

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890146

研究課題名(和文) 熱ショック応答を用いた音響障害と老人性難聴予防の研究

研究課題名(英文) Protection for inner ear against noise injury and aging by heat shock response

研究代表者

御厨 剛史 (MIKURIYA TAKEFUMI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00467797

研究成果の概要(和文)：熱ショック応答誘導剤はモルモット音響障害モデルに対し、保護的に働いた。このとき、内耳熱ショックタンパク質(Hsp)は、他器官とは違う誘導パターンを示し、内耳での特殊性が示唆された。また、マウス音響障害モデルでも同様に保護効果を示した。老人性難聴モデルマウスでこの薬剤は、Hspの誘導と、難聴の進行と感覚細胞死の抑制効果を認めた。以上の結果から、本薬剤が音響障害と老人性難聴に対し保護効果を示すこと、熱ショック応答が内耳で重要な意味をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein inducer protect against noise injury in guinea pig and mice. In this response, the pattern of induction of Hsp is interestingly different from other organs. Moreover this reagent prevent age related hearing loss and loss of sensory neuron. These results indicate that heat shock response in inner ear is vital response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,320,000	396,000	1,716,000
2009年度	1,180,000	354,000	1,534,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：内耳保護、熱ショック応答

科研費の分科・細目：外科臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳保護、老人性難聴、音響障害、熱ショック応答

1. 研究開始当初の背景

熱ショック応答はすべての生物が有する生存にとって必須のストレス応答である。これは生体にストレス(高温、虚血、毒性物質など)が加わると、変性した蛋白質が、熱ショック転写因子(HSF1)を活性化し、熱ショック蛋白質(Hsp)を誘導する応答であり、この熱ショック蛋白質は変性した蛋白質の

機能を回復、分解処理し、またアポトーシスを抑制することで多くの細胞を保護することが知られている(Morimoto et al,1998)。生体はあらかじめストレスにさらされておくと、次の致命的なストレスに対し耐性を獲得するが(preconditioning)、これには熱ショック蛋白質とその転写因子であるHSF1が中心的な役割を持つ。

内耳においてもこの現象は知られ、あらかじめ熱ストレスで熱ショック蛋白質を誘導しておく、音響ストレスによる障害を軽減する (Yoshida et al, 1999)。反対に、HSF1 ノックアウトマウスでは障害が増加し、熱ショック応答が内耳保護に働くことが証明されている (Sugahara et al, 2003)。内耳の感覚細胞は自然な状態では再生せず、内耳保護、特に予防医学の重要性が再認識される。

この観点から各方面で広く研究されている熱ショック応答誘導剤、ガラニルガラニルアセトン (GGA、Hirakawa et al, 1996) に着目し、モルモット音響障害に対する保護効果を報告した (Mikuriya et al, 2005)。ガラニルガラニルアセトンは 1984 年以來国内で広く処方されている抗潰瘍薬で、副作用の少ない薬剤である。しかし、予防医学の一手段として臨床応用するには、より強力な保護効果の追求、安全投与量の設定、分子レベルでの保護機構の解明など解決すべき点がある。これらの課題を本研究で明らかにしていき、さらに音響障害だけではなく、ヒトで頻度の高い老人性難聴のモデルマウスに対する保護効果を併せて検討し、内耳疾患に対する熱ショック応答を用いた予防法を確立する。

2. 研究の目的

モルモット音響障害モデルに対するガラニルガラニルアセトンの有効かつ安全な投与量、投与期間を検討する。また新たにマウス音響障害モデルを作成し、モルモットと比較しながら、ガラニルガラニルアセトンの有効投与量を決定する。続いてマウス蝸牛を用いた遺伝子的評価方法 (real time RT-PCR) を確立し、マウス蝸牛での熱ショック応答を、これまでのタンパク質レベルに加え、遺伝子レベルで評価する。さらに、確立したマウス蝸牛での熱ショック応答の評価方法を利用し、老人性難聴モデルマウスを用いて、ガラニルガラニルアセトンを長期投与した蝸牛での熱ショック応答の遺伝子的変化の評価を目指す。

