

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15724

研究課題名(和文)カルシウムチャネル修飾薬の聴覚増強作用の検討

研究課題名(英文)Hearing threshold shifts by calcium channel modulators

研究代表者

稲垣 彰(Inagaki, Akira)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：70405166

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文):ヒトの内耳で重要な役割を果たすカルシウムイオン制御機構に着目し、薬剤で調節することで聴力を改善させる効果がないかを検討した。まず、未解明であった内耳のカルシウム調節機構を網羅的に検討し、薬剤のターゲットとなる新たなカルシウム調節機構として、カルシウム感知受容体を同定した。次に内耳での効果を検討するため、この分子の阻害薬を投与したところ、中度の難聴を呈することが分かった。活性化薬の聴力改善効果を検討したが、有意な効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人体の様々な場面でカルシウムは重要な役割を果たしている。その機能を薬剤によって調整することで、高血圧治療や疼痛治療は大きく進歩してきた。一方、難聴は社会的に大きな問題であるが、これに対する有効な薬剤は今なお開発されていない。本検討は内耳におけるカルシウム制御の新たな機構を見出し、それに対する薬理的な制御が可能であることを示した。将来の聴力改善薬の開発に道を開く、意義のある知見が得られた。

研究成果の概要(英文):Pharmacological modulation is an approach that has not well tested to achieve hearing improvement. To test this approach, we forced on the physiological mechanisms that handle the calcium ion, which is one of the vital components of the inner ear. First, we have performed a comprehensive approach to find novel mechanisms regulating calcium ions in the inner ear that can be targeted for hearing modulation; we found calcium sensing receptor as the candidate as a novel target for hearing modulation. To evaluate the potential as the target for the hearing modulation, we first applied allosteric inhibitor for the calcium sensing receptor. The inhibitor induced moderate hearing loss. Next, we have tried its activator expecting the opposite effect; however, no significant such effect could be identified in the present examination.

研究分野：聴覚

キーワード：カルシウム 聴覚 薬理的制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人間にとって、聴覚は視覚とならび情報量が多い感覚である。一方で、聴覚障害は比較的高頻度に生じるため、世界でも 5000 万人が病悩する、生活の質への影響の高い障害の一つである。

現在、糖尿病や高血圧など、幅広い疾患に有効な薬剤が確立され、人類がその恩恵を受ける一方で、聴覚障害に対しては高度難聴に対しては人工内耳、軽中度難聴に対しては補聴器など、機器による補聴のみが実用化されている。しかしながら、これらの方法には欠点が見られた。たとえば、補聴器であれば粗密波である音波を物理的に大きくすることができるが、一つ一つ有毛細胞から発せられるシグナルが飽和すると、ほとんどの場合の聴力障害の機序である有毛細胞数が減少する病態には対応できない。実際に、補聴器は(非線形のデシベル換算であるが)2倍程度の音圧にしか音圧を増幅することができず、それ以上の増幅は困難である。人工内耳はらせん神経節を直接電気刺激する機器であり、より強い刺激を与えることができるが、通常、幅広い音階に 7000 個の内毛細胞で対応するのに対して現在実用化されている人工内耳は最大で 24 個の刺激チャンネルにとどまっております、元の音波波形を再現するにはほど遠く、言葉の聞き取りには問題があるケースもある。これらの問題点を解決するには新たな聴覚路の刺激法をもたらす技術革新が必要であった。中でも、聴覚路の活動を直接改善する薬剤は臨床応用されておらず、検討が望まれていた。

2. 研究の目的

興奮性細胞にとって、 Ca^{2+} が膜電位上昇に呼応して細胞内へと流入するのは普遍的なステップである。これは Ca^{2+} 陽イオンとして電荷の上昇に寄与するだけでなく、セカンドメッセンジャーとしての様々な機能を有するためである。聴覚路の起点となる内外有毛細胞も例外でなく、その神経伝達は細胞内、とりわけシナプス周囲へのカルシウムの流入に依存しており、音刺激に伴うカルシウム流入を強化することで、神経伝達を強化できる可能性がある。一方で、内耳における Ca^{2+} の制御には未解明な部分も多い。

本研究の目的は、内耳の Ca^{2+} 制御機構を同定し、その機構の薬理的な機能修飾によって聴覚の改善効果が見られないかどうかを検討することである。とりわけ、内耳有毛細胞におけるカルシウムチャンネルではその閉口過程のみを遅延させる効果のある 2,5-Di-t-butyl-1,4 benzohydroquinone (BHQ)には内毛細胞のプレシナプスからのカルシウム流入の増大を介した、神経伝達増強作用、さらには聴覚改善作用が期待できる。本研究は機構スクリーニングによって同定されたシステムに対する薬剤、それに加えて既報告を基にした BHQ などの薬剤など、聴覚改善の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

