

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591949
 研究課題名 (和文) 突発性難聴およびベル麻痺における新規病因の探索
 研究課題名 (英文) Investigations for new pathogeneses of sudden deafness and Bell's palsy
 研究代表者
 古田 康 (FURUTA YASUSHI)
 北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
 60261301

研究成果の概要：原因不明の内耳疾患である Bell 麻痺・突発性難聴において、発症時の患者の生体反応を遺伝子・蛋白質レベルで網羅的に捉えることにより、これら疾患における発症病態・新規病因を解明することを目的とし研究をおこなった。その結果、Bell 麻痺においては自然免疫に関与する抗菌性小ペプチドであり、抗ウイルス作用を有することが判明している α -defensin がベル麻痺の発症に関与していることが推定された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：突発性難聴、ベル麻痺、マイクロアレイ、 α -defensin、ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

突発性難聴はわが国において年間約 3 万 5 千人が罹患し、その治癒率は 40%程度と報告されている。すなわち、過半数の患者では難聴、耳鳴など後遺症が残り QOL が著しく低下する。病因としてはウイルス感染、内耳循環障害などが推定されており、治療薬としてはステロイド剤、血管拡張剤などが用いられている。しかし、その病因・発症機序についてはまだ不明な点が多く、新たな治療法を開発する上で、病因・発症病態のさらなる解明が

急務である。

一方、突発性難聴と同様に原因不明の耳科疾患である Bell 麻痺は年間約 3 万人が罹患し、その治癒率は 80-90%と良好であるが、非治癒例においては病的共同運動などの後遺症が残り患者の QOL を著しく低下させる。Bell 麻痺においては申請者らの研究により、その病因として単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1; HSV-1) や水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus; VZV) の再活性化が明らかにされてき

た。しかし、中にはこれらのヘルペスウイルス再活性化の関与が否定される症例もあり、Bell 麻痺の病因のさらなる解明と新たな治療法の開発が強く望まれる。

2. 研究の目的

これらの原因不明の耳科疾患の発症に関連する因子については、様々な研究がなされてきたが、その治療や予防に結びつくものは明らかにされていないのが現状である。この現状を打破するには、これまでとは異なる戦略による発症因子の同定、それに基づく治療法の開発が急務である。そこで、まずゲノミクスおよびプロテオミクスに基づき、これら疾患の発症に関する新規病因を探索し、将来的には新しい耳科疾患治療法を開発することを着想するに至った。

本研究においては、DNA マイクロアレイ解析を用いて、突発性難聴および Bell 麻痺の発症に関連した遺伝子・蛋白質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 患者サンプルの採取

突発性難聴および Bell 麻痺患者において、同意を得た後に初診時と発症 2～3 週後の 2 回、末梢血を採取し末梢血単核球と血清に分離後、凍結保存した。症例の耳科学検査を行うとともに臨床経過を詳細に調べた。

(2) 末梢血単核球の DNA マイクロアレイを用いた解析

(1) で得られた初診時と発症 2～3 週後の末梢血単核球よりそれぞれ RNA を抽出した。次に、T7-based RNA 増幅を行い十分量の aRNA を得た後、ヒト遺伝子約 5 万 5 千個が搭載された CodeLink Human 55K アレイ (アマシャム社) を用いて解析を行った。両病日間で発現差異のある遺伝子を選び出した。

(3) Real-time PCR 法による解析

(2) で同定された発症に関連する遺伝子候補について、さらに多くの患者サンプルを用いて解析を行った。初診時と発症 2～3 週後の末梢血単核球よりそれぞれ RNA を抽出し、遺伝子の発現変化を Real-time RT-PCR 法にて定量解析した。

(4) ELISA 法による解析

患者血清を用いて、タンパクレベルでの発現変化を ELISA 法にて解析した。

(5) ヘルペスウイルス感染診断

末梢性顔面神経麻痺におけるヘルペスウイルス感染診断の現状と限界について解析を加えた。

4. 研究成果

(1) Bell 麻痺患者における DNA マイクロアレイを用いた解析

初診時と発症 2～3 週後の末梢血単核球よりそれぞれ RNA を抽出後、T7-based RNA 増幅を行った後、ヒト遺伝子約 3 万個が搭載されたオリゴ DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。4 症例において両病日間で発現差異のある遺伝子を選び出したところ、 α -defensin が同定された。 α -defensin は自然免疫に関与する抗菌性小ペプチドであり、細菌のみならず抗ウイルス作用を有することが判明しており、さらなる解析を行う上で興味深い遺伝子と考えられた。

(2) Bell 麻痺患者における real-time PCR を用いた解析

初診時と発症 2～3 週後の末梢血単核球よりそれぞれ RNA を抽出後、real-time PCR を用いて α -defensin の発現を両病日間で比較した。その結果 24 症例中 8 例において発症後に α -defensin の発現が 5 倍以上に上昇していた。以上から、 α -defensin がベル麻痺の発症に関与していることが推定された。

(3) Bell 麻痺患者における血漿中 α -defensin 発現の ELISA 解析

健常人 20 名と Bell 麻痺患者 22 名の血漿中 α -defensin の発現を ELISA 法を用いて調べた。健常人においては 2～3 週において 2 回測定した。その結果、1 名 (5%) においてのみ 2 回目に採取した血漿で α -defensin の発現が測定感度以上に上昇していた。他のサンプルにおいては測定感度以下であった。患者群では 22 例中 6 例 (27%) において血漿 α -defensin が測定感度以上に発現していた。そのうち、1 例においては初診時と発症 2～3 週後の 2 回の血漿ともに発現が上昇していた。残りの 5 例においては、発症 2～3 週後の血漿においてのみ α -defensin の発現上昇がみられた。この 5 例中 4 例において real-time PCR で末梢血単核球の α -defensin の発現を測定できたが、遺伝子レベルにおいても同様に α -defensin の発現が上昇していた。つまり末梢血単核球と血漿中の α -defensin 発現が相関していることが示された。今後、症例を増やしてさらなる解析と、Bell 麻痺患者における α -defensin の発現上昇の機序、発現上昇がみられない症例との差異などについて研究を深める予定である。

(4) 末梢性顔面神経麻痺におけるヘルペスウイルス感染診断の現状と限界 (論文③, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧)

末梢性顔面神経麻痺におけるヘルペスウイルス感染の早期ウイルス診断には唾液を用いたPCR検査が有用である。しかしPCRの検出限界、麻痺発症パターンの多様性から早期診断には限界も存在することを明らかにした。また、ステロイドと抗ウイルス剤併用療法の普及により、従来の血清診断基準では診断できないzoster sine herpete例が増える可能性について報告した。

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9件)

- ① 藤原圭志、古田 康、武市紀人、津布久崇、福田 諭、寺坂俊介、第VII、VIII神経症状を呈した脳幹部海綿状血管腫の1例、Facial Nerve Research、28、162-165、2008、査読有
- ② 古田 康、大谷文雄、藤原圭志、福田 諭、ステロイドと抗ウイルス剤の併用療法によるVZV再活性化診断のマスク、Facial Nerve Research、28、65-67、2008、査読有
- ③ 古田 康、Bell麻痺におけるHSV-1再活性化動態 第14回ヘルペス感染症フォーラム講演集、38-42、2008、査読無
- ④ 古田 康、顔面神経麻痺とウイルスの関係は？、JOHNS、24、1787-1789、2008、査読無
- ⑤ 黒田 徹、古田 康、福田 諭、末梢性顔面神経麻痺における耳介擦過による水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の再活性化診断、Facial Nerve Research、27、131-133、2007、査読有
- ⑥ 藤原圭志、古田 康、武市紀人、津布久崇、福田 諭、Ramsay Hunt症候群における眼振所見の検討、Facial Nerve Research、27、90-93、2007、査読有
- ⑦ 古田 康、大谷文雄、相澤寛志、福田 諭：Zoster sine herpeteのウイルス診断、Facial Nerve Research、27、41-44、2007、査読有
- ⑧ 古田 康、大谷文雄、山本有平、福田 諭、神経端側縫合(epineural window technique)を用いた顔面神経再建-耳下腺腫瘍例における経験-、Facial Nerve Research 27、221-224、2007、査読有
- ⑨ Hato N, Yamada H, Kohno K, Matsumoto S, Honda N, Gyo K, Fukuda S, Furuta Y, Ohtani F, Aizawa H, Aoyagi M, Inamura H, Nakashima T, Nakata S, Murakami S, Kiguchi J, Yamano K, Takeda T, Hamada

M, Yamakawa K. Valacyclovir and prednisolone treatment for Bell's palsy: a multicenter, randomized placebo-controlled study, Otol Neurotol、28、408-13、2007、査読有

[学会発表] (計10件)

- ① 古田 康、大谷文雄、福田 諭、顔面神経の温存と再建に苦心した耳下腺多形腺腫再発例、第19回日本頭頸部外科学会、2009年1月29日、名古屋市(名古屋東急ホテル)
- ② 藤原圭志、古田 康、武市紀人、津布久崇、福田 諭、寺坂俊介、第VII、VIII神経症状を呈した脳幹部海綿状血管腫の1例、第31回日本顔面神経研究会、2008年5月29日、東京都(東京国際フォーラム・ホールD5)
- ③ 古田 康、大谷文雄、藤原圭志、福田 諭、ステロイドと抗ウイルス剤の併用療法によるVZV再活性化診断のマスク、第31回日本顔面神経研究会、2008年5月29日、東京都(東京国際フォーラム・ホールD5)
- ④ 古田 康、Bell麻痺におけるHSV-1再活性化動態、第14回Japan Herpesvirus Infection Forum、2007年8月24日、札幌市(京王プラザホテル)
- ⑤ 古田 康、大谷文雄、山本有平、福田 諭：神経端側縫合(epineural window technique)を用いた顔面神経再建-耳下腺腫瘍例における経験-、第30回日本顔面神経研究会、2007年6月1日、名古屋市(名古屋市立大学病院大ホール)
- ⑥ 古田 康、シンポジウム「Ramsay Hunt症候群のマネージメント」zoster sine herpeteの早期ウイルス診断、第30回日本顔面神経研究会、2007年5月31日、名古屋市(名古屋市立大学病院大ホール)
- ⑦ 藤原圭志、古田 康、武市紀人、津布久崇、福田 諭、Ramsay Hunt症候群における眼振所見の検討、第30回日本顔面神経研究会、2007年5月31日、名古屋市(名古屋市立大学病院大ホール)
- ⑧ 黒田 徹、古田 康、福田 諭：末梢性顔面神経麻痺における耳介擦過による水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の再活性化診断、第30回日本顔面神経研究会、2007年5月31日、名古屋市(名古屋市立大学病院大ホール)

[図書] (計1件)

- ① 古田 康、耳性帯状疱疹(Hunt症候群)、(森山 寛、岸本誠司、小林俊光、川内秀之編：今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針 第3版、医学書院、123-124、東京、2008)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 康 (FURUTA YASUSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤
講師
研究者番号：60261301

(2) 研究分担者

折館 伸彦 (ORIDATE NOBUHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90312255

武市 紀人 (TAKEICHI NORIHITO)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40396289

(3) 連携研究者

澤 洋文 (SAWA HIROFUMI)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・教授
研究者番号：30292006