3. 研究の方法

(1) モルモットを用いた実験系

モルモット音響障害に対するガラニルガラニルアセトンの効果は、既に報告済みであるが (Mikuriya, et al, 2005)、効果はまだ満足すべきものではない。しかし、蝸牛での熱ショック蛋白質の誘導のパターンが、投与量ではなく投与期間の違いにより大きく修飾されることを申請者は発見しており (30st Midwinter meeting of association for research in otolaryngology, 2006 で発表済み)、投与期間を大きく延長した予防動物モデルを作成し音響障害への効果を検討する。同時に蝸牛内での熱ショック蛋白質 mRNA

を real time RT-PCR で評価し、蛋白質レベルの解析と照合させ保護機序をより詳細に明らかにする。

モルモット音響障害

動物：ハートレイ系モルモット

投与期間 1 から 4 週間を 1 日 1 回経口投与
→ 音響負荷 → 7 日後に ABR 検査・組織学的検討

(投与量を 50-600mg/kg に設定)

蛋白質解析、RNA 発現解析

(2) マウスを用いた実験系

マウス (CBA/N マウス、C57/B6 マウス、ICR マウス、DBA/2J マウス) の蝸牛より抽出した RNA を用い、realtime RT-PCR で熱ショック蛋白質 mRNA の発現量を評価する方法を確立する。マウスにガラニルガラニルアセトンを投与し、各器官 (蝸牛以外の) での熱ショック蛋白質の発現を mRNA レベルと蛋白質レベルでみる。これにより蝸牛での誘導能がわかり、至適投与量の決め手の助けとなる。また、体温や体重を測定し薬の効果や副作用の有無を評価する。いくつかの系統のマウスで音響障害モデルを作成し、最も効率の良いマウスを選択し次の実験に移る。マウス音響障害モデルに対するガラニルガラニルアセトンの予防効果と、音響付加前後の熱ショック蛋白質発現の変化を検討し、さらにモルモットの結果と比較することでこの薬の効果を追試する。

マウス音響障害

投与期間 1 から 4 週間を 1 日 1 回経口投与
→ 音響負荷 → 7 日後に ABR 検査・組織学的検討 (投与量を 50-600mg/kg に設定)

蛋白質解析、RNA 発現解析

また、蝸牛、脳、心臓、肝臓等を摘出し蛋白質・RNA 解析し内耳と他器官との熱ショック応答を比較する。

(3) 老人性難聴の治療にむけて

老人性難聴モデルとしてしられる DBA/2J マウスを用い、年齢による熱ショック応答の変化を蛋白質レベル、mRNA レベルで評価する。このマウスにガラニルガラニルアセトンを投与すると、難聴進行と蝸牛有毛細胞死の予防効果が得られることは報告者がすでに結果を得ている (Mikuriya, et al. Brain Res. in press)。このメカニズムを、音響障害モデルで培った生化学的・分子生化学的手法で検討する。

マウス老人性難聴

DBA/2J マウスに薬剤投与 (4 週齢から) → 20 週齢で蝸牛摘出。ABR、組織学的検討に加え、RNA、蛋白質発現解析を行う。

薬剤：ガラニルガラニルアセトンの原体または粉末製剤 (Selbex®) を経口投与する

蛋白質発現：Western blotting 法と免疫組織化学。1 次抗体には Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp27, Hsf1, β -actin に対する抗体を用いる。

mRNA 発現：フェノールにて RNA を抽出。2 step realtime PCR 法 (Lightcycler®を使用。当大学遺伝子実験施設で共用可) で定量を行う。モルモット Hsp70, Hsp90, Hsp27 mRNA のプライマーは公開されていないが、申請者のグループで既にシーケンス解析されているのでこれを用いる。マウスのものはすべての熱ショック蛋白質塩基配列が公開されているので、これらより設定する。

聴性脳幹反応検査 (ABR 検査)：当施設でこれまで使用してきた設備を用いる (Sugahara et al, 2001)。周波数刺激は 2~32kHz である。

