

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861564

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞を用いた内耳保護候補薬物のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening for a protective effect in cochlear hair cells using candidate drugs in the zebrafish lateral line

研究代表者

廣瀬 敬信 (HIROSE, Yoshinobu)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80555714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：側線器有毛細胞の障害モデルで、内耳保護候補薬物をスクリーニングし、内耳保護薬物を同定する実験を行った。サプリメント18種類・漢方薬8種類のスクリーニングを行い、サプリメント類3種類、また漢方薬は全てに保護効果を認めた。抗酸化実験から、スクリーニングされた薬物の保護作用は抗酸化作用によるものと考えられた。更にモルモットを用いた強大音による聴覚障害モデルを用いて実験を行ったところ、有意に聴覚の保護を認めた。このことから、スクリーニングされた薬物は聴覚、平衡覚を保護すると考えられる。これらの薬物は、難聴、平衡障害などに対する薬物予防治療へとつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the protective effect of 18 supplements, and 8 herbal medicine against hair cell degeneration induced by neomycin using zebrafish lateral hair cells damage model. We found that 3 supplements and all of 8 herbal medicine protects sensory hair cells against neomycin-induced death in zebrafish lateral cell lines. In addition, we confirmed the protective effect of screened drugs against noise-induced hearing loss in guinea pigs. These results show that screened drugs can be useful as a protective drug in the inner ear.

研究分野：内耳基礎研究

キーワード：ゼブラフィッシュ 側線器有毛細胞 内耳障害 内耳保護

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な内耳へのストレス(強大音、加齢、薬剤)によって引き起こされる難聴(騒音性難聴、加齢性難聴、薬剤性難聴)や平衡障害等の内耳有毛細胞障害は、補聴器、人工内耳などの治療を必要とし、患者の QOL を低下させる要因となる。しかし、内耳感覚細胞である有毛細胞は一度障害されると再生しないため、このような障害に対する治療は確立されておらず、予防治療が大切となる。特にサプリメント類や、市販されている漢方薬などの内服治療を確立できれば、医療費の増大無しに予防治療を行う事ができる。

(2) ゼブラフィッシュの体表面には水流を感知する側線器有毛細胞があり構造的に内耳と酷似している。また、アミノグリコシド等内耳毒性薬物がゼブラフィッシュの有毛細胞を障害するなど、生理学的にも似ていることから、内耳有毛細胞のモデルとして側線器有毛細胞を用いて、薬物の有毛細胞保護効果をみる事ができる。

2. 研究の目的

(1) ゼブラフィッシュ稚魚の側線器有毛細胞障害モデルを用いて、サプリメント類や漢方薬を中心とした多種多数の内耳有毛細胞を保護し得る薬剤をスクリーニングする。マウスやラット等のげっ歯類を用いれば、解剖が必要になるため数年に及ぶ実験となるが、ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞は、可視化が極めて容易であるため短期間で行える。今まで不可能であったスクリーニングを、ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞障害モデルで薬剤を同定する事で、加齢性難聴、騒音性難聴、薬剤性難聴、平衡障害に代表される様々な内耳障害に対する薬物予防治療を確立し、臨床応用へとつなげる。

(2) スクリーニングによって同定された薬物の内耳保護効果のメカニズムを明らかにする。

(3) スクリーニングにて同定された薬物をげっ歯類を用いた有毛細胞障害モデルで確認する。具体的には、マウスを用いて Neomycin による卵形嚢有毛細胞障害モデルやモルモットを用いた内耳有毛細胞障害モデルを用いる。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング方法

ゼブラフィッシュ稚魚を用いて、内耳保護候補薬物のスクリーニングを行う。有毛細胞障害モデルとして内耳障害物質である Neomycin を用いる。対象群は Neomycin のみ投与、内耳保護候補薬物群は薬物を 1-1000 μM 濃度、1 時間で暴露した後、Neomycin で障害する。固定後、有毛細胞のマーカーである抗 parvalbumin 抗体を用い、蛍光顕微

鏡下で有毛細胞を数え、容量反応曲線を作成、統計学的に評価する。

サプリメント 18 種類のスクリーニング sigma から購入することのできるサプリメント類を用いた。

漢方 8 種類のスクリーニング
抗酸化作用、抗炎症作用、ステロイド作用のある漢方薬を用いた。

(2) メカニズム (抗酸化実験)

生後 5 日目のゼブラフィッシュを用い、 H_2DCF (酸化ストレスマーカー) を用いた。

サプリメント類

Control 群: 溶媒のみ、Neomycin 群: 溶媒 + Neomycin 200 μM 、Quercetin + Neomycin 群: Quercetin 100 μM + Neomycin 200 μM の 3 群に分けた。

漢方類

Control 群: 溶媒のみ、Neomycin 群: 溶媒 + Neomycin 200 μM 、四物湯 + Neomycin 群: 四物湯 1 mg/ml + Neomycin 200 μM の 3 群に分けた。

(3) げっ歯類での評価

サプリメント類の評価

プライエル反射正常なハートレイ系モルモット (350-400 g) を用い、Quercetin 群 (n=4): Quercetin を 100 mg/kg を 3 日前から音響障害後 3 日後まで 1 回/day で腹腔内投与、対照群 (n=4): Quercetin と同量の溶媒を同様に腹腔内投与に分けて評価を行った。音響負荷は 4 kHz 中心のオクターブバンドノイズ、130 dB SPL、3 時間を用いた。1 週間後に聴力閾値、外有毛細胞数の評価を行った。

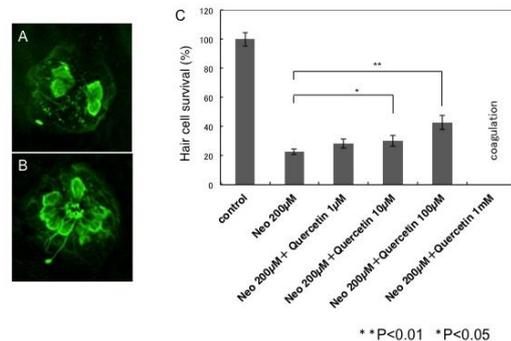
漢方類の評価

培養卵形嚢 (CBA/N マウス) を用いて

Control 群: 溶媒のみ、Neomycin 群: 溶媒 + Neomycin 2 mM、四物湯 + Neomycin 群: 四物湯 1 mg/ml + Neomycin 2 mM の 3 群に分けて評価を行った。

4. 研究成果

(1) サプリメント類



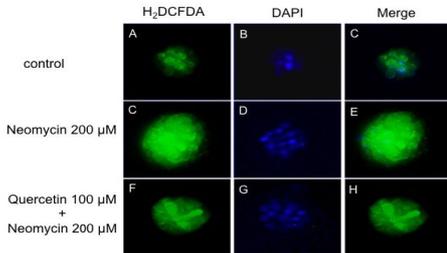
スクリーニング結果
上図はスクリーニング例を示す。Neomycin に

より有毛細胞が障害・消失している一方、Quercetin 群では Neomycin 単独に比べ、有毛細胞が残存している。それを基に容量反応曲線を作成、100 µg/ml, 1000µg/ml で有意に有毛細胞が残存していた。

Drug	0 µM	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM
Bilobalide	15.9±2.9	13.5±2.0	15.8±3.4	16.3±1.3	coagulation
Caffeic acid	25.3±2.8	26.1±2.8	26.8±3.9	20.1±2.6	coagulation
Catechin	15.9±2.9	17.4±2.3	12.5±3.0	16.8±2.3	33.4±4.7
Coenzyme Q10	25.3±2.8	31.5±1.9	28.2±2.2	29±2.2	coagulation
Coumarin	22.5±2.0	29.6±4.3	25.9±2.1	24.6±2.7	coagulation
Ellagic acid	25.3±2.8	26.3±2.5	28.0±2.1	coagulation	coagulation
Ginkgolide B	25.3±2.8	24.0±3.7	25.1±3.4	22.8±2.9	coagulation
Glycyth	22.5±2.0	22.5±1.6	23±2	25.5±2.9	coagulation
L-Ascorbic acid	15.9±2.9	19.1±3.8	20±2.3	18.2±2.6	19.7±2.1
Paeoniflorin	15.9±2.9	18.5±3.8	18.6±3.2	18.5±3.5	coagulation
Pyroloquinoline quinone	22.5±2.0	26.7±2.5	22.3±2.0	24.2±2.8	coagulation
Quercetin	22.5±2.0	28.4±3.2	30.1±3.8	42.8±4.9	coagulation
Riboflavin	15.9±2.9	18.2±3.4	19.5±2.0	20.3±2.7	coagulation
Rutin	25.3±2.8	21.4±2.1	20.1±2.1	22.1±2.7	coagulation
Secoisolaricresinol	25.3±2.8	24.6±2.6	25.1±3.3	20.1±2.6	coagulation
Tannic acid	25.3±2.8	38.6±3.3	53±4.7	coagulation	coagulation
Vitamin E	15.9±2.9	22.3±4.0	coagulation	coagulation	coagulation
Xanthohumol	15.9±2.9	16.4±3.0	coagulation	coagulation	coagulation

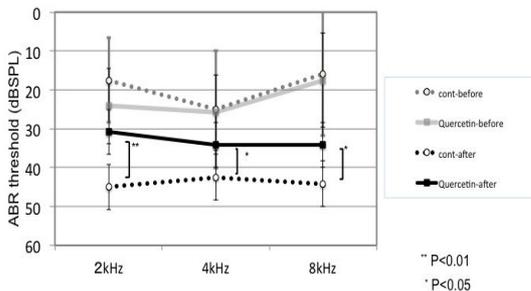
上図はサプリメント 18 種類の有毛細胞残存率 (%) を示す。3 種類のサプリメントで有意に有毛細胞が保護されていた。

抗酸化実験

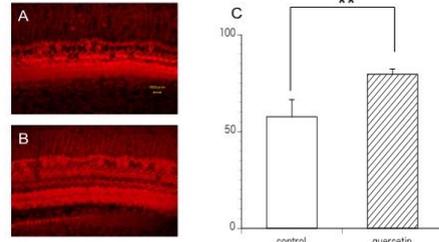


Control 群では酸化ストレスマーカーである H2DCF がほとんど染まっていないが、Neomycin 200µM を加えると強く染まっている (上図参照)。Quercetin を加えた後に Neomycin を投与した群では Neomycin 群に比べ、染色が減弱していた。このことから、Quercetin は Neomycin による酸化ストレスを減弱したと考えられた。

げっ歯類での評価

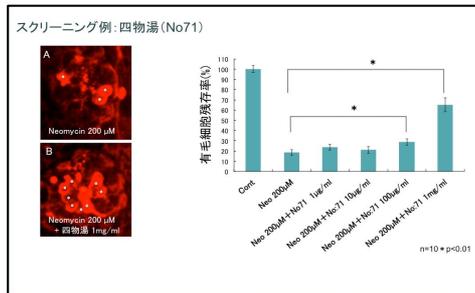


上図は音響障害前後のコントロール群と Quercetin 群の ABR 閾値を示す。音響障害後、Quercetin はコントロール群にくらべ、閾値上昇が有意に抑制された。側線器障害モデルで保護効果のあった薬物は、げっ歯類の内耳でも有効であった。



上図は外有毛細胞の有毛細胞欠損率を示す。音響障害後、Quercetin 群はコントロール群にくらべ、有意に有毛細胞欠損が少なかった。

(2) 漢方類 スクリーニング結果

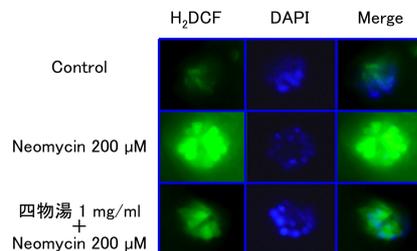


上図はスクリーニング例を示す。Neomycin により有毛細胞が障害・消失している一方、四物湯を加えた群では、Neomycin 単独に比べ、有毛細胞が残存している。それを基に容量反応曲線を作成、100 µg/ml, 1000µg/ml で有意に有毛細胞が残存していた。

Drug	0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml
小柴胡湯	22.4±1.8	17.9±2.6	16.4±3.4	24.7±4.1	40.1±5.2 **
黄连解毒湯	22.4±1.8	25.4±4.6	24.9±4.4	28.2±4.8	38.0±4.5 **
当帰芍薬散	22.4±1.8	21.4±3.4	19.6±3.5	22.2±2.8	36.0±2.4 **
四逆散	22.4±1.8	28.2±3.3	28±2.6	30.5±3.5 *	41.1±3.7 **
補中益気湯	18.5±2.7	15.7±3.0	23±7.0	20.1±3.5	36.4±3.5 **
十全大補湯	18.5±2.7	16.6±2.1	11.9±3.3	24.5±2.2 *	34.7±3.5 **
温清飲	18.5±2.7	14.5±2.6	17.7±3.9	26.3±5.6	61.3±6.8 **
四物湯	18.5±2.7	23.6±2.6	21±3.3	28.7±3.1 **	65.1±6.7 **

上図は漢方 8 種類の有毛細胞残存率 (%) を示す。1000 µg/ml では全ての漢方薬で有意に残存有毛細胞数が多かった。また、四逆散、十全大補湯、四物湯では 100 µg/ml でも残存有毛数が有意に多かった。

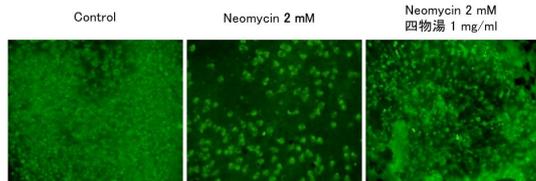
抗酸化実験



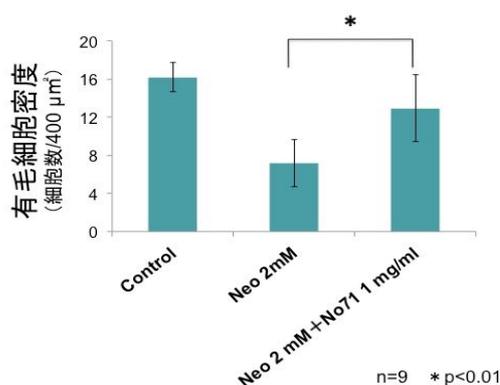
四物湯を加えた後に Neomycin を投与した群では Neomycin 群に比べ、染色が減弱していた (上図参照)。このことから、四物湯は

Neomycin による酸化ストレスを減弱したと考えられた。

げっ歯類での評価



Control 群では有毛細胞が良く染まっている。Neomycin にて有毛細胞死を誘導すると、有毛細胞が消失している。四物湯を加えた群では有毛細胞が残存している（上図参照）。



上図は有毛細胞の細胞密度を示す。Neomycin で有毛細胞が障害されるが、四物湯と Neomycin を投与した群では有意に有毛細胞密度が多かった。ゼブラフィッシュの側線器障害モデルで保護効果のあった薬物は、げっ歯類の内耳有毛細胞でも有効であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

広瀬敬信、菅原一真、山下裕司 げっ歯類を用いた漢方薬の内耳保護効果 -zebrafish 側線器有毛細胞障害モデルのスクリーニング結果から-
第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会

2016 年 05 月 19 日

名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Hiroshi Yamashita
Protective effect in herbal medicine “Shimotsuto” using the zebrafish lateral line and CBA/N mice vestibular hair cells
39th Association for Research in Otolaryngology Annual MidWinter Meeting
2016 年 02 月 21 日

サンフランシスコ（米国）

広瀬敬信、菅原一真、山下裕司

モルモットを用いた音響障害に対する四物湯の内耳保護効果-ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞障害モデルのスクリーニング結果から-

第 31 回 日本耳鼻咽喉科漢方研究会 学術集会

2015 年 10 月 24 日

グランドセントラルタワー3階(東京都港区)

広瀬敬信、菅原一真、山下裕司

げっ歯類を用いた四物湯の内耳保護効果 -zebrafish 側線器有毛細胞障害モデルのスクリーニング結果から-

第 25 回 日本耳科学会総会・学術講演会

2015 年 10 月 07 日

長崎ブリックホール（長崎県長崎市）

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣瀬 敬信 (HIROSE, Yoshinobu)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 8 0 5 5 5 7 1 4

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし