

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861374

研究課題名(和文)新しいウイルス性内耳障害治療の基礎的研究

研究課題名(英文)The molecular biological research of a new treatment of viral-induced inner ear dysfunction

研究代表者

滝本 泰光(Takimoto, Yasumitsu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：00624298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：RT-PCR、in situ hybridizationの結果にてマウスの蝸牛、らせん神経節、前庭神経節にTLR3受容体の発現が認められた。poly I:Cを鼓室内に投与すると、投与側の内耳で炎症細胞の浸潤所見が認められた。前庭動眼反射を利用した平衡機能検査装置の開発し、マウスの末梢前庭機能の評価が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We revealed TLR3mRNA expression in the mouse cochlea, spiral ganglion, and vestibular ganglion using RT-PCR and in situ hybridization. After poly I:C intratympanic administration, the infiltration of inflammatory cells was observed in the treatment side of inner ear. We developed new evaluation system of mouse vestibular function.

研究分野：内耳

キーワード：内耳障害 末梢前庭機能 TLR3 内耳炎

1. 研究開始当初の背景

突発性難聴や前庭神経炎などの急性の内耳障害は、未だ治療に苦慮することが多い疾患である。発症の原因としてウイルス感染説が候補の一つとして考えられており、その根拠を示す基礎的な報告もあるが、未だ機序に不明な点が多い。

Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)は免疫細胞を活性化する成分を人工合成したもので、ウイルスの自然免疫に関わる分子の一つである Toll-like receptor 3 (TLR3)に認識される。つまり理論的には poly I:C を投与すればウイルスを用いずに擬似的なウイルス感染状態を作り出すことが可能である。TLR3 は樹状細胞などの免疫細胞、線維芽細胞、上皮系細胞などのエンドソームに存在することが知られ、疾患に関しては腎臓、消化管、リウマチの炎症や乳癌や悪性黒色腫などの悪性腫瘍との関連が報告されている。しかし内耳の炎症との関連の報告はない。また、TLR3 は一部のウイルスが持つ二本鎖 RNA を認識するが、それ以外のリガンドも報告されるなど、未だ機能の解明は発展途上にある。しかしながら同様にウイルスを認識する。TLR7 の阻害剤が尖圭コンジローマの治療薬として既に使われており TLR3 の活性化を阻害することが急性内耳障害の治療になる可能性は十分にあると思われる。

我々は TLR3 の活性化剤である poly I:C をマウスの片側内耳に投与したところ片側前庭障害行動を認めることを発見した。また投与マウスの全身状態は良好であり 1 か月以上の生存を確認できた。この結果からウイルス性内耳障害は、感染したウイルスが TLR3 に認識され炎症が起こり、難聴や眩暈などが引き起こされるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

急性の内耳障害は難治性であり、原因にウイルス感染説などがあるが未だ不明である。

新たな治療法開発や原因解明には適切な内耳障害動物モデルによる基礎研究が必要と考える。poly I:C はウイルスが免疫細胞を活性化する成分を人工合成したものであり、TLR3 で認識されて炎症が起こる。本研究の目的は poly I:C を用いて新たなウイルス性内耳障害モデルを確立し、TLR3 をターゲットにしたまったく新しい急性内耳障害の治療薬を開発することである

3. 研究の方法

マウス内耳における TLR3 遺伝子発現及び蛋白局在の発現の確認：

57BL/6J マウスを用いて RT-PCR、in situ hybridization (ISH)、免疫染色法を行った。
1. RT-PCR 蝸牛、前庭神経節から抽出した total RNA から逆転写反応を経て cDNA を作成し TLR3 に特異的なプライマーを作成し PCR を行った。

2. ISH

前庭神経節から抽出した total RNA から逆転写反応を経て cDNA を作成し、TLR3 の約 1Kbp を鋳型にして Digoxigenin でラベルした cRNA を作成した。マウス側頭骨の新鮮凍結切片を準備して上記の cRNA プローブで hybridization を 24 時間行い、抗体は Anti-DIG-AP (アルカリフォスファターゼ) を、発色には HNPP を用いた。

poly I:C 腹腔内投与、鼓室内投与後の側頭骨病理所見の評価：投与後のマウスより側頭骨を取り出し PFA 固定、脱灰処理を経て切片を作成し HE 染色法にて評価を行った。

