

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15462

研究課題名(和文)病態形成メカニズムに基づいて展開した感音難聴に対する薬物治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of pharmacotherapy for sensorineural hearing loss based on the pathogenetic mechanism

研究代表者

山口 太郎 (Yamaguchi, Taro)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：30710701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗酸化剤あるいは一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤とカルパイン阻害薬との併用処置によって、カルパイン阻害薬単独処置よりも強力な内耳保護効果を得るか否かを検証することを目的とした。その結果、併用処置は単独処置と比較して、内耳保護効果を部分的に増強したが、その程度が劇的ではなかった。その原因として、音響曝露による難聴病態形成に酸化ストレスやNOとは独立して生じる蝸牛内炎症反応が関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで申請者が明らかにした難聴治療候補薬の併用療法でより高い効果を発揮するか否かを検証するものである。結果として、期待されるほど大きな効果は得られなかったものの、新たな治療標的の同定に成功した。本研究成果は、現時点でも有効な治療薬の存在しない難聴病態に対して、新たな創薬標的を生み出したことから、今後の創薬への発展が期待できるものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine whether treatment with an antioxidant or nitric oxide (NO) synthase inhibitor in combination with a calpain inhibitor provided more potent inner ear protection than treatment with a calpain inhibitor alone. The results showed that the combination treatment partially enhanced the inner ear protection effect compared with the single treatment, but to a less dramatic extent. As the cause, it was found that the inflammation reaction in the cochlea which is generated independently of oxidative stress and NO was possibly involved in the deafness disease state formation by the acoustic exposure.

研究分野：薬理学

キーワード：感音難聴 薬物治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、難聴の有病率は20%を超えており、WHOの世界疾病調査においても日常生活に支障を来す障害の最上位にあげられている(WHO, 2004)。また、難聴者の60%以上が高齢者ではなく就労年齢であることも大きな問題とされるが、この感音難聴に対する根本的な治療法は確立されていないのが現状である。治療薬として経験的にステロイド性薬の短期的大量投与(ステロイドパルス療法)や内耳循環改善薬が臨床的に広く用いられているが、治療効果を示すエビデンスは限りなく少ない。さらに、症状が固定し、慢性化した症例では補聴器装用や人工内耳治療に頼らざるを得ないのが現状である。また、感音難聴は、強大音響曝露による音響外傷性難聴、アミノグリコシド系抗菌薬やループ利尿薬などによる薬剤性難聴、加齢性難聴、突発性難聴などに分類される。国内外を問わず、様々な感音難聴モデル動物や細胞レベルでの研究により感音難聴治療に応用しうる知見が集積し始めている。たとえば、抗酸化剤や細胞成長因子を用いることで音響外傷時の内耳障害が抑制され、内耳保護療法となり得ることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに感音難聴の一種である音響外傷性難聴モデル動物を用いた検討において、酸化ストレスに伴う不適切なカルパインの活性化に伴う内耳内環境(イオン恒定性)の破綻が発症の原因であることを報告し、カルパイン阻害薬が新規難聴治療薬として有用であることを提唱した。しかしながら、このカルパイン阻害薬の内耳保護効果は完全ではなく一部聴力の悪化が残存した。本研究は、カルパイン阻害薬と申請者らによる既報の内耳保護薬との併用療法によって、カルパイン阻害薬単剤処置よりもさらに高い内耳保護効果を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

音響曝露は、騒音発生装置(RION社)を用いて8kHzオクターブバンド、110dBを1時間、防音箱内で直接曝露した。TempolあるいはL-NAMEは、音響曝露30分前に腹腔内投与し、PD150606は音響曝露直後に径後半規管的に局所投与した。聴力は、4、12、20kHzにおける周波数帯域の聴覚閾値として、音響曝露1、2、5、7日後に聴覚刺激由来の脳波である聴性脳幹反応を解析することにより測定した。蝸牛有毛細胞に対する影響を音響曝露14日後に内耳コルチ器を摘出し、phalloidine(F-actinマーカー)およびMyosinVIIa抗体を用いてを染色・計数し、その脱落率を解析した。定量的PCRは、Trizolによる遺伝子抽出を行い、TaKaRaにて解析した。免疫組織化学法に際して、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、脱灰処理後、パラフィン包埋を行い、試料を作製した。染色過程では抗原に対する特異的抗体を用いた。統計解析は、医療統計解析ソフトGraphPad Prism6を用いて適切に実施した。

4. 研究成果

(1) 組み合わせ投与による内耳保護効果の解析

Tempol(抗酸化剤)とPD150606(カルパイン阻害剤)との組み合わせ、L-NAME(一酸化窒素合成酵素阻害剤)とPD150606との組み合わせと、PD150606単独投与とを比較検討し、組み合わせ投与による音響外傷性難聴に対する内耳保護効果における相加効果の有無について検討した。聴性脳幹反応解析による聴力測定の結果、TempolとPD150606との組み合わせ、L-NAMEとPD150606との組み合わせ投与は、12および20kHzの周波数帯において音響曝露(8kHz octave band noise、110dB、1時間)による聴覚閾値変動の上昇を有意に抑制し、PD150606単独処置と比較してより聴覚閾値変動の上昇を抑制する傾向が認められた。また音受容細胞である有毛細胞数をPhalloidin染色により解析したところこちらも聴力同様、TempolとPD150606との組み合わせ、L-NAMEとPD150606との組み合わせ投与は、音響曝露後の有毛細胞死を有意に抑制し、PD150606単独処置と比較してより細胞死を抑制する傾向が認められた。しかしながらこれらの効果の変動は想定よりもはるかに下回るものであった。このことから、音響曝露後の炎症性サイトカインの変化について解析した。定量的PCRの結果、単独投与と比較していずれの併用投与でも音響曝露後に生じるTnf mRNAの増加に影響を与えなかった。また、炎症惹起に關与するNF- κ Bの核内移行についても免疫組織化学法を用いて解析した。その結果、音響曝露後に生じるNF- κ Bの核内移行は、単独投与群およびいずれの併用投与群でも影響はみられなかった。このことから、難聴病態形成に蝸牛内の炎症が關与すること、およびこの炎症反応は酸化ストレスと独立事象であり、酸化ストレスとカルパインの活性化はある一定の従属事象であることが推察される。

(2) 新たな難聴治療標的としてのNO/cGMP/PKGシグナルとNa⁺,Ca²⁺交換体

音響曝露によるNO/cGMP/PKGシグナルについて解析を行った。我々は、これまでに8kHz、110dB、1時間の音響曝露後iNOSの発現が蝸牛内で増加し、これが活性酸素と反応することで細胞障害が引き起こされることを報告している。一方で、NOはcGMP/PKG経路を介して血管拡張反応などの生理反応を引き起こす。そこで、音響曝露各時間経過後に蝸牛を摘出し、蝸牛内cGMPレベルを測定した。その結果、音響曝露直後から少なくとも曝露4時間まではcGMPレベルが減少した。このことから、音響曝露後に生じるNO/cGMP/PKGシグナルが減弱することが示唆された。そこでPKG阻害薬を音響曝露30分前に腹腔内投与したところ、音響曝露による聴覚障

