

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20175

研究課題名(和文)内耳障害モデルを用いた音響療法の検討

研究課題名(英文)Sound therapy used by inner ear damage model

研究代表者

池田 怜吉(ikedai, ryokichi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30645742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎生期並びに新生児マウスにおける音響外傷の影響の検討を行った。胎生期14,16,18,生後1,3,5日目のC57BL/6マウスに対し、音響負荷装置を用いて、octave of band noiseにて95, 100, 116dB SPLの条件にて音響負荷を2時間与えた。生後28日目にABRの測定並びに内耳有毛細胞、蝸牛神経節の測定を行った。

ABRの検討では胎生期16日目にて有意に音響負荷の影響が認められた。組織学的検討では、内耳有毛細胞並びに蝸牛神経節細胞数には変化が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Methods: Pregnant wild-type C57BL/6 mice with 14, 16, and 18 day embryos (E14, E16, and E18) or mice at postnatal day 1, 3, and 5 (P1, P3, and P5) were used. Acoustic overexposure of an octave of band noise (8 - 16 kHz) at 95, 100, 105, 110, and 116 dB SPL was applied for 2h. Results: The auditory brainstem response (ABR) of 8, 12, and 16 kHz in the E16 group were significantly increased compared to the control group ($p < 0.05$). The hearing loss of E16 C57BL/6 mice was sound pressure dependent at 8 kHz and 12 kHz. Noise exposure to E16 C57BL/6 mice did not alter the inner ear hair cells (HCs) or spiral ganglion (SG) cells. Conclusion: Noise exposure during the embryonic stage and in neonatal mice affected cochlear function that was evident at postnatal day 28. Further studies are needed to determine the precise mechanism underlying the acoustic effect in embryos and neonatal mice.

研究分野：内耳

キーワード：内耳 音響外傷 マウス

1. 研究開始当初の背景

急性感音難聴に対する治療法としては様々な方法が試みられているが、その一つとして近年、Sound therapy が注目されている。これまでも動物実験、特に音響外傷モデルにおいて、あらかじめ強大音曝露前に、それ自体では聴覚閾値を変化させない中等度音を負荷しておく、音響外傷に対する易受容性が軽減される現象(コンディショニング効果)が報告されてきたが、強大音響曝露後に音響負荷を行った場合にも内耳保護効果が認められることがわかってきた。

さらに、突発性難聴患者に対してステロイド+音響療法を施行したところ、ステロイド単独群に比べ有意に聴力が改善したとの報告も見られる。

申請者はこれまで様々な内耳侵襲モデルを作成し研究を行ってきた。

(1) 内耳侵襲(半規管、半規管膨大部、前庭)での EP 並びに K^+ 、 Ca^{2+} 濃度の検討

(Ikeda R, et al. Hear Res 2010, Neuroreport 2010)

(2) 内耳侵襲(半規管、半規管膨大部、前庭)での内耳保護効果の検討

(Ikeda R, et al. Acta Oto Laryngologia 2011)

(3) アブミ骨手術モデルによる前庭吸引の影響の検討

(Ikeda R, et al. Otolaryngology head and neck surgery 2011)

(4) 人工内耳モデルによる蝸牛機能の検討

(Oshima H, Ikeda R, et al. Otology & Neurotology 2013)

また、エピジェネティクスに関わる HDACi が耳毒性を生じうることを明らかにした。

(5) (Ikeda R, Allen Ryan, et al. ARO 2014)

そこでこれまで申請者行ってきた内耳侵襲モデル並びに耳毒性物質に対して内耳障害後の音響療法にて内耳保護効果の検討を行うこととした。

また急性内耳障害では蝸牛において、フリーラジカル、酸化代謝産物(ROS)を増加させる。これらはそれ自体、あるいは他の代謝経路を誘導することにより、細胞膜のリン脂質を酸化させ、蛋白や DNA に酸化障害を生じさせる。細胞に存在し抗酸化作用を有するグルタチオンはフリーラジカルスキャベンジャーとして、ROS 生成を抑制し、内耳障害に対して保護的に働くと考えられている。音曝露によりグルタチオン合成は誘導されるが、強大音曝露による過剰な誘導は基質の枯渇をもたらすグルタチオン量は減少する。

