

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16017

研究課題名（和文）イメージング質量分析技術を用いたOCT-2基質薬物の内耳動態の可視化

研究課題名（英文）Visualization of inner ear kinetics of OCT-2 substrate drugs using mass spectrometry imaging

研究代表者

山口 太郎 (Taro, Yamaguchi)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：30710701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：全身投与したOCT-2基質薬物の内耳内における薬物分布を質量分析イメージング（Mass Spectrometry Imaging; MSI）技術により可視化することを目的として本研究を遂行した。蝸牛は骨組織に囲まれた器官であるため、そのままの条件ではMSIを適用できなかった。しかし、テープ材を用いた切片作成方法を用いることで、メトホルミン投与後、マウス蝸牛組織切片中の各部位におけるメトホルミン由来のシグナルを検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身投与された薬物は、内耳蝸牛内の難聴治療標的細胞への分布過程を経て応答性を得ることができる。しかしながら、この標的細胞への分布に及ぼす薬物輸送体の寄与については未解明なままである。本研究の遂行により、全身投与後のメトホルミンの時間経過に伴う内耳内分布をMSIを用いて可視化することができた。メトホルミン以外にも質量分析が可能な薬物であれば、本法を適用可能であり、有効な治療候補薬の薬物動態の詳細を可視化・定量化することを可能とし、それら薬物の適切な投与設計への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to visualize the distribution of systemically administered OCT-2 substrate drugs in the inner ear using Mass Spectrometry Imaging (MSI). Because the cochlea is surrounded by bone tissue, MSI could not be applied under the same conditions. However, by using a sectioning method with tape material, we were able to detect metformin-derived signals at various sites in sections of mouse cochlear tissue after metformin administration.

研究分野：薬理学

キーワード：内耳 質量分析イメージング メトホルミン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国において、加齢に伴う難聴（加齢性難聴）の予防・治療は、早急に克服すべき高齢者医療における課題の一つであるが、対応策は現時点では存在しない。加齢性難聴のみならず、突発性難聴や急性音響外傷に適応のある治療薬は認可されていない。申請者らを含めて国内外を問わず難聴モデル動物や細胞レベルでの研究が数多く実施され、細胞成長因子やカルパイン阻害薬が内耳保護作用を示すことが明らかにされ、難聴治療候補薬に関する知見は集積している。一方で、難聴に対する医薬品創出には、治療標的分子を探索するだけでなく、薬効を発揮するための十分な内耳内薬物濃度を維持することが必須となる。全身投与された薬物は、血液内耳関門を通過する内耳移行過程、内耳移行した薬物の難聴治療標的細胞への分布過程を経て、内耳応答性を得ることができる。しかしながら、この血液内耳関門における薬物輸送機構および標的細胞への分布に及ぼす薬物輸送体の寄与については未解明なままである。

### 2. 研究の目的

本研究では、薬物の内耳移行を制限する血液内耳関門での OCT-2 基質薬物であるメトホルミンの輸送制御の変化について解析するとともに、全身投与した OCT-2 基質薬物の内耳内における薬物分布を質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging: MSI) 技術により可視化する。本研究により、全身投与後の OCT-2 基質薬物の内耳動態を包括的に明らかにし、難聴に対する医薬品創出を目指す。

