

令和元年6月11日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10753

研究課題名(和文) 新しいRNA干渉法を用いた内耳感覚上皮の発現遺伝子の検討

研究課題名(英文) Evaluation of expressed gene in the inner ear with RNA interference method

研究代表者

菅原 一真 (SUGAHARA, Kazuma)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20346555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：内耳感覚細胞が障害される際、細胞内シグナル伝達に関わる分子群の活性化が誘導され、その後感覚細胞が死滅する。哺乳動物の感覚細胞はひとたび障害されると再生されることはなく、現在の難聴治療上の障壁となっている。本研究では内耳感覚細胞におけるミトコンドリアに着目した研究を行った。手段としてRNAによる分子生物学的手法の導入を試みた。

結果として、内耳感覚細胞においてもミトコンドリア機能を保護することで、細胞傷害を抑制できることを明らかにした。In vivo動物モデルの構築に難渋したが、他の薬剤を用いたモデルは構築し、英文誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳感覚細胞死のメカニズムは最近の研究で明らかになりつつあるが、まだ治療方法として確立されたものはない。本研究は動物実験のレベルであるが、これまでに報告されていない手段を用いて、内耳感覚細胞を保護できることを示した。さらに研究が進展することで、内耳疾患の新しい治療法の一手段につながることを期待している。

研究成果の概要(英文)：When inner ear sensory cells are damaged, activation of molecules involved in intracellular signal transduction is induced, and then sensory cells are killed. Mammalian sensory cells are not regenerated once they are impaired, and they constitute a barrier to the current treatment of deafness. In this study, we focused on mitochondria in inner ear sensory cells. We tried to introduce molecular biological techniques using RNA as a means.

As a result, we also clarified that protecting mitochondrial function in inner ear sensory cells can suppress cell damage. Although it was difficult to construct in vivo animal models, models using other drugs were constructed and reported in English.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳

## 1. 研究開始当初の背景

内耳感覚細胞が障害される際、細胞内シグナル伝達に関わる分子群の活性化が誘導され、その後、感覚細胞が死滅する。哺乳動物の感覚細胞はひとたび障害されると再生されることはなく、現在の難聴治療上の障壁となっている。研究代表者は、これまで内耳感覚細胞死のメカニズムを明らかにするべく基礎的研究を行ってきた。有毛細胞がストレスに曝露される際には、早期に MAP キナーゼの 1 種である JNK が活性化することが細胞死に深く関わっていることを明らかにした (Sugahara et al, 2006)。また、細胞死の最終段階にはカスパーゼ-9 やカスパーゼ-3 が重要な役割を果たすことを報告している (Okuda et al, 2005)。しかし、これらのシグナル伝達にミトコンドリアがどのように関わっているかは、内耳感覚細胞では十分に明らかにされたとは言えないのが現状である (右図参照)。

ミトコンドリアに細胞死のシグナルが伝わると、イオンチャンネル蛋白質 (VDAC) が PT pore と呼ばれる構造を形成し、膜電位の消失、チトクロム C の放出を引き起こし、これがカスパーゼの活性化を誘導し、細胞死が生じると報告されている。研究代表者は、当該研究において、内耳有毛細胞においてもミトコンドリアに関わるシグナル伝達が細胞死に関わっているのかどうかを明らかにしたい。さらに、その知見により、新たな内耳保護療法の可能性について検討したいと考える。

## 2. 研究の目的

内耳感覚細胞死におけるミトコンドリア膜電位の役割について明らかにする。また、新たな内耳感覚細胞障害の予防法について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 有毛細胞障害時のミトコンドリアにおけるシグナル伝達の検討

実験材料として、CBA/N マウスの卵形嚢培養を用い、有毛細胞のミトコンドリア膜電位を測定する。卵形嚢は過去に報告した方法 (Sugahara et al, 2006) で行う。その際、両群とも、培地内にミトコンドリア膜電位に応じて蛍光波長が変化する薬剤 (JC-1 等) を溶解させる。ネオマイシン群では、有毛細胞死を誘導するために培地内にネオマイシン (1 mM) を溶解させる。培養は、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行うが、培養開始後 6、12、18 時間の時点で、蛍光顕微鏡下に観察し、ミトコンドリアの膜電位を評価する。この実験によって、ネオマイシン曝露後、ミトコンドリアに細胞死のシグナルが伝わる時期が明らかとなる。

### (2) 実験的内耳障害に対するミトコンドリアの役割

ミトコンドリアに細胞死のシグナルが伝わると、イオンチャンネル蛋白質 (VDAC) が、PT pore と呼ばれる構造を形成し、膜電位の消失、チトクロム C の放出を引き起こすと報告されている。VDAC の阻害剤 (Bcl-xL BH44-23 等) を用いて、内耳感覚細胞死におけるミトコンドリアの役割を明らかにする。

### (3) 内耳保護療法動物モデルの作成

(2) で得られた情報を元に、実験動物を用いた in vivo モデルを構築する。

## 4. 研究成果

### (1) 有毛細胞障害時のミトコンドリアにおけるシグナル伝達の検討

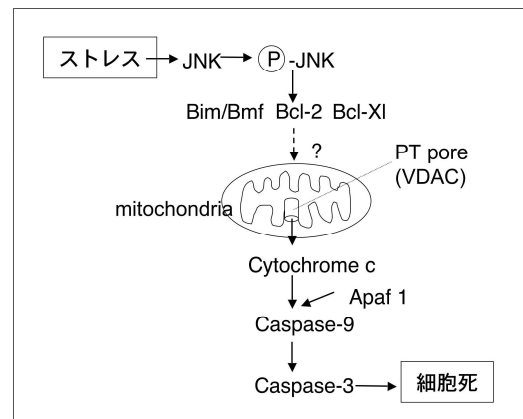
マウスの培養卵形嚢をアミノグリコシド系薬剤に曝露することで、容易に有毛細胞障害が観察された。JC-1 を用いて観察すると、曝露後 24 時間の時点で、ミトコンドリア膜電位の消失と思われる信号の変化を観察できた。卵形嚢における有毛細胞はサイズが小さいという問題があり、蛍光顕微鏡レベルでは、それ以上の詳細な検討は困難であった。

### (2) 実験的内耳障害に対するミトコンドリアの役割

ミトコンドリアを保護する目的で、VDAC の阻害剤である Bcl-xL 製剤を培地に加えた実験を行った。Bcl-xL 製剤の培地への添加は、ミトコンドリア電位の消失を抑制し、有毛細胞の生存率を向上させた。また、細胞死のマーカーである caspase3 の活性化も抑制していた。これらの結果は現在、海外誌に投稿中である。

### (3) 内耳保護療法動物モデルの作成

Bcl-xL 製剤を用いた in vivo モデルの構築を試みたが、奏功しなかった。代わりにミトコン



有毛細胞死に関するシグナル伝達の経路

ドリアも含めて内耳感覚細胞保護効果が報告されている熱ショック蛋白質を誘導できる物質を経口投与するモデルを構築した。結果は *Auris Nasus Larynx* 誌 (Shinpei Nagato, et al. 2018) に報告した。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

菅原一真, 山下裕司. 内耳保護を目標とした薬物スクリーニング研究. *Equilibrium Research*.78(2) : 102-105, 2019

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jser/78/2/78\\_102/\\_article/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jser/78/2/78_102/_article/-char/ja) ( 査読無 )

菅原一真, 山下裕司. 薬剤性難聴. *JOHNS*.35(1) : 56-58, 2019 ( 査読無 )

Takeshi Hori, Kazuma Sugahara, Junko Tsuda, Yoshinobu Hirose, Makoto Hashimoto, Yosuke Takemoto, Shunsuke Tarumoto, Hiroshi Yamashita. Oral administration of an herbal medicine to prevent progressive hearing loss in a mouse model of diabetes. *Auris Nasus Larynx*. E-Pub. 2019 doi:10.1016/j.anl.2019.01.011 ( 査読有 )

Shinpei Nagato, Kazuma Sugahara, Yosuke Takemoto, Makoto Hashimoto, Hironori Fujii, Hiroshi Yamashita. Oral administration of geranylgeranylacetone to protect vestibular hair cells. *Auris Nasus Larynx*.45(3) : 412-416, 2018 doi:10.1016/j.anl.2017.07.006 ( 査読有 )

Hironori Fujii, Makoto Hashimoto, Kazuma Sugahara, Takuo Ikeda, Yoshinobu Hirose, Hiroshi Yamashita. Quantitative Analysis of Smooth Pursuit Eye Movement Using Video-Oculography. *Arch Otolaryngol Rhinol*.4(1) : 30-34, 2018 doi:10.17352/2455-1759.000071 ( 査読有 )

Yosuke Takemoto, Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Hirotaka Hara, Hiroshi Yamashita. Protective effect of an astaxanthin nanoemulsion against neomycin-induced hair-cell damage in zebrafish. *Auris Nasus Larynx*.45(1) : 20-25, 2018. doi:10.1016/j.anl.2017.02.001 ( 査読有 )

菅原一真, 山下裕司. 抗加齢医学の観点から見た老人性難聴. *ENTONI*.(211) : 44-48, 2017 ( 査読無 )

菅原一真, 山下裕司. 生活習慣と耳鼻咽喉科疾患 血糖異常. *JOHNS*.33(8) : 963-966, 2017( 査読無 )

Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Eiju Kanagawa, Yosuke Takemoto, Makoto Hashimoto, Hiroshi Yamashita. Quercetin protects against hair cell loss in the zebrafish lateral line and guinea pig cochlea. *Hearing Research*.342 : 80-85, 2016 doi:10.1016/j.heares.2016.10.001 ( 査読有 )

菅原一真, 山下裕司. 乳突削開術と posterior tympanotomy. *JOHNS*.32(9) : 1110-1112, 2016 ( 査読無 )

Junko Tsuda, Kazuma Sugahara, Takeshi Hori, Eiju Kanagawa, Eiichi Takaki, Mitsuaki Fujimoto, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Oto-Laryngologica*.136(11) : 1097-1106, 2016 doi:10.1080/00016489.2016.1195012 ( 査読有 )

菅原一真, 山下裕司. 【新しい治療・将来展望】 Drug delivery system. *JOHNS*.32(1) : 94-96, 2016 ( 査読無 )

Shuhei Yoshida, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Yoshinobu Hirose, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita. The minimum peptides of IGF-1 and substance P protect vestibular hair cells against neomycin ototoxicity. *Acta Oto-Laryngologica*.135(5) : 411-415, 2015 doi:10.3109/00016489.2014.979438 ( 査読有 )

[学会発表](計 14 件)

Kazuma Sugahara , Yoshinobu Hirose , Makoto Hashimoto , Shunsuke Tarumoto , Hiroshi Yamashita : Expression of advanced glycation end-product in the cultured utricles 42nd ARO Annual MidWinter Meeting Baltimore ( US ) 2019.2.9 ( ポスター )

Kazuma Sugahara , Hironori Fujii , Makoto Hashimoto , Yoshinobu Hirose , Takuo Ikeda , Hiroshi Yamashita : Quantitative analysis of smooth pursuit eye movement by video-oculography (VOG) XXX Barany Society Meeting Uppsala ( Sweden ) 2018.6.10 ( ポスター )

Kazuma Sugahara , Makoto Hashimoto , Hiroshi Yamashita : EXPRESSION OF AGES IN THE COCHLEA OF METABOLIC SYNDROME MODEL MICE 6th East Asian Symposium on Otology Seoul ( Korea ) 2018.5.24 ( ポスター )

Kazuma Sugahara , Yoshinobu Hirose , Makoto Hashimoto , Yosuke Takemoto , Shunsuke Tarumoto , Hiroshi Yamashita : Expression of advanced glycation end-product in the cochlea of metabolic syndrome model mice 41st ARO Annual MidWinter Meeting San Diego ( USA ) 2018.2.10 ( ポスター )

菅原一真 , 津田潤子 , 広瀬敬信 , 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウス内耳における終末糖化産物の生成 第 27 回 日本耳科学会総会・学術講演会 横浜 2017.11.22 ( 講演 )

菅原一真 , 津田潤子 , 橋本 誠 , 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウスの内耳における終末糖化産物の生成について 第 62 回 日本聴覚医学会総会・学術講演会 福岡 2017.10.19 ( 講演 )

菅原一真 , 津田潤子 , 堀 健志 , 広瀬敬信 , 原 浩貴 , 山下裕司 : メタボリック症候群モデル動物における AGE 産生と難聴について 第 17 回 日本抗加齢医学会総会 東京 2017.6.2 ( 講演 )

菅原一真 , 竹本洋介 , 広瀬敬信 , 橋本 誠 , 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウスにおける糖化最終産物と難聴の関係 第 118 回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会 広島 2017.5.17 ( 講演 )

Kazuma Sugahara : Case of Eosinophilic Otitis Media with One-Stage Cochlear Implantation MED-EL Product Training Innsbruck ( Austria ) 2017.5.11 ( 講演 )

Kazuma Sugahara , Junko Tsuda , Takeshi Hori , Yoshinobu Hirose , Makoto Hashimoto , Hiroshi Yamashita : Effect of pyridoxamine on the hearing function in the mouse model of metabolic syndrome 40th ARO Annual MidWinter Meeting Baltimore ( USA ) 2017.2.11 ( ポスター )

菅原一真 , 津田潤子 , 広瀬敬信 , 竹本洋介 , 樽本俊介 , 山下裕司 : メタボリック症候群モデルマウスにおける難聴予防の試み 第 26 回 日本耳科学会総会・学術講演会 長野 2016.10.6 ( 全国学会・シンポジスト )

Kazuma Sugahara , Yoshinobu Hirose , Yosuke Takemoto , Makoto Hashimoto , Hiroshi Yamashita : Protective Effect in Herbal Medicine "SHIMOTSUTO" in the Zebrafish Lateral Line and Mice Vestibular Hair Cell. 29th Barany Society Meeting 2016 Seoul ( Korea ) 2016.6.5 ( 講演 )

Kazuma Sugahara , Junko Tsuda , Takeshi Hori , Yoshinobu Hirose , Makoto Hashimoto , Hirotsuka Hara , Hiroshi Yamashita : Age related hearing loss in the mouse model of metabolic syndrome. The 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery Tokyo 2016.3.28 ( ポスター )

Kazuma Sugahara , Yoshinobu Hirose , Yosuke Takemoto , Makoto Hashimoto , Hiroshi Yamashita : Astaxanthin nano emulsion can protect hair cells against aminoglycosides. 39th ARO Annual MidWinter Meeting San Diego ( USA ) 2016.2.20 ( ポスター )

[ 図書 ] ( 計 6 件 )

菅原一真. おすすめ難聴予防法 朝日脳活マガジン ハレやか. 朝日新聞出版. 178 ( 13-16 ) , 2019.2.

菅原一真. 聞こえの低下を防ぐには？耳にいい生活習慣. 週刊朝日MOOK「よく聞こえない」ときの耳の本. 朝日新聞出版. 112 ( 36-41 ) , 2018.9.

菅原一真 , 山下裕司. 感覚器の構造と機能

感覚・平衡覚 蝸牛. 日本医師会雑誌 わかりやすい感覚器疾患. 364 ( 55-56 ) , 2018.6.

菅原一真, 山下裕司. 医師が知っておきたいサプリメント 耳鼻咽喉科領域. 機能性表示食品 DATA BOOK【第3版】. メディカルレビュー社. 308 ( 238-243 ) 2017.12.

菅原一真, 山下裕司. 医師が知っておきたいサプリメント 耳鼻咽喉科領域. 機能性表示食品 DATA BOOK【第2版】. メディカルレビュー社. 296 ( 234-239 ) , 2016.12.

Kazuma Sugahara, Ke Tan, Akira Nakai, Hiroshi Yamashita. HSF Maintains Sensory Organs. Heat Shock Factor. Springer. 301 ( 131-146 ) , 2016.1.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山下 裕司

ローマ字氏名：YAMASHITA, Hiroshi

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：0 0 2 1 0 4 1 9

研究分担者氏名：広瀬 敬信

ローマ字氏名：HOROSE, Yoshinobu

所属研究機関名：山口大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号 (8桁)：8 0 5 5 5 7 1 4

研究分担者氏名：原 浩貴 (削除：2017年6月9日)

ローマ字氏名：HARA, Hirotaka

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8桁)：9 0 2 7 4 1 6 7

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。