

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592482

研究課題名(和文)音響外傷性難聴における細胞死制御メカニズムと新たな治療法開発

研究課題名(英文) Mechanism of cell death and development of a new therapy against noise-induced hearing loss

研究代表者

山下 大介 (Yamashita, Daisuke)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60306785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに強大音響に曝露されることにより、難聴になる動物モデルを作製した。次にその難聴モデル動物において、内耳有毛細胞(聴覚を司る神経細胞)の細胞死(アポトーシス)に至るメカニズムを詳細に解明した。最後にその結果に基づき、難聴を治療する方法を種々のアプローチで検討し、聴覚機能・内耳形態の両面において難聴を治す可能性のある結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We first manufactured the animal models that became hearing loss induced by intense noise. In the hearing loss animal model, we elucidated the mechanism which led to the cell death (apoptosis) of inner hair cells. Finally, based on these results, we examined the method that hearing loss was treated by various kinds of approaches, and the results that might cure hearing loss in the both sides where were in hearing function / inner ear morphology were obtained.

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：内耳 再生 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

音響性聴器障害による内耳性難聴は感音難聴の主な原因の一つで、その多くが難治性である。特に先進国では難聴の3分の1以上が過剰な騒音によると言われている。また、騒音性難聴は多くの国において、国が補償する最も大きな職業疾患の一つである。実際に先進国では、GNPの約0.2 - 2%が騒音の対策費となっている。そこで音響性聴器障害の際、内耳蝸牛にどのような病態生理的、形態的、生化学的変化が生じているかを基礎的に研究することによって、強大音響曝露より聴覚系を保護する研究は臨床上、非常に大きなインパクトがあると考えた。

2. 研究の目的

音響外傷性難聴における内耳細胞死のメカニズムを詳細に解明し、その結果に基づき治療へのアプローチを多角的に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 騒音難聴モデルの作製

種々の音響負荷条件(音圧、周波数、曝露時間)で動物(モルモット・マウス)に強大音響を曝露する。音圧は100~125 dB SPL、周波数は4 kHz OBNもしくはBBN(ブロードバンド)曝露時間は1~5時間の範囲とする。

(2) 聴力の機能評価

音響曝露後、経時的に機能評価(難聴の程度)を聴性脳幹反応(ABR: Auditory Brainstem Response)を用いて施行する。

(3) 有毛細胞の形態的評価

機能評価と同様に形態的変化も経時的に追って定量する。surface preparation法により rhodamine 蛍光色素標識 phalloidin にて細胞骨格を染め、欠損細胞をカウントする。

(4) PTS と TTS モデルの確立

上記音響負荷条件から機能及び、形態的に一過性閾値変化(TTS: temporary threshold shift)と永続性閾値変化(PTS: permanent threshold shift)の両動物モデルを確立する。

(5) 正常内耳リンパ液の質量分析

モルモット(ハートレー系、オス、8週齢:

250-300g)を用いて、深麻酔下に断頭し、蝸牛を摘出する。その際、同時に血液も採取する。次に顕微鏡下に正円窓・卵円窓からマイクロピペットを用いて、内耳リンパ液を採取する。(1匹2耳より約5~10µl)採取した内耳リンパ液および血漿から水溶性代謝物を抽出し、フリーズドライ、誘導体化の過程を経て、最後にガスクロマトグラフィー質量分析計(GCMS-QP2010)にて代謝物を測定する。得られたデータを主成分分析にて内耳リンパ液に特異的な代謝物を検討する。

(6) 音響外傷による内リンパ液の組成変化
強大音響曝露後の内耳リンパ液の組成変化を上記質量分析により検討する。音響負荷条件は、4 kHz OBN, 120 dB SPL, 2時間とする(PTSモデル)。音響負荷直後と1日目にリンパ液を採取して検討する。

4. 研究成果

騒音難聴モデル動物作製として、難聴が回復しない永続的閾値変化(PTS: permanent threshold shift)と、難聴が最終的には完全に回復する一過性閾値変化(TTS: temporary threshold shift)の両モデルを作製した。両モデルに対して、聴力の機能評価として聴性脳幹反応(ABR: Auditory Brainstem Response)にて、また内耳有毛細胞の形態的評価として surface preparation法を用いて欠損細胞数をカウントした。

内耳リンパ液と血漿代謝物組成の比較によりイノシトールやアスコルビン酸など計29種の代謝物組成が検出された。例えば、今回検出されたアスコルビン酸には、フリーラジカルスカベンジャーとして音響外傷に対する内耳保護効果があることが報告されている。これまでの報告では、聴覚機能(ABR)や内耳形態から内耳保護効果を証明してきたが、この手法を用いることで、直接内耳リンパ液内での代謝物の変化を調べ、統計学的に検討することが可能になると考える。また強大音響負荷後の内耳リンパ液の組成では、計6種の代謝物に変化がみられた。

現在は、内耳リンパ液中の代謝物の定量化を進めている。また音響外傷モデル動物における、内耳障害後のリンパ液中の代謝物の変化を探ることにより Metabolic pathway から内耳障害におけるメカニズム解明につながるのではないかと考えている。さらに治療薬開発への応用も可能と考える。

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7件)すべて査読有

1. Yonezawa K, Nishiumi S, Kitamoto-Matsuda J, Fujita T, Morimoto K, Yamashita D, Saito M, Otsuki N,

- Irino Y, Shinohara M, Yoshida M, Nibu KI. Serum and tissue metabolomics of head and neck cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2013, 10(5), 233-238
2. 耳下腺に発症したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の2例 四宮瞳、四宮弘隆、長谷川信吾、山下大介、大月直樹、丹生健一 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85(13) 1093-1097, 2013
 3. 頸部リンパ節転移を認めた原発不明悪性黒色腫の2例 米澤宏一郎、森本浩一、山下大介、谷本均、齋藤幹、大月直樹、清田尚臣、佐々木良一、丹生健一 頭頸部癌 39(1) 72 - 76, 2013
 4. Fujita T, Yamashita D, Katsunuma S, Hasegawa S, Tanimoto H, Nibu KI. Increased inner ear susceptibility to noise injury in mice with streptozosin-induced diabetes. *Diabetes*. 2012, 61, 1-7
 5. Cui Y, Sun G, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujii M, Kaga K, Ogawa K. Noise-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlear spiral limbus of mice. *European Arch. Oto.* 268(7):973-978 2011
 6. Shibata T, Yamashita D, Hasegawa S, Saito M, Otsuki N, Hashikawa K, Tahara S, Nibu K. Oral candidiasis mimicking tongue cancer. *Auris Nasus Larynx* 38(3):418-420 2011
 7. 耳下腺癌における予防的頸部郭清と術後放射線治療について、柴田智久、米澤宏一郎、森本浩一、山下大介、大月直樹、西村英輝、佐々木良平、丹生健一 頭頸部癌、37(1) 78-82, 2011
 4. 25-year experience with primary major salivary gland carcinoma at a single institution in Japan. Imamura Y, Kiyota N, Ohtsuki N, Hirai C, Funakoshi Y, Mukohara T, Yamashita D, Itoh T, Minami H, Nibu KI. The European Cancer Congress Organization (8th Belgium) 2013.10.1
 5. Metabolome analysis of inner ear fluid in guinea pigs cochlea. Yamashita D, Fujita T, Hashimoto Y, Shinomiya H, Hasegawa S, Nibu KI. Association for Research in Otolaryngology meeting (36th USA) 2013.2.18
 6. Hearing impairments and cochlear changes in Type1 diabetes model mice and diet-induced obesity mice. Fujita T, Yamashita D, Katsunuma S, Tanimoto H, Hasegawa S, Nibu KI. Association for Research in Otolaryngology meeting (36th USA) 2013.2.16.
 7. Clinical feature and prognosis of hearing impairment due to meningeal carcinomatosis. Inokuchi G, Komatsu H, Sawada N, Yamashita D, Kumoi K. Association for Research in Otolaryngology meeting (36th USA) 2013.2.17
 8. Managenet outcome following lateral temporal bone resection for cancer of external auditory canal. Hasegawa S, Yamashita D, Fujita T, Nibu KI. International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery (9th Nagasaki) 2012.6.3
 9. Congenital middle ear cholesteatoma in children; retrospective review. Fujita T, Hasegawa S, Yamashita D, Nibu KI. International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery (9th Nagasaki) 2012.6.3
 10. Hearing loss and mechanism in xeroderma pigmentosum (XP). Yamashita D, Fujita T, Hasegawa S, Otsuki N, Nibu KI. East Asian Symposium on Otology (3th Nagasaki) 2012.6.1
 11. Subtotal temporal bone resection for the recurrent external auditory canal cancer after proton beam therapy: case report. Sawada N, Hsegeawa S, Morimoto K, Yamashita D, Tahara S, Nibu KI. East Asian Symposium on Otology (3th Nagasaki) 2012.6.1
 12. Mechanism and Protection Against Noise-Induced Hearing Loss. Yamashita D, Kanzaki S, Ogawa K, Nibu K. Japan-Korea Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kyoto Japan, 2012.4.13
 13. Vulnerability for noise injury of