### 3. 研究の方法

聴力測定は、4、8、12、16、20、32 kHz における聴覚閾値を測定した。マウス外耳道へスピーカーを差し、スピーカーから一定音圧のトーンバースト純音を 0.1 msec 間隔で発生させた。音圧を 100 dB SPL から 5 dB SPL ずつ段階的に減弱させ、脳波が出現する最小の音圧を聴覚閾値とした。免疫染色は、生理食塩水および 4% paraformaldehyde (PFA) で全身を灌流固定し、内耳を摘出したのち、さらにブアン液にて浸漬固定後にパラフィン包埋して標本を作成した。標本の切片を作成し、rabbit anti-organic cation transporter2 polyclonal antibody (1:100) で反応し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, OLYMPUS 社製) を用いて撮影した。メトホルミン投与後の蝸牛内への移行は、-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (-CHCA) で前処理を行なった標本を用いて iMScope TRI0 (SHIMAZU 社製) により解析した。解析するにあたって  $m/z$  129.99 (MS) 付近のケミカルノイズの影響を考慮して  $m/z$  130.11 (MS) のピークを測定した。統計解析は、JMP ソフトウェアを用いて実施し、多群間の統計学的有意性は、1 元配置分散分析後に Steel-Dwass 法により評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 音響曝露による聴覚障害に対するメトホルミンの効果

騒音曝露は、防音室内でマウスに 1 時間 8 kHz オクターブバンド、110 dB Sound Pressure Level (SPL) のホワイトノイズを曝露した。メトホルミン (50、200 mg/kg) あるいはその溶媒は、騒音曝露 30 分前に皮下投与した。騒音曝露直後 (Day 0)、1 日後 (Day 1)、7 日後 (Day 7) に聴覚閾値 (4、8、12、16、20、32 kHz) を測定した。騒音曝露は、測定した全ての周波数において曝露直後に聴覚閾値を有意に上昇させた。この上昇は、12、16、20、32 kHz において少なくとも騒音曝露 7 日後まで持続し、20 dB から 40dB の聴覚閾値変動を示した。メトホルミン皮下投与は、用量依存的に騒音曝露による聴覚閾値の上昇を有意に抑制した。特に 200mg/kg のメトホルミンの投与では、測定した全ての周波数の聴覚閾値において騒音曝露 7 日後の聴覚閾値の上昇を有意に抑制した。

#### (2) Organic cation transporter2 の蝸牛内局在

未処置マウスの蝸牛組織切片を作製し、organic cation transporter (OCT)2 に対する特異的抗体を用いて免疫組織化学法により、OCT2 の局在を解析した。その結果、OCT2 は、ラセン靱帯 (Spiral ligament: SLig) および血管条 (Stria vascularis: SV)、コルチ器 (Organ of Corti: OC)、ラセン板縁 (Spiral limbus: SLim) などの広範囲に発現が認められた。血管条では基底細胞 (Basal cell)、コルチ器では外有毛細胞 (Outer hair cell) に特に強いシグナルが検出された。

#### (3) イメージング質量分析全身投与したメトホルミンの内耳内分布

蝸牛切片にメトホルミン標準溶液 (1 mg/mL) を滴下後、MSI 測定を行った。蝸牛切片上においてメトホルミン由来ピークが  $m/z$  130.11 に検出された。メトホルミン非投与のマウスの蝸牛組織切片を作製し、MSI 測定を行ったところ、蝸牛切片上にメトホルミン由来シグナル ( $m/z$  130.11) は検出されなかった。メトホルミン投与後 0.5、1 時間、3 時間のマウスの蝸牛組織切片を作製し、MSI 測定を行ったところ、投与後 0.5、1、3 時間においてメトホルミン由来ピークが検出さ

れた。また、全てのスポットのシグナル相対強度の平均値を算出した結果、少なくともこれら時間における切片上のメトホルミン量の増減は認められなかった。さらに、メトホルミン投与後の蝸牛内局在を明らかにするために OC、SG、蝸牛軸 (Modiolus)、LW、SLim、骨 (Bone) を ROI 指定し、各 ROI におけるシグナル強度を算出した。その結果、LW のみで投与後 1 時間において投与後 0.5 時間と比較して増加がみられた。その他の領域において投与後 0.5 時間から 3 時間までの時間におけるシグナル強度に大きな変化は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 太郎、喜多 知子、坂本 達則、三輪 徹、尾中 勇祐、米山 雅紀
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いた メトホルミン全身投与後の内耳内分布の可視化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------