マウスの正確な前庭機能評価を行うために新たに平衡機能検査装置を開発する：半規管機能評価のためのマウス用回転検査装置、耳石器機能評価のためマウス用直線加速度加速装置の開発を進めた。

4. 研究成果

TLR3 の内耳での局在：

mRNA については RT-PCR、in situ hybridization にて前庭神経節、らせん神経節、コルチ器に後半に発現が認められた。蛋白の局在に関しては内耳の神経節に発現が認められたが、まだ非特異的な反応である可能性があり、今後も検討が必要と考えている。

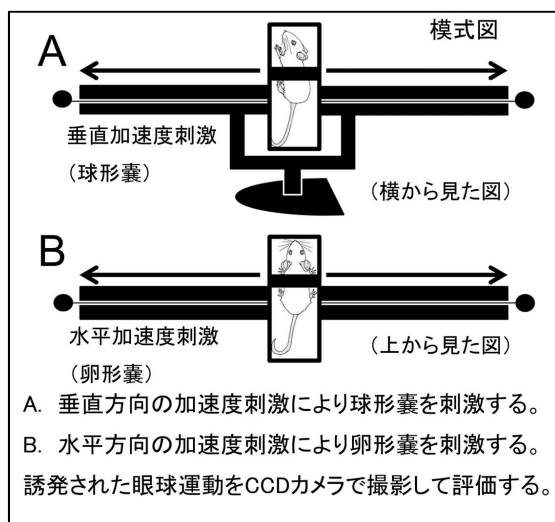
poly I:C 投与後の病理所見：

腹腔内投与では明らかな異常所見は認めなかったが、鼓室内投与では、投与側の内耳で広範な炎症細胞の浸潤所見が認められた。

平衡機能検査装置の開発について：

回転刺激による前庭動眼反射誘発による半規管機能検査装置は完成し、再現性のあるデータをとることが可能となった。このメソッドに関しては論文にて報告した (Imai, Takimoto et al., Plos one, 2016)。直線刺激による耳石器機能検査装置はおおむね完成している (図)。これらを用いて今後 poly I:C 投与後のマウスの前庭機能解析を行っていく方針である。

直線加速度刺激装置 (作製前の完成予想図)



直線加速度刺激装置 (作製中の装置)



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)

High-Speed Video-Oculography for Measuring Three-Dimensional Rotation Vectors of Eye Movements in Mice.

Imai T, Takimoto Y, Takeda N, Uno A, Inohara H, Shimada S.

Plos One. 2016 Mar 29

〔学会発表〕(計 5 件)

第 73 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会

平成 26 年 11 月 6 日, 横浜.

滝本泰光, 今井貴夫, 宇野敦彦, 鎌倉武史, 北原 紘, 堀井 新, 奥村朋子, 猪原秀典.

240Hz ハイスピードカメラを用いたマウス前庭動眼反射検査装置の開発.

Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto
November 14, 2014, Kyoto, Japan.

Takimoto Y, Imai Y, Uno A, Ishida Y, Kitahara T, Kamakura T, Okumura T, Horii A, Inohara H, Shimada S.

Evaluation of the mouse vestibulo-ocular reflex with video-oculography.

ARO 39th MidWinter Meeting

February 21, 2015, Baltimore, USA.

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.

第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会
平成 27 年 3 月 21 日, 神戸.

滝本泰光、石田雄介、中村雪子、鎌倉武史、
近藤誠、島田昌一

マウス前庭神経節におけるセロトニン受容
体 3 の発現.

第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講
演会 平成 27 年 11 月 26 日, 岐阜.

滝本泰光, 今井貴夫, 鎌倉武史, 北原 紘,
宇野敦彦, 堀井新, 奥村朋子, 猪原秀典.

マウス前庭神経節におけるセロトニン 3 受
容体の発現について.

〔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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

滝本 泰光 (TAKIMOTO, Yasumitsu)

大阪大学・医学部医学系研究科・特任研究員

研究者番号: 00624298

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: