

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791788

研究課題名(和文) ポリアルギニンを用いたタンパク質導入法による内耳性難聴の治療

研究課題名(英文) Inner ear therapy with protein transduction using polyarginine

研究代表者

高村 惇 (Takamura, Makoto)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60623973

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)：中耳正円窓経由でタンパク質を投与したときの内耳への導入効率をアダルトモルモットを用いて調べた。また、細胞死を抑制する蛋白質(XIAP)を投与し、騒音性難聴の抑制効果を検討した。運搬媒体としてはゼラチンスポンジを用い、細胞内への移行を良くするため細胞透過ペプチド(CPPs)をタンパク質に付加した。タンパク質を投与後、12時間から48時間後まで内耳内にタンパク質の発現を認め、2回投与の有用性と処置後内耳障害のないことを示した。また、騒音難聴処置前のモルモットに同様の方法でXIAPを投与し難聴処置をしたところ、コントロール群と比較して高音域で難聴抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Cell-penetrating peptides (CPPs) are short sequences of amino acids that facilitate the penetration of conjugated cargos across mammalian cell membranes. We showed that a peptide consisting of nine arginines ('9R') effectively delivered enhanced green fluorescent protein (EGFP) into guinea pig cochleae via the round window niche without causing any deterioration in auditory or vestibular function. A second application 24 h after the first prolonged the presence of EGFP. To assess the feasibility of protein transduction using 9R-CPPs via the round window, we used 'X-linked inhibitor of apoptosis protein' attached to a 9R peptide (XIAP-9R). XIAP-9R treatment prior to acoustic trauma significantly reduced putative hearing loss and the number of apoptotic hair cells in the cochleae.

研究分野：歯科薬学

キーワード：Polyarginine protein inner ear

1. 研究開始当初の背景

ポリアルギニン(9R)を用いたタンパク質導入法(9R-PTD)は、1)ベクター作成が容易、2)様々な細胞への導入が可能、3)細胞傷害を起こすことがない安全なベクターであることが知られており、当教室三輪はポリアルギニンを用いた蛋白質導入法を、マウスの内耳原基である耳胞に対して行い、耳胞周囲の細胞にレポータータンパク質が効率的に導入され、生後マウスの内耳機能の悪化も引き起こさないことを過去に報告している(Neuroreport)。今回アダルトモルモットに対して内耳内への9R-PTDの取り込みを調べることを目的とし、侵襲の少ない中耳正円窓経由での投与を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究はポリアルギニン(9R)を用いたタンパク質導入(9R-PTD)による内耳性難聴の治療法の開発を最終目的としている。9R-PTDは、作成が容易で安全なベクターであることが知られており、当教室三輪もマウス耳胞に対して9R-PTDを行い、その有効性と安全性について報告している(Neuroreport)。一方、内耳傷害の進行にはアポトーシスが関与しており、抗アポトーシス因子の投与により内耳傷害の発生が抑制されることがこれまでに報告されている。そこで本研究においては抗アポトーシス因子の一つであるX-linked Inhibitor of Apoptosis Proteins(XIAP)に着目し研究を行う。XIAPに9Rを付加したXIAP-9Rを作製し、XIAPの内耳へのタンパク質導入による蝸牛機能保護作用・治療効果について、蝸牛傷害モデルを用いて検討を行う予定である。本研究における蝸牛内細胞へのタンパク質導入は、目的のタンパク質に9Rを付加し、これをゼルフォームに含浸させ蝸牛正円窓窩に留置することにより達成する。

3. 研究の方法

(1)250~300gのHartley系アダルトモルモットに対して、蛍光タンパクであるEGFPにPTDである9Rを付加したEGFP-9Rを使用して、単回投与群と2回投与群で評価を行い、コントロールとして9Rを付加していないEGFP群(s-EGFP群)と非処置側群を用いた。単回投与群(s-EGFP-9R群)では正円窓窩にEGFP-9Rを染み込ませたスポンゼル®を留置し、EGFP-9R導入後12時間、24時間、48時間、72時間後に蝸牛切片を作製し、蛍光強度をLabelling Indexという方法を用いて計測した。コントロールとしてEGFP-9RのかわりにEGFPを用いた群と、EGFP-9R群の非処置側を用いた。また、タンパク質導入28日後に前庭機能の評価、ABR、有毛細胞数、ラセン神経節細胞数の計測を行い内耳障害の有無を検討した。2回投与群としてEGFP-9Rの初回投与から24時間後に2回目のEGFP-9R導入

を行い(d-EGFP-9R群)初回投与から48時間、72時間後に同様に評価した。コントロールにはEGFP群と非処置側群を用いた。

(2)抗アポトーシス蛋白であるXIAPに9Rを付加したXIAP-9Rを作成し、同様のモルモットモデルに対して投与後6時間、12時間、24時間、48時間でWestern blotを用いて蝸牛内の蛋白量を測定した。また、XIAP-9Rを投与後、騒音難聴を起こし、24時間後にCaspase-3での免疫染色、48時間後にTUNEL染色、14日後にABRでの聴力評価とMyoVIIa/CtBp2での免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)単回投与群：非処置側の蝸牛と比較して、EGFP投与群では内耳での発現は認めなかった。EGFP-9R単回投与群では12、24時間後には血管条、コルチ器、ラセン神経節を中心に内耳に強い発現を認め、48時間後には発現強度は低下し、72時間後にはコントロールと同程度まで低下した(図1)。最も発現の強かった24時間後の蝸牛における回転別の発現強度は、有意差は得られなかったが、基底回転が最も強く、中回転、頂回転の順に低下していた(図2)。また、28日後の評価では機能的形態的内耳障害は認めなかった。

(2)2回投与群：EGFP-9R2回投与群において初回投与から48時間、72時間経過後では、EGFP-9R単回投与群でのタンパク質導入からの同時間経過と比較すると2回投与群のほうが発現が強く、発現持続時間の延長が示唆された(図1)。しかし、2回投与群における2回目投与から24時間経過後の発現強度は、単回投与群における24時間後の発現強度より低下していた(図1)。この原因として、タンパク質を投与することによって正円窓膜に炎症が起こり肥厚したため透過性が低下した可能性を考え、EGFP-9R投与24時間後の正円窓膜の厚さを測定した。その結果、非処置側と比較してEGFP-9R群では有意に正円窓膜が肥厚していた(図3)。

(3)EGFP-9R単回投与群での処置後28日目の評価では、前庭機能評価に異常は認めず、ABRでは非処置側と比較して聴力の低下なく、有毛細胞数、ラセン神経節細胞数に優位差を認めず、処置による内耳障害はなかった。

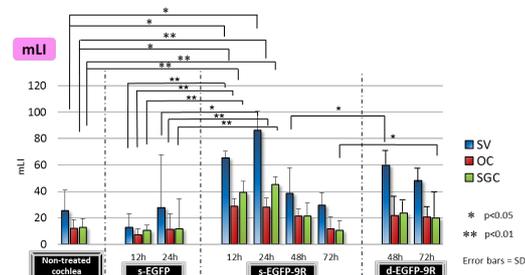


図1 各群におけるEGFP発現強度

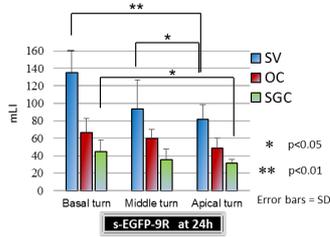


図2 s-EGFP-9R群24時間回転別のEGFP発現強度

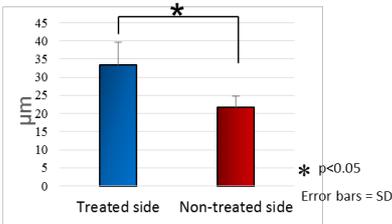


図3 s-EGFP-9R群24時間後における正円窓膜の厚さ

(2)XIAP, XIAP-9R 投与群では、投与後12時間後をピークに内耳内に発現していた(図4)。

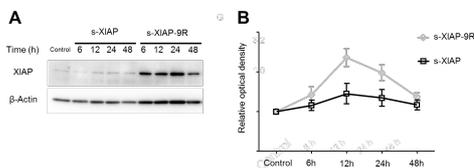


図4 Western blot

また、XIAP-9R 投与群での処置後14日目のABR結果では32kHzのみ生食投与群と比較して優位に聴力保存効果を認めた(図5)。

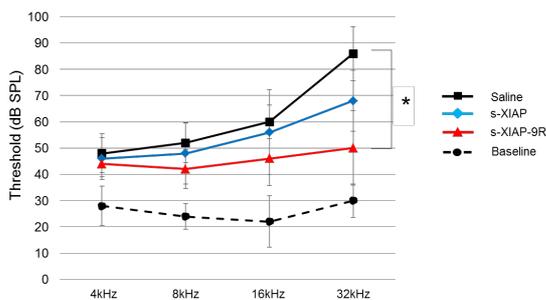


図5 ABR Threshold

さらに、XIAP-9R 投与群では32kHzでの外有毛細胞数は生食群に比較して優位に温存され、シナプスリボン数には優位差を認めなかった(図6)。また、生食群と比較して優位にTUNEL陽性細胞数の低下がありアポトーシス抑制効果を認めた。Caspase-3陽性細胞数は優位に低下しており、Caspase-3経路でのアポトーシスを抑制することで聴覚保護効果を持つことを示した(図8)。

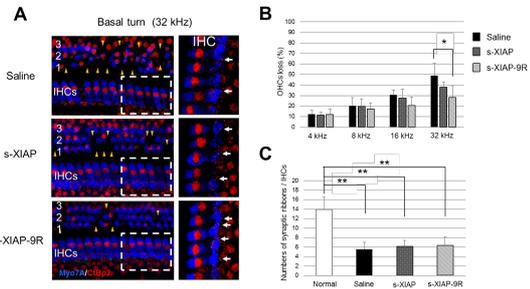


図6 s-XIAP群での外有毛細胞数とシナプスリボン

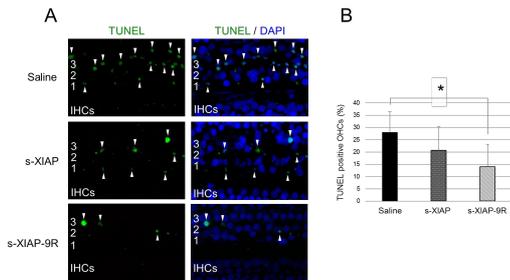


図7 TUNEL陽性細胞数

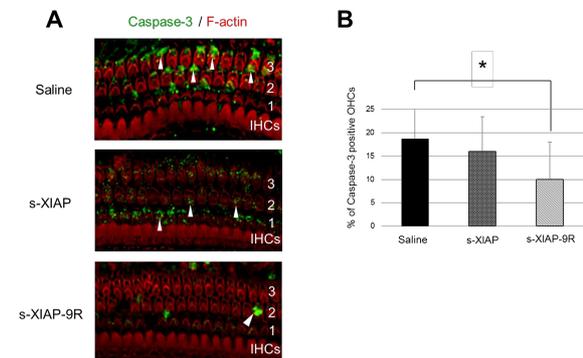


図8 Caspase-3陽性細胞

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0件)

現在英語論文に投稿中である。

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 惇 (Takamura Makoto)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60623973

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし