

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592504

研究課題名(和文)内耳障害における酸化ストレスの関与の解明と新規診断法および新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy against oxidative stress-induced inner ear damage

研究代表者

松延 毅 (MATSUNOBU, TAKESHI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：00332205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：Erk1/2ノックアウトマウスの聴覚(聴覚測定には聴性脳幹反応, ABRを用いる)を生後2w, 4w, 8w, 16w, 20wと測定し、野生型のマウスと比較を行う。また、いくつかの週齢において強大音負荷を行い、強大音負荷に対する聴覚の脆弱性の検討を行う。音響外傷後の内耳有毛細胞およびらせん神経節細胞の脱落の程度を検討し、音響性内耳障害におけるMEK/Erk経路の関連性、重要性を証明した。また、低出力レーザー照射により急性音響外傷における内耳保護効果を機能的に、また生化学メカニズムと共に解明した。

研究成果の概要(英文)：We show that ERK2 play an important role in regulating inner hair cell survival and NIHL in mice. We created conditional Erk2 knockout mice to delete the Erk2 gene primarily in the hair cells using Cre/loxP system. Resultant hair cell-specific Erk2 conditional knockout (hErk2 CKO) were viable and fertile with normal appearance. After noise exposure control mice demonstrated a moderate recovery of ABR threshold shifts, however, no significant recovery was found for hErk2 CKO mice. There was significant difference between hErk2 CKO and control mice in ABR threshold shift. Furthermore a significant lower survival rate of IHCs was observed of hErk2 CKO mice as compared to control mice. We found that hErk2 CKO mice exhibited an increased sensitivity to noise exposure, suggesting that ERK2 plays an important role in protecting the inner hair cells from noise exposure.

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：内耳性難聴 レーザー アポトーシス 内耳保護効果

1. 研究開始当初の背景

突発性難聴や音響外傷などの急性感音難聴の発症には酸化ストレスの関与によるところが大きいとの報告が増加しているが、詳細なメカニズム、有効な治療法は未だ未解明である。本研究の目的は感音難聴の主病巣である内耳蝸牛における強大音負荷等による酸化ストレスのシグナル伝導路の詳細な解明にある。また新しい治療法として新規薬剤の開発、遺伝子治療の開発を行う。併せて、これまで不可能であった内耳組織のバイアピリティーの非侵襲的な測定法を開発することにより内耳障害の治療のタイミング、予後診断等に生かすことを目標とする。

2. 研究の目的

(急性内耳性難聴の病態の解明)

近年、内耳性障害のモデル動物を用いた研究などから、難聴の発症において特に強大音負荷動物、アミノ配糖体などの耳毒性薬剤負荷動物や老化動物における感覚細胞障害に活性酸素を引き金とするアポトーシスの関与が示唆されている。最近になり中枢神経組織、肝臓などにおいて有害刺激や保護刺激を受けた場合に MEK/Erk 経路が活性化され、上記のストレス応答転写因子 AP-1 がさらに活性化され種々のストレス応答遺伝子を制御していることが提唱されている。本研究ではさらに神経特異的 Erk-1/2 コンディショナルノックアウトマウスを解析し、強大音負荷により MEK/Erk 経路が音響性難聴の発症メカニズムにどのように関与しているかを生化学的および組織学的に解析する。

(内耳性難聴に対する新規治療法の開発)

(1) 最近になり中枢神経系を中心として酸化ストレスが細胞内の多様な伝導路を経て様々なストレス応答タンパクを発現し、さらには遺伝子を介して細胞の変化を来すことが報告されるようになってきている。今回われわれは臨床治験を目標に音響外傷モデル動物に T-817MA を投与し音響性内耳障害に対する有効性を機能的(聴覚)および組織学的(細胞保護効果)等について詳細に検討を行う。早期の臨床応用を目標とする。

(2) また、全く新しい内耳障害に対する治療法として遺伝子治療を検討する。遺伝子導入の方法には、ベクターとしてウイルスを用いない方法(非ウイルス)とウイルスを用いる方法とがある。現在主に使用されているウイルスベクターは導入効率の上では優れているものの、ウイルスベクターの共通の問題として、ウイルス自体の持つ毒性、抗原性、病原性など克服すべき課題も多い。本研究では、ウイルスを用いない新しい遺伝子導入法として、ファイバー誘導式レーザー誘起応力波(Laser-induced Stress Wave: LISW)を用いた内耳への遺伝子導入を行い、レポーター遺伝子 EGFP の発現を観察した。これは YAG レーザー光を集光して組織に照射し、過渡的に細胞膜に小孔を形成することにより遺伝子を導入する全く新しい技術である。本

