

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10750

研究課題名(和文)音響外傷性難聴に対するプログラムされたネクローシスによる細胞死制御機構

研究課題名(英文) Mechanism of cell death for programmed necrosis against noise-induced hearing loss

研究代表者

山下 大介 (Yamashita, Daisuke)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：60306785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに強大音響に曝露されることにより、難聴になる動物モデルを作製した。次にその難聴モデル動物において、内耳有毛細胞(聴覚を司る神経細胞)の細胞死(アポトーシ)に至るメカニズムを詳細に解明した。最後にその結果に基づき、難聴を治療する方法を種々のアプローチで検討し、聴覚機能・内耳形態の両面において難聴を治す可能性のある結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We first manufactured the animal models that became hearing loss induced by intense noise. In the hearing loss animal model, we elucidated the mechanism which led to the cell death (apoptosis) of inner hair cells. Finally, based on these results, we examined the method that hearing loss was treated by various kinds of approaches, and the results that might cure hearing loss in the both sides where were in hearing function / inner ear morphology were obtained.

研究分野：医歯薬学

キーワード：内耳 アポトーシス 再生

## 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は、WHOの世界疾病調査(Global Burden of Disease 2010)によると世界で13億人が罹患しており、日常生活に支障をきたす障害の13番目に位置づけられている。そのうち音響性聴器障害による内耳性難聴は感音難聴の主な原因の一つで、その多くが難治性である。特に先進国では難聴の3分の1以上が過剰な騒音によると言われている。また実際に先進国では、GNPの約0.2-2%が騒音の対策費となっている(アメリカでは年間2億4200万ドル NISOH 2013)。そこで音響性聴器障害の際、内耳蝸牛にどのような病態生理的・形態的・生化学的变化が生じているかを基礎的に研究することによって、強大音響曝露より聴覚系を保護する研究は临床上、非常に大きなインパクトがあると考えた。

我々はこれまでに音響曝露後の経時的な変化を機能的・形態的に詳細に調べ、その成因とフリーラジカルとの関与を報告した(Yamashita et al., Brain Res. 2004)。音響曝露後の遅発性メカニズムに着目した研究は国際的にも我々を除いて皆無である。この結果に基づき、我々はさらにフリーラジカルスカベンジャーを用いて音響曝露後からの薬剤投与による内耳性難聴の防御を機能的・形態的に確認し、また活性酸素・活性窒素の発現が抑制されたことを報告した(Yamashita et al., Neuroscience 2005)。この研究は、従来の音響による障害を負荷前や直後にのみ着目したものと違い、実際に臨床応用に結び付く方向性を指摘した。

## 2. 研究の目的

音響外傷性難聴における内耳細胞死のメカニズムを詳細に解明し、その結果に基づき治療へのアプローチを多角的に検討することを目的とする。

内耳における細胞死制御に関して、我々はこれまでに種々のアプローチからその成果を報告してきた(Yamashita et al., J Neurosci. Res. 2014, Watada, Yamashita et al., Neurosci. Res. 2014, Fujita, Yamashita et al., Diabetes 2012, Cui, Yamashita et al., Euro. Arch. Oto. 2011 Wakabayashi, Yamashita et al., Neurosci. Res. 2010)。また「Oxidative stress in noise-induced hearing loss」と題してこれまでの結果を総説としてまとめた(Yamashita; Free Radical in ENT pathology. Springer, 2014)。

しかし、従来の報告も含めいづれも完全に音響外傷性難聴を防御するものではない。これは内耳障害のメカニズムがさらに複雑であることが示唆される。そこでまず、音響曝露後に聴力閾値が固定されるまでの期間における内耳障害の遅発性メカニズムを、早期と晩期に分けて解明する。具体的には、曝露後のプログラムされたネクローシスの時期に