害がより増悪した。

内耳蝸牛には Na^+ , Ca^{2+} 交換体 (NCX) が発現し、その発現レベルは、8 kHz、110 dB、1 時間の音響曝露を行った。その結果、4 時間後から少なくとも 24 時間後まで優位に増加することを明らかにした。そこで、音響曝露前に NCX 阻害剤を腹腔内投与し、音響曝露による聴覚障害を防ぐことができるか否かについて検討した。その結果、完全ではないものの有意に聴覚障害を軽減する結果が得られた。音響曝露に対する効果が劇的でないことの原因として薬剤の内耳到達率が低いことを考え、局所投与により検討を継続して進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Taro, Yoneyama Masanori, Ogita Kiyokazu | 4. 巻 803 |
| 2. 論文標題 Calpain inhibitor alleviates permanent hearing loss induced by intense noise by preventing disruption of gap junction-mediated intercellular communication in the cochlear spiral ligament | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 187 ~ 194 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2017.03.058 | 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 Yamaguchi Taro, Yoneyama Masanori, Onaka Yusuke, Imaizumi Atsushi, Ogita Kiyokazu | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 Preventive effect of curcumin and its highly bioavailable preparation on hearing loss induced by single or repeated exposure to noise: A comparative and mechanistic study | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 225 ~ 233 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2017.07.003 | 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 T Yamaguchi, K Ogita, M Yoneyama, Y Onaka | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Stress is irrelevant to the onset and exacerbation of sensorineural hearing loss: Evaluation using various types of stress models in mice | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics | 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） 10.15761/GDT.1000S1003 | 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 Yoneyama Masanori, Hasebe Shigeru, Yamaguchi Taro, Onaka Yusuke, Ogita Kiyokazu | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Melatonin suppresses neuronal regeneration following neuronal degeneration in the hippocampal dentate gyrus | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics | 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） 10.15761/GDT.1000131 | 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 Yoneyama Masanori, Ogita Kiyokazu, Yamaguchi Taro, Onaka Yusuke | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Glycine transporter-1 regulates the proliferation of neural stem/progenitor cells derived from the embryonic mouse hippocampus | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics | 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) 10.15761/GDT.1000S1007 | 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 - |

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口太郎、原田里佳子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 強大音響曝露に伴うらせん靭帯線維細胞死におけるMAPK経路の関与 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第138年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西山徳人、山口太郎、藤本頼門、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 蝸牛外側壁のギャップ結合機能の破綻は蝸牛有毛細胞死を引き起こすか？ |
| 3. 学会等名 日本薬学会第138年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 尾中勇祐、田中優衣、田邊航、新谷紀人、中澤敬信、吾郷由希夫、米山雅紀、山口太郎、橋本均、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 腫瘍切除後マウスにおける炎症関連分子の発現変化と情動障害への関与 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第138年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 山口太郎 |
| 2. 発表標題 音響外傷性難聴に対するカルパイン阻害剤の治療効果 |
| 3. 学会等名 第27回日本耳科学会総会・学術講演会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 尾中勇祐、和田 翔太、米山 雅紀、山口太郎、荻田 喜代一 |
| 2. 発表標題 有機スズ誘発性認知機能障害に対するオランザピンの作用 |
| 3. 学会等名 第47回日本神経精神薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 山口太郎、尾中勇祐、米山雅紀、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 新規感音難聴治療薬としてのカルパイン阻害薬の有用性 |
| 3. 学会等名 第19回応用薬理学シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 米山 雅紀、山口 太郎、尾中 勇祐、荻田 喜代一 |
| 2. 発表標題 プロテアーゼ活性化受容体1は、Rho kinase経路を介して成体マウス海馬歯状回由来神経系幹・前駆細胞の増殖を負に制御する |
| 3. 学会等名 第60回神経化学学会大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口太郎、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 内耳蝸牛らせん靭帯における強大音響誘発性細胞障害へのp38MAPKの関与 |
| 3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 三羽尚子、山口太郎、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 クロロゲン酸は反復騒音曝露による聴力損失を改善する |
| 3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 米山 雅紀、山口 太郎、尾中 勇祐、荻田 喜代一 |
| 2. 発表標題 Regulation of proliferative activity by protease-activated receptor 1 in neural stem/progenitor cells generated after neuronal degeneration in the hippocampal dentate gyrus of adult mice. |
| 3. 学会等名 26th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and European Society for Neurochemistry, (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 米山 雅紀、山口 太郎、尾中 勇祐、荻田 喜代一 |
| 2. 発表標題 成体マウス海馬歯状回神経細胞障害後に出現する神経系幹・前駆細胞の増殖におけるプロテアーゼ活性化受容体1の役割 |
| 3. 学会等名 第40回神経科学学会大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 山口太郎、三羽尚子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一 |
| 2. 発表標題 不可逆的聴力損失に対するクロロゲン酸の効果 |
| 3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 尾中 勇祐、和田 翔太、米山 雅紀、山口 太郎、荻田 喜代一 |
| 2. 発表標題 オランザピンは海馬歯状回の神経脱落に伴う認知機能障害を抑制する。 |
| 3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2017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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|