研究では LISW を用いて HGF, IGF, GDNF などの治療遺伝子を内耳組織に導入し組織学的、機能的に内耳が保護、治療効果がみられるかを検討する。YAG レーザーはすでに臨床現場において汎用されておりこの新しい技術は臨床現場の治療に大きく寄与するものと考えられる。

(急性内耳障害の新しい診断法の開発)

また、本研究においては新しく開発した近赤外光を用いたモルモット蝸牛のバイアピリティーの評価を試み、臨床応用に可能かどうかを検討する予定である。これまで、他覚的な内耳性難聴の診断として聴性脳幹反応(ABR)、耳音響放射(OAE)、蝸電図などがあつたがいずれも内耳組織のバイアピリティーを直接反映したものではなかった。生体において蝸牛のバイアピリティーが評価できれば、急性感音難聴などの治療のタイミング、予後などの予測などに応用できる可能性がある。我々は、生体組織の細胞や細胞小器官、分子レベルの情報を非侵襲かつリアルタイムで観察可能な光学的手法に着目した。とりわけ組織の血行動態を反映する内因性の光吸収信号や、細胞・細胞内小器官の形態変化を反映する光散乱信号を計測する手法が有力と考えた。本研究ではこの技術を用いて、現在不可能である内耳組織のバイアピリティーの直接の計測を行う技術確立することを目標とする。

3. 研究の方法

急性感音難聴のモデルとして急性音響外傷モルモットの作成を行い、そのモデルを用いて急性音響外傷における転写制御因子 Activator protein-1(AP-1)および Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)などのストレス応答分子の動態の観察を生化学的および形態学的手法を用いて行う。また、AP-1 を制御している Erk1/2 の神経特異的コンディショナルノックアウトマウスの聴覚機能の解析を行い、強大音負荷への耐性の程度などを検討する。

新規治療法の開発として新規薬剤 T-817MA のモルモット音響外傷への治療効果の検討を行う。また新しい遺伝子導入法として、LISW を用いた非ウイルス的遺伝子導入、センダイウイルスを用いた遺伝子導入の可能性につきレポーター遺伝子および治療遺伝子を用いて効果を検討する。新しい非侵襲的リアルタイムな内耳障害診断法として、内耳組織の光散乱を計測し、その効果を組織学的、機能的(聴覚)に裏付ける。

(急性内耳性難聴の病態の解明)

神経特異的 Erk1/2 コンディショナルノックアウトマウスの聴覚特性の解析(防衛医科大学校麻酔学講座佐藤泰司との共同研究)

Erk1/2 ノックアウトマウスの聴覚(聴覚測定には聴性脳幹反応, ABR を用いる)を生後 2w, 4w, 8w, 16w, 20w と測定し、野生型のマウスと比較を行う。また、いくつかの週齢において強大音負荷を行い、強大音負荷に対す

る聴覚の脆弱性の検討を行う。音響外傷後の内耳有毛細胞およびらせん神経節細胞の脱落の程度を検討し、音響性内耳障害における MEK/Erk 経路の関連性、重要性を証明する。

(内耳性難聴に対する新規治療法の開発)

(1) 新規神経保護薬剤 T-817MA の内耳障害治療効果の検討

音響箱に、オーディオメーター及びアンプを接続したスピーカーを取り付ける。プライエル反応が正常であることを確認したモルモットを試験に使用する。聴性脳幹反応 (ABR) を測定後 (音響外傷前 ABR), モルモットを音響箱に入れ, 6 kHz を中心としたオクターブバンドノイズ, 110dB SPL の騒音に, 5 時間暴露する。音響外傷終了直後に, 対照群に蒸留水を強制経口投与し, T-817MA 低用量群に T-817MA 28 mg/kg を T-817MA 高用量群に T-817MA 56 mg/kg を強制経口投与する。正常群は音響外傷前 ABR 測定後, 音響外傷を負荷せず, 蒸留水を強制経口投与する。対照群, T-817MA 低用量群及び T-817MA 高用量群は, 強制経口投与後 ABR を測定する (音響外傷直後 ABR)。さらに強制経口投与 2 時間後に正常群, 対照群に蒸留水飲水投与を開始し, T-817MA 低用量群に T-817MA 0.2 mg/mL を T-817MA 高用量群に T-817MA 0.7 mg/mL 飲水投与を開始する。各個体の右耳の音響誘発 ABR を, 音響外傷前, 音響外傷負荷直後, 7 日後及び 14 日後に測定する。有毛細胞の評価については断頭後, 側頭骨及び内耳組織を取り出し, 実体顕微鏡下, 卵円窓, 正円窓及び頭頂部近辺の骨を開き, 頂部より 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定後, 冷蔵庫にて組織を約 12 時間固定する。外側有毛細胞の評価のため, コルチ器を 1% ローダミンファロイジン液で 40 分間インキュベートし, F-アクチンを染色する。蛍光顕微鏡で観察し, 頂部, 中央部, 基底部の内及び外有毛細胞数を計数する。各個体について両耳の消失有毛細胞数を平均し, 障害率を算出する。

(2) LISW を用いた新しい遺伝子治療法の確立

一定強度以上のパルスレーザー光を光吸収材に照射すると, 熱弾性過程・アブレーション・光学破壊などのメカニズムにより, 強い圧縮性の応力波が放出される。これを, LISW, フォトメカニカル波などと呼ぶ。標的組織にプラスミド DNA を注入し, LISW を照射することにより, 細胞膜に過渡的な変性や変形を誘起し, 薬剤分子を細胞内に輸送することが可能である。本研究ではこの技術を応用し内耳へのウイルスを用いない安全な遺伝子導入法を確立する。LISW を用いた内耳への遺伝子導入を行い, レポーター遺伝子 eGFP の発現を観察する。また, LISW の最大圧力を変化させることによる導入効率と内耳障害の有無について検討する。方法は, モルモットの蝸牛基底回転の鼓室階レベルの骨壁に小孔を作成し, 鼓室階に eGFP がコードされたプラスミドを注入する。続いて, レーザーターゲ

ットを蝸牛基底回転に垂直に置き, 経骨的に LISW を照射する。そして, 7 2 時間後に内耳を採取し固定, 脱灰後, 凍結切片を作成し, 蛍光顕微鏡にて eGFP の発現を観察する。

また, LISW 照射前後で ABR を測定し, LISW による内耳障害の有無につき検討する。治療遺伝子 HGF 等を搭載したプラスミドを用いて音響性内耳障害に対する治療効果に関して検討する。

(3) 安全なセンダイウイルスベクターを用いた内耳組織への遺伝子導入

上記と同様に蝸牛鼓室階側壁に小孔を作成し LacZ, eGFP などのレポーター遺伝子を搭載したセンダイウイルスを注入し, 遺伝子の導入状況を観察する。治療遺伝子 FGF 等を搭載したウイルスを用いて音響性内耳障害に対する治療効果に関して検討する。

(急性内耳障害の新しい診断法の開発)

内耳低酸素モデルを用いて, 内耳組織の光散乱の変化が実際の聴覚機能の変化を反映しているかを機能的, 組織学的に検討する。実際の難聴モデル動物において治療可逆期間等の診断, 予後判定に有用であるかを更に深く検討する。

4. 研究成果

我々は, 生体組織の細胞や細胞内小器官, 分子レベルの情報を非侵襲かつリアルタイムで観察可能な光学的手法に着目した。とりわけ組織の血行動態を反映する内因性の光吸収反応や, 細胞・細胞内小器官の形態変化を反映する光散乱信号を計測する手法が有力と考えた。組織のバイアピリティーは細胞のエネルギー産生状態だけでなく, 細胞や細胞内小器官の形態維持と密接に関連することから, これらの形態変化を鋭敏に反映する光散乱は, 特にバイアピリティーのゆこうな指標になると期待される。本研究ではこの技術を応用して, 現在不可能である内耳組織のバイアピリティーの直接の計測を行う技術を確立することを目標とした。内耳低酸素モデルを用いて, 内耳組織の光散乱の変化が聴覚機能の変化を反映しているかを機能的に検討した。生体蝸牛組織の光散乱信号と聴覚機能 (内耳機能の評価は歪成分音響放射を用いた) かなり相関することが示唆された。また, アルツハイマー病に対して T-817MA という PKC のトランスロケーションを介して酸化ストレスから神経細胞を保護し治療効果を発揮する薬剤が開発された。今回我々は臨床治験を目標に音響外傷モデル動物に T-817MA を投与し音響性聴覚障害に対する有効性を機能的 (聴覚) および組織学的に検討を行い, その有意な効果を認めた。

低出力レーザーによる内耳傷害の新しい治療

音響外傷モデル動物に対する低出力レーザー治療 (LLLT) を行った。7 週齢の SD ラットを, 強大音に 5 時間暴露した後, 2 種類の出力 (165mW/cm² または 110mW/cm²) の LLLT 群と無治療群とに分けた。LLLT の照射条件につ

いては、波長 808nm のダイオードレーザーを用いて、前述の 2 種類いずれかの出力で LLLT を 1 日 30 分、5 日間連続で実施した。聴覚機能の評価は、ABR を用いて強大音負荷前を含め、継時的に聴力閾値変化を比較検討した。

組織学的検討目的で、28 日後に蝸牛コルチ器を摘出し、外有毛細胞の観察を行った。また作用機序の検証のため、iNOS および caspase-3 について免疫組織化学染色を行い、control 群、無治療群、LLLTT 群の間で比較した。聴力閾値変化は、治療開始早期より高音域において、2 種類の LLLT 群と無治療群との間に有意差を認めた。外有毛細胞の観察では、無治療群において細胞の消失が散見される一方、2 種類の LLLT 群における細胞の消失はいずれも少数で、消失率についても有意差を認めた。

免疫組織化学的検討では、強大音負荷終了後 1 時間の時点で、無治療群では iNOS を強く検出したが、LLLTT 実施群では、同時点での iNOS の検出は認められるものの減弱していた。一方で caspase3 は強大音負荷終了後 8 時間の時点で、無治療群において強く検出されたが、同時点での LLLTT 実施群において減弱していた。

以上から、本実験においては、LLLTT により iNOS の誘導を抑制した結果、アポトーシスを抑制し、内耳保護効果をもたらした可能性が示唆された。

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 4 件)

Tamura A, Matsunobu T, Kurita A, Shiotani A. Hemophagocytic Syndrome in the Course of Sudden Sensorineural Hearing Loss. ORL, 74: 211-214, 2012.
Kamide D, Matsunobu T, Shiotani A. Facial baroparalysis caused by scuba diving. Case Reports in Otolaryngology. 10: 329536, 2012.

Maeda M, Yamashita T, Matsunobu T, Araki K, Tomifuji M, Shiotani A. Outpatient oral chemotherapy with S-1 for unresectable or distant metastatic head and neck cancer. Anticancer Res. 33; 3285-3289, 2013.

Tomifuji M, Araki K, Niwa K, Miyagawa Y, Mizokami D, Kitagawa Y, Yamashita T, Matsunobu T, Shiotani A. Comparison of voice quality after laser cordectomy with that after radiotherapy or chemoradiotherapy for early glottic carcinoma. ORL. 75; 18-26, 2013.

[学会発表](計 9 件)

Matsunobu T, Kawauchi S, Kurita A, Kamide D, Sato S, Shiotani A. Monitoring of cochlear tissue viability by measurement of light scattering change. 35th Annual

MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Feb.25, 2012, San Diego, USA

丹羽克樹、松延毅、栗岡隆臣、田村敦、上出大介、塩谷彰浩. ゲンタマイシン耳毒性に対する半夏瀉心湯の内耳保護効果. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会. 2012.5.15~5.17, 新潟

松延毅. 光散乱計測による蝸牛の viability のリアルタイム評価法の開発. 第 22 回日本耳科学会学術講演会(シンポジウム). 2012.10.9 名古屋

田村敦、松延毅、丹羽克樹、栗岡隆臣、川内聡子、佐藤俊一、塩谷彰浩. 音響外傷に対する低出力レーザー照射による内耳保護効果の検討. 第 22 回日本耳科学会学術講演会. 2012.10.9 名古屋

丹羽克樹、松延毅、栗岡隆臣、田村敦、上出大介、塩谷彰浩. ゲンタマイシン耳毒性に対する半夏瀉心湯の内耳保護効果. 第 57 回日本聴覚医学会学術講演会. 2012.10.20-10.21, 京都

Kurioka T, Matsunobu T, Niwa K, Tamura A, Kawauchi S, Sato H, Sato S, Shiotani A. A novel animal model for studying blast injuries of the inner ear using laser-induced shock waves. 35th Annual MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Feb.15, 2012, Baltimore, USA

丹羽克樹、松延毅、栗岡隆臣、田村敦、塩谷彰浩. レーザーを用いた頭部爆傷動物モデルにおける耳鳴の行動学的評価. 第 23 回日本耳科学会学術講演会. 2013.11.24-11.26. 宮崎.

栗岡隆臣、松延毅、丹羽克樹、田村敦、佐藤泰司、塩谷彰浩. 活性化プロテイン C (Activated Protein C) の内耳保護効果の検討. 第 23 回日本耳科学会学術講演会. 2013.11.24-11.26. 宮崎.

田村敦、松延毅、栗岡隆臣、塩谷彰浩、清水直樹、三浦健一郎、和田佳郎. 新しい耳石器刺激法(Counter-rotation)の紹介. 第 72 回日本めまい平衡医学会学術講演会. 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松延毅 (MATSUNOBU Takeshi)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：00332205

(2) 研究分担者

塩谷彰浩 (SHIOTANI Akihiro)

防衛医科大学校・病院・教授

研究者番号：80215946

佐藤 泰司 (SATO Yasushi)
防衛医科大学校・病院・講師
研究者番号： 10505267

佐藤 俊一 (SATO Shunichi)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・准
教授
研究者番号： 90502906

川内 聡子 (KAWAUCHI Satoko)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・助
教
研究者番号： 20506505