

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2011
課題番号：	22791637
研究課題名（和文）	新しい虚血再灌流動物を用いた、内耳虚血の高圧酸素、エダラボン同時投与の治療効果
研究課題名（英文）	Evaluation of effect of simultaneous hypervaric oxygen therapy and edaravone for inner ear ischemic diseases in animal models.
研究代表者	
	乾 崇樹 (Inui Takaki)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	60465614

## 研究成果の概要（和文）：

突発性難聴をはじめとする内耳性難聴の病態の一つとして、内耳における虚血性病変が唱えられている。無呼吸負荷による一過性内耳虚血により蝸牛内直流電位（EP）は一時的に低下するが、内リンパ腔にCキナーゼ阻害剤を投与すると、無呼吸負荷によるEP低下が著明に抑制される。また、内リンパ腔にCキナーゼ活性化剤を投与するとEPが著明に低下した。したがって、虚血により血管条細胞においてCキナーゼが活性化することがEP低下の一因であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Ischemia is one of the possible pathological conditions causing sudden deafness. The endolymphatic application with PKC inhibitors significantly suppressed the decrease in the EP induced by transient asphyxia. Furthermore, endolymphatic application with PKC activator caused large decrease in the EP. These results indicate that decrease in the EP induced by asphyxia is the result of PKC activation in the stria vascularis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：蝸牛内直流電位、高圧酸素療法、エダラボン、内耳虚血

## 1. 研究開始当初の背景

突発性難聴をはじめとする内耳性難聴は日常診療においてしばしば経験する疾患で

あるが、その原因、病態についてはいまだ不明な点が多い。現在EBMとして治療の有効性が確立されているのはステロイドホルモン

の全身投与のみであるが、エビデンスはないものの明らかな有効例を経験する他の治療法が存在するのも事実である。これらの治療の根拠となる病態の一つとして、内耳における虚血性病変が唱えられており、内耳虚血が生じた結果、蝸牛血管条への血流供給が低下することで蝸牛内直流電位 (EP) が低下した結果、聴力損失が生じる可能性が示唆される。

内耳蝸牛中央階には+80 mV 程度の EP が存在し、この電位は有毛細胞での受容器電位の発生に重要な役割を果たしているが、その発生・維持機構にはいまだ不明な点が多く残されている。EP の発生機構として、世界的には two-cell model と呼ばれる説が主流であり、これは蝸牛血管条の中間細胞におけるカリウムチャンネルを介した K<sup>+</sup> の拡散電位が EP を発生するとするものである。我々の研究室では、膜透過性の Ca<sup>2+</sup> キレート剤である EGTA/AM や L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネル阻害剤である nifedipine を内リンパ腔に投与すると、無呼吸負荷時の EP の低下が著明に抑制されることを見いだしている (Mineharu A. et al., 2005, Nimura Y. et al., 2007)。そこで我々は、そして申請者らは、無呼吸負荷による EP の低下が、無呼吸負荷により血管条側基底膜に存在する L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが開孔し、辺縁細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇することで EP 発生機構に影響を及ぼして起こることを明らかにしてきた (Inui T. et al., 2007, Mori Y. et al., 2009)。これらの結果は、内リンパ腔に投与した膜透過性の薬剤が無呼吸による EP 低下を抑制することから内リンパ腔に面していない中間細胞での EP 発生に対して疑問を投げかけるものである。また、辺縁細胞側基底膜には L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが多数存在しており、これを阻害することで無呼吸負荷による EP 低下を抑制できることから、少なくとも辺縁細胞は EP の調節に関与していることが示唆される。以上の成果を総括すると、無呼吸負荷による酸素欠乏時には辺縁細胞側基底膜の L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが開孔して辺縁細胞内に Ca<sup>2+</sup> が流入し、これが辺縁細胞の正常機能を阻害することにより EP が低下するものと考えられる。そこで本申請では、無呼吸負荷に伴う辺縁細胞 L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルの開孔機序についての検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

かねてより、EP の正の部分は蝸牛血管条において発生し、負の部分はコルチ器において発生すると考えられてきた。申請者らは、EP の正の部分に着目して検討を行い、無呼吸負荷による低酸素状態では、血管条側基底膜の L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが開孔し、辺縁細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇することで EP 発生機構が障害されることにより生じることを明らかにしてきた (Inui T. et al., 2007, Mori

Y. et al., 2009)。本申請では、この低酸素状態において L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが開孔する機構に着目して検討を行った。例えば、低酸素状態を感知することが知られている頸動脈小体では、低酸素状態において蛋白リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) が活性化し、L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを含む電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが開孔することが知られている。さらに、過去の報告では、蝸牛血管条細胞には A キナーゼ (PKA) および C キナーゼ (PKC) が存在することが知られている。このことから、無呼吸負荷による EP 低下においては、低酸素によりこれらのプロテインキナーゼが活性化することで L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが活性化して辺縁細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇することで EP が低下するとの仮説をたて、無呼吸負荷による EP 低下におけるプロテインキナーゼの関与を検討した。なお、PKC には多くのアイソフォームが存在するが、活性化に Ca<sup>2+</sup> およびジアシルグリセロール (DAG) が必要な conventional PKC (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$ )、活性化に DAG が必要であるが Ca<sup>2+</sup> は必要ない novel PKC (PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\mu$ , PKC $\theta$ )、活性化に Ca<sup>2+</sup> および DAG が不要な atypical PKC (PKC $\iota$ , PKC $\zeta$ ) の 3 つのサブファミリーに分類される。

本研究では蝸牛内リンパ腔に種々のプロテインキナーゼ阻害剤および活性化剤を投与し、無呼吸負荷時の EP 低下に対する効果と、薬剤単独による EP に対する効果を検討した。この検討を行うことで、無呼吸負荷による EP 低下におけるプロテインキナーゼを介した L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルの活性化機構を明らかにし、その結果から虚血性内耳障害に対する治療法の検討を行うことを目的とした。

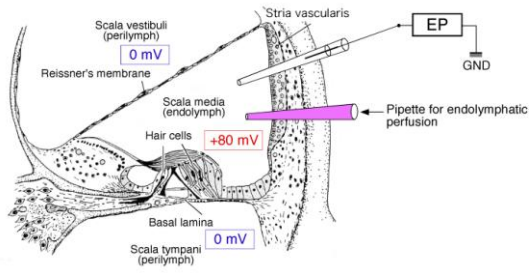
## 3. 研究の方法

実験動物としてプライエル反射陽性の白色モルモットを用いた。気管切開による人工呼吸下に蝸牛を露出し、経血管条的にカ・ラス微小電極およびカ・ラス微小ヒ・ットを蝸牛中央階に刺入することで、内リンパ腔に各種薬剤を投与しながら EP を同時に測定した。EP 測定用電極には 0.5 M の KCl 溶液を充填し、電極ホルダーを介してエレクトロメーター (WPI, FD223) に接続し、EP 変化を MacLab 8s (ADInstrument) にて記録した (図 1)。また、内リンパ腔に投与した薬剤として、非選択的プロテインキナーゼ阻害剤である staurosporin、PKA 選択的阻害剤である PKAi、PKC 選択的阻害剤である GF109203X、G66976、rottlerin、PKC 活性化剤である thymeleatoxin、ingenol を使用した。

実験動物に対する内耳虚血の誘発は、人工呼吸器停止により無呼吸とすることにより

虚血状態を誘発し、人工呼吸器の再稼働により再灌流させた。

## METHODS 2

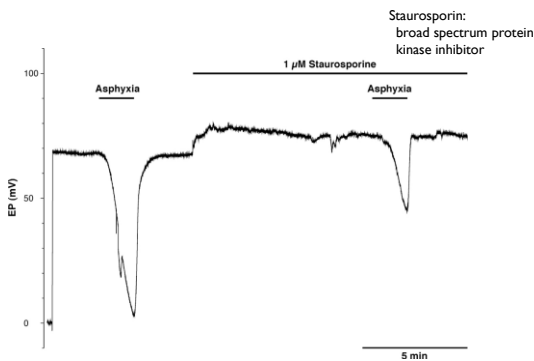


(図1：方法)

### 4. 研究成果

平成 22 年度は、週齢 3 週のマウスを用い虚血モデルマウスの作成と実験手技の確立を試みた。さらに平成 23 年度は、前年度に確立した虚血再灌流マウスを①コントロール群、②非特異的プロテインキナーゼ阻害剤投与群、③A キナーゼ阻害剤投与群、④C キナーゼ阻害剤投与群の 4 群に分け、EP について評価を行った。

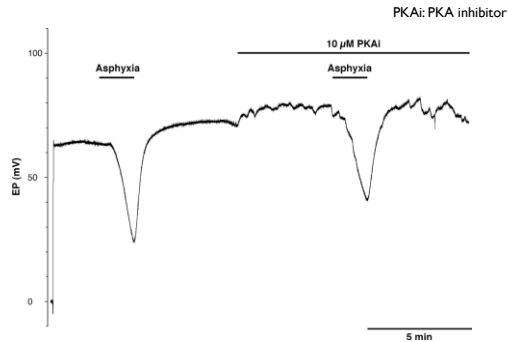
ベンチレーター停止による無呼吸負荷を行うと、コントロール群では+80 mV 程度であった EP は、90 秒以内に 0 mV 以下に低下するが、内リンパ腔に非特異的プロテインキナーゼ阻害剤である staurosporin を投与すると EP 低下が著明に抑制される (図 2) ため、虚血状態では何れかのプロテインキナーゼが活性化して EP 低下を引き起こすものと考えられた。そこで、虚血状態で活性化するプロテインキナーゼを同定するために、PKA および PKC に関して検討を加えた。



(図 2)

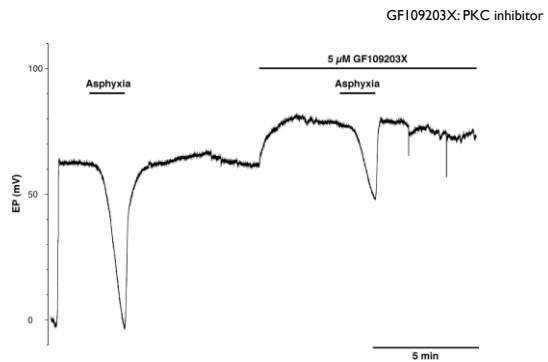
PKA 阻害剤投与群では、PKA 選択的阻害剤である PKAi を内リンパ腔に投与したが、無呼吸負荷による EP 低下は抑制されず、呼吸再開時の EP の回復が著明に抑制された (図 3)。

このことから、低酸素負荷による PKA の活性化を介して L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが活性化するのではないものと考えられた。一方、人工呼吸再開時の EP の回復が PKA を阻害することで明らかに抑制されることから、PKA は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA および SARCA) の活性化等を介して、辺縁細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度低下に関与している可能性が示唆された。



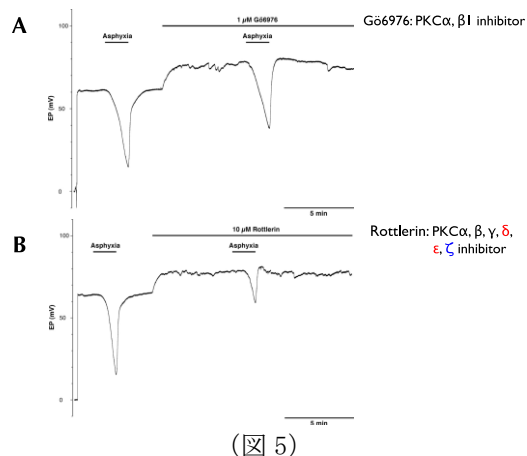
(図 3)

次に、アイソフォーム非選択的 PKC 阻害剤である GF109203X を内リンパ腔に投与すると、無呼吸負荷による EP 低下が著明に抑制された (図 4)。このことから、虚血状態での EP 低下に PKC を介した蛋白リン酸化過程が関与している可能性が示唆された。



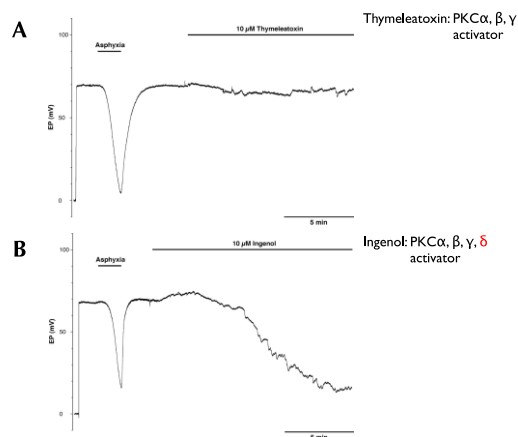
(図 4)

そこで、PKC の活性化と L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの開孔による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が、相互にどのような関連を示すかを検討するため、活性化される PKC のアイソフォームの同定を試みた。PKC  $\alpha$  および  $\beta_1$  の選択的阻害剤である G66976 を内リンパ腔に投与しても、無呼吸負荷により EP 低下はほとんど抑制されず、一方 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  および  $\zeta$  の阻害剤である rottlerin を内リンパ腔に投与すると、無呼吸負荷による EP 低下が著明に抑制された (図 5)。



(図 5)

さらに、無呼吸負荷を行わない定常状態で PKC 活性化剤を投与する実験を行ったところ、PKC  $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  の活性化剤である thymeleatoxin を内リンパ腔に投与しても定常状態の EP はあまり変化しなかったが、PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  および  $\delta$  の活性化剤である ingenol を内リンパ腔に投与すると、明らかな EP の低下が観察された (図 6)。

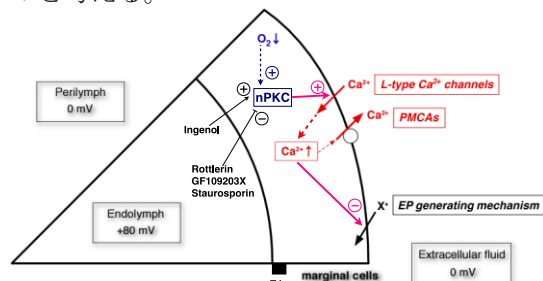


(図 6)

これらの結果から、無呼吸負荷時には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の結果として PKC が活性化されるのではなく、低酸素により何らかの経路を介してフォスホリパーゼ C (PLC) が活性化して DAG が産生され、この結果  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性である novel PKC サブファミリーに属する  $\delta$  PKC が活性化するものと考えられた。なお、低酸素負荷に伴う PLC の活性化機構に関しては、hypoxia inducible factor (HIF) を介するものが報告されているが、これについては今後さらに検討を要するものである。

以上より、虚血状態では血管条を構成する辺縁細胞において novel PKC が活性化することで L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが磷酸化を受けて開孔

し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することで EP 産生機構が障害され、その結果として EP が低下することが示唆された (図 7)。したがって、drug delivery system 等を用いて内耳に A キナーゼ活性化剤や C キナーゼ阻害剤を投与することが出来れば、虚血による内耳障害を防止出来る可能性があり、本研究にかかわる成果をもとに新規治療法を開発できるものとする。



(図 7)

## 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 3 件)

1. 西川周治、河田 了、李 昊哲、前田美紀、野村文恵、櫛原崇宏、乾 崇樹、吉村勝弘、辻雄一郎：小児進行甲状腺癌の 2 例。耳鼻咽喉科臨床 104:279-283;2011
2. 前田美紀、荒木倫利、長谷川恵子、乾 崇樹、辻雄一郎、李 昊哲、河田 了：上咽頭から翼口蓋窩に進展した MALT リンパ腫例。耳鼻咽喉科臨床 104:267-272;2011
3. 乾 崇樹、荒木倫利、田中朝子、服部康人、竹中 洋：急性めまいとして耳鼻咽喉科を受診した中枢性めまい 17 症例の検討。Equilibrium Res 69:198-206;2010

[学会発表] (計 22 件)

1. Takaki Inui, Toshiaki Mori, Masahito Watanabe, Keiko Hasegawa-Tsujimura, Atsuko Takamaki-mori, Shin-ichi Haginomori, Takahiro Kubota, and Ryo Kawata: Role of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in marginal cells of the stria vascularis during transient asphyxia. 11<sup>th</sup> Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2011. 12. 8, Hyogo
2. 乾 崇樹、寺田哲也、奥 雄介、長谷川恵子、吉村勝弘、河田 了：鼻副鼻腔疾患における呼吸および鼻呼吸 NO の検討。

- 第 50 回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会. 2011. 12. 1、岡山
3. 奥 雄介、寺田哲也、乾 崇樹、柚木 歩、吉村勝弘、東野正明、河田 了：上気道炎症性疾患における NO の意義についての検討. 第 50 回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会. 2011. 12. 1、岡山
  4. 長谷川恵子、森 禎章、乾 崇樹、森 京子、萩森伸一、窪田隆裕、河田 了：無呼吸負荷によりモルモット内リンパ直流電位と蝸牛管上皮抵抗の変化. 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会. 2011. 11. 25、沖繩
  5. 乾 崇樹：急性めまいとして耳鼻咽喉科を受診した中枢性めまい 17 症例の検討. 第 70 回日本めまい平衡以外句会総会学術講演会. 2011. 11. 18、千葉
  6. 乾 崇樹、萩森伸一、松村 麗、辻村恵子、樺原崇宏、藤山吉更、金沢敦子、森京子、荒木倫利、河田 了：メニエール病における頭振り眼振所見の検討. 第 70 回日本めまい平衡以外句会総会学術講演会. 2011. 11. 17、千葉
  7. 乾 崇樹：めまい疾患、診断・治療の ABC：第 100 回社団法人大阪府耳鼻咽喉科医会研修会. 2011. 10. 29、大阪
  8. 乾 崇樹、寺田哲也、松村 麗、柚木 歩、吉村勝弘、東野正明、河田 了：鼻副鼻腔疾患における鼻呼吸 NO 測定の有用性についての検討. 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会総会および学術講演会. 2011. 6. 24、長野
  9. 乾 崇樹、萩森伸一、稲守真璃、長谷川恵子、樺原崇宏、藤山吉更、金沢敦子、森 京子、松村 麗、河田 了：メニエール病における頭振り眼振所見について. 第 317 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会. 2011. 6. 4、大阪
  10. 乾 崇樹、森 禎章、森 京子、長谷川恵子、萩森伸一、窪田隆裕、河田 了：蝸牛内直流電位のプロテインキナーゼ C 依存性蛋白磷酸化過程による調節機構. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2011. 5. 21、京都
  11. 東野正明、西川周治、乾 崇樹、吉村勝弘、辻雄一郎、李 昊哲、河田 了：耳下腺腫瘍の超音波エコーによる浅葉・深葉の部位診断. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2011. 5. 20、京都
  12. 東野正明、寺田哲也、長谷川恵子、乾 崇樹、柚木 歩、河田 了：スギ花粉症に対する減感作療法時の皮膚発赤反応の評価について. 第 316 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会. 2011. 3. 5、大阪
  13. 乾 崇樹、荒木倫利、長谷川恵子、河田了：当科におけるめまい症例の臨床的検討. 第 69 回日本めまい平衡医学会総会学術講演会. 2010. 11. 19、京都
  14. 森 禎章、乾 崇樹、森 京子、長谷川恵子、荒木倫利、萩森伸一、河田 了、窪田隆裕、無呼吸負荷による蝸牛内直流電位低下における PKC 依存性蛋白磷酸化過程の関与. 第 20 回日本耳科学会総会学術講演会. 2010. 10. 9、愛媛
  15. 乾 崇樹、森 禎章、森 京子、渡辺 正仁、長谷川恵子、荒木倫利、萩森伸一、窪田隆裕、河田 了、蝸牛内直流電位の維持に対する血管条辺縁細胞の Ca<sup>2+</sup>透過性チャネルの役割. 第 20 回日本耳科学会総会学術講演会. 2010. 10. 9、愛媛
  16. 荒木倫利、松村 麗、乾 崇樹、吉村勝弘、河田 了：鼻出血症例の臨床的検討. 第 314 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会. 2010. 9. 4、大阪
  17. 乾 崇樹、荒木倫利、吉村勝弘、河田 了：嗅神経芽細胞腫 6 例の検討. 第 49 回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会. 2010. 8. 27、北海道
  18. 吉村勝弘、乾 崇樹、荒木倫利、河田 了：当科における鼻副鼻腔悪性黒色腫の臨床的検討. 第 49 回日本鼻科学会総会ならびに学術講演会. 2010. 8. 27、北海道
  19. 奥 雄介、荒木倫利、乾 崇樹、吉村勝弘、河田 了：大阪医科大学耳鼻咽喉科における上顎癌の臨床的検討. 第 72 回耳鼻咽喉科臨床学会総会および学術講演会. 2010. 7. 3、岡山
  20. 奥 雄介、乾 崇樹、吉村勝弘、李 昊哲、荒木倫利、河田 了：当科における上顎癌の臨床的検討. 第 313 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会. 2010. 6. 5、大阪
  21. 荒木倫利、乾 崇樹、吉村勝弘、但・民江、河田 了：好酸球性副鼻腔炎の臨床像の検討. 第 313 回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会. 2010. 6. 5、大阪
  22. Yoshiaki Mori, Atsuko Takamaki-Mori, Takaki Inui, Keiko Hasegawa, Junko Tashiro-Yamaji, Manabu Miyamoto, and Takahiro Kubota: PKC-dependent phosphorylation pathway(s) contribute to the decrease in endocochlear potential induced by the transient asphyxia., 第 87 回日本生理学会大会, 2010. 5. 19、岩手

〔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

乾 崇樹 (Inui Takaki)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：60465614