虚血の動物モデルに同種大腿骨および脛骨から抽出した骨髓由来幹細胞

を静注し、その聴力および内耳組織への影響を検討したので報告する。

当科ではこれまでにスナネズミに一過性内耳虚血を負荷して難聴を惹起し、これに骨髓幹細胞を蝸牛内投与の効果を検証したことがある。その結果、一過性虚血は内耳にアポトーシスを誘導し、有毛細胞やラセン神経節細胞の変性をきたし、不可逆的な難聴を引き起こす。その際、虚血前に骨髓幹細胞を投与しておくことで、これが神経栄養因子を分泌して内耳障害を防御することを報告した。しかし急性高度難聴患者の治療を考えた場合、骨髓幹細胞の蝸牛への直接投与は

むしろ内耳障害を悪化させる可能性があり、臨床的には問題がある。そこで今回、骨髄幹細胞を静脈に投与し、その効果を ABR や組織学的手法を用いて検討することにした。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

ドナーおよびレシピエントには 8~12 週齢のスナネズミを用いた。レシピエントには全身麻酔下に両側椎骨動脈の血流を 15 分間遮断し、一過性内耳虚血を誘導した。

### 2. 骨髄幹細胞の採取、染色、投与

ドナーから採取した大腿骨および脛骨より、骨髄幹細胞を分離抽出した。一匹あたり約 4 万~5 万個の骨髄細胞が抽出できた。注入後の細胞の局在を容易にする目的で、これを緑色の蛍光色素 PKH67 で染色した。ここまでの操作に要する時間は約 2 時間であった。レシピエントに一過性内耳虚血を負荷した後、直ちに大腿静脈に骨髄幹細胞 (PKH 陽性細胞) を投与した。なお今回の実験は homograft になるが、放射線照射や免疫抑制剤は使用しなかった。

### 3. ABR の測定

ABR は虚血前、虚血 1 日後、4 日後、7 日後に測定した。刺激音は 8kHz、16kHz、32kHz のトーンバーストを用い、300 回の加算を行い、10dB ステップで刺激音圧を変化させた。閾値付近では 5dB ステッ

プで変化させて聴力閾値を求めた。

### 4. 骨髄幹細胞の局在の確認

虚血の負荷後、7 日目に 4%paraformaldehyde (PFA) 液にて全身灌流固定を行い、蝸牛を採取した。採取標本は PFA 液にて浸漬固定後、0.1M EDTA 液で脱灰し、OCT compound に凍結包埋を行った。これをクライオスタットにて薄切し 10  $\mu$ m の切片を作製し、緑色の蛍光色素 PKH67 で染色した幹細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

### 5. 組織学的検討

虚血 7 日目に ABR 測定後、蝸牛を採取した。前庭窓、蝸牛窓、蝸牛頂に設けた小孔より 4%PFA 液にて局所灌流固定を行った後、surface preparation 法にてコルチ器を取り出した。基底回転を摘出し、Rhodamine-phalloidin、Hoechst33342 による二重染色を行い、光学顕微鏡で観察し、有毛細胞の脱落割合を算出した。

### 6. ウェスタンブロット解析

虚血 7 日後に蝸牛を摘出してウェスタンブロット解析を行い、投与群と control 群で比較検討した。摘出した蝸牛を細片化し、超音波破碎を行ってホモジナイズした後、遠心分離で得られた上清の可溶性蛋白質をサンプルとした。これを一次抗体である抗 GDNF、抗 BDNF、抗 VEGF、抗 FGF2、抗 NT-3、抗 Ang-1 と反応させ、二次抗体以後は ECL Western blotting Kit を用いて処理し、神経栄養

因子の発現量を比較検討した。

### C. 結果

#### 1. ABR 閾値の変化 (図 1)

図 1 に虚血前後の ABR 閾値の経時的推移を示す。虚血後、ABR 閾値は著明に上昇するが、7 日目には 33dB 程度にまで改善した。閾値の上昇は高音域ほど高度であった。ABR 閾値の変化は投与群とコントロール群で投与 1 日目と 4 日目に統計学的に有意差がみられたが ( $p < 0.05$ )、7 日目には有意差はなかった。

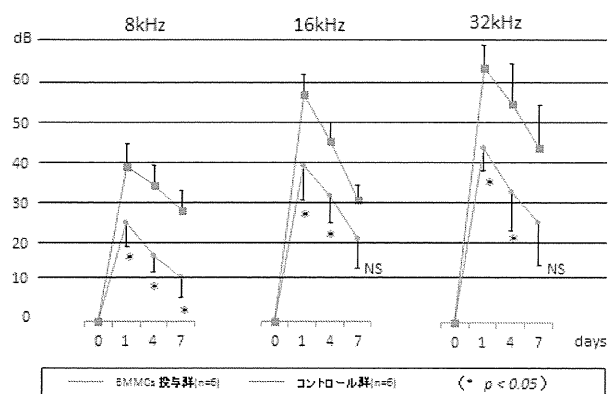


図 1 ABR 閾値の経時的推移

#### 2. 骨髄幹細胞の局在 (図 2 a, b)

採取した蝸牛組織を蛍光顕微鏡で観察すると、PKH67 で緑色に染色された骨髄幹細胞が modiulus の血管内に認められた (図 2a)。また、一部では血管から周囲に浸潤している所見も認められた (図 2b)。

