

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462640

研究課題名(和文)急性感音難聴の病態と治療のプロテオーム解析 -質量分析計を用いた解析-

研究課題名(英文)Proteomic analysis of acute sensorineural hearing loss and steroid treatment in mice using mass spectrometry approach

研究代表者

前田 幸英 (Maeda, Yukihide)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00423327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性感音難聴は比較的頻繁にみられ、難治性の病態である。急性感音難聴の治療にはステロイド投与が行われる。当研究ではマウスに対するステロイド投与で、蝸牛局所で発現が変動する蛋白質を質量分析計で解析し、急性感音難聴モデルにおいても蛋白発現を検討した。生体内の蝸牛から、質量分析計で247種類の蛋白質を同定し、ステロイド投与で発現量が変動する蛋白質を11同定した。音響外傷による難聴モデルマウスにおいて、前述の蛋白質のうち、Myelin protein zeroとHeat shock protein 70の発現がステロイド投与により変動することをウエスタンブロットで確認した。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids are widely used therapeutically to treat acute sensorineural hearing loss, however, molecular mechanisms of glucocorticoid action in the cochlea are largely unknown. We analyzed protein expression in cochleae of mice following administration of a potent glucocorticoid, dexamethasone by mass spectrometry. Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) approach identified 11 differentially expressed proteins by dexamethasone in the cochlea. Of these proteins, it was verified that Myelin protein zero (Mpz) and Heat shock protein 70 (Hsp 70) are differentially regulated within 12 hours following administration of dexamethasone by western blot from the cochlear sample of a mouse model of noise-induced hearing loss. Immunohistochemistry revealed Mpz is localized to the myelin sheath of the spiral neurons, whereas Hsp 70 is widely expressed in the spiral neurons, organ of Corti, spiral ligament and stria vascularis in the cochlea.

研究分野：医歯薬学

キーワード：急性感音難聴 音響外傷 デキサメタゾン 質量分析計 ウエスタンブロット 免疫染色 Myelin protein zero Heat shock protein 70

1. 研究開始当初の背景

急性感音難聴は、比較的頻繁にみられ、かつ難治性の病態である。臨床的に急性感音難聴に対しては、ステロイド(グルココルチコイド)全身投与ないし局所投与が行われる。また、動物実験では音響外傷、耳毒性薬物、内耳虚血によって引き起こされた急性感音難聴に対してステロイド投与が有効であると示されている。しかしながらその分子機構の多くは不明である。

2. 研究の目的

急性感音難聴発症時の病態、ステロイド治療の際、蝸牛局所でどのような蛋白質の発現が増減しているか、質量分析計を使った網羅的蛋白質発現解析より明らかにする。これにより、急性感音難聴発症時の蝸牛におけるステロイド薬理作用を解明し、急性感音難聴に対するステロイド治療の理論的根拠の確立に貢献する。

3. 研究の方法

本研究の動物実験はすべて、岡山大学動物実験委員会の審査承認をうけて行われた。

(1)質量分析計による蝸牛局所の蛋白質発現解析。

6週齢雌 C57/BL6 マウスをケタミンとキシラジンで麻酔し、中耳骨包の小孔から内耳局所にステロイド(デキサメタゾン 24mg/ml)またはコントロール生理食塩水を投与した(中耳鼓室内投与)。投与後12時間でマウスを深麻酔下にて心臓から生食を灌流し、血液を除去し、内耳組織を剖出、採取した。ステロイド投与群15匹(蝸牛組織15個)コントロール群16匹(組織16個)の組織サンプルを採取した。

組織を摩砕して総蛋白を抽出し、各蛋白サンプルをトリプシン処理してペプチド化した後、isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)試薬で化学ラベリングした。デキサメタゾン投与群のペプチドサンプルは115、117Da-質量ラベル、コントロール群は114、116Da-質量ラベルでラベリングした。

上記のペプチドサンプルをHPLCカラムで分画したのち、質量分析計(5800 MALDI-TOF mass spectrometer, AB SCIEX)で分析した。各ペプチドサンプル中のペプチド鎖の質量と、各シグナルスポットのシグナル強度を解析した。

質量分析計で収集された質量スペクトラムのデータをProteinPilot 4.0 software (AB SCIEX)とデータベース情報(SwissProt data base)をもとに解析し、Unused ProtScore、115Da-:114Da-および117Da-:116Da- 標識ペプチドの発現量の比を算出した。

(2)急性感音難聴発症モデルマウスにおける、ウエスタンブロットでの蛋白質発現解析。

6週齢雌 C57/BL6 マウスを120dB SPL オクターブバンドノイズ(8.0-16.0 kHz)に2時間暴露し、急性感音難聴を惹起させた。騒音暴露直後にデキサメタゾン10mg/kg(計12匹)またはコントロール生理食塩水(計12匹)を腹腔内注射した。騒音暴露6時間および12

