

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591973

研究課題名（和文） 熱ショック応答による内耳保護機構の解明と臨床応用

研究課題名（英文） The protection with heat shock response in the inner ear

研究代表者

山下 裕司 (YAMASHITA HIROSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00210419

研究成果の概要：

本研究は、感覚細胞死を抑制する保護療法を目的として行われた。熱ショック応答という生体に備わる保護機構を利用することから、副作用が軽微である点、よって長期にわたって治療が可能な点が長所として期待される。内耳における熱ショック応答の役割を十分に明らかにできれば、将来的に内耳保護療法として臨床に応用できる可能性が高いと考えられる。加齢による進行性難聴モデルマウスを用いて、熱ショック応答誘導剤が難聴の進行を抑制できることを明らかにし論文化した。また、加齢によって、内耳における熱ショック応答が減弱し、強大音などのストレスに対する耐性が低下することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：内耳，有毛細胞，細胞死，熱ショック応答

1. 研究開始当初の背景

現在、内耳疾患の治療としてステロイドなどの全身投与が行われているが、十分な治療効果が得られない症例をしばしば経験する。難聴の進行は患者の QOL を低下させるだけでなく、人工内耳など的高額医療を必要とし、医療費を増大させる要因ともなっている。これらのことから、内耳疾患に対する新たな治療法が強く望まれているのが現状である。こ

れまでの研究から、内耳障害時の感覚細胞死は不可逆性の難聴の原因のひとつとして知られているが、いかに感覚細胞を保護するかが患者の聴覚予後を考える上で重要である。我々は、すべての生体に備わる生体防御機構である熱ショック応答に着目し、それを制御する熱ショック転写因子 HSF1 による内耳保護が、新しい治療法の候補になると考えた。

生体が外部からのストレスに曝された際、

細胞内には速やかに熱ショック蛋白質群が発現し、細胞を保護する方向に作用する。この熱ショック応答は、熱ショック転写因子 (HSF1) に制御されており、HSF1 の活性化によって生体の熱ショック応答を誘導できることが明らかにされている。細胞内で HSF1 を活性化させることは、細胞に熱ショック応答を誘導し、細胞死を抑制する作用を期待できるとされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、熱ショック転写因子 (HSF1) による熱ショック応答を利用した内耳保護療法の可能性を明らかにし、将来的な臨床応用に向けた研究を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 熱ショック応答誘導剤による内耳への熱ショック応答の誘導と保護効果について

当施設の動物実験施設内の飼育室で出生し、飼育された DBA/2J マウス (Jackson Labo) を用いた。この動物は生後 3 週より聴力が低下し、徐々に進行することが報告されている。組織学的にも蝸牛の基底回転より有毛細胞、らせん神経節細胞が減少することが知られている。熱ショック応答を誘導するためにテプレノンを用いた。テプレノンは胃粘膜保護剤として臨床応用されている薬剤であるが、最近、全身の様々な組織に熱ショック応答を誘導することが明らかとなっている。DBA/2J マウスを 4 週齢で 3 群に分割し、通常の飼料 (コントロール群)、テプレノン 0.5% を含有した飼料 (テプレノン 0.5% 群)、テプレノン 1% を含有した飼料 (テプレノン 1% 群) で飼育する群を作成した。

内耳の熱ショック応答を評価するために、8 週齢時に一部のマウスより側頭骨を摘出し、ウエスタンブロットにて主要な熱ショック蛋白質について調べた。

聴覚の評価のために、聴性脳幹反応 (ABR) 閾値を経時的に測定した。また、各時点で、組織学的に検討し、有毛細胞障害の程度を評価した。

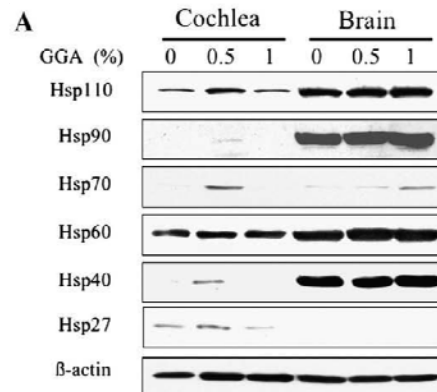
(2) 遺伝子改変動物を用いた内耳熱ショック応答の解明

実験動物として HSF1 欠損マウス (CBA/N 背景) を用いた。コントロールとして HSF1 欠損マウスのヘテロ、通常の CBA/N マウスをそれぞれ用いた。これらの動物を通常の市域条件で飼育した。生後 4 週、20 週、36 週において、聴覚の評価のため ABR 閾値を測定した。また、実験の最後に側頭骨を摘出し、組織学的に評価を行った。

