

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462639

研究課題名(和文) 耳鳴発生の分子機構の解明と新規治療法の模索

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and new therapeutic strategies for tinnitus

研究代表者

北原 紘 (Kitahara, Tadashi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30343255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者本人が平成26年5月1日付で、大阪大学准教授から奈良県立医科大学教授に赴任したため、新環境において耳鳴動物モデルの立ち上げを行った。

平成25-27年度科研費による成果として、新環境におけるラット用動物行動学的逃避実験装置を用いてサリチル酸耳鳴動物モデルの作成に成功し、らせん神経節において発現上昇する侵害受容体TRPV1がサリチル酸耳鳴分子マーカーとして利用可能であることを確かめた。さらに細胞障害受傷機構としてのアラキドン酸経路および細胞生命維持機構としての脳由来神経栄養因子BDNF自己調節経路を検索し、カプサゼピンの中耳腔投与がサリチル酸耳鳴の治療として可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Due to moving from Osaka University to Nara Medical University, we established the animal behavioral model for tinnitus again. Salicylate-induced tinnitus in rats could be visualized by behavioral and molecular experiments. Behavioral experiments were performed using an active avoidance task and molecular experiments were performed using a nociceptive receptor, transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) in the rat auditory pathway. By means of these tinnitus visualization experiments, capsazepine, a specific antagonist of TRPV1, could be one of candidates to block tinnitus pathway and cure tinnitus. Further additional experiments are required.

研究分野：耳科・神経耳科

キーワード：耳鳴 逃避行動 TRPファミリー 侵害受容体 サリチル酸 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

耳鳴は音の大きさや持続時間は様々であるが、多くの方が日常的に少なくとも一度は経験していると言われている。Calgary大学のEggermont-JRの報告によると、米国では一般人口の約5~15%に絶え間ない耳鳴を自覚しており、高齢者にその比率は高くなるとしている(TRENDS in Neurosci 27: 676-682, 2004)。とくに耳鳴を苦痛と感じ日常生活に支障を来たす、いわゆる耳鳴症患者も一般人口の1~3%と看過できない比率である。また耳鳴は直接生命予後には影響しない一方、重篤な精神神経症状を併発するなど社会的問題となる場合が少なくない。このような耳鳴症患者はストレスの多い現代社会において増加傾向にある一方で、実際の臨床の場における耳鳴治療はおざなりな薬物治療が漫然と続けられ、発展性に乏しいのが現状である。その主たる原因の一つは、動物を用いた基礎実験法が未だ確立されていない点である。すなわち、耳鳴を引き起こす刺激や薬物投与により小動物に耳鳴を引き起こしても、小動物の感じているであろう耳鳴の程度を客観的に評価できない。

2. 研究の目的

本研究の期間内目標として、耳鳴動物モデルの確立と耳鳴動物モデルにおける耳鳴分子マーカーの検索を計画したい。サリチル酸のヒト投与での耳鳴の副作用はアスピリン耳鳴としてよく知られているが、その過剰投与で小動物にも耳鳴を引き起こすことが電気生理学的に証明されている(Cazals-Y: Progress in Neurobiol 62: 583-631, 2000)。このサリチル酸による耳鳴動物モデルを用いて、およびを実現する。

については、Guitton-MJらにより提案されているラットを用いた音刺激と電気足底刺激の組み合わせ条件付けによる動物行動学的逃避実験を、当施設でラットのみならずマウスを用いても施行可能なように修飾して行う(J Neurosci 23: 3944-3952, 2003)。については、われわれの最近の研究でカナマイシン内耳障害マウスのらせん神経節に侵害受容体 transient receptor potential cation channel subfamily V(以下TRPV)が発現上昇することが証明された(Kitahara-T et al: Hear Res 201: 132-144, 2005)。TRPVファミリーは熱、酸、浸透圧などの非特異的侵害刺激に対して反応するカチオン・チャンネルを有する6回膜貫通型受容体で、活性化されることで細胞内にカルシウムが流入することがわかっている(Benham-CD et al: Cell Calcium 33: 479-487, 2003)。サリチル酸による耳鳴動物モデルを用いて、まず real-time PCR 法により、TRPVファミリーを分子生物学的耳鳴分子マーカーの候補として聴覚伝導路における発現変化を検索する。さらにDNA microarray法により、聴覚伝導路において発現変化する遺伝子を耳鳴分子マーカーの候補として網羅的に検索する。

およびが実現された後、主としてを応用してサリチル酸耳鳴動物モデルにおける「薬物による耳鳴軽減効果の検討」、主としてを

用してサリチル酸耳鳴動物モデルにおける「耳鳴発生機序の解明」を進める。さらに、サリチル酸耳鳴以外の臨床に直結するような耳鳴を引き起こすモデル、例えばアミノグリコシド内耳障害モデルや音響障害モデルの耳鳴を評価していく。

3. 研究の方法

耳鳴発生時にラットおよびマウスが起こす特異的な行動を同定すること(耳鳴動物行動モデルの確立)。

耳鳴発生時に小動物の聴覚伝導路において特異的に発現上昇する分子を同定すること(耳鳴分子マーカーの確立)。

を応用してサリチル酸耳鳴動物モデルにおける「薬物による耳鳴軽減効果の検討」、サリチル酸耳鳴動物モデルにおける「耳鳴発生機序の解明」を進める。

4. 研究成果

サリチル酸投与ラットおよびマウスにおいて無音状態での反応行動が増加し、ラセン神経節におけるTRPV1の発現が上昇していた。またこれらの上昇はTRPV1拮抗剤カプサゼピン投与により抑制された。これらの結果から、サリチル酸投与により誘発される耳鳴には、聴覚伝導路におけるTRPV1の活性化が関与している可能性が示唆された。耳鳴は幻肢痛と類似した現象であり、内耳の感じる痛みであると考え、痛み受容体TRPV1の耳鳴への関与は非常に興味深い所見である。

ラットおよびマウスのらせん神経節における神経細胞生命維持機構に、BDNFなどの神経栄養因子等々の関与が考えられている。サリチル酸投与ラットのらせん神経節において、BDNF分子動態を確認しつつ、TRPV1およびその周辺分子との相互関与を検索する。耳鳴治療薬としてTRPV1拮抗薬等々の利用の可能性が考えられるが、そのことでBDNFを介する神経細胞生命維持機構に悪影響を及ぼさないかを確認していく。

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12件)

1. Kamakura-T, Ishida-Y, Nakamura-Y, Yamada-T, Kitahara-T, Takimoto-Y, Horii-A, Uno-A, Imai-T, Okazaki-S, Inohara-H, Shimada-S. Functional expression of TRPV1 and TRPA1 in rat vestibular ganglia. Neurosci Lett 552: 92-97, 2013.
2. Michiba-T, Kitahara-T, Hikita-Watanabe-N, Fukushima-M, Ozono-Y, Imai-R, Inohara-H. Residual tinnitus after the medical treatment of sudden deafness. Auris Nasus Larynx 40: 162-166, 2013.
3. Kitahara Tadashi, Horii Arata, Imai Takao, Ohta Yumi, Morihana Tetsuo, Inohara Hidenori,

Sakagami Masafumi : Effects of endolymphatic sac decompression surgery on vertigo and hearing in patients with bilateral Ménière's disease. *Otol Neurotol* 35,1852-1857,2014.

4. Kitahara Tadashi, Horii Arata, Imai Takao, Ohta Yumi, Morihana Tetsuo, Inohara Hidenori, Sakagami Masafumi: Does endolymphatic sac decompression surgery prevent bilateral development of unilateral Meniere's disease? *Laryngoscope*. 124, 1932-1936, 2014.