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Hearing loss in Xeroderma pigmentosum and mechanism of inner ear disorder. Yamashita D, Fujita T, Otsuki N, Sakai Y, Kanda F, Nishigori C, Nibu KI International Symposium on Xeroderma pigmentosum and Related Disease, Kobe Japan, 2014.3.7
2. Metabolome analysis of inner ear fluid in guinea pigs cochlea after intense noise. Yamashita D, Fikuda Y, Fujita T, Shinomiya H, Inokuchi G, Hasegawa S, Otsuki N, Nibu KI. Association for Research in Otolaryngology meeting (37th USA) 2014.2.24
3. High-Fat Diets Delay the Progression of Age-Related Hearing Loss in C57BL/6J Mice. Fujita T, Yamashita D, Hasegawa S, Nibu KI. Association for Research in Otolaryngology meeting (37th USA) 2014.2.23

- inner era in diabetic model mice. Fujita T, Yamashita D, Katsunuma S, Hasegawa S, Tanimoto H, Nibu K. Japan-Korea Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kyoto Japan, 2012.4.13
14. Hearing loss in Xeroderma pigmentosum (XP) and mechanism of inner ear disorder. Yamashita D, Fujita T, Hasegawa S, Otsuki N, Nibu KI. Association for Research in Otolaryngology meeting (35th USA) 2012.2.26
 15. Hearing impairments and cochlear changes in Type1 diabetes model mice. Fujita T, Yamashita D, Katsunuma S, Tanimoto H, Hasegawa S, Nibu KI. Association for Research in Otolaryngology meeting (35th USA) 2012.2.27
 16. Mechanism and Protection Against Noise-Induced Hearing Loss. Yamashita D, Kanzaki S, Ogawa K, Nibu K. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kobe Japan, 2011.12.8
 17. Mechanism and Strategy to Prevent Noise-Induced Hearing Loss. Yamashita D KANSAI RESEARCH SEMINAR for 80th Anniversary of ENT, Osaka Japan, 2011.11.12

〔図書〕(計 4 件)

1. 耳鼻咽喉科領域のジェネリック薬品 特集・耳鼻咽喉科領域のジェネリック薬品とサプリメント 山下大介 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85(12)679-683 2013
2. 特集 これだけは知っておきたい麻酔の知識 局所麻酔手術の総論 山下大介 東京医学社 1695-1699 2012
3. 線維索性唾液管炎 最新の診療 NAVI (日常診療必携) 山下大介、小川郁、丹生健一 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 84(5) 319-322, 2012
4. ヘルパンギーナ、手足口病 特集 口腔内ウィルス感染の診断と治療 山下大介、丹生健一 ENTONI 129 17-21, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 大介 (YAMASHITA DAISUKE)
神戸大学・医学部附属病院・特命准教授
研究者番号 : 60306785

(2)研究分担者

神崎 晶 (KANZAKI SHO)
慶応義塾大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 50286556

藤田 岳 (FUJITA TAKESHI)
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号 : 90533711