4. 研究成果

(1) 熱ショック応答誘導剤による内耳への熱ショック応答の誘導と保護効果について

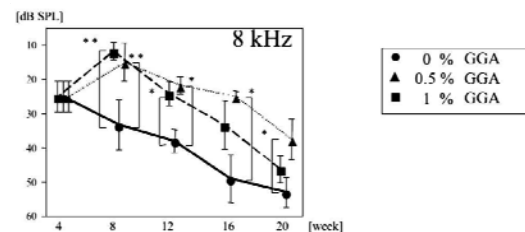
テプレノン (GGA) を摂取させたマウスの脳、蝸牛より抽出物を用いたウエスタンブロットの結果を示す。



(発表論文 1 より改編して引用)

コントロールに比較して、テプレノンを摂取させた群で、脳、蝸牛の両方に熱ショック蛋白質の発現が上昇していた。脳では 1% を蝸牛では 0.5% 摂取させた場合に最も強く発現した。このことより、テプレノンの経口摂取が内耳に熱ショック応答を誘導することが明らかになった。

次に、ABR 閾値の経時的变化を示す。



(発表論文 1 より改編して引用)

すべての群で、加齢と共に ABR 閾値が上昇し、聴覚機能の低下が認められたが、テプレノン摂取群ではその速度が緩徐であり、比較的聴覚が保たれていた。組織学的な検討でも、有毛細胞がテプレノン摂取群で多く残存していることが明らかとなった。この結果は進行性難聴マウス DBA/2J の聴覚障害を抑制する初めて報告である。

(2) 遺伝子改変動物を用いた内耳熱ショック応答の解明

4 週齢の ABR 閾値は各群でほぼ同じであった。経時的に評価すると 20 週齢までは変化はなかったが、36 週齢で HSF1 欠損マウスのみ ABR 閾値が上昇し、聴覚障害が示唆された。組織学的には、有毛細胞の欠損を認めたが、らせん神経質や血管条には明らかな変化を認めなかった。

以上の結果は、内耳が聴覚機能を維持するために HSF1 が必須の役割を持つことを示唆しており、現在、海外論文に投稿中である。

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 11件)

1. Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Kazutaka Sugimoto, Mitsuaki Fujimoto, Tsuyoshi Takemoto, Makoto Hashimoto, Yoshinobu Hirose, Hiroaki Shimogori, Naoki Hayashida, Sachiye Inouye, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita. Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. BRAIN RESEARCH 212:9~17, 2008 (査読有)
2. Tsuguyuki Arai, Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yuji Miyauchi, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita. The Free Radical Scavenger Edaravone Protects Hair Cells against Aminoglycoside Toxicity. THE BULLETIN OF THE YAMAGUCHI MEDICAL SCHOOL 55(1-2):15~20, 2008 (査読有)
3. Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita. Effect of water-soluble coenzyme Q10 on noise-induced hearing loss in guinea pigs. Acta Oto-Laryngologica 128:1071~1076, 2008 (査読有)
4. 菅原一真, 山下裕司. 平衡覚の加齢とアンチエイジング. アンチ・エイジング医学 -日本抗加齢医学会雑誌 4:621~624, 2008 (査読無)

5. 橋本 誠, 菅原一真, 御厨剛史, 田中邦剛, 広瀬敬信, 折田浩志, 下郡博明, 山下裕司. 音響障害に対するエダラボン投与の検討: 経正円窓膜的投与と全身投与について. 頭頸部自律神経 21:25~27, 2007 (査読無)
6. 菅原一真, 御厨剛史, 新井紹之, 下郡博明, 山下裕司. 熱ショック応答誘導物質を用いた前庭感覚細胞保護. 頭頸部自律神経 21:22~24, 2007 (査読無)
7. 御厨剛史, 菅原一真, 綿貫浩一, 山下裕司. 蝸牛において誘導剤により upregulateされていた Heat shock proteins の音響負荷後の変化の検討. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 25:67~68, 2007 (査読無)
8. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 下郡博明, 山下裕司. モルモットを用いた音響障害におけるコエンザイムQ10の蝸牛保護効果の検討. 頭頸部自律神経 22:43~45, 2007 (査読無)
9. 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 竹本剛, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司. 熱ショック応答誘導剤による内耳熱ショック応答の修飾と音響ストレスとの関係. 頭頸部自律神経 22:49~51, 2007 (査読無)
10. 山下裕司. 内耳疾患の治療をめざして-基礎研究の最前線 -末梢前庭器保護を目的とした治療戦略-. 日本耳鼻咽喉科学会会報 112:12~17, 2007 (査読無)

