

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390442

研究課題名（和文） プロテオーム解析技術を用いた虚血性内耳障害の病態解明・診断法開発

研究課題名（英文） Proteomic analysis of ischemic cochlear damage as a diagnostic tool of sudden sensorineural hearing loss

研究代表者

暁 清文 (GYO KIYOFUMI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00108383

研究成果の概要（和文）：突発性難聴の原因の一つである一過性内耳虚血の病態を実験動物で検討した。1) プロテオーム解析の結果、虚血負荷により内耳には GPCRs Class A と Peptide GPCRs をコードする遺伝子の発現が顕著であり、臨床例での検討が期待された。2) 高度虚血に先行して軽度虚血を負荷しておくこと、内耳障害は有意に軽減され、内耳にも虚血耐性が備わっていることが証明された。3) 虚血直後に、アポトーシス阻害剤である AM-111 を正円窓上に留置すると内耳障害は濃度依存性に軽減された。

研究成果の概要（英文）：Pathology of transient cochlear ischemia as a cause of sudden deafness was investigated in gerbils. 1) Proteomic analysis showed that two genes, encoding GPCRs Class A and Peptide GPCRs, were dominantly expressed, suggesting needs for clinical study. 2) Cochlear damage was ameliorated by applying minor ischemia 2 days before major ischemia. 3) Administration of AM-111, an apoptosis inhibitor, on the round window membrane was proved effective in decreasing damage of the cochlea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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、虚血関連遺伝子、虚血関連タンパク、内耳低温療法、ischemic tolerance、虚血再発の防御

1. 研究開始当初の背景

一過性内耳虚血は突発性難聴の有力な原因の

一つであるが、その病態やメカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで本研究は、一過

性内耳虚血の動物モデルを作成し、虚血によって惹起される内耳病態の解明、内耳における虚血耐性の作用機序、内耳感覚細胞のアポトーシスとその治療、の3つの視点から突発性難聴の新しい診断・治療法開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血性内耳障害や虚血耐性、虚血後の内耳再生に関与するタンパク質を同定し、内耳虚血の新しい診断法や治療法開発への道筋をつけることにある。

実験にはスナネズミを用いた。この動物は生後2~3週頃にウイリス動脈輪の後交通動脈が自然閉塞することから、頸部で両側の椎骨動脈を絞扼することにより開頭せずに一過性内耳虚血が惹起できる。

この動物を用いることで、1)虚血により内耳で発現する遺伝子や蛋白質を探求する、2)突発性難聴の再発が稀な理由として、内耳虚血耐性の可能性を探索する、3)虚血障害を防御するためにアポトーシス阻害剤の効果を検証する、の3項目について研究を行った。

3. 研究の方法

1) 内耳虚血で変化する遺伝子の機能解析

実験動物に一過性内耳虚血を負荷した後、蝸牛骨壁を除去、Isogenを用いてtotal RNAを抽出した。これをBiotinでラベルしhybridizationを行った後、microarray法を用いてプロテオーム解析を行った(Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan)。その結果からコントロールと比べ5倍以上変化した遺伝子を Gene Ontology system (<http://www.geneontology.org/>) およびGene Map Annotator and Pathway Profiler (GenMapp, <http://www.genmapp.org/>)を用いて

検索し、遺伝子の機能解析を行った。

2) 虚血耐性メカニズムの解明

虚血耐性は「軽度虚血を先行負荷すると、その後の致命的虚血による障害が軽減される」現象である。そこで先行する軽度障害には2分間虚血を、高度障害には15分間虚血を用いて実験を行った。高度虚血をおこす2日前に軽度虚血を負荷し、7日後にABR測定や組織学的検査を行い、先行虚血の影響を検討した。

3) アポトーシス阻害剤の効果

虚血30分後に、アポトーシスを阻害する薬剤であるAM-111(ApoptosisのJNK inhibitor)を投与し、一過性虚血による内耳障害が軽減されるか否かを、ABR測定ならびに組織学的に内耳標本作製して検討した。