5. Kitahara Tadashi, Kamakura Takefumi, Ohta Yumi, Morihana Tetsuo, Horii Arata, Uno Atsuhiko, Imai Takao, Mishiro Yasuo, Inohara Hidenori: Chronic otitis media with cholesteatoma with canal fistula and bone conduction threshold after tympanoplasty with mastoidectomy. *Otol Neurotol* 35, 981-988, 2014.

6. Okamoto-H, Fukushima-M, Teismann-H, Lagemann-L, Kitahara-T, Inohara-H, Kakigi-R, Pantev-C. Constraint-induced music therapy for sudden sensorineural hearing loss – a pilot study. *Scientific Reports* 4: 3927, 2014.

7. Takimoto-Y, Ishida-Y, Nakamura-Y, Kamakura-T, Yamada-T, Kondo-M, Kitahara-T, Uno-A, Imai-T, Horii-A, Okazaki-S, Nishiike-S, Inohara-H, Shimada-S. 5-HT₃ receptor expression in the mouse vestibular ganglion. *Brain Res*. 1557: 74-82, 2014.

8. Nishimura-T, Hosoi-H, Saito-O, Miyamae-R, Shimokura-R, Yamanaka-T, Kitahara-T, Levitt-H. Cartilage conduction is characterized by vibrations of the cartilaginous portion of the ear canal. *PLOS ONE* 10: e0120135, 2015.

9. Yoshida-T, Nin-F, Ogata-G, Uetsuka-S, Kitahara-T, Inohara-H, Akazawa-K, Komune-S, Kurachi-Y, Hibino-H. NKCCs in the fibrocytes of the spiral ligament are silent on the unidirectional K⁺ transport that controls the electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Pflugers Arch*. 467: 1577-1589, 2015.

10. Uetsuka-S, Ogata-G, Nagamori-S, Isozumi-N, Nin-F, Yoshida-T, Komune-S, Kitahara-T, Kikkawa-Y, Inohara-H, Kanai-Y, Hibino-H. Molecular architecture of the stria vascularis membrane transport system, which is essential for physiological functions of the mammalian cochlea. *Eur. J Neurosci*. 42: 1984-2002, 2015.

11. Ito-T, Kitahara-T, Inui-H, Miyasaka-T, Kichikawa-K, Ota-I, Nario-K, Matsumura-Y, Yamanaka-T. Endolymphatic space size in patients with Meniere's disease and healthy controls. *Acta Otolaryngol*, in press.

12. Inui-H, Ito-T, Sakamoto-T, Kitahara-T, Volumetric measurements of the inner ear in patients with Meniere's disease using three-dimensional MRI. *Acta Otolaryngol*, in press.

[学会発表] (計 12 件)

1. Kitahara-T. Acute vestibular peripheral vertigo at ER. 20th IFOS, June, 2013, Seoul.

Takimoto-Y, Imai-T, Kitahara-T, Inohara-H. Evaluation of eye movements in eccentric rotation on three dimensional VOR in human. 20th IFOS, June, 2013, Seoul.

2. 今井隆介, 西池季隆, 福嶋宗久, 大園芳之, 道場隆博, 北原 紘. ステロイド加療後に高圧酸素療法を追加治療を行った突発性難聴 43 例の検討. 第 23 回日本耳科学会, 2013.11/24-26, 宮崎.

3. Kitahara Tadashi. Behavioral and molecular biological assessments for visualization of phantom tinnitus in animal studies. 4th East Asian Symposium on Otology. 2014.5/8-10, Shanghai.

4. Kitahara Tadashi, Kamakura Takefumi, Horii Arata, Imai Takao, Inohara Hidenori, Mishiro Yasuo, Sakagami Masafumi. Changes in bone conduction threshold after tympanoplasty with mastoidectomy for chronic otitis media with cholesteatoma with canal fistula. 49th Annual Spring Meeting American Neurotology Society. 2014.5/17-18, Las Vegas.

5. Imai-T, Higashi-Shingai-K, Kitahara-T, Masumura-C, Horii-A, Sakagami-M, Inohara-H. New scoring system of interview for diagnosis of benign paroxysmal positional vertigo. 49th Annual Spring Meeting American Neurotology Society. 2014.5/17-18, Las Vegas.

6. Kitahara Tadashi, Inohara Hidenori. Does endolymphatic sac decompression surgery with local steroids prevent bilateral development of Meniere's disease? AAO-HNS Annual Meeting & OTO EXPO. 2014.9/21-24, Orlando.

7. 北原 紘. 耳鳴りの他覚的評価. 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 2014.5/14-17, 福岡.

8. 北原 紘, 山中敏彰, 成尾一彦, 西村忠己, 山下哲範, 下倉良太, 森本千裕, 阪上雅治: 一側メニエール病両側内リンパ水腫に対する内リンパ嚢手術. 第 24 回日本耳科学会. 2014.10/15-18, 新潟.

9. 北原 紘, 山中敏彰, 岡本英之, 村井孝行, 清水直樹, 伊藤妙子, 阪上雅治: 両側メニエール病に対する内リンパ嚢手術. 第 73 回日本めまい平衡医学会. 2014.11/5-7, 横浜.

10. Kamakura-T, Kitahara-T, Ishida-Y, Nakamura-Y, Yamada-T, Kondoh-M, Takimoto-Y, Imai-T, Horii-A, Inohara-H, Shimada-S. Effect of brain-derived neurotrophic factor, BDNF on TRPV1 and TRPA1 channels in the cultured rat vestibular ganglia. 38th Annual ARO Midwinter Meeting, 2015.2/21-25, Baltimore.

11. 北原 紘, 山下哲範, 伊藤妙子, 阪上雅治, 山中敏彰. 耳鳴を可視化する. 第 30 回奈良脳神経ネットワーク研究会, 2015.7/10, 奈良.

12. 北原 紘, 山下哲範, 伊藤妙子, 阪上雅治, 道場隆博. 突発性難聴聴力固定後の耳鳴経過. 第 1 回耳鳴・難聴研究会. 2015.7/11, 名古屋.

(図書) (計 8 件)

1. 北原 紘: 特集 高齢者の感覚器障害 - 診断と最新の治療: 耳鳴 -, 臨床と研究, 91, 1183-1187, 2014.
2. 北原 紘: 自律神経系の病態と治療 - 感覚器疾患・前庭障害 - Clinical Neuroscience 32, 1422-1423, 2014.
3. 北原 紘: 特集2: 「めまい研究の新展開」—メニエール病の分子生物学と手術, 脳 21, 17, 51-55, 2014.
4. 北原 紘: 内リンパ水腫と内耳液性恒常性, 耳鼻咽喉科展望, 58, 8 18, 2015.
5. 北原 紘, 山中敏彰: 高齢者のみみ・はな・のど 6. 高齢者のめまい, Geriatric Medicine, 539, 339-344, 2015.
6. 北原 紘: 7. めまい (28) メニエール病に対する内リンパ嚢開放術のエビデンスは?. 池田勝久, 武田憲昭, 香取幸夫, 原淵保明, 丹生健一編. EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 2015-2016. 中外医学社, 東京: pp118-123, 2015.
7. 北原 紘: 内リンパ嚢手術はメニエール病の両側化を予防できるか? 白井聡一郎, 高木和浩, 石野貴之編. 医学のあゆみ 252 巻 9 号. 医歯薬出版, 東京: pp966-967, 2015.
8. 北原 紘: メニエール病. 福井次矢, 高木 誠, 小室一成編. 今日の治療方針 2016 年版—私はこう治療している. 医学書院, 東京: pp1524-1525, 2015.

(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:
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

北原 紘 (KITAHARA TADASHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30343255

(2) 研究分担者

今井貴夫 (IMAI TAKAO)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 80570663

太田有美 (OTA YUMI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 00598401

森鼻哲生 (MORIHANA TETSUO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 80634170