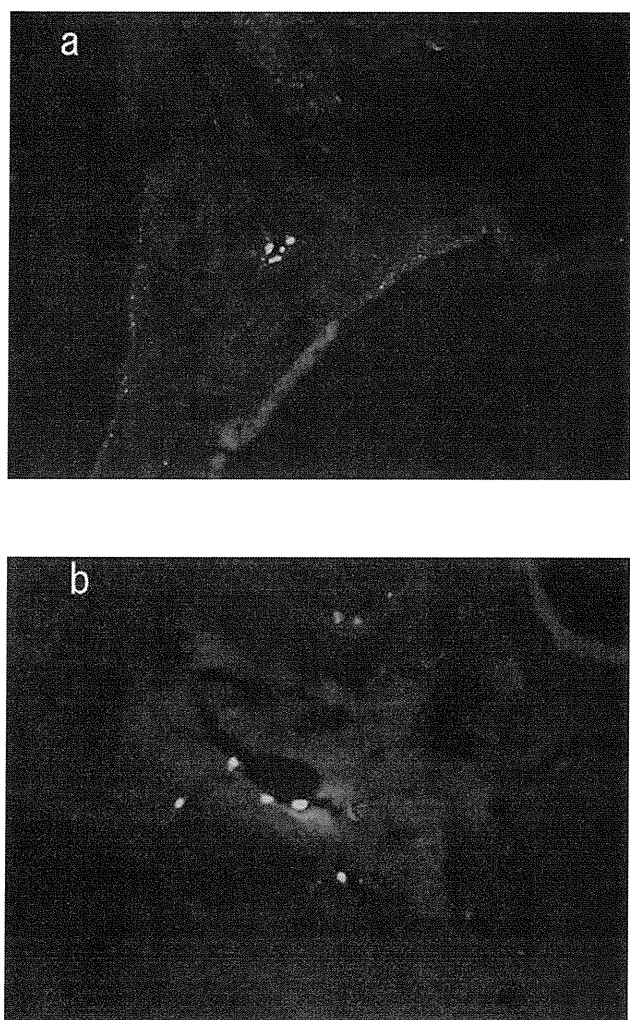


図 2、a、b 骨髄幹細胞の局在

#### 3. 内有毛細胞の脱落割合 (図 3)

幹細胞投与群と control 群において、内有毛細胞の核の消失と聴毛の脱落所見を観察したところ、control 群と比較して幹細胞投与群では内有毛細胞の脱落割合が有意に抑制されていた。



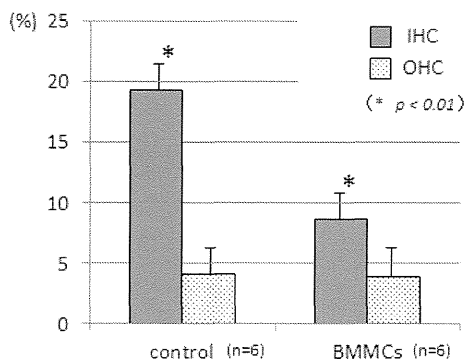


図 3. 有毛細胞の脱落率

#### 4. ウェスタンブロット解析 (図 4)

6 種の栄養因子について蛋白発現を比較した結果、GDNF のみ発現がみとめられ、幹細胞投与群では control 群と比較して強く発現した。

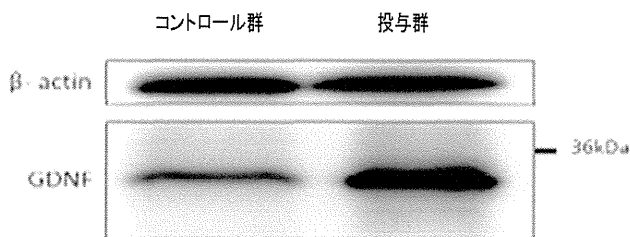


図 4. 神経栄養因子の発現

#### D. 考察

一般に幹細胞は胚性幹細胞 (ES 細胞) と組織特異的幹細胞に分類される。前者は胎児から採取するため倫理的問題があり、臨床研究には適さない。後者は成人では多くの臓器に存在が確認されており、倫理的問題はない。特に骨髄

