

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09359

研究課題名(和文)内耳性難聴発症に対する細胞生物学的・行動科学的アプローチと新規治療法の開発

研究課題名(英文)Biochemical and behavioral approach against inner ear disorder and development of new therapeutic modality

研究代表者

松延 毅 (TAKESHI, MATSUNOBU)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00332205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：強大音曝露によりモルモット蝸牛内のHeme Oxygenase-1(HO-1)の活性が上昇することから、急性感音難聴発症の病態にHO-1の活性化が関与することを証明した。また音響外傷モデル動物にフリーラジカルスカベンジャーを投与して、内耳障害を抑制しうることを報告した。急性音響外傷などの急性内耳性難聴の発症には細胞死制御に関連するMAPキナーゼであるErkが関連する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、急性感音難聴および加齢性難聴の発症メカニズムを生化学的、組織学的なアプローチと聴覚機能との関連づけて示した。また、大きな社会問題となりつつある耳鳴の発生メカニズムを、耳鳴と痛覚の機序が類似しているのではないかとこの点に着目し、これまでにない新規治療法の開発を目指した。本研究により新技術を駆使した内耳障害の診断と治療、またその進行の予防法が明らかになると考えられ、臨床にも大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Because activity of Heme Oxygenase-1(HO-1) in the guinea pig cochlea increased by intense noise exposure, we proved that activation of HO-1 was associated with clinical condition of the acute sensorineural hearing loss onset. Also, we gave a free radical scavenger against the acoustic trauma model animal and reported that we could inhibit noise-induced cochlea damage. We examined that Erk-2 which was MAP kinase associated with the cell death control was associated with for the onset of acute cochlear damage such as noise-induced cochlear traum.

研究分野：内耳生化学

キーワード：内耳性難聴 急性感音難聴 蝸牛 Erk 細胞死

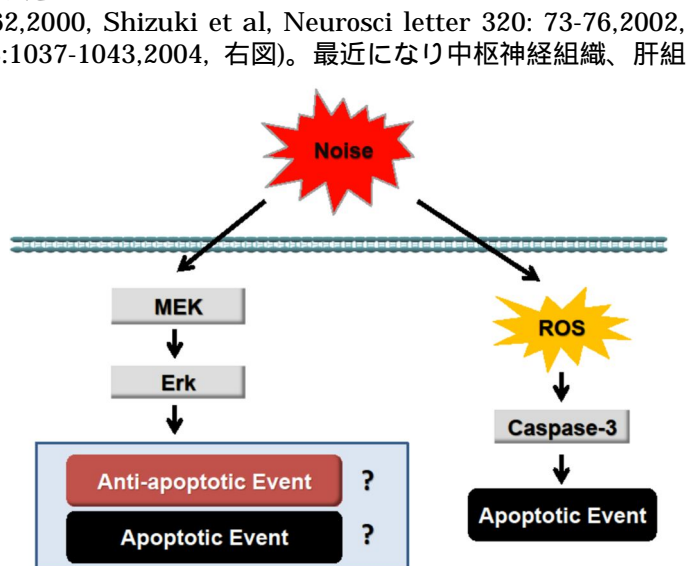
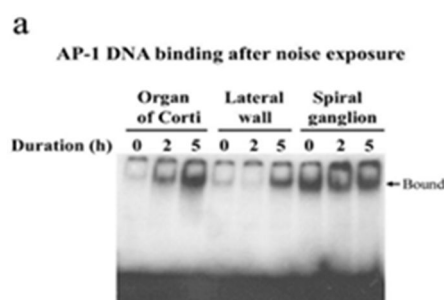
1. 研究開始当初の背景

突発性難聴や音響外傷などの急性感音難聴の発症には酸化ストレスの関与によるところが大きいとの報告が増加しているが、詳細なメカニズム、有効な治療法は未だ未解明である。本研究の目的は感音難聴の主病巣である内耳蝸牛における強大音負荷等による酸化ストレスのシグナル伝導路の詳細な解明にある。また新しい治療法として新規薬剤の開発、遺伝子治療の開発を行う。併せて、これまで不可能であった内耳組織のバイアピリチーの非侵襲的な測定法を開発することにより内耳障害の治療のタイミング、予後診断等に生かすことを目標とする。本研究により新技術を駆使した内耳障害の診断と治療、またその進行の予防法が明らかになると考えられ、臨床にも大きく貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

近年、内耳性障害のモデル動物を用いた研究などから、難聴の発症において特に強大音負荷動物、アミノ配糖体などの耳毒性薬剤負荷動物や老化動物における感覚細胞障害に活性酸素を引き金とするアポトーシスの関与が示唆されている。しかしながら、活性酸素などによる酸化ストレスの聴覚に及ぼす影響や聴覚感覚細胞の障害や細胞死に至るメカニズムの詳細は解明されていない。我々は強大音暴露による急性音響外傷のよりモルモット蝸牛組織内においてストレス応答転写制御因子である Activator protein-1(AP-1) の DNA binding 活性が増強することを証明した

(Ogita et al., Neuroreport 11:859-862,2000, Shizuki et al, Neurosci letter 320: 73-76,2002, Matsunobu et al., Neuroscience 123:1037-1043,2004, 右図)。最近になり中枢神経組織、肝組織などにおいて有害刺激や保護刺激を受けた場合に MEK/Erk 経路が活性化され、上記のストレス応答転写因子 AP-1 がさらに活性化され種々のストレス応答遺伝子を制御していることが提唱されている。本研究ではさらに神経特異的 Erk-1/2 コンディショナルノックアウトマウスおよび内耳特異的 Erk-1/2 コンディショナルノックアウトマウスを生化学的、組織学的、機能的(聴覚・行動)に解析し、強大音負荷により MEK/Erk 経路が音響性難聴および耳鳴の発症メカニズムにどのように関与しているかを生化学的および組織学的に解析する。



加齢性難聴のモデルマウスや急性感音難聴のモデルとしての急性音響外傷モルモットの作成を行い、それらのモデルを用いて急性音響外傷における転写制御因子 Activator protein-1(AP-1) および Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)などのストレス応答分子の動態の観察を生化学的および形態学的手法を用いて行う。また、AP-1 を制御している Erk1/2 の神経特異的コンディショナルノックアウトマウスの聴覚機能の解析を行い、強大音負荷への耐性の程度などを検討する。内耳特異的 Erk1/2 コンディショナルノックアウトマウスの聴覚特性の解析することにより、内耳障害を引き起こす可能性のある分子ネットワークを網羅的に解析、検討することが可能となり、内耳障害の診断と治療、またその進行の独創的な予防法が明らかになると考えられ、臨床にも大きく貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

転写制御因子の発現とリン酸化の解明(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室藤岡正人との共同研究)

急性音響外傷を作成後、蝸牛を摘出する。実体顕微鏡下にコルチ器、ラセン神経節、蝸牛外側壁(血管条、ラセン靭帯)を分離し、各組織中の細胞核抽出液を調整する。各組織の細胞核分画

における構成ファミリー蛋白質を特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。また、ある種の転写制御因子はその特異的部位のリン酸化により転写因子活性が発現することが明らかになっており、このような転写因子ではリン酸化蛋白質をその特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。また、MEK, Erk1/2に対しても同様に解析を行った。

(2) 免疫組織化学的解析

ウエスタンブロッティング法による解析にて発現が認められた転写制御因子の構成ファミリー蛋白質およびリン酸化蛋白質に関しては各々の蝸牛内発現部位を免疫組織学的に検討した。

(3) 急性音響外傷モデル動物に対する新規治療薬の検討

上記で得られた知見をもとに、生化学的な裏付けが得られた可能性のある新規治療薬を音響外傷モデル動物に投与し、その効果を機能的（聴覚）及び生化学的に評価した。

4. 研究成果

強大音暴露による急性音響外傷のよりモルモット蝸牛組織内においてストレス応答転写制御因子である Activator protein-1(AP-1)の DNA binding 活性が増強することを証明した。

強大音暴露によりモルモット蝸牛内の Heme Oxygenase-1(HO-1)の活性が上昇することから、急性感音難