4. 研究成果

1) 遺伝子解析

虚血後に遺伝子解析を行った結果、コントロールと比べ5倍以上変化した(up-regulate)された遺伝子は、2分間虚血で454遺伝子、15分間虚血で453遺伝子であり、共通して増加していたのは155遺伝子であった。一方、1/5以下に減少した遺伝子は2分間虚血で342遺伝子、15分間虚血で361遺伝子であり、88遺伝子が共通して減少した。

これら遺伝子の機能解析を行ったところ、2分間虚血ではG protein-coupled receptor (GPCRs) Class A Rhodopsin-like が、15分間虚血ではGPCRs Class A Rhodopsin-like と Peptide GPCRs をコードする遺伝子の発現が顕著であった。

以上の結果から突発性難聴の患者でこのよう

な遺伝子が増えている場合は虚血が原因であると推察できることが分かった。

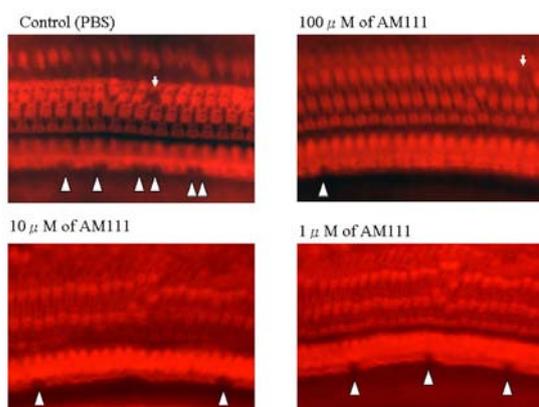
2) 虚血耐性

15 分間虚血による ABR 閾値上昇は 23.4 ± 8.9 dB (n=16)であったが、2 日前に 2 分間虚血を追加した場合、閾値上昇は 12.9 ± 9.4 dB (n=12) であり、軽度虚血を先行負荷することにより内耳障害は有意に軽減された。

このことは脳や心臓と同様、内耳にも虚血耐性のメカニズムが備わっていることを意味する。突発性難聴で再発が稀な理由の一つと考えられる。

3) アポトーシス阻害剤の効果

虚血後に正円窓上に AM-111 ゲルを留置することにより、内耳障害は濃度依存性に軽減された(下図、矢印は脱落した外有毛細胞)。本剤は虚血性内耳障害の治療に効果があるだろうと推察した。



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 13 件)

①Cao F, Hata R, Zhu P, Takeda S, Yoshida T, Hakuba N, Sakanaka M, Gyo, K.
Delayed neuronal cell death in brainstem after transient brainstem ischemia in gerbils

査読有, BMC Neuroscience 11, 115 2010.

①Hato N, Hyodo J, Takeda S, Takagi D, Okada M, Hakuba N, Gyo K.

Local hypothermia in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss.

査読有, ANL 2010;37(5): 626-30.

③暁 清文、勢井洋史

急性感音難聴の治療—高齢者のバリエーション

査読なし, 耳喉頭頸 82(1): 33-39, 2010.

④白馬伸洋、暁 清文

神経幹細胞による虚血性内耳障害の抑制効果

査読有, 耳鼻臨床 103:6; 517-521, 2010.

⑤Hyodo J, Hakuba N, Hato N, Takeda S, Okada M, Omotegawa Y, Gyo K.

Glutamate agonist causes irreversible degeneration of inner hair cells.

査読有 Neuroreport. 2009, 23;20(14):1255-9.

⑥Takeda S, Hata R, Cao F, Yoshida T, Hakuba N, Hato N, Gyo K.

Ischemic tolerance in the cochlea

査読有, Neurosci Lett, 2009 25, 462(3) 263-6.

⑦Watanabe F, Hakuba N, Gyo K.

Measurement of DPOAE after ischemia/reperfusion injury of the cochlea in gerbils.

査読有, Neurosci Lett. 2009 25; 467(2):135-8.

⑧Maetani T, Hyodo J, Takeda S, Hakuba N, Kiyofumi G.

Prednisolone prevents transient ischemia-induced cochlear damage in gerbils.

査読なし, Acta Otolaryngol Suppl. 2009; (562):24-7.

⑨岡田昌浩、兵頭 純、暁 清文、小林泰輔。

脳底動脈解離後に生じた高度感音難聴例。

査読有, 耳鼻臨床.102(10): 813-819, 2009.

