

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：19591974

研究課題名 (和文) 内耳障害時のミトコンドリアにおけるシグナル伝達の役割

研究課題名 (英文) The role of mitochondrial signal transmission in inner ear damages

研究代表者

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

研究成果の概要：

研究の目的は、ミトコンドリアを保護することを作用機序とした内耳保護療法の可能性を明らかにし、将来的に臨床応用につながる研究を行うことである。そのため、マウス卵形嚢の器官培養を用いて実験を行った。ネオマイシンの存在下で培養を行うと感覚細胞のみに細胞死を認めた。一方で培地中に Bcl-xl を溶解させると、細胞死の程度に影響が見られた。また、Bcl-xl は細胞死のシグナル伝達物質である JNK のリン酸化は阻害しなかったが、カスパーゼの活性化を阻害していた。これらの結果より、ミトコンドリアにおけるシグナル伝達分子が、有毛細胞死にも強く影響していることが示された。これらの結果は学会で報告済みであるが、現在、海外論文にも投稿中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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，ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

内耳感覚細胞が障害される際、細胞内シグナル伝達に関わる分子群の活性化が誘導され、その後に感覚細胞が死滅する。哺乳動物の感覚細胞はひとたび障害されると再生されることはなく、現在の難聴治療上の障壁となっている。我々は有毛細胞がストレスに曝露される際には、早期に MAP キナーゼの 1 種である JNK が活性化することが細胞死に

深く関わっていることを明らかにした (Sugahara et al, 2006)。また、細胞死の最終段階にはカスパーゼ-9 やカスパーゼ-3 が重要な役割を果たすことを報告している (Okuda et al, 2005)。しかし、これらのシグナル伝達にミトコンドリアがどのように関わっているかは、内耳感覚細胞では十分に明らかにされたとは言えないのが現状であった。

他の分野では、細胞死にミトコンドリアが

深く関わっていることが既に知られている (Shimizu et al, 1999)。ミトコンドリアに細胞死のシグナルが伝わると、イオンチャンネル蛋白質 (VDAC) が PT pore と呼ばれる構造を形成し、膜電位の消失、チトクロム C の放出を引き起こし、これがカスパーゼの活性化を誘導し、細胞死が生じると報告されている。

本研究において、内耳有毛細胞においてもミトコンドリアに関わるシグナル伝達が細胞死に関わっているのかどうかを明らかにし、その知見により新たな内耳保護療法の可能性について検討したいと考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ミトコンドリアを保護することを作用機序とした内耳保護療法の可能性を明らかにし、将来的に臨床応用につながる研究を行うことである。そのため、内耳障害においてミトコンドリアのシグナル伝達がどのような役割を持つのかを明らかにし、ミトコンドリア保護による内耳治療の動物モデルを作成、解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験的内耳障害に対するミトコンドリアの役割

実験動物として生後 4 週から 6 週の CBA/N マウスを用いた。多量のペントバルビタールを腹腔内投与した後、断頭した。無菌操作下に両側の側頭骨より卵形嚢を摘出し、培養液 (BME/EBSS 2:1 %v) に浮遊させ、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。実験的内耳障害として有毛細胞死を誘導するために培養液に 2 mM のネオマイシンを加えた。また、ミトコンドリア内のイオンチャンネル蛋白質を阻害する目的で、Bcl-XL, BH44-23, Bongkrekic Acid を様々な濃度で培養液に溶解させて用いた。薬剤は、ネオマイシンを加える 2 時間前に加え、その後にネオマイシンに曝露されるようにした。培養終了後、組織を 4%パラホルムアルデヒド (4 °C, overnight) で固定した。PBS で十分洗浄した後、シリジポンプと 27G の注射針による水流にて卵形嚢膜や耳石膜を除去し、感覚上皮を露出させた。その後、標本を抗カルモデュリン抗体、抗カルビンディン抗体を一次抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、有毛細胞を標識、蛍光顕微鏡下に評価した。

### (2) 有毛細胞におけるミトコンドリアシグナ

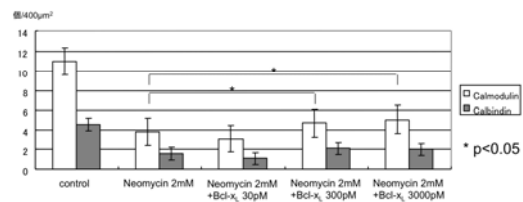
### ル伝達の位置づけ

実験 (1) で作成した標本を、抗リン酸化 JNK 抗体を用いた免疫組織化学を行い、JNK の活性化について評価した。また、卵形嚢培養を修了する 1 時間前に、蛍光物質でラベルされたカスパーゼ-3 阻害剤 (CaspaTag : Chemicon) を、培養液に追加した。洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、Texas-Red で標識された Phalloidin にて有毛細胞を染色、蛍光顕微鏡下に観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 実験的内耳障害に対するミトコンドリアの役割