幹細胞は骨髄より比較的容易に採取・分離ができ、自己組織を用いては倫理面だけでなく移植免疫にも問題がないため、臨床応用に適した細胞といえる。

骨髄幹細胞は自己増殖能と多分化能を持ち、多種多様な組織や臓器になりうる細胞であることから、不可逆的障害を受けた組織・臓器を再生させる効果が期待できる。幹細胞の効果については、内耳前駆細胞や胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた内耳再生の研究が進められ、すでに動物実験段階で一定の成果が報告されている。最近の研究によると、障害局所に投与した幹細胞は、死滅した神経細胞と置き換わり機能を代行するだけでなく、神経栄養因子を分泌して障害進行を制止する効果もあることが分かっている。従って障害急性期に骨髄幹細胞を投与すると、神経栄養因子の合成促進を介して内耳障害防御に働くものと推察される。

今回の実験では虚血直後に骨髄幹細胞の投与を行い、虚血による内耳障害を抑制する効果をもとめた。組織学的にも骨髄幹細胞は内耳に移行しており、虚血時には Blood labyrinthine barrier を通過すると推察された。神経栄養因子 (GDNF) の発現が上昇していたことから、内耳に到達した幹細胞が GDNF を産生し、これが内耳障害の防御に働いたものと考えられた。

## E. 結論

一過性内耳虚血の直後に骨髄幹細胞を静注したところ、ABR 閾値の改善と内毛細胞の脱落抑制が見られた。これは内耳に到達した幹細胞より分泌された神経栄養因子（GDNF）が、内耳障害抑制に働くためと推察された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

未発表

### 2. 学会発表

第 58 回日本聴覚医学会

## 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

なし

## 蝸牛でのステロイド薬理作用の iTRAQ プロテオーム解析

分担研究者：福島邦博（岡山大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：前田幸英（岡山大学耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

急性高度感音難聴の治療薬として用いられるステロイドの鼓室内投与によって、蝸牛局所で発現変動する蛋白質を iTRAQ(isobaric Tags Relative and Absolute Quantification)標識法と質量分析計を用いて 11 種類同定した。さらに急性感音難聴発症、ステロイド全身投与モデルマウスにおいて、ステロイド投与により蝸牛局所で難聴関連蛋白 Myelin protein zero の発現量が増加し、Heat shock protein 70 が減少することを明らかにした。

#### A 研究目的

ステロイドは急性高度難聴の治療薬として広く用いられ、一般にその作用機序は抗炎症作用、免疫抑制作用が中心とされている。動物実験の知見からはこれらの作用以外にも作用機序が存在すると考えられるが詳細は不明である。ステロイド（デキサメタゾン）投与により蝸牛局所で発現が増減する蛋白質を同定し、その機能を考察することによって蝸牛におけるステロイドの作用機序を明らかにし、より適切な急性高度難聴治療戦略の確立を目指す。

#### B 研究方法

雌 C57/BL6 マウスにデキサメタゾン (24mg/ml, n=15) またはコントロール生食 (n=16) を鼓室内局所投与した。内耳から総蛋白を抽出しペプチド鎖とした後、各サンプルを iTRAQ 質量標識した。質量分析計でペプチドを多数同時検出、各サンプル間で定量比較した。

全身投与モデルではマウスを 120dB オクターブバンドノイズに 2 時間暴露して難聴を惹起し、直後にデキサメタゾン(10mg/kg, n=6) またはコントロール生食(n=6)を腹腔内へ全身

投与した。投与後 6 時間、12 時間で内耳を剖出し、ウエスタンブロットで蛋白質の発現量を比較した。

#### C 研究結果

質量分析計では内耳組織から 248 種類の蛋白質が同定され、ステロイド投与により内耳局所で有意に ( $p<0.05$ ) 発現が増減する蛋白質が 11 種類同定された。これらの内、Myelin protein zero (Mpz) と Heat shock protein 70(Hsp70)の発現を全身投与モデルで検討したところ、Mpz は投与後 6 時間で有意に ( $p<0.01$ ) 増加、Hsp70 は投与後 12 時間で有意に ( $p<0.05$ ) 減少していた。

#### D 考察

Mpz はステロイド投与により蝸牛局所で発現が増加する。Human では Mpz の変異は遺伝性ニューロパチー (Charcot-Marie-Tooth 病) に伴う感音難聴を引き起こす。Mpz は神経髓鞘の構成蛋白であるが、ステロイド投与によりその発現量が増加し、聴力改善に個体レベルでの効果をもたらすと考察される。

Hsp70 は自己免疫性難聴の自己抗体である。

ステロイド投与により Hsp70 の発現が低下し、自己免疫性難聴を軽減する機序が存在すると考えられる。

H 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### E 結論

質量分析計とウエスタンブロットを用いて、ステロイド投与により内耳局所で Mpz が増加し、Hsp70 が減少することを示した。

Mpz の増加は、急性高度難聴発症時のステロイド投与の作用機序の一つであり、その効果を支持する。Hsp70 の低下は自己免疫的病因による急性高度難聴のステロイド治療の基礎的根拠である。

#### 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

“ステロイド鼓室内投与の iTRAQ プロテオーム解析”

前田幸英、福島邦博、假谷 伸、  
西崎和則

第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会

平成 25 年 5 月 18 日 札幌市