時間後に、マウスを深麻酔して蝸牛組織を剖出した(デキサメタゾン投与群:6、12間後に各々マウス6匹、蝸牛組織6個;生理食塩水投与群:6、12間後に各々マウス6匹、蝸牛組織6個)。

各サンプルから総蛋白を抽出、1レーン当たり15μgの蛋白サンプルをSDS-PAGEで電気泳動して蛋白質をPVDFメンブレンに転写した。ウエスタンブロットでMyelin protein zero (Mpz)蛋白、Heat shock protein 70 (Hsp70)蛋白の発現を検出した。Mpzの検出には抗Mpzポリクローナル抗体(ab31851、Abcam)および抗Hsp70モノクローナル抗体(3177、Cell signaling technology)を用いた。X線フィルム上の各蛋白の検出バンドをTIFFファイルとしてスキャンし、GelQuant softwareで定量化して、デキサメタゾン投与群とコントロール群の間で比較した。各群のデータはGapdhの発現量で補正し、統計解析にはMann-Whitney U-testを用いた。

(3)急性感音難聴発症モデルマウスにおける、免疫染色法での蛋白質発現解析。

マウスを騒音に暴露し、難聴を惹起した後、6、12時間後に深麻酔して、4%パラフォルムアルデヒドにて灌流固定した。蝸牛組織を切り出し、後固定した後、パラフィン切片を作成した。免疫染色法にてMpzおよびHsp70の発現を検討した。免疫染色法にはABC-DAB法を用いた。

4. 研究成果

(1)質量分析計による蝸牛局所の蛋白質発現解析。

質量分析計では3065のペプチド質量スペクトラムが検出され、これらを解析することにより、生体内の蝸牛からUnused ProtScore 1.3以上の蛋白質が247種類、2.0以上の蛋白質が178種類同定された。Unused ProtScoreは蛋白質同定の確度を表す指標であるが、Unused ProtScore 1.3以上は信頼区間95%、2.0以上は信頼区間99%に相当する。デキサメタゾン投与群とコントロール群の比較については、115Da-:114Da- 標識ペプチドの比較で、発現量が有意($p<0.05$)に異なる蛋白質が40種類(37蛋白質がデキサメタゾン投与群で増加、3蛋白質が減少)同定された。117Da-:116Da- 標識ペプチドの比較では28変動蛋白質が同定された(25蛋白質がデキサメタゾン投与群で増加、3蛋白質が減少)。115Da-:114Da-の比較と、117Da-:116Da-の比較で発現量変動データが共通に一致する蛋白質が11種類同定された。デキサメタゾン投与により蝸牛で有意に発現量が増加する蛋白質として、mitochondrial ATP synthase subunit beta、Prostaglandin-D2 synthase、mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 5A、Neurofilament medium polypeptide(Nefm)、Myelin protein zero、

mitochondrial elongation factor Tu、N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1、Lamin-B1、Ras-related protein Rab A1 の9蛋白質を同定した。発現量が減少する蛋白質としては Heat shock 70kDa protein 5 (Hsp70)、Apolipoprotein A-1 の2蛋白質を同定した。

(2)急性感音難聴発症モデルマウスにおける、ウエスタンブロットでの蛋白質発現解析。

マウスにおける急性感音難聴惹起後 6、12 時間後には Mpz の発現量は有意に減少していた(騒音暴露前:1.0 に比較して、6 時間後: 0.786 ± 0.053 , $n=4$, $p<0.05$, by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U-test; 12 時間後: 0.471 ± 0.103 , $n=4$, $p<0.05$)。Mpz の発現量は、騒音暴露 6 時間後に、デキサメタゾン投与群(1.870 ± 0.201 , $n=6$)ではコントロール群(1.000 ± 0.369 , $n=6$)より有意に増加していた($p<0.01$)。騒音暴露 12 時間後には、デキサメタゾン投与群(0.856 ± 0.130 , $n=6$)とコントロール群(1.000 ± 0.170 , $n=6$)で有意差を認めなかった。

Hsp70 の発現量には、騒音暴露 6 時間後に、デキサメタゾン投与群(1.170 ± 0.118 , $n=6$)とコントロール群(1.000 ± 0.161 , $n=6$)で有意差を認めなかった。騒音暴露 12 時間後に、デキサメタゾン投与群(0.511 ± 0.274 , $n=6$)ではコントロール群(1.000 ± 0.367 , $n=6$)より有意に減少していた($p<0.05$)

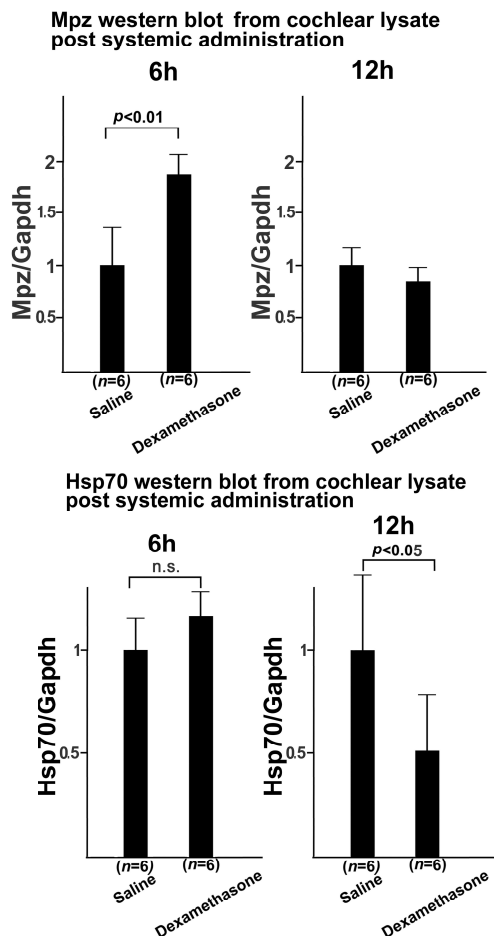
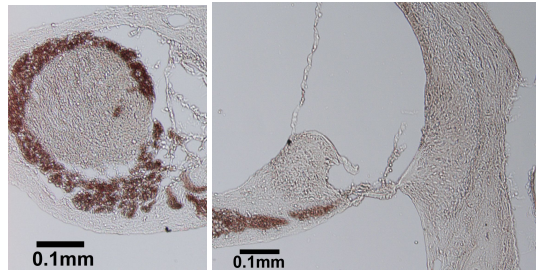


図1(上段):デキサメタゾンおよびコントロール生食投与後の蝸牛でのMpz発現量。

図2(下段):デキサメタゾンおよびコントロール生食投与後の蝸牛でのHsp70発現量。

(3)急性感音難聴発症モデルマウスにおける、免疫染色法での蛋白質発現解析。

騒音暴露後 6、12 時間後のマウス蝸牛において、らせん神経節周囲(下図、左)からコルチ器へ至る神経線維髄鞘(下図、右)にMpzの発現をみとめた。Hsp70の発現はらせん神経節、コルチ器、らせん靭帯、血管条など、蝸牛内に広汎にみとめた。



考察

当研究では、質量分析計によるプロテオーム解析と、急性感音難聴モデルマウスでの検討により、難聴発症時のステロイド投与により、蝸牛局所でMpzの発現が有意に変動することを見出した。ヒトではMPZ遺伝子の変異により、Charcot-Marie-Tooth (CMT) neuropathyが引き起こされ、感音難聴を発症する。従って、当研究結果はステロイドの、個体レベルでの難聴に対する効果を示唆する。培養細胞における実験ではMPZプロモーターはデキサメタゾンによる制御をうけており、デキサメタゾンにより遺伝子レベルでMPZの発現は制御されていると報告されている。

Hsp70は自己免疫性難聴の際に内耳で発現が増加する蛋白質であるが、デキサメタゾン投与により、発現が減少する。MpzとHsp70の検討により、デキサメタゾン投与により発現が増加する蛋白質と減少する蛋白質の両者のデータが示された。このことにより当研究での質量分析計を用いた方法論が有効であると支持された。

従来急性感音難聴におけるステロイドの薬理作用は免疫抑制作用、抗炎症作用が中心とされるが、当研究の実験結果から、神経軸索に対する作用等も存在すると考えられる。急性感音難聴の治療におけるステロイドの薬理作用機序は複数有ると推察された。

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1件)

Dexamethasone Regulates Cochlear
Expression of Deafness-associated
Proteins Myelin Protein Zero and Heat
Shock Protein 70, as Revealed by iTRAQ
Proteomics. Maeda Y, Fukushima K, Kariya S,
Orita Y, Nishizaki K.
Otol Neurotol. 2015 Aug;36(7):1255-65
査読有

〔学会発表〕(計3件)

前田 幸英、假谷 伸、菅谷 明子、片岡
祐子、西崎 和則、蝸牛におけるステロイド
作用機序 Charcot-Marie-Tooth neuropathy
関連蛋白、Myelin protein zero の制御
、
2015年10月07日～2015年10月10日、
長崎市、日本耳科学会

Yukihide Maeda, Kazunori Nishizaki .
Pharmacological action of steroids on
spiral nerve axon of the cochlea: a
hypothesis based on basic and clinical
evidence. 2015年06月30日～2015年07月
03日、新潟市、30th Politzer Society Meeting

前田 幸英、假谷 伸、西崎 和則、蝸
牛でのステロイド薬理作用のプロテオーム
解析、2014年10月15日～2014年10月18
日、新潟市、日本耳科学会

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学研究者総覧 (<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&l=ja>) にて当研究の内容、論文成果について紹介。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 幸英 (MAEDA, Yukihide)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：00423327

(2) 研究分担者

福島 邦博 (FUKUSHIMA, Kunihiro)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：50284112

假谷 伸 (KARIYA, Shin)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：10274226

片岡 祐子 (KATAOKA, Yuko)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：10362972

(3) 連携研究者

()

研究者番号：