よる発現の差を調べる。それらの結果をもとに、音響曝露後の時期によって種々の薬剤(抗酸化剤やアポトーシス抑制剤など)を分けて投与し、音響外傷性難聴をより完全に防御できるかを追及する。その際、種々の内耳への薬剤投与経路を検討する。具体的には微小浸透圧ポンプ(Alzet社)を用いた持続投与に改良を加え、より効率のよい新たなドラッグデリバリーシステムを開発したいと考えている。また我々はMRIの造影剤である超常磁性体酸化鉄(SPIO)を用いて、内耳移植細胞の生体内動態のモニタリング法を世界で初めて確立した(Watada, Yamashita et al., Neurosci. Res. 2014)。これらの技術を駆使し、より臨床応用に向けた内耳保護を目指したいと考えている。

## 3. 研究の方法

・ネクローシス様細胞死の実行因子(RIPK1とRIPK3)の検討:PTSモデルにおいて、ネクローシス様細胞死の実行因子であるRIPK1とRIPK3の発現を免疫染色にて調べる。音響曝露後、各タイムポイント(負荷直後、1, 3, 7, 10日目)において内耳蝸牛を摘出し4%パラホルムアルデヒドで固定の後、8%EDTAで脱灰、凍結切片を作製し免疫染色を行う。

・アポトーシス誘導因子(DISC)の検討  
PTSモデルにおいて、プログラムネクローシスの抑制因子として機能するアポトーシス誘導因子(DISC)の発現を免疫染色で比較する。(方法は上記(1)と同じ)

・細胞死(アポトーシス、ネクローシス)の発現の時期的検討:両PTS及びTTSモデルにおいて、音響曝露後各タイムポイント(負荷直後、1, 3, 7, 10日目)でアポトーシス(Tunnel法)とネクローシス(PI stainingで核の形態評価)の発現を検討する。また、電子顕微鏡で外有毛細胞の核の形態でネクローシスを評価し、経時的にダメージの拡がりやどちらに起因しているかを検討する。

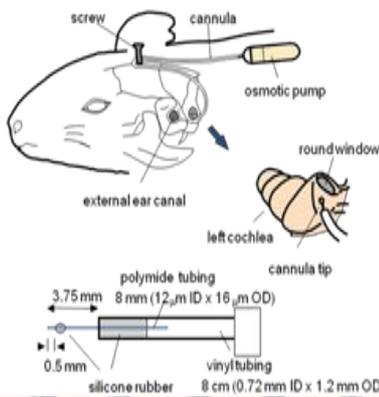
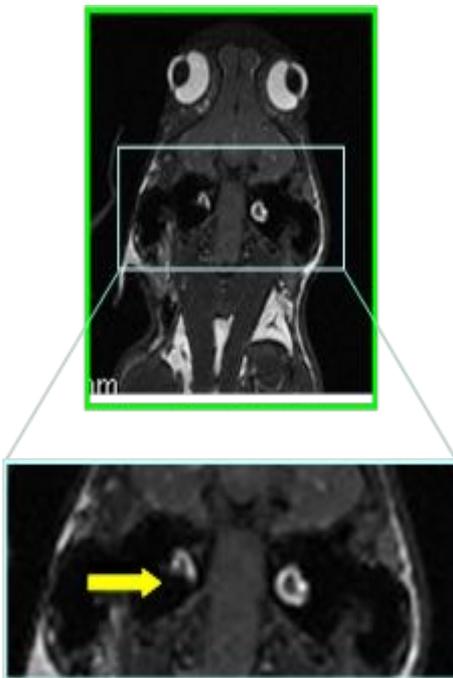
上記手技に関して、我々はすでにこれまでの報告(Yamashita et al., Neuroscience 2005, Yamashita et al., Brain Res. 2004)で安定した方法を確立している。しかし研究が当初計画どおりに進まない時(有意な結果が得られなかった時)の対応として、他のアポトーシス関連因子やシグナル伝達機構の検討を行う。

・新たなドラッグデリバリーシステムの確立  
全身投与としては、皮下・腹腔内注射に加え、外頸静脈へのカテーテル留置による持続投与法の確立を検討する。内耳への局所投与に関しては、これまでに報告してきた微小浸透圧ポンプ(Alzet社)を用いた持続投与(Minami, Yamashita et al., Brain Res. 2007, Le Prell CG, Yamashita et al., Hearing Res. 2006)に改良を加え、より効率のよい投与法の確立に向けて検討する。

#### 4. 研究成果

近年、音響外傷性難聴におけるアポトーシスに関する報告が主に国外を中心にみられるようになった。我々は、上記のように音響曝露後の遅発性メカニズムに着目し、経時的な変化を詳細に調べ報告してきており、この視点は国内外含めて我々のみである。他領域ではカスパーゼ非依存的な経路が着目され、我々も内耳性難聴では初めてこの経路に関して報告した (Yamashita et al., Neuroreport 2004)。また音響外傷による障害には一過性閾値変化 (TTS) と永続的閾値変化 (PTS) の両モデルがあり、この両者を比較することで難聴へのメカニズムを解明する手がかりになると思われる。我々は、両モデルとアポトーシスに重要な因子の1つである Bcl-2 ファミリーの関与を報告した (Yamashita et al., J Neurosci. Res. 2008)。新たに今年 N Engl J Med. 誌 (Linkermann et al., 2014) にプログラムされた細胞死には、実はアポトーシス以外にネクローシスも関与することが報告された。そこで我々のこれまでの研究成果に加え、両モデルにおいて新しい概念であるプログラムされたネクローシスの発現を調べることは、より詳細な細胞死に至るメカニズムの解明につながり、難治性の感音難聴を完全に治療することにつながることを予想され、独創的かつ発展的であり大変意義深いと考える。

騒音難聴モデル動物作製として、難聴が回復しない永続的閾値変化 (PTS: permanent threshold shift) と、難聴が最終的には完全に回復する一過性閾値変化 (TTS: temporary threshold shift) の両モデルを作製した。

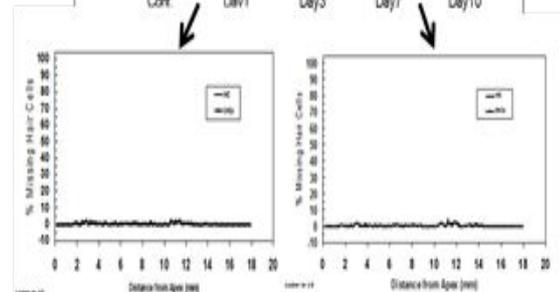
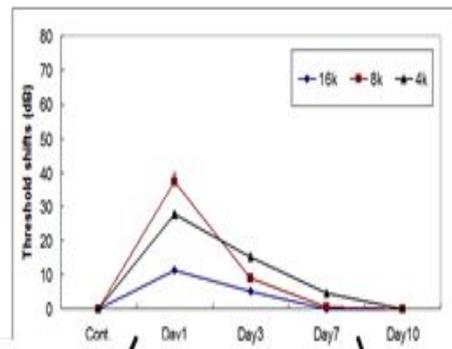


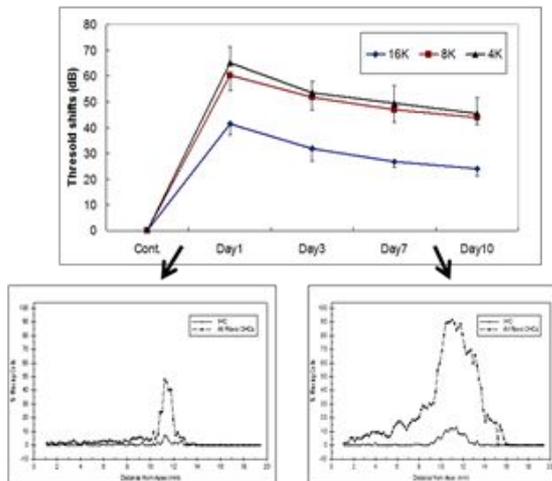
- ・種々の薬剤投与による内耳保護効果の検討  
音響曝露後の時期により投与薬剤を検討し、上記で確立した投与方法にて薬剤 (フリーラジカルスカベンジャーや抗酸化剤、アポトーシス抑制剤など) を併用して投与し、機能的に ABR、形態的に Hair cell count の手技を用いて、聴器障害が防御できるかを検討する。

- ・機能的聴力の評価  
音響曝露後、経時的に機能評価 (難聴の程度) を聴性脳幹反応 (ABR: Auditory Brainstem Response) を用いて施行する。

- ・形態的有毛細胞死の評価  
機能評価と同様に形態的变化も経時的に追って定量する。surface preparation 法により rhodamine 蛍光色素標識 phalloidin にて細胞骨格を染め、欠損細胞をカウントする。

ABR, Hair cell count の手技については、これまでの報告にてすでに我々が確立した手法である。





両モデルに対して、聴力の機能評価として聴性脳幹反応 (ABR: Auditory Brainstem Response)にて、また内耳有毛細胞の形態的評価として surface preparation 法を用いて欠損細胞数をカウントした。

内耳リンパ液と血漿代謝物組成の比較によりイノシトールやアスコルビン酸など計 29 種の代謝物組成が検出された。例えば、今回検出されたアスコルビン酸には、フリーラジカルスカベンジャーとして音響外傷に対する内耳保護効果があることが報告されている。これまでの報告では、聴覚機能 (ABR) や内耳形態から内耳保護効果を証明してきたが、この手法を用いることで、直接内耳リンパ液内の代謝物の変化を調べ、統計学的に検討することが可能になると考える。また強大音響負荷後の内耳リンパ液の組成では、計 6 種の代謝物に変化がみられた。

現在は、内耳リンパ液中の代謝物の定量化を進めている。また音響外傷モデル動物における、内耳障害後のリンパ液中の代謝物の変化を探ることにより Metabolic pathway から内耳障害におけるメカニズム解明につながるのではないかと考えている。さらに治療薬開発への応用も可能と考える。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Moriwaki S, Kanda F, Hayashi M, Yamashita D, Sakai Y, Nishigori C. Xeroderma pigmentosum clinical practice guidelines revision committee. J Dermatol. 2017 44(10):1087-1096.
2. Shinomiya H, Yamashita D, Fujita T, Nakano E, Inokuchi G, Hasegawa S, Otsuki N, Nishigori C, Nibu KI. Hearing Dysfunction in Xpa-Deficient Mice. Front Aging Neurosci. 2017 Feb

3. Shinomiya H, Otsuki N, Yamashita D, Nibu K. Patterns of lymph node metastasis of parotid cancer. Auris Nasus Larynx. 2016 43(4):446-50.
4. Nishida K, Morioka I, Nakamachi Y, Kobayashi Y, Imanishi T, Kawano S, Iwatani S, Koda T, Deguchi M, Tanimura K, Yamashita D, Nibu K, Funakoshi T, Ohashi M, Inoue N, Iijima K, Yamada H. Neurological outcomes in symptomatic congenital cytomegalovirus-infected infants after introduction of newborn urine screening and antiviral treatment. Brain Dev. 2016 38(2):209-16.
5. Shinomiya H, Hasegawa S, Yamashita D, Ejima Y, Kenji Y, Otsuki N, Kiyota N, Sakakibara S, Nomura T, Hashikawa K, Kohmura E, Sasaki R, Nibu K. Concomitant chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the temporal bone. Head Neck. 2016 38 Suppl 1:E949-53

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

##### 6. 研究組織

###### (1) 研究代表者

山下 大介 (YAMASHITA DAISUKE)  
神戸大学・医学研究科・医学研究員  
研究者番号：60306785