音響障害：モルモットに対してはこれまで使用してきた障害システムを用いる (Sugahara et al, 2001)。

組織学的検討：蝸牛外有毛細胞のカウントと免疫組織化学的評価法 (熱ショック蛋白質) を行う。

4. 研究成果

モルモットへの熱ショック応答誘導剤の投与量、投与期間を割り振って設定したところ、ABR、組織学的検討では 1 週間の至適投与量は 100mg/kg/回を一週間であった。また、この投与量で投与期間を 4 週間に延長すると保護効果の増強を認めた。この結果は投与期間を延長させれば一回投与量を低く抑えることが可能な意味をもつと考えられた。また、生化学的な結果では音響負荷後の熱ショック蛋白質の変化が薬剤によって修飾されていた。具体的には、音響負荷 3 時間後に Hsp70 の著明な発現減少をみとめ、RT-PCR でも Hsp70 の誘導が減少していた。負荷後 24 時間後にはすみやかに増加した。一方 Hsp27 は負荷後 3 時間で増加し、24 時間後にはさらに増強された。音響負荷 3 時間後に内耳で急速に Hsp70 の変化がおきていることがわかったが、この変化は他のストレスではみられない変化であり、内耳での熱ショック応答の特殊性を示唆していると考えられた。

続いて、マウスでも同様の熱ショック応答が起きるかどうかを検討した。マウス (CBA/N) に薬剤を 0.5% 濃度 (100-400mg/kg 相当) の混合餌経口投与で連日投与 (8 週間) をおこなったところ、モルモットと同様にマウス蝸牛へ熱ショック応答が誘導され、音響

障害からの保護効果を示した。この結果から、種を変えても、熱ショック応答誘導剤が働くことがわかった。

老人性難聴モデルマウス (DBA/2j) に対して、4 週齢から 20 週齢までこの薬剤を投与した。投与 8 週で内耳に Hsp が誘導され、Hsp70 の主な誘導部位は内外有毛細胞が著明で、他の細胞でも誘導が認められた。このマウスは 4 週齢からすでに難聴を発症するが、年齢に伴って進行する難聴の進行と、感覚細胞死の抑制効果が示された。実験を通して致命的な副作用や体重減少など見られなかった。以上の結果から代表的な内耳障害である音響障害、老人性難聴に対して、熱ショック応答誘導剤が有用でかつ安全な手段であることが示唆された。

熱ショック応答は細胞を強力に不死化する方向へ導く生体に本来備わった応答であると考えられる。内耳を構成する感覚細胞はすべて、障害を受けると自然には再生できない。再生できない感覚細胞を多く含む蝸牛において、ストレス時の熱ショック応答が、再生できる細胞を多く含む器官とは違うと考えられる。今回使用した薬剤を用いて熱ショック応答を増強し、音響障害、老人性難聴を予防するという手法は、初の試みで独創性があるものである。また、増強の手段に用いた薬剤も、国内のみで、臨床で既に安全に広く用いられている薬剤でありヒトへの応用性が高い。本研究を遂行していくことによって、内耳での熱ショック応答の特殊性・重要性をより明確にし、さらには、ヒト音響障害または老人性難聴の予防法の確立に近づけると考えられる。

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 5 件)

- ① 中本哲也、御厨剛史、菅原一真、下郡博明、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の動向、頭頸部自律神経、24、15、2010、査読なし
- ② 山下裕司、御厨剛史、熱ショック応答と内耳保護機能、耳鼻咽喉科展望、52、10-16、2009、査読なし
- ③ 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、43-45、2008、査読なし
- ④ 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、査読あり

- ⑤ 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、査
読あり

〔学会発表〕(計2件)

- ① 御厨剛史、加齢による内耳熱ショック蛋
白質の変化について、第54回日本聴覚
医学会総会・学術講演会、2009年10月
22日、神奈川県横浜市
② 御厨剛史、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回学術講演会・耳科学会、2008年
10月16日、兵庫県神戸市

〔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

御厨 剛史 (MIKURIYA TAKEFUMI)
山口大学医学部附属病院・助教
研究者番号：00467797

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし