

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04992

研究課題名(和文) 新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスによる蝸牛イムノバイオロジーの新展開

研究課題名(英文) Immunobiology in the cochlea: an analyses with a novel autoimmune transgenic mouse

研究代表者

小川 郁(Ogawa, Kaoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：00169179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：当研究では自己免疫発症の実態である免疫寛容の破綻に焦点を当て、発生工学を駆使して新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウス(Tg)モデルを樹立し解析している。内耳有毛細胞に外来抗原HAを強制発現するMath-HAを樹立し、さらにこのHA抗原を特異的に認識するCD4+ T細胞、CD8+T細胞を有するTg(6.5TCR, CL4-TCR)と交配させたところ、前者との二重Tgは一側性低音障害から始まる変動性進行性感音難聴を、後者との二重Tgは緩徐進行性両側性高音障害型難聴を呈した。また前者の一部に、難聴の進行に伴って姿勢障害、歩行障害を呈する個体が現れ、組織学的には内リンパ水腫を呈していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on the immune tolerance and intolerance in the cochlea, which is the actual condition of autoimmune onset. We established a novel autoimmune hearing loss model by generating Math-HA transgenic mouse (Tg) carrying a foreign antigen HA specifically in the inner ear hair cells and crossed with T-cell Tgs (6.5 TCR, CL4-TCR) harboring CD4+ and CD8+ T cells which specifically recognize this HA antigen, respectively. Double Tg with the former exhibited fluctuating progressive sensory hearing loss starting with unilateral low-tone dominant deafness, and the double Tg with latter exhibited slow progressive bilateral high-frequency dominant hearing loss. In addition, part of the former double Tgs displayed postural disorder and gait disturbance as the hearing loss progresses, with the endolymphatic hydrops observed in the cochlear sections.

研究分野：耳科学

キーワード：免疫学 耳科学 自己免疫 難聴 橋渡し研究 前庭障害

1. 研究開始当初の背景

当研究室ではこれまで、年間受療者数 35,000 人を数える急性高度難聴や両側変動性のステロイド依存性難聴(全身型、局所型)の原因と考えられている、自己免疫が関与した内耳性難聴に焦点を当て、自己免疫=免疫寛容の破綻を原因とする難聴モデル遺伝子改変動物の解析をしてきた。自己免疫性内耳炎・難聴は、臨床的にステロイド剤に効果があることや末梢血における炎症反応関連バイオマーカーの上昇、HLA 型の SNP と難聴の相関などを根拠に提唱されてきた古くも新しい疾患概念である。しかしながら自己免疫=免疫寛容の破綻と感音難聴の因果関係を prospective に免疫学的手法で直接証明する試みは依然乏しく、動物実験レベルの検討も、内耳組織の抗体産生能(Harris JP ら)や、自己抗原の同定(CTL2: Nair S, 2004 など複数)、内耳ペプチド摂取リンパ球による難聴誘導(Solares, 2004)など、内耳組織は必ずしも免疫系に隔絶されてはいないことを示す状況証拠の蓄積であった。この状況において我々は個体遺伝子操作により内耳免疫研究に本格的な免疫学を導入する、初の自己免疫難聴モデルトランスジェニックマウス(Math-HA)を樹立し、解析してきた。

2. 研究の目的

内耳性難聴の原因のひとつに古くから自己免疫の関与が考えられており、自己抗体や標的タンパクの同定を中心に国内外で多くの基礎・臨床的検討がされてきた。当研究室では自己免疫発症の実体である免疫寛容の破綻に焦点を当て発生工学を駆使した新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルを樹立し、自己免疫発動と感音難聴の因果関係を prospective に免疫学的手法で直接証明し、さらにその治療法を探索することを究極的な目的としてきた。

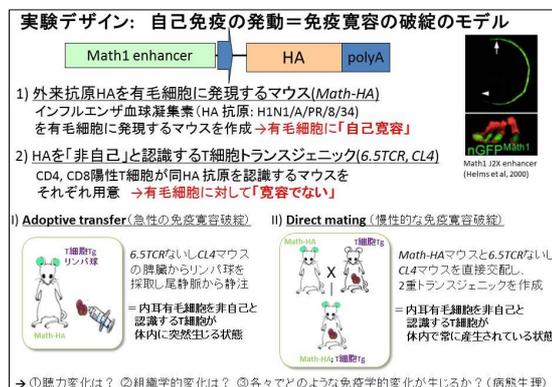
本研究課題では、上述の新規自己免疫性難聴モデルマウスにおける病態生理の詳細な解析を行い、新規治療標的や治療薬候補を探索・検討し、検証することを目的とした。

3. 研究の方法

内耳有毛細胞のマスター遺伝子である Math1 遺伝子の有毛細胞特異的エンハンサー(J2X-enhancer: Helms 2000)による発現調節下で、内耳感覚上皮特異的に外来抗原を発現するトランスジェニックマウス(Math-HA)を作成した。この外来抗原(HA 抗原)強制発現系は I 型糖尿病や炎症性腸疾患が自己免疫疾患であることを証明してきた実績がある。Math-HA マウス自身においては、HA 抗原陽性の有毛細胞は「自己」と認識(=免疫寛容)されるが、この個体に対して同抗原を「非自己」と認識する“遺伝子改変 T 細胞”を移

入すると、自己免疫性 T 細胞が HA を「非自己」と認識する。すなわち内耳有毛細胞に対する自己攻撃性 T 細胞が出現する状態が作り出されることになり、「有毛細胞に対する免疫寛容の破綻」が個体レベルで再現されるモデルが作成されることになる。

HA 抗原を特異的に認識する遺伝子改変 TCR を CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞に強制発現するトランスジェニックマウス(6.5TCR, CL4TCR マウス)をそれぞれ導入し、ヘルパー T 細胞による自己免疫性難聴と、キラー T 細胞による自己免疫性難聴の 2 種を作成した。さらに各々について、T 細胞を静注で移入することによる急性の免疫寛容破綻モデルと、両者を交配して局所寛容を観察する慢性の免疫寛容破綻モデルを樹立した。この 2 x 2 = 4 種類につき観察をした。本研究課題では特に CD4 陽性 T 細胞による慢性の自己免疫モデルを詳細に検討した。



4. 研究成果

(1) マウス作成

Carlson 博士(UCLA, Scripps 研究所)より供与を受けたインフルエンザ血球凝集素遺伝子 HA (H1N1, A/PR/8/34) を内耳感覚上皮特異的に発現するように外挿遺伝子を国内で作製し、Wu 博士(ハーバード大)の協力でトランスジェニックマウス 30 系統を作製した。共同研究先のハーバード大学において、その中で発現量が多く安定している 2 系統を選別した後に、戻し交配で T 細胞遺伝子改変マウスと同じ CD1 系統へと遺伝学的背景を揃えた。HA 抗原を「非自己」と認識する T 細胞トランスジェニックマウスとして、HA 抗原特異的 TCR を CD4 陽性 T 細胞に発現する 6.5TCR マウスを、von Boehmer 博士(ハーバード大)から供与を受けた。これらを用い Edge 研究室で CL4TCR から Math-HA に T 細胞を移入して難聴発症を確認し、今回作製した Math-HA において実際に外挿抗原が機能することを確認した上で、国内へ輸送し、(株)日本クレアにて微生物学的クリーンアップし、慶大で繁殖した。

(2) T 細胞トランスジェニックとの直接交配

による慢性自己免疫性難聴モデルの樹立

Math-HAと6.5-TCRと交配し、CD4陽性T細胞が内耳有毛細胞を常に非自己と認識するマウスを作成、検討した。本システムでは進行性の両側感音難聴が観察された。興味深いことにその過程ではまず低音に一側性の変動性難聴（左右は固定しない）を各個体で認め、徐々に中高音へ難聴が広がっていた。5週齢より同腹対照群と比べて統計学的に有意な難聴を認め、これは前身の研究で観察していたCD8陽性T細胞の自己免疫モデルと比して早かった。ヘルパーT細胞など（CD4+T細胞）の有毛細胞に対する局所免疫の破綻は、低音部の変動性感音難聴を契機とし、経過で高音部へ移行する内耳性難聴を起こすことが示された。

この聴力像は日常臨床で我々がしばしば遭遇する内リンパ水腫による内耳性難聴と酷似している。そこで本個体についてその表現形を長期的に追ったところ、難聴の進行に伴い、姿勢障害、歩行障害を呈する個体が現れ、本モデルマウスにおける前庭機能障害の合併が示唆された。そこで組織学的に検討したところ、変動性難聴が頻繁に観察される生後半年前後の個体において蝸牛正中階体積が増加する（組織学的）内リンパ水腫が確認されたが、極めて興味深いことに生後1年を超えた高齢マウスではこの表現形は消失し、代わりに同腹対照群と比較して著しいらせん神経節および蝸牛軸内の蝸牛神経の脱落を認めた。この神経脱落の所見は前庭でも認められた。両者ともにこれらの表現形と比較して有毛細胞の脱落は比較的軽度であった。

以上よりCD4陽性T細胞による内耳有毛細胞への免疫寛容の破綻は、形態学的にも電気生理による行動生理学的にも内リンパ水腫を呈し、その表現形はヒトでいうメニエール病と酷似していた。その病態においては変動性内リンパ水腫が原因として強く示唆されるものの、高齢マウスにおける前庭障害や高音部への難聴進行は、感覚上皮や水腫というよりは、内耳感覚上皮のすぐ傍に位置する1次ニューロンの遅発性脱落によるものと考えられた。臨床的内リンパ水腫の長期例における難聴進行を抑制するには、神経保護が治療標的と考えられ、今後の検討課題となった。

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1件）

Fujimoto C, Iwasaki S, Urata S, Morishita H, Sakamaki Y, Fujioka M, Kondo K, Mizushima N, Yamasoba T. Autophagy is essential for hearing in mice. *Cell Death Dis.* 11;8(5). 2017. e2780. DOI:10.1038/cddis.2017.194. 査読有

〔学会発表〕（計3件）

粕谷健人・藤岡正人・渡部高久・神崎晶・大石直樹・西山崇経・野口勝・石川徹・細谷誠・小川郁 蝸牛有毛細胞特異的脱落モデルにおける内耳障害と耳鳴の関係 第3回耳鳴難聴研究会 2017年

藤岡正人 内耳感覚上皮へのT細胞依存性自己免疫が引き起こすこと-T細胞トランスジェニックマウスモデルを用いた解析から 第75回日本めまい平衡医学会総会学術講演会 2016年

Masato Fujioka Inflammatory and immune responses in the cochlea: perspective of basic research toward clinics Inner Ear Biology Workshop - IEB2015 2015年

〔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：
取得年月日：
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〕

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室研究紹介
<http://www.ent.med.keio.ac.jp/>

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（信濃町）教授
研究者番号：00169179

(2) 研究分担者

藤岡 正人 (FUJIOKA, Masato)
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師
研究者番号：70398626

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

原田 竜彦 (HARADA, Tatsuhiko)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号 : 60238186

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし