

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791597

研究課題名（和文）アポトーシス制御による人工内耳成績向上・適応拡大に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Basical study for regulation of apoptosis; Aiming to improve the results and to enlarge the application of cochlear implant surgery.

研究代表者

櫻尾 明憲（KASHIO AKINORI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20451809

研究成果の概要（和文）：

ウロキナーゼ(uPA)およびそのレセプター(uPAR)作用・PTD-FNKのアポトーシス抑制作用に着目した。モルモットにおいて蝸牛有毛細胞・らせん神経節などにウロキナーゼ受容体が発現していることを証明した。この結果から蝸牛有毛細胞においてもウロキナーゼがアポトーシス抑制に関与する可能性が示唆された。続いて、ラット培養有毛細胞におけるアポトーシス抑制効果を検討した。その結果ウロキナーゼは濃度依存的にアミノ配糖体(カナマイシン)による有毛細胞のアポトーシスを予防することが分かった。PTD-FNKについてもCaspase-9の発現が抑制されミトコンドリアを介したアポトーシスを抑制することが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) are recently shown to have close relationship to the apoptosis. We demonstrated that uPAR was in the cochlea especially in organ of corti and spiral ganglion, which is indicating that the uPA-uPAR anti-apoptotic system is working in cochlea. Next we demonstrated, using cochlear organotypic cultures of the rat, that uPA attenuates the aminoglycoside induced apoptotic hair cell death in a dose dependent manner. We have also demonstrated that artificial anti-apoptotic protein PTD-FNK attenuates the aminoglycoside induced apoptotic hair cell death by affecting caspase-9 related mitochondrial apoptotic pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：アポトーシス・人工内耳・ウロキナーゼ・タンパク治療

1. 研究開始当初の背景

人工内耳は中途失聴者、および先天性聾患者に対してこれまで一定の成績を上げている非常に有益な治療手段である。しかしながら、

現時点では人工内耳の適応は全周波数で高度の難聴を認める症例に限定されており、罹患人数として圧倒的に多い老人性難聴・高音

急墜型の難聴など一部の領域に残聴がある症例には適応がない。また、中途失聴者で失聴期間が長い場合人工内耳の成績は思わしくないのが現状である。前者の理由の一つに、一般に人工内耳挿入を挿入するとその影響で残聴が失われることがあげられる。もし、残聴を保ち難聴部分のみを人工内耳で補完することができれば、人工内耳の適応は爆発的に拡大する。これに対して近年 Soft surgery の研究が進められ、それに応じた人工内耳の装置も開発されつつある。Soft Surgery のコンセプトは短い電極・細い電極を挿入し蝸牛の機械的損傷を防ぎ、残聴の消失を防ぐというものである。Soft Surgery はある一定の効果を挙げつつあるが、残聴を失う症例も少なくない (Kieder et al. 2004, 2005)。人工内耳動物モデルの研究で人工内耳挿入時、機械的損傷 (組織学的損傷) を皆無にてもその後の経過で有毛細胞のアポトーシスが生じ聴力閾値が上昇するという報告がある (ADRIEN A et al.)。人工内耳挿入による残聴温存のためには Soft Surgery による機械的損傷の予防に加え、その後発生するアポトーシスを制御することも重要であり、その手法の開発は今後耳科領域の治療に大きな変革をもたらす可能性がある。一方後者の理由としては失聴後時間経過とともに、らせん神経節細胞のアポトーシスが進行するためと考えられている。有毛細胞障害動物モデルで時間経過とともに、らせん神経節細胞のアポトーシスが起ることが示されている (Bae WY et al 2008)。中途失聴者に対してらせん神経節細胞のアポトーシスを制御することもまた、人工内耳の成績向上につながる重要な手段と考える。

2. 研究の目的

今回我々はウロキナーゼ、PTD-FNK に着目し、その効果を検討する。ウロキナーゼ (uPA) は血栓溶解剤として臨床応用されているが、ウロキナーゼレセプター (uPAR) に作用後アポトーシスを抑制することが最近の研究で分かっている。PTD-FNK は人工のアポトーシスタンパクでミトコンドリア経路のアポトーシスを抑制すると考えられている。これらを用い実際に各薬剤が蝸牛有毛細胞のアポトーシス抑制につながるかを検証する。

3. 研究の方法

アミノ配糖体による有毛細胞アポトーシスの予防

ラット有毛細胞の培養系を用いカナマイ

シンによるアポトーシスに対してウロキナーゼ・PTD-FNK が予防効果を示すかを検討した。

1. ウロキナーゼ

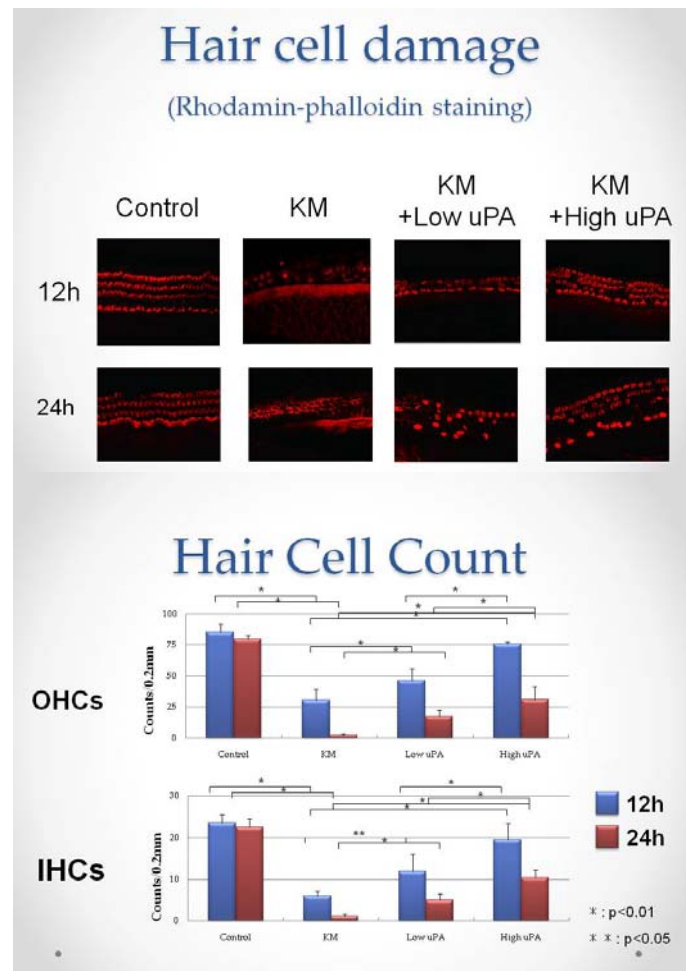
P7 Rat より蝸牛・有毛細胞を摘出、培養した。ウロキナーゼをカナマイシン投与 1 時間前から (20nM もしくは 2uM) の濃度で投与し、その後カナマイシンを投与 (2.6mM) 1 2 時間後もしくは 2 4 時間後での生存有毛細胞数を比較した。

2. PTD-FNK

P5 Rat より蝸牛・有毛細胞を摘出、培養した。PTD-FNK をカナマイシン (2.6mM) 投与 2 時間前に PTD-FNK200 pM 投与しその後カナマイシンを加えた。1 0 時間後における Caspase-9 発現および 1 2 時間後における生存有毛細胞数について比較検討を行った。

4. 研究成果

1. ウロキナーゼ

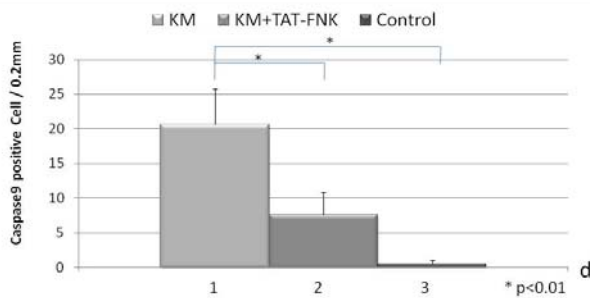
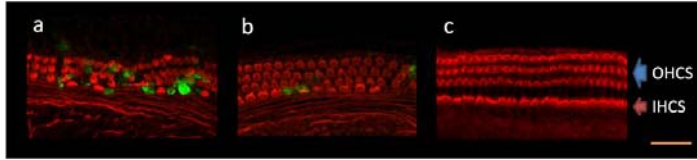


KM 投与後 1 2 時間および 2 4 時間培養における生存細胞数の変化 (OHC: 外有毛細胞、IHC 内有毛細胞)

KM 投与群では 1 2 時間で多くの有毛細胞障害を認め、2 4 時間後にはほとんど有毛細胞

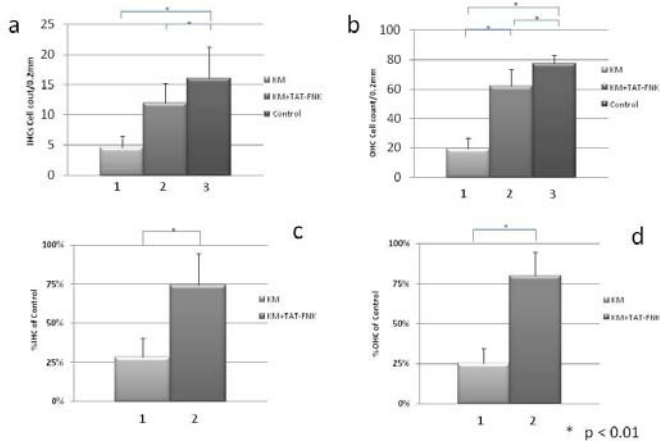
は消失していた。これに対してウロキナーゼを投与した群では障害が抑制された。特に高濃度 (2uM) ウロキナーゼ投与群では24時間後においてもかなりの有毛細胞残存が確認できた。以上よりウロキナーゼはカナマイシンによる有毛細胞アポトーシスを濃度依存的に抑制することが分かった。

2. PTD-FNK



Caspase-9 染色 (緑 a&1:KM 投与群、b&2:KM+PTD-FNK 投与群、c&3: コントロール群)

10時間後の培養で Caspase-9 の染色を行うと KM 投与群では発現が認められるのに対して、PTD-FNK を同時投与した群では殆ど発現がないことが分かった。以上より PTD-FNK は Caspase-9 を介したアポトーシス経路を抑制していることが示唆された。



12時間後における生存細胞 (a: 内有毛細胞、b: 外有毛細胞、1:KM 投与群、2:KM+PTD-FNK 投与群、3: コントロール群)

12時間培養後の生存細胞数の比較ではカナマイシン投与群では内有毛細胞・外有毛細胞ともにコントロール比約25%となるのに対してPTD-FNK同時投与群では約75%の有毛細胞生存が確認できた。以上よりPTD-FNKはアミノ配糖体KMにおける細胞死を有意に抑制することが分かった。

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 12 件)

1. Kashio A, Ito K, Kakigi A, Karino S, Iwasaki S, Sakamoto T, Yasui T, Suzuki M, Yamasoba T. Carhart's notch, a 2kHz bone conduction threshold dip, is not a definitive predictor of stapes fixation in conductive hearing loss accompanied with a normal ear drum. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 137(3):236-40, 2011 (査読あり)
2. Suzuki M, Goto T, Kashio A, Yasui T, Sakamoto T, Ito K, Yamasoba T. Preservation of vestibular function after scala vestibuli cochlear implantation. Auris Nasus Larynx. 38(5):638-42, 2011 (査読あり)
3. Sakamoto T, Kakigi A, Kashio A, Kanaya K, Suzuki M, Yamasoba T. Evaluation of the Carhart effect in congenital middle ear malformation with both an intact external ear canal and a mobile stapes footplate. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 73(2):61-7, 2011 (査読あり)
4. Lin Y, Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Kakigi A, Yamasoba T. Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. Neurosci Lett 487(1):12-6, 2011 (査読あり)

5. Kagoya R, Ito K, Kashio A, Karino S, Yamasoba T. Dislocation of stapes with footplate fracture caused by indirect trauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 119(9):628-30, 2010 (査読あり)
6. Suzuki M, Kashio A, Sakamoto T, Yamasoba T. Effect of Burow's solution on the guinea pig inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 119(7):495-500, 2010 (査読あり)
7. Sakamoto T, Sugimoto M, Kakigi A, Iwamura H, Kashio A, Suzuki M, Yamasoba T A spontaneous true aneurysm of the superficial temporal artery treated by surgical resection. *Auris Nasus Larynx.* 2010 Jun 22. (査読あり)
8. Kawamura S, Sakamoto T, Kashio A, Kakigi A, Ito K, Suzuki M, Yamasoba T. Cochlear implantation in a patient with atypical Cogan's syndrome complicated with hypertrophic cranial pachymeningitis. *Auris Nasus Larynx.* 2010 Jun 22. (査読あり)
9. Sakamoto T, Iwamura H, Kashio A, Ito K, Kaga K, Suzuki M, Yamasoba T. Comparison of hearing improvement and complications after stapes surgery with and without potassium titanil phosphate laser for manipulation of the foot plate. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 72(1):16-21, 2010. (査読あり)
10. Kashio A, Amano A, Kondo Y, Sakamoto T, Iwamura H, Suzuki M, Ishigami A, Yamasoba T. Effect of vitamin C depletion on age-related hearing loss in SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 18;390(3):394-8. Epub 2009 Sep 4. (査読あり)
11. Chihara Y, Iwasaki S, Ushio M, Fujimoto C, Kashio A, Kondo K, Ito K, Asakage T, Yamasoba T, Kaga K, Murofushi T. Ocular vestibular-evoked myogenic potentials (oVEMPs) require extraocular muscles but not facial or cochlear nerve activity. *Clin Neurophysiol.* 2009 Mar;120(3):581-7. (査読あり)
12. Kashio A, Ogata E, Akamatsu Y, Ito K, Kaga K, Yamasoba T Cochlear implantation in children with inner ear malformations : Proceedings of the 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences - APSCI on press. (査読なし)
- [学会発表] (計2件)
1. Urokinase-type plasminogen activator attenuates hair cell damage induced by aminoglycoside. ARO 2011 Baltimore
2. Round Window administration of TAT-FNK protein, a Bcl-XL derivative, immersed in gelatin sponge prevents aminoglycoside-induced cochlear damage ARO 2010 Los Angeles
- [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◇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

榎尾 明憲 (KASHIO AKINORI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 20451809

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：