

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390444

研究課題名(和文)

内耳の易受傷性と加齢変化に関する検討

研究課題名(英文)

Differences of susceptibility and aging of inner damage

研究代表者

小川 郁 (OGAWA KAORU)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00169179

研究成果の概要(和文):

われわれは、マウスを用いて、活性酸素除去能、オートファジーに代表される維持機構の状態が内耳恒常性維持に関与することを見出した。OGG と呼ばれる活性酸素除去能が低下したマウスに対して音響外傷を与えたところ、対照群と比較して内耳有毛細胞の障害が強かった。また、オートファジー7 コンディショナルノックアウトマウスにおいて、内耳有毛細胞のせん毛が消失しており、有毛細胞維持に critical な因子であると考えられた。加齢変化を示す TBL-1 ノックアウトマウスについては現在検討中である。

研究成果の概要(英文):

We concluded that differences of free radical scavenger and autophagy between individuals can determine inner ear homeostasis. OGG (free radical scavenger gene) KO mice exposed to acoustic trauma demonstrated more hair cells damages compared to wild type mice as control. Autophagy 7 conditional knockout mice presented stereocilia loss. It may suggest that autophagy is critical factor for maintaining hair cells. One study is still ongoing research regarding functional and morphological analysis of TBL-1 KO mice which we proposed as presbycusis mice model

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉頭科学

キーワード：易受傷性、内耳障害、有毛細胞、活性酸素、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

内耳障害の受けやすさ(いわゆる易受傷性)において個体差がある。たとえば音響に対する易受傷性は個体によって異なると思われる。同様に加齢性変化による難聴(老人性難聴)も個体差があり、難聴の程度が異なることから、環境因子に加えて先天的因子(遺伝子)

が関与していると考えられる。加齢変化は、いわゆる感覚器の“使いすぎ”と換言することが可能であるが、それらを規定する因子について解明することが临床上重要である。すなわち内耳障害の個体差を説明できる因子を発見し臨床に向けて応用したいと考えた。

内耳障害による感音難聴ではステロイド投与が行われるが、鼓室内投与は、突発性難聴、メニエール病など内耳性難聴を対象に施行される。薬液が鼓膜を介して中耳に入り、正円窓膜を通過する必要がある。諸家の報告によると必ずしも全症例で正円窓膜を薬液が通過する例ばかりでないにもかかわらず、正円窓膜を観察せずに投与される場合も多い。鼓室内投与法は全例に効果が得られないが、得られない症例のうち、上記のような正円窓閉鎖例が潜在することを確認し、対応する必要がある。鼓室内投与によってステロイド投与される方が内耳へ高濃度ステロイドが浸透する。鼓室内投与において内耳の正円窓からステロイドが吸収されると予想される。ところが、正円窓上に偽膜が生じている場合、偽膜が内耳への薬剤吸収を阻害し、内耳に薬液が到達できない。なお、偽膜の存在は過去の報告から 10 - 30%存在すると考えられ、すなわち 10~30%の症例に薬液が到達せず、効果がでないと予想される。その点を解消するため、内視鏡を用いて内耳正円窓を観察しながら偽膜が存在する場合、偽膜を摘出し薬液を注入することが良いと考えている。

2. 研究の目的

マウスモデルを使って内耳恒常性維持と受傷性について解析した。
内耳活性酸素除去能)
活性酸素は内耳に対して傷害性に作用する因子であり、循環障害、音響外傷やアミノグリコシド薬剤による内耳障害では、内耳の中で活性酸素が発生することが報告されている。多くの内耳障害に深く関与する因子である。したがって、活性酸素除去能に差があれば内耳障害の回復や内耳障害の後遺症の程度も異なるだろう。

加齢に伴う遺伝子)

TBL-1 遺伝子はショウジョウバエ眼の加齢変化をとらえる過程で感覚器恒常性維持に重要であることがわかっており、哺乳類にも保持されている遺伝子である。
TBL-1 遺伝子トランスジェニックマウスにおいて TBL-1 遺伝子がドミナントネガティブ効果をきたし加齢性難聴をきたすと予想される。

恒常性に関する遺伝子)

Autophagy は発生や加齢変化を含めて細胞死にも関わる因子であり、全身にユビキタスに存在すると考えられる。Autophagy 4, 5 は内耳前庭における耳石発生に関わり、circling behavior(マウスが回転運動を行ってしまう)が認められる。それ以外について

は、現在までのところ、内耳における機能が全く解明されておらず、autophagy 7 についても調べられていない。Autophagy 7 は中枢性障害が発生してしまうため、生後すぐに死亡してしまうため、成獣マウスの臓器を解析することは困難である。そこで内耳特異的に autophagy が欠損したマウスを用いて解析を行うこととした。

3. 研究の方法

下記の各種マウスを用いて ABR(聴性脳幹反応)で聴力の解析と組織学的解析を行った。
OGG(活性酸素)ノックアウトマウス
TBL-1 トランスジェニックマウス
Autophagy7 ノックアウトマウス
上記マウスの homozygous mice と野生型を比較して、遺伝子が与える影響を解析する。組織学的検討は、surface preparation とパラフィン包埋切片にて解析する。
音響外傷は音響ブースに入れて 124dB 2 時間を与えた。
上記の実験すべては慶應義塾大学医学部実験動物委員会の承認や遺伝子組み換え動物実験の承認が得られている。

内耳内視鏡の応用

ご遺体において、われわれが開発した内耳内視鏡を用いて正円窓を観察し、偽膜を処理する方法を開発し、トレーニングを行った。本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て解剖学教室の指導のもと共同研究にて行われた。

4. 研究成果

1)OGGは活性酸素除去が行えないマウス(OGG KOマウス)は野生型マウス(対照群マウス)と比較して、音響外傷になりやすいことが判明した(現在論文準備中)。

2) TBL1遺伝子部分欠損とTBL1遺伝子全長の両者を有するマウスを作成して、ドミナントネガティブ効果を見る予定である。このマウスにおいて比較的強大音響を負荷した後に ABRによる聴力測定をする予定である。

3)オートファジーは細胞死、発生や加齢変化などに関与する。われわれは、オートファジーのサブタイプであるautophagy(atg)7 を内耳特異的に欠損させることにより、感覚細胞である有毛細胞のせん毛が欠損し、ABR上で高度難聴を示すことを発見した。オートファジーが細胞内のカプセル化に関与する因子であるので、せん毛を作成するタンパクを運搬できないなどの問題が生じている可能性があるのではないかと推測している。

現在マウスを増殖させて更なる解析を加える予定である。さらに内耳培養細胞も使用して解析しており、in vivo in vitroで包括的にデータを報告する予定である（なお、内耳培養細胞を用いたautophagyの研究は2010年アメリカ耳鼻咽喉科学会AAOポスター賞を受賞した）。

以上の結果から、活性酸素除去能、オートファジーに代表される維持機構の状態が内耳恒常性維持に関与することがわかった。また、TBL1 遺伝子の機構は不明な点も多いが、分担者である津田博士と継続してショウジョウバエからマウスまで解析していく予定である。

内耳の恒常性には今回調べられた因子以外にも多くの因子が関与していると考えられる。たとえばこれらの遺伝子が複合的に絡み合っているものであり、今後は網羅的にとらえていく必要があるだろう。また、その網羅的に捉えられた遺伝子が環境によってどのようにスイッチが入っていくのか？について考える必要がある。このような知見に基づいてどうやって臨床応用につなげていくかも今後の課題であろう。

内耳障害への鼓室内投与
諸外国のデータ同様に、われわれのデータも偽膜が存在した。

われわれの内視鏡を用いることで偽膜を破ることが可能であった。

- 1) 極細内視鏡の開発：外径 0.5mm の内視鏡を用いて正円窓を観察してみる。画質は劣るが正円窓膜の動きをとらえることが可能であった。ただしこれだけでは処置ができない。
- 2) 内視鏡のチャンネル経由で針付きカテーテルから注入する方法：ワーキングチャンネルをつけた内視鏡を用いると、正円窓膜を観察しながら薬液を注入できる。チャンネルの中にカテーテルを通し、カテーテル先端に 26G 注射針を装着することにより、その針で正円窓膜上結合織を貫通して注入することが可能になる(図)。

確実かつ低侵襲で内耳に薬を到達させるために必要なことは何か？ということを目的に内視鏡を用いて正円窓膜の観察・処置を行うことについて検討する。さらに今回新たに開発した内視鏡による鼓室内投与法について提案した。

基礎研究において、グリア細胞にルシフェリンを発現させるマウスにルシフェラーゼという酵素を鼓室内投与したところ、内耳に存在するグリア細胞（すなわち、らせん神経節内に存在するグリア細胞）にルシフェラーゼ

が到達し、グリア細胞に存在するルシフェリンと酵素反応を生じて蛍光（緑）色に発色することを示した。しかしながら、正円窓膜を閉鎖する処置を行ったマウスについてはルシフェラーゼが到達できず発色できなかった。

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2件)

Kanzaki S, Saito H, Inoue Y, Ogawa K, A new device for delivering drugs into the inner ear: otoendoscope with microcatheter Auris Nasus Larynx in press (2011)(査読有)

— 神崎晶 内視鏡による鼓室内投与法、耳科学会パネルディスカッション「感音難聴は鼓室内注入で治るか」Otolology Japan 21(2), (2011)(査読無)

〔学会発表〕(計2件)

神崎晶 内視鏡による鼓室内投与法、耳科学会パネルディスカッション「感音難聴は鼓室内注入で治るか」日本耳科学会、2010年10月6日、愛媛県松山市ひめぎんホール

Hayashi K, Goto F, Kanzaki S, Ogawa K, The molecular mechanism of autophagy in auditory cells (poster award) Annual Meeting American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery & OTO Expo in Boston, MA, USA September 26 - 29, 2010 (poster award)

〔図書〕(計0件)

〔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)研究代表者

小川 郁 (OGAWA KAORU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00169179

(2)研究分担者

津田 玲生 (TSUDA REO)
国立長寿センター・老化機構研究部・室長
研究者番号：30333355

(2)研究分担者

神崎 晶 (KANZAKI SHO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：50286556

(3)連携研究者

なし