

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592547

研究課題名(和文)メタボロミクスによる音響外傷性難聴の病態解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Metabolomic profiling in inner ear fluid by gas chromatography-mass

## 研究代表者

長谷川 信吾 (HASEGAWA, SHINGO)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30444607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回用いたメタボロミクス解析という手法により、内耳リンパ液内の代謝産物を網羅的に初めて測定することができた。これらの代謝産物は、遺伝子やタンパク質と異なり、種特異性が無い点が特長である。そのため音響などの難聴モデル動物を作成して、内耳における代謝の変化を観察することは、ヒトでの難聴発生メカニズムや、治療法開発に直接繋がるのが期待される。具体的には今回の手法を応用して、難聴モデル動物の内耳リンパ液内で増加している代謝物の経路をブロック、あるいは減少している物質を補充するといった方法で、難聴メカニズムの解明や治療法開発を目指して今後は研究を進めていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The composition and homeostasis of the inner ear fluids are important for hearing function. This study is for the first time to perform metabolome analysis of the inner ear fluid in guinea pigs cochlea using gas-chromatography/mass-spectrometry (GC/MS). Seventy-seven kinds of metabolites were detected in the inner ear fluid. Six metabolites; ascorbic acid, fructose, galactosamine, inositol, pyruvate + oxalacetic acid and meso-erythritol were significantly more abundant and nine metabolites; phosphate, valine, glycine, glycerol, ornithine, glucose, citric acid + isocitric acid, mannose and trans-4-Hydroxy-L-proline were less frequent in the inner ear fluid than in plasma. The level of ten metabolites; 3-Hydroxy-Butyrate, glycerol, fumaric acid, galactosamine, pyruvate + oxalacetic acid, phosphate, meso-erythritol, citric acid + isocitric acid, mannose and inositol in the inner ear fluid significantly changed after loud noise exposure.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳 細胞死 再生

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 内耳外リンパ液はラセン神経節を初めとして、蝸牛内で音が伝達するほぼ全ての組織に接している。そのため蝸牛が障害を受けるとアポトーシスやネクローシスの過程で分泌・消費される物質の影響が、血液や髄液などの他の体液中よりも、反映されやすいと考えられている。

(2) 外リンパ液中の組成については以前から検討されており、古くは聴神経腫瘍ではリンパ液中のタンパク濃度が高いという報告があり、また単一の化合物やアミノ酸のみについて測定した報告も散見される。

(3) 近年、分析機器の発達により、膨大な情報を解析するオミクス研究が発展している。ゲノム情報を解析するゲノミクス、タンパクを解析するプロテオミクス、そして代謝物を解析するメタボロミクスを総称してオミクス研究と呼ばれている。プロテオミクスの成果として、外リンパ液中のタンパクを網羅的に解析し、外リンパ液に特異的な物質として Cochlin タンパクが報告されている。

(4) 生体内の活動をタンパクよりもダイレクトに反映するとされる、有機酸や脂肪酸などの代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスが近年、生命科学分野で注目されており、新たな腫瘍マーカーの探索などに用いられている。

(5) 内耳外リンパ液の代謝物組成を調べ、さらに障害された蝸牛における外リンパ液中の代謝物の変化を研究することは、難聴のメカニズム解明から予防、治療へとつながると期待される。しかしこれまでにメタボロミクスの手法を用いて内耳リンパ液を解析した研究は報告されていない。

### 2. 研究の目的

代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスの手法を用いて内耳外リンパ液中の代謝物の組成を調べることで難聴のメカニズムを解明し、その予防や治療法を探る。

(1) ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)を用いて、モルモット内耳外リンパ液中の水溶性および脂溶性代謝物を網羅的に解析し、血液や髄液との組成の違いを検討し、特徴を明らかにする。

(2) この結果を基に、モルモット内耳に音響を加えて感音難聴モデルを作成し、その外リンパ液中の代謝物の変化を測定、分析することで内耳保護や感音難聴の治療法の開発に結びつける。

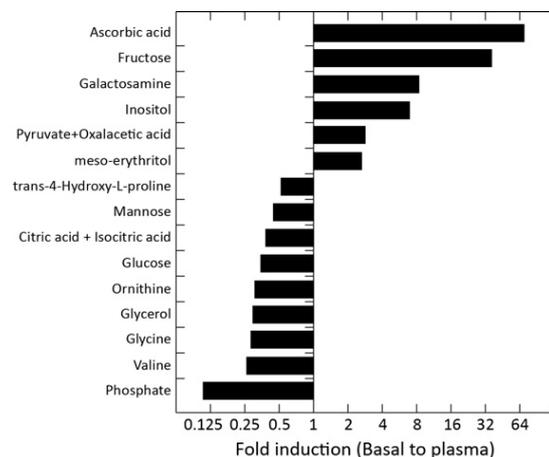
### 3. 研究の方法

(1) モルモット(ハートレー系、オス: 250-300g)を用いた。まずモルモットを深麻酔下に断頭し、蝸牛を摘出した。その際に同時に血液も採取した。次に顕微鏡下に正円窓・卵円窓からマイクロピペットを用いて、内耳リンパ液を採取した(1匹2耳より約5-10µl)。採取した内耳リンパ液および血漿から水溶性代謝物を抽出し、フリーズドライ、誘導体化の過程を経て、最後にガスクロマトグラフィー質量分析装置(GCMS-QP2010)にて代謝物を測定した。得られたデータは主成分分析にて内耳リンパ液に特異的な代謝物を検討した。

(2) 次にモルモットに4kHz、126B SPLのオクターブバンドノイズを2時間加えることにより不可逆的な難聴モデルを作成した。音響暴露直後と24時間後の各タイムポイントで内耳リンパ液を採取し、質量分析装置にて代謝物を測定した。

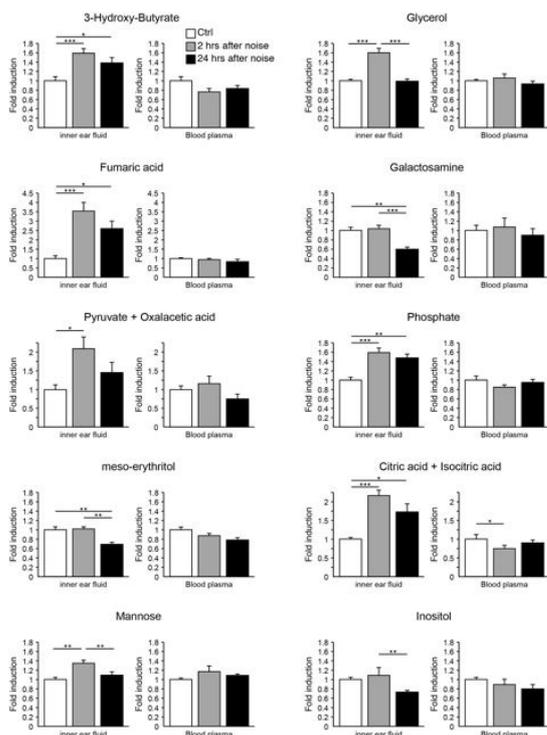
### 4. 研究成果

(1) 主成分の分析の結果から内耳リンパ液中に水溶性代謝物が合計77種検出された。このうち、アスコルビン酸やイノシトールなど血漿中と比較してリンパ液中に有意に多く認められる代謝産物や、パリンやリン酸など血漿中よりリンパ液中に有意に少ない物質もみられた。具体的には血漿中より有意に多かった代謝産物は ascorbic acid, fructose, galactosamine, inositol, pyruvate + oxalacetic acid, meso-erythritol の6種類であった。一方、血漿中より有意に少なかった代謝産物は phosphate, valine, glycine, glycerol, ornithine, glucose, citric acid + isocitric acid, mannose, trans-4-Hydroxy-L-proline の9種類であった。



(2) グリセロールなどの合計10種の代謝産物において、血漿と比べて有意に音響負荷による変化がみられた。具体的には

3-Hydroxy-Butyrate, glycerol, fumaric acid, galactosamine, pyruvate + oxalacetic acid, phosphate, meso-erythritol, citric acid + isocitric acid, mannose, inositol の 10 種類であった。



当初の予定通り、内耳リンパ液中と血漿中の代謝物の比較や強大音負荷後の内耳リンパ液中の代謝物の変化を測定することにより内耳リンパ液に特異的な代謝物や音響外傷に関連する代謝物を検出することが出来た。ただし、今回用いた水溶性代謝物を測定するメタボローム解析の手法は、予想よりも個体差や測定状況によりデータのバラつきも大きくみられた。そのため、使用する動物個体数を増やしてデータの信頼性を上げることにしたため、金銭的および時間的に当初の研究計画内容の全てを行うことはできなかった。

今回用いたメタボロミクス解析という手法により、内耳リンパ液内の代謝産物を網羅的に初めて測定することができた。これらの代謝産物は、遺伝子やタンパク質と異なり、種特異性が無い点が特長である。そのため音響などの難聴モデル動物を作成して、内耳における代謝の変化を観察することは、ヒトでの難聴発生メカニズムや、治療法開発に直接繋がることが期待される。具体的には今回の手法を応用して、難聴モデル動物の内耳リンパ液内で増加している代謝物の経路をブロック、あるいは減少している物質を補充するといった方法で、難聴メカニズムの解明や治療法開発を目指して今後は研究を進めていき

たいと考えている。

この手法を用いることで、直接内耳リンパ液内での代謝物の変化を調べ、統計学的に検討することが可能になると考える。また音響外傷モデル動物における、内耳障害後のリンパ液中の代謝物の変化を探ることにより Metabolic pathway から内耳障害におけるメカニズム解明につながるのではないかと考えている。さらに治療薬開発への応用も可能と考える。

## 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)

[学会発表](計 5 件)

(1) "Metabolome Analysis of Inner Ear Fluid in Guinea Pigs Cochlea After Intense Noise", Daisuke Yamashita; Yuriko Fukuda; Takeshi Fujita; Hitomi Shinomiya; Go Inokuchi; Shingo Hasegawa; Naoki Otsuki; Ken-ichi Nibu 37th ARO Mid Winter Meeting 2014 2.22 - 2.26 San Diego, CA, USA

(2) 「内耳リンパ液におけるメタボローム解析」山下 大介 第 6 回内耳研究会 2013 年 3 月 16 日 神戸大学

(3) "Metabolome Analysis of Inner Ear Fluid in Guinea Pigs Cochlea" Daisuke Yamashita, Takeshi Fujita, Yuriko Hashimoto, Hitomi Shinomiya, Shingo Hasegawa, Ken-ichi Nibu 36th ARO 2013 2.16 - 2.23 Mid Winter Meeting Baltimore, MA, USA

(4) 「内耳リンパ液におけるメタボローム解析」山下 大介, 藤田 岳, 長谷川 信吾, 丹生健一 第 22 回日本耳科学会総会 2012 年 10 月 4 日～6 日 名古屋国際会議場

(5) 「内耳外リンパ液のメタボロミクス」藤田 岳, 山下 大介, 松田淳子, 勝沼紗矢香, 長谷川 信吾, 谷本均, 入野康宏, 吉田優, 丹生健一 第 3 回臨床メタボロミクス研究会 2011 年 10 月 25 日 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 信吾 (HASEGAWA Shingo)  
神戸大学医学部附属病院・講師  
研究者番号：30444607

### (2) 研究分担者

山下 大介 (YAMASHITA Daisuke)  
神戸大学医学部附属病院・特命准教授  
研究者番号：60306785

藤田 岳 (FUJITA Takeshi)  
神戸大学医学部附属病院・助教  
研究者番号：90533711

(3)連携研究者

吉田 優 (YOSHIDA Masaru)  
神戸大学質量分析センター