薬剤を加えずに培養を行った卵形嚢では有毛細胞はほとんど消失しなかったが、2 mM のネオマイシン存在下では著明に減少していた。Bcl-XL を加えると、ネオマイシンによる有毛細胞死が抑制されていた。BH44-23、や Bongkrekic Acid を加えた群では、有毛細胞の残存率は、ネオマイシンのみの群と有意な差を認めなかった。



この結果より、ミトコンドリアにおいて、イオンチャンネル蛋白質を阻害することで、内耳感覚細胞の細胞死を抑制できることが明らかとなった。内耳感覚細胞死にミトコンドリアが重要な役割を持つことが示唆され、有毛細胞保護の標的すべき細胞内小器官であると考えた。

### (2) 有毛細胞におけるミトコンドリアシグナルの位置づけ

ネオマイシンのみと培養された卵形嚢では、リン酸化 JNK と caspase-3 の活性化の両方を認めた。Bcl-XL を加えた群では、caspase-3 の活性化は抑制されたが、リン酸化 JNK は抑制されなかった。このことから、ネオマイシンによる有毛細胞障害においては、まず、JNK のリン酸化が生じ、それ以降に、ミトコンドリアにシグナルが伝達され、caspase-3 が活性化することで細胞死が生じるものと考えられた。

これらの知見は、前庭器における初めての知見であり、Bcl-XL は内耳保護を目的とした、治療薬の候補となりうると考えられる。

## 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 9 件)

1. 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 55:15～20, 2008.
2. 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.
3. 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 1212:9～17, 2008.
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(5):621～624, 2008.
5. 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, 2008.
6. 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, 2008.
7. 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.
8. 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: 経正円窓膜の投与と全身投与について. 頭頸部自律神経 21:25～27, 2007.
9. 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(2):67～68, 2007.

[学会発表] (計 42 件)

1. 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 Research Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
2. 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 Research Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
3. 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 Research Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
4. 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 Research Meeting Baltimore, Maryland (アメリカ合衆国) 2009. 2. 14
5. 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
6. 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)
7. 宮内裕爾, 菅原一真, 橋本 誠, 新井紹之, 下郡博明, 山下裕司: 有毛細胞死抑制におけるミトコンドリアの変化 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. 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
9. 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
  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. 菅原一真, 御厨剛史, 橋本 誠, 広瀬敬信, 下郡博明, 山下裕司: 音響障害に対するエタラボンの保護効果と機序 第53回 日本聴覚医学会総会・学術講演会 東京 2008.10.2
  12. 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
  13. 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-xL の役割 第26回 頭頸部自律神経研究会 大阪 2008.8.23
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  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. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 橋本誠, 下郡博明, 山下裕司: DBA/2J マウスの進行性難聴に対する水溶性コエンザイム Q10 の効果 第109回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 大阪 2008.5.15
  20. 宮内裕爾, 菅原一真, 橋本誠, 新井紹之, 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109回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 大阪 2008.5.15
  21. 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
  22. 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
  23. 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
  24. 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
  25. 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
  26. 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
  27. 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)
  28. 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)
29. 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)
30. 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
31. 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
32. 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)
33. 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)
34. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 橋本 誠,  
下郡博明, 山下裕司 : DBA/2J マウスの進  
行性難聴に対するコエンザイム Q10 の効果  
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)
35. 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)
36. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 橋本 誠,  
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 第25回 頭頸部自律神  
経研究会 大阪 2007.8.25 (講演)
37. 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)

38. 菅原一真, 広瀬敬信, 御厨剛史, 橋本 誠,  
下郡博明, 山下裕司 : コエンザイム Q10 を  
用いた有毛細胞保護 第108回 山口大学  
医学会学術講演会並びに平成19年度総会  
宇部 2007.7.14 (講演)
39. 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)
40. 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  
有毛細胞保護 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)
41. 広瀬敬信, 菅原一真, 御厨剛史, 橋本 誠,  
下郡博明, 山下裕司 : 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  
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)
42. 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

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし