

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16901

研究課題名（和文）薬剤性難聴モデルの確立と新規治療薬の検討

研究課題名（英文）Establishment of drug-induced hearing loss model and investigation of new therapeutic drugs

研究代表者

角木 拓也（Kakuki, Takuya）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70706548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：TGF- β 1、EGFR阻害剤処置で認められた繊毛形成の亢進はアミカシン処置により抑制された。また、アミカシン処置で誘導されたアポトーシスがデキサメタゾン処置により抑制され、Caspase3の発現抑制を認めた。各種増殖因子、シグナル伝達阻害剤による変化の検討ではTGF- β 1、EGFR、JNK、PYK2、PKCa阻害剤処置により細胞遊走能の明らかな抑制がみられ、3細胞間タイト結合蛋白であるトリセルリンの明らかな膜への発現誘導がみられた。HDAC阻害剤処置により明らかなアポトーシスの誘導がみられ、一方で、mTOR阻害剤のラパマイシン前処置によるHDAC阻害剤のアポトーシス誘導の阻害が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本細胞を用いた研究結果として、薬剤性難聴を引き起こすとされるアミカシンの処置により繊毛形成が抑制され、デキサメタゾン処置によりアミカシン処置により誘導されたアポトーシスが抑制されることが確認され、薬剤性難聴を含む内耳性難聴における内耳有毛細胞の繊毛形成、tight junction蛋白の変化、アポトーシスの変化を解析可能である本培養細胞はそのメカニズムの解明、治療法の開発のためのin vitroモデルとして有用であると考えられた。また、mTOR阻害剤であり、Autophagy阻害剤でもあるラパマイシンはアポトーシスの抑制が観察され、新規治療薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The increased ciliogenesis observed with TGF- β 1 inhibitor and EGFR inhibitor treatment was suppressed by amikacin treatment. Furthermore, apoptosis induced by amikacin treatment was suppressed by dexamethasone treatment, and the expression of caspase 3 was suppressed.

In examining changes caused by various growth factors and signal transduction inhibitors, treatment with TGF- β 1 inhibitor, EGFR inhibitor, JNK inhibitor, PYK2 inhibitor, and PKCa inhibitor clearly suppressed cell migration, and clearly induced the expression of tricellulin that is a tricellular tight junction protein

on the membrane. Treatment with HDAC inhibitors clearly induced apoptosis, while pretreatment with the mTOR inhibitor rapamycin inhibited the apoptosis induction of HDAC inhibitors.

研究分野：Otology

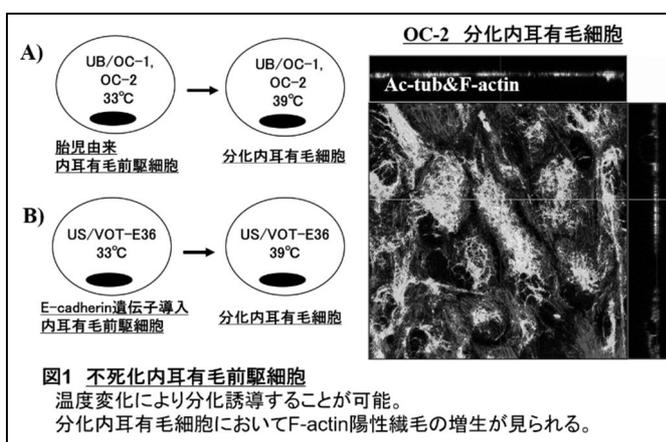
キーワード：内耳有毛細胞 平面内細胞極性 タイト結合 三細胞間タイト結合

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

聴覚器は空気の疎密波などの機械的振動をとらえる器官であり、ヒトはこの振動を音として感じ取っている。その振動をとらえる役割を担っているのがコルチ器に存在する内耳有毛細胞である。内耳有毛細胞は自己再生能を持たず、有毛細胞のダメージによる難聴は不可逆的である。そのため、内耳性難聴にはかねてから再生医療が待ち望まれている。これまで多くの研究者により内耳性難聴時の内耳有毛細胞の変性について研究され、内耳性難聴に対する有効性を示す薬剤の報告も散見される。しかしながら、その作用機序は解明されておらず、臨床応用に至る薬剤はまだ報告されていない。そのため、内耳性難聴の病態解明および新規内耳性難聴治療薬の開発、作用機序の解明が必要である。

一方、内耳有毛細胞において正常な機能には整然とした繊毛配列が必要であり、その配列には細胞極性が重要となる。我々は、培養温度の変化により有毛細胞へ分化させることが可能である温度感受性 SV40-large T antigen 遺伝子導入マウスの胎児より分離培養した不死化内耳有毛前駆細胞を有しており(図1)、以前に我々は、この不死化内耳有毛前駆細胞を用いて、三細胞間サイト結合分子の変化とそれによる細胞死への影響についてや一次繊毛の伸長、細胞周期依存性の増殖能、遊走能の変化について報告した。本細胞を用いた研究では繊毛形成の劇的な変化も観察されており、培養し、増殖させることも容易であることから、内耳性難聴のモデルとして難聴の新規治療法開発の検討に有用性が高いと考えられた。



2. 研究の目的

上記背景より、本研究ではこの不死化内耳有毛前駆細胞を用いて、様々な増殖因子およびシグナル伝達阻害剤を処置し、繊毛形成や細胞遊走、tight junction 蛋白、epithelial cell polarity の変化を観察し、薬剤性難聴を含む内耳性難聴における新規内耳性難聴治療薬の開発、作用機序の解明に寄与する基礎的なデータを得ることを目的とした。

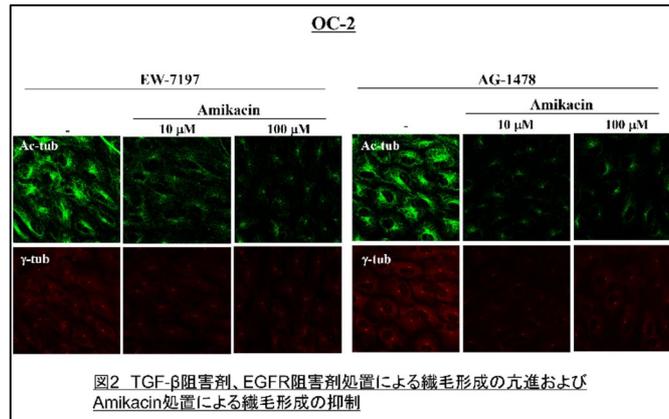
3. 研究の方法

- (1) 薬剤性難聴による内耳有毛細胞の変化を解析するため、耳毒性薬剤として知られる Amikacin と以前の研究で繊毛形成の亢進を認めた TGF- β R inhibitor (EW-7197) および EGFR inhibitor (AG-1478) を用い、内耳有毛細胞の繊毛形成の変化を免疫染色で検討した。
- (2) Amikacin による内耳有毛細胞の変化を一般に内耳性難聴の治療薬として広く使われている Dexamethasone を併用することで抑制することが可能か検討するため、Muse cell analyzer を用いたアポトーシス細胞数の解析や Caspase3 の Western blotting によりアポトーシスの抑制について検討した。
- (3) TGF- β R inhibitor (EW-7197), EGFR inhibitor (AG-1478), JNK inhibitor (SP600125), PYK2 inhibitor (PF431396), PKCa inhibitor, HDAC inhibitor (JNJ) などの様々な増殖因子およびシグナル伝達阻害剤を処置し、wound healing assay により細胞遊走能の変化、免疫染色により 3 細胞間 tight junction 蛋白の変化を検討した。
- (4) 内耳細胞増殖および分化に関与がみられる Hippo pathway の阻害剤である MST inhibitor (MP-1) を処置して、wound healing assay により細胞遊走、Western blotting により tight junction の発現変化を解析した。

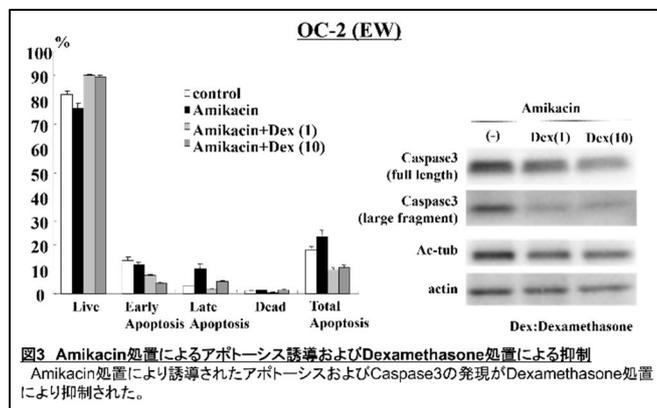
- (5) 難聴に関与が知られている HDAC および autophagy の内耳細胞における apoptosis に焦点を当て、HDAC inhibitor である TSA および JNJ 処置や mTOR inhibitor であり、Autophagy 阻害剤でもある Rapamycin 処置によるアポトーシスの変化を Muse cell analyzer により検討した。

4. 研究成果

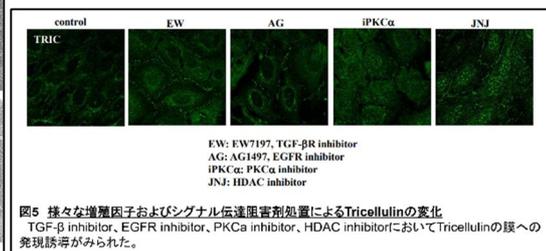
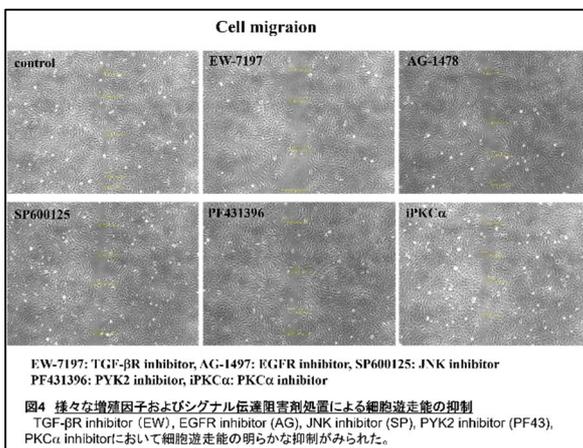
EW-7197 および AG-1478 処置により認められた繊毛形成の亢進は Amikacin 処置により抑制された (図 2)。



また、Amikacin 処置による誘導されたアポトーシスが Dexamethasone 処置により抑制され、Caspase3 の発現抑制を認めた (図 3)。



各種増殖因子、シグナル伝達阻害剤処置による細胞遊走能の変化においては TGF-inhibitor、EGFR inhibitor、JNK inhibitor、PYK2 inhibitor、PKCa inhibitor 処置により細胞遊走能の明らかな抑制がみられた (図 4)。また、3 細胞間 tight junction 蛋白である Tricellulin においては明らかな膜への発現誘導がみられた (図 5)。



HDAC inhibitor である TSA および JNJ 処置により明らかな apoptosis の誘導がみられ、一方で、mTOR inhibitor であり Autophagy 阻害剤でもある Rapamycin 前処置による HDAC inhibitors の apoptosis 誘導の阻害が確認された (図 6)。

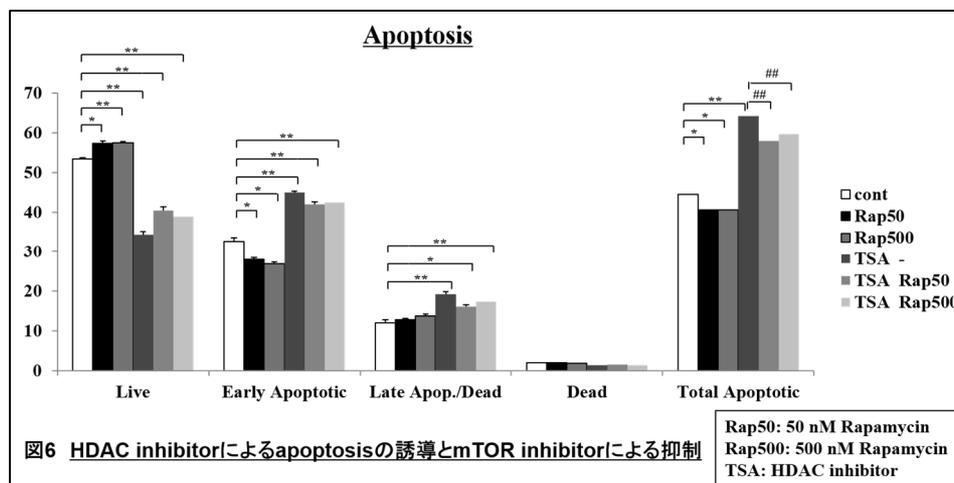


図6 HDAC inhibitorによるapoptosisの誘導とmTOR inhibitorによる抑制

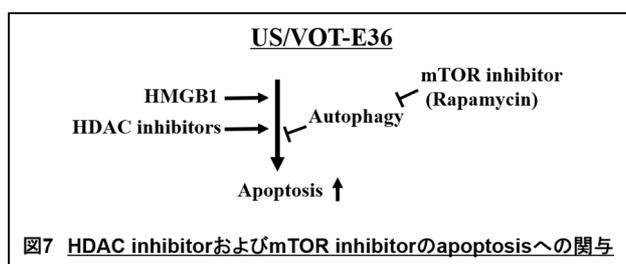


図7 HDAC inhibitorおよびmTOR inhibitorのapoptosisへの関与

以上のことより、薬剤性難聴を含む内耳性難聴における内耳有毛細胞の繊毛形成、tight junction 蛋白の変化、アポトーシスの変化を解析可能である本培養細胞はそのメカニズムの解明、治療法の開発のための in vitro モデルとして有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakuki Takuya, Kohno Takayuki, Nishida Soshi, Konno Takumi, Kikuchi Shin, Ohwada Kizuku, Nakano Masaya, Tezuka Mitsuki, Takano Kenichi, Kojima Takashi	4. 巻 157
2. 論文標題 FOXO3/TGF- signal-dependent ciliogenesis and cell functions during differentiation of temperature-sensitive mouse cochlear precursor hair cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-02068-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kakuki Takuya
2. 発表標題 FOXO3-mediated ciliogenesis during differentiation of temperature-sensitive mouse cochlear precursor hair cells.
3. 学会等名 4th World Congress on Endoscopic Ear Surgery（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角木 拓也
2. 発表標題 マウス内耳有毛細胞における繊毛形成、タイト結合分子の動態変化
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
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
---------	---------