Keap1-Nrf2 制御系は外来異物や酸化ストレスに対する生体防御機構として重要な役割を果たすことが知られている。HO-1 などの酸化ストレス防御標的遺伝子群や NQO1 などの異物代謝標的遺伝子群の発現を誘導するだけでなく、グルタチオン合成酵素であるグルタミルシステイン合成酵素を誘導することでグルタチオンの合成を促進することも報告されている。

これらの報告から、内耳障害後の音響療法では、中等度の音響負荷により Keap1-Nrf2 制御系が活性化され、グルタチオン量の増加をもたらすことにより、内耳保護に働くという仮説を思い立ち、内耳障害モデルでの Keap1-Nrf2 ストレス応答系について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

急性感音難聴に対する音響療法 (Sound therapy) は近年、急性感音難聴に対する新規治療法として注目を浴びている。

今回、申請者がこれまで用いてきた内耳障害モデルを用いて音響療法の効果並びに内耳保護のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)

音響負荷に対する Keap1-Nrf2 制御系の検討

音響療法の負荷音圧についてはこれまで様々な条件で行われている報告がある。そこでまず 8-16kHz octave band noise にて負荷音圧 80dB、70dB、60dB、負荷時間 2h、4h、8h にて音響負荷を行い、最適な負荷音圧・時間を検討する。また、音響外傷モデルとして当科にて行っている音圧・時間 (8-16kHz octave band noise, TTS: 89dB, 120min, PTS 105dB, 120min) にて音響を負荷する。

Nrf2 が恒常的に活性化している Keap1 ノックダウン (Keap1f/-) マウスを用いて、Nrf2 活性化の効果を検討する。

評価としては、負荷前後の ABR、DPOAE にて電気生理学的検討を行う。内耳有毛細胞のカウントにて組織学的検討を行う。分子生物学的検討として glutathione, Nrf2, HO-1, NQO1 について RT-PCR にて Keap1f/- マウス・Keap1f/+ マウス・Nrf2 ノックアウトマウス・WT マウスでの発現量を比較検討する。また免疫染色にてそれらの発現部位の検討を行う。

(2)

音響外傷モデルにおける音響療法の効果の検討

音響外傷モデルとしては前述の条件で行う。TTS、PTS 両者にて音響療法の効果の検討を行う。前年度の結果を踏まえて、最適な負

荷音圧・時間にて音響負荷を行い、TTS については音響療法直後、1、3、5 日後の評価を行い、PTS については音響療法直後、7、14、28 日後の評価を行う。評価項目は、電気生理学検査として、負荷前後の ABR、DPOAE の検討を行う。組織学的検討として内耳有毛細胞のカウントを行う。

(3) 内耳侵襲モデルに対する音響療法の効果の検討

これまでの申請者らの検討により、内耳侵襲においては内外リンパの破綻並びにリンパの急激な減少が内耳障害を引き起こすことが分かってきた。従って内耳障害を起こしうる内耳侵襲モデルを用いて、音響療法の効果を検討し、前年度までの研究を踏まえ Keap1-Nrf2 ストレス応答系の関与についても検討を行う。

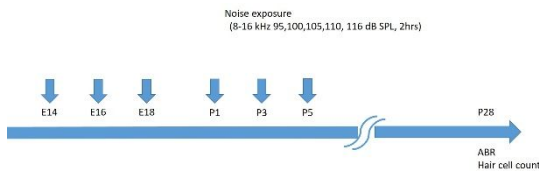
内耳侵襲モデルとしては、
前庭窓からの急激な吸引モデル
前庭破壊による内外リンパ破綻モデル
の2つを用いる。

このモデルに対して、内耳侵襲後に前年度までの結果を踏まえた音負荷を与え、その内耳保護効果について検討を行う。

評価項目としては、電気生理学検査として、負荷前後の ABR、DPOAE、並びに double barrel 電極にて EP、K⁺、Ca²⁺の検討を行う。組織学的検討として内耳有毛細胞のカウント、並びに内耳形態の変化の検討を行う。分子生物学的検討として glutathione、Nrf2、HO-1、Nqo1 について RT-PCR にて発現量を比較検討する。

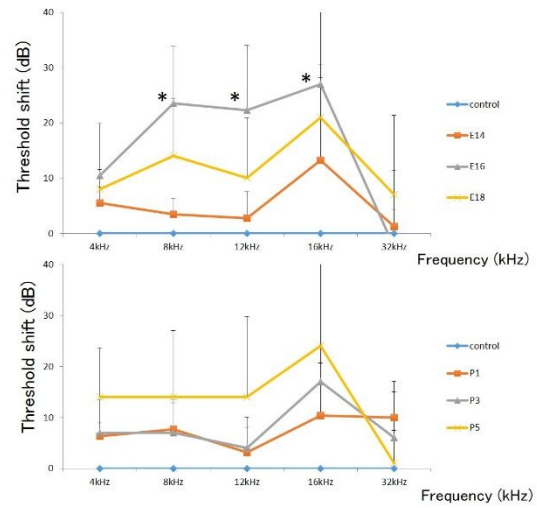
4. 研究成果

胎生期における音響外傷の影響の検討を行った。

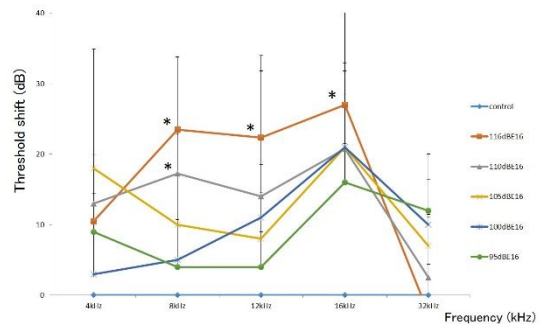


上図のプロトコルにて音響外傷を与えた。

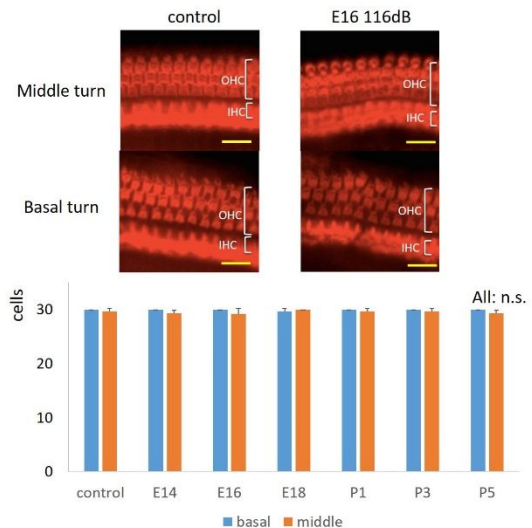
すなわち、E14、E16、E18、P1、P3、P5 のマウスに対して、8-16kHz octave band noise にて、95dB、100dB、105dB、110dB、116dB にて 2 時間音響負荷を与えた。



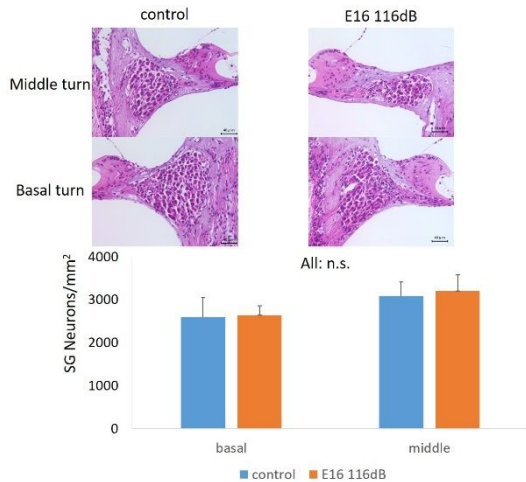
E16 に音響外傷を与えると有意に生後 28 日での聴力閾値上昇を認めた。



周波数別に解析を行うと、8kHz、12kHz、16kHz にて有意な差が認められた。



外有毛細胞に明らかな障害は認めなかった。



ラセン神経節細胞にも有意な障害は認めなかった。

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2件)

1. Tubal function tests with optional myringotomy detect Eustachian tube closing failure in acquired pars flaccida retraction cholesteatoma.

Asawapittayanont P, Ikeda R, Oshima H, Kikuchi T, Miyazaki H, Kawase T, Katori Y, Kobayashi T.

Auris Nasus Larynx. 2017 Feb;44(1):65-69. doi: 10.1016/j.anl.2016.06.011. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27427536 (査読有)

2. Hernia of the tympanic membrane.

Ikeda R, Miyazaki H, Kawase T, Katori Y, Kobayashi T.

Auris Nasus Larynx. 2017 Feb;44(1):119-121. doi: 10.1016/j.anl.2016.04.009. Epub 2016 Apr 29. (査読有)

PMID: 27138366

〔学会発表〕(計0件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔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

池田 怜吉 (Ikeda Ryokichi)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講

師

研究者番号: 30645742