内耳における新たな制御機構をスクリーニングするため、内耳の遺伝子発現情報より新たな Ca^{2+} 制御機構・チャンネルをスクリーニングする。スクリーニングにより同定された遺伝子の分布を確認し、生理学的な機能を推定、重要度の重み付けをする。併せて、既知の機能調節薬剤の有無を検討する。

次に、薬理的な聴力修飾の可能性を検討するため、薬剤を持続的に投与しながら聴力をモニタリングすることが可能な生理学的実験系を新たに構築する。今まで、そのようなシステムの報告はなく、開発が必要となる。開発後にシステムを用いて、新たに同定された機構の薬理的な阻害、活性化薬や、既知の活性化薬である BHQ などの薬剤の投与を行う。

4. 研究成果

聴力改善へとつながるような、内耳における Ca^{2+} 制御の新たな作用点を探索するため、 Ca^{2+} 制御機構・チャンネルを中心に内耳遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、腎尿管や副甲状腺でカルシウムの再吸収やカルシウム濃度感知に必要な不可欠な機能を果たすカルシウム感受容体 (Calcium sensing receptor; CaSR) が同定された。PCR による全長の遺伝子増幅を確認、バリエーションを確認したが、同定されなかった。モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行い、糖鎖など修飾の確認を行ったが、腎に発現する CaSR と内耳に発現する CaSR とに分子量に違いは見られなかった。次に免疫組織化学法を用いて組織内分布を確認したところ、らせん靭帯、蝸牛軸の線維芽細胞に強い発現が見られた。蝸牛内の支持細胞は細胞間結合によりイオンの交通がある、いわゆる合胞体を形成している。これらの細胞で Ca^{2+} の CaSR の発現は、そのいずれもが外リンパ液と接する区画に存在することから、外リンパ液の Ca^{2+} の組成を制御する可能性があるとの知見が得られた。

次に、これらの機序の生理学的なインパクトを確認するために、in vivo での薬剤の聴力への影響を測定する実験系の確立を行った。Wistar/ST ラットを用いて内耳内に薬剤を注入しながら聴力を安定的に連続的に測定できる系を確立した。この系を用いて CaSR の生理学的意義を 2つの CaSR 阻害薬を用いて行った。そうしたところ、中度難聴が生じたことから生理学的に重要な役割をはたしていることが明らかとなった。次に、活性化薬を用いて聴力増強効果の検討

を行ったが、有意な増強効果は見られなかった。同様に BHQ による聴力変動効果も確認したが、わずかに ABR での、波の増大が見られるものの、有意な変動は今回の検討では検出できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi M, Kabaya K, Sekiya K, Matsuda F, Sekiya Y, Esaki S, Sato Y, Inagaki A, Murakami S.	4. 巻 27
2. 論文標題 An improved system for grading and treating tinnitus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 30808-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2017.11.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aihara N, Yamada H, Takahashi M, Inagaki A, Murakami S, Mase M.	4. 巻 57
2. 論文標題 Postoperative Headache after Undergoing Acoustic Neuroma Surgery via the Retrosigmoid Approach.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir	6. 最初と最後の頁 634-640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2017-0108.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minakata T, Inagaki A, Yamamura A, Yamamura H, Sekiya S, Murakami S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Calcium-Sensing Receptor Is Functionally Expressed in the Cochlear Perilymphatic Compartment and Essential for Hearing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2019.00175.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inagaki A, Yamashita Y, Mori Y, Takeuchi E, Asaoka K, Murakami S.	4. 巻 -
2. 論文標題 An Unusual Tumor of the Ear: Pilomatricoma in a Middle-Aged Woman.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/4975216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Concurrent Treatment With Intratympanic Dexamethasone for Moderate-Severe Through Severe Bell's Palsy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otol Neurotol	6. 最初と最後の頁 e1018-e1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002377.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Concurrent treatment with intratympanic dexamethasone improves facial nerve recovery in Ramsay Hunt syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.116678.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toshiya Minakata, Akira Inagaki, Shinji Sekiya, Hisao Yamamura, Shingo Murakami
2. 発表標題 Expression of Calcium sensing receptor in the mature inner ear
3. 学会等名 第39回日本神経科学学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2016年 ~ 2017年

1. 発表者名 南方寿哉, 稲垣 彰, 関谷 真二, 村上 信五
2. 発表標題 牛内カルシウム制御に関する新たな分子機構の検討
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 稲垣彰
2. 発表標題 蝸牛の新たなCa ²⁺ 調節機構
3. 学会等名 日本解剖学会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	蒲谷 嘉代子 (Kayoko Kabaya) (50569259)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	村上 信五 (Shingo Murakami) (80157750)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	