⑩暁 清文

虚血機序に基づいた突発性難聴と病態と治療

査読なし, 日本医事新報 67-71:4420:2009.

⑪Takeda S, Hakuba N, Yoshida T, Fujita K, Hato N, Hata R, Hyodo J, Gyo K.

Postischemic mild hypothermia alleviates hearing loss because of transient ischemia.

査読有, Neuroreport, 2008, 27;19(13):1325-8

⑫Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, Tabata Y, Yoshida T, Komobuchi H, Takeda S, Hyodo J, Hakuba N, Gyo K.

Insulin-like growth factor 1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury.

査読有 Neuroreport. 2008 29; 19(16):1585-8.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 白馬伸洋、兵頭 純、竹田将一郎、表原慶典、岡田昌浩、暁 清文：一過性内耳虚血障害モデルとグルタミン酸アゴニスト蝸牛内投与による内耳障害モデル。第 55 回日本聴覚医学会、平成 22 年 11 月 11-12 日、奈良
- ② 表原慶典、白馬伸洋、岡田昌浩、竹田将一郎、暁 清文：一過性内耳虚血モデルに対するアポトーシス抑制蛋白 AM-111 の保護効果。第 28 回頭頸部自律神経研究会、平成 22 年 9 月 11 日、大阪
- ③ 暁 清文：虚血機序に基づいた突発性難聴の治療。第 7 回信州めまい・難聴研究会、平成 21 年 12 月 12 日、松本
- ④ Gyo K: Pathophysiology of sudden hearing loss. 10th Taiwan-Japan otolaryngology head and neck conference. 2009, December 4-5, 2009. Yilan, Taiwan.
- ⑤ 表原慶典、白馬伸洋、寺岡正人、暁 清文：一過性内耳虚血に対するアポトーシス抑制人工ペプチド AM-111 の防御効果。第 54 回日本聴覚医学会、平成 21 年 10 月 22-23 日、横浜
- ⑥ 竹田将一郎、吉田 正、白馬伸洋、羽藤直人、暁 清文：内耳における虚血耐性。第 19 回日本耳科学会、平成 21 年 10 月 8-10 日、東京
- ⑦ 白馬伸洋、暁 清文：虚血性内耳障害に対する神経幹細胞を用いた治療。第 27 回頭頸部自律神経研究会、平成 21 年 8 月 29 日、大阪
- ⑧ 白馬伸洋、清水義貴、暁 清文：グルタミン酸トランスポーター欠損マウスにおける加齢変化。第 3 回聴覚アンチエイジング研究会。平成 21 年 7 月 3 日、東京
- ⑨ 岡田昌浩、暁 清文：一過性内耳虚血に対する人工酸素運搬体の有用性。第 53 回愛媛県地方部会、平成 20 年 12 月 14 日、松山

⑩ 表原慶典、暁 清文：一過性内耳虚血に対する AM-111 の保護効果。第 53 回愛媛県地方部会、平成 20 年 12 月 14 日、松山

⑪ 竹田将一郎、白馬伸洋、兵頭 純、羽藤直人、暁 清文：一過性虚血後の内耳に対する低体温の保護効果。第 18 回日本耳科学会、平成 20 年 10 月 16-18 日、神戸。

⑫ 森実 勲、白馬伸洋、兵頭 純、暁 清文：一酸化窒素(NO)による虚血性内耳障害の機序。第 53 回日本聴覚医学会、平成 20 年 10 月 2-3 日、東京

⑬ 高木大樹、羽藤直人、兵頭 純、暁 清文：内耳低温療法を用いた突発性難聴の治療検討。第 53 回日本聴覚医学会、平成 20 年 10 月 2-3 日、東京

⑭ 竹田将一郎、吉田 正、秦 龍二、白馬伸洋、兵頭 純、暁 清文：内耳における虚血耐性。第 26 回頭頸部自律神経研究会、平成 20 年 8 月 23 日、大阪

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

暁 清文 (GYO KIYOFUMI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00108383

(2) 研究分担者

秦 龍二 (HATA RYUJI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90258153

羽藤 直人 (HATO NAOHITO)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60284410

白馬 伸洋 (HAKUBA NOBUHIRO)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70304623