[学会発表] (計 35件)

1. Hiroshi Yamashita: Vestibular ototoxicity and protection
Oto-Neurotology Symposium 2009 大邱広域市 (韓国) 2009. 3. 21
2. Tetsuya Nakamoto, Yoshinobu Hirose, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto,

- Kazuma Sugahara, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: The Expression of Proinflammatory Cytokines After Acoustic Overexposure 第32回 Midwinter Reseach Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
3. Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Yuji Miyauchi, Tetsuya Nakamoto, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: The Protection of Vestibular Hair Cells with the Oral Administration of Teprenone 第32回 Midwinter Reseach Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
4. Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita: Decline of Heat Shock Response in Age Related Hearing Loss Model 第32回 Midwinter Reseach Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
5. Yoshinobu Hirose, Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Tetsuya Nakamoto, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: Maintenance of Hearing Requires Heat Shock Transcription Factor 1 in Mice 第32回 Midwinter Reseach Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
6. 中本哲也, 御厨剛史, 菅原一真, 山下裕司: 蝸牛における音響障害後の炎症性サイトカインと熱ショック転写因子の発現の変化について 第27回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 千葉2009. 2. 12
7. 菅原一真, 下郡博明, 宮内裕爾, 橋本 誠, 山下裕司: テプレノンによる前庭感覚細胞の保護効果 第67回 日本めまい平衡医学会総会 秋田2008. 10. 29 (ポスター)
8. 広瀬敬信, 御厨剛史, 菅原一真, 下郡博明, 山下裕司: 熱ショック転写因子の加齢性難聴への関わり 第18回 日本耳科学会総会・学術講演会 神戸2008. 10. 16
9. 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 下郡博明, 山下裕司: マウス音響障害モデルの熱ショック応答の評価と系統間による誘導の違いの検討 第18回 日本耳科学会総会・学術講演会 神戸2008. 10. 16
10. 中本哲也, 広瀬敬信, 御厨剛史, 菅原一真, 下郡博明, 山下裕司: 音響障害に対する内耳における炎症性サイトカインの発現について 第18回 日本耳科学会総会・学術講演会 神戸2008. 10. 16
11. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司: コエンザイムQ10の内耳保護効果に関する検討 第53回 日本聴覚医学会総会・学術講演会 東京 2008. 10. 2
12. 菅原一真, 宮内裕爾, 広瀬敬信, 御厨剛史, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司: 前庭感覚細胞死におけるBcl-1-xLの役割 第26回 頭頸部自律神経研究会 大阪2008. 8. 23
13. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 中本哲也, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司: 加齢における内耳熱ショック蛋白質発現の変化 第26回 頭頸部自律神経研究会 大阪 2008. 8. 23
14. 菅原一真, 御厨剛史, 広瀬敬信, 下郡博明, 山下裕司: 薬剤を用いたDBA/2Jマウスに対する内耳保護の試み 第2回 日本聴覚医学会聴覚アンチエイジング研究会 東京2008. 7. 4

15. 菅原一真, 広瀬敬信, 御厨剛史, 下郡博明, 山下裕司: コエンザイムQ10による進行性難聴マウスの内耳保護の試み 第8回 日本抗加齢医学会総会 東京2008. 6. 6
16. 菅原一真, 御厨剛史, 広瀬敬信, 下郡博明, 山下裕司: 進行性難聴モデルマウス DBA/2Jに対する内耳保護の試み 東京アンチエイジングアカデミー 東京2008. 6. 5
17. 山下裕司: 末梢前庭障害-末梢前庭器保護を目的とした治療戦略- 第109回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 大阪 2008. 5. 15 (シンポジスト)
18. 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 下郡博明, 山下裕司: 老人性難聴モデルに対する熱ショック応答増強剤の保護効果の検討 第109回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 大阪2008. 5. 15
19. Yoshinobu Hirose, Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: Effect of coenzyme Q10 and geranylgeranylacetone on DBA/2J mice, the model of age-related hearing loss 第12回 日韓耳鼻咽喉科学会 奈良 2008. 4. 3
20. Kazuma Sugahara, Hiroaki Shimogori, Makoto Hashimoto, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Yuji Miyauchi, Hiroshi Yamashita: The mitochondrial signals modulate the aminoglycoside induced hair cell death 第25回 バラニー学会 京都2008. 3. 31
21. Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: Effect of Water-Soluble Coenzyme Q10 on Age-Related Hearing Loss in DBA/2J and C57/B6 Mouse 第31回 MIDWINTER RESEARCH MEETING Phoenix, Arizona (アメリカ合衆国) 2008. 2. 16
22. Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Yuji Miyauchi, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: The Expression of Heat Shock Proteins in the Cochlea of DBA/2J Mice 第31回 MIDWINTER RESEARCH MEETING Phoenix, Arizona (アメリカ合衆国) 2008. 2. 16
23. Yuji Miyauchi, Kazuma Sugahara, Hiroaki Shimogori, Takefumi Mikuriya, Yoshinobu Hirose, Hiroshi Yamashita: Effects of Bax Inhibiting Peptide, Bcl-xL and Betulinic Acid on Neomycin Induced Outer Hair Cell Death 第31回 MIDWINTER RESEARCH MEETING Phoenix, Arizona (アメリカ合衆国) 2008. 2. 16
24. Takefumi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita: Effect of Geranylgeranylacetone on Progressive Hearing Loss in a Mouse Model of Age-Related Hearing Loss. 第31回 MIDWINTER RESEARCH MEETING Phoenix, Arizona (USA) 2008. 2. 16
25. 宮内裕爾, 菅原一真, 橋本 誠, 新井紹之, 折田浩志, 竹野研二, 下郡博明, 山下裕司: 有毛細胞死におけるミトコンドリアの役割 第66回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 大阪2007. 11. 14 (ポスター)
26. Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Takefumi Mikuriya, Makoto Hashimoto, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita: Effect of CoQ10 on noise-induced

- hearing loss in guinea pigs 第9回
Japan-Taiwan Conference in
Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck
Surgery 仙台2007. 11. 9 (講演)
27. Hiroshi Yamashita, Takefumi Mikuriya,
Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara :
Long-term pretreatment by
geranylgeranylacetone upregulates
heat shock proteins and ameliorates
noise injury in the guinea pig 第9回
Japan-Taiwan Conference in
Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck
Surgery 仙台2007. 11. 9 (講演)
28. 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 下郡博
明, 山下裕司 : 熱ショック応答誘導剤投与
御の音響ストレスに対する内耳Hsf1活性
化と熱ショック蛋白質誘導の関連につい
て 第17回 日本耳科学会総会 福岡
2007. 10. 18
29. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 下郡博
明, 山下裕司 : コエンザイムQ10の音響障
害に対する保護効果のメカニズム 第17
回 日本耳科学会総会 福岡2007. 10. 18
30. 菅原一真, 御厨剛史, 橋本 誠, 広瀬敬
信, 下郡博明, 山下裕司 : DBA/2J マウス
の内耳における変化と熱ショック応答関
連蛋白質の発現について 第52回 日本聴
覚医学会総会ならびに学術講演会 名古屋
2007. 10. 4 (講演)
31. 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 橋本 誠 ,
下郡博明, 山下裕司 : DBA/2J マウスでの
熱ショック応答増強・維持による進行性難
聴の保護の試み 第52回 日本聴覚医学会
総会ならびに学術講演会 名古屋
2007. 10. 4 (講演)
32. 御厨剛史, 菅原一真, 広瀬敬信, 竹本 剛,
橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司 : 熱ショッ
ク応答誘導剤による内耳熱ショック応答

の修飾と音響ストレスとの関係 第25回
頭頸部自律神経研究会 大阪2007. 8. 25 (講
演)

33. 菅原一真, 御厨剛史, 下郡博明, 山下裕
司 : DBA/2J マウスの加齢による内耳変化
と保護の試み 第7回 日本抗加齢医学会
総会 京都2007. 7. 20 (ポスター)
34. 御厨剛史, 菅原一真, 山下裕司 : 進行性
難聴モデルにおける蝸牛内熱ショック蛋
白質発現の変化と保護の検討 第1回 聴
覚アンチエイジング研究会 東京2007. 7. 6
(講演)
35. 御厨剛史, 菅原一真, 竹本 剛, 下郡博
明, 山下裕司 : モルモット蝸牛における音
響ストレス時とheat shock protein誘導剤
によるHsf-1の活性化とHsps誘導の検討
第108回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講
演会 金沢2007. 5. 17 (講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 裕司 (YAMASHITA HIROSHI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 00210419

(2) 研究分担者

下郡 博明 (SHIMOGORI HIROAKI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 702262763
菅原 一真 (SUGAHARA KAZUMA)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 20346555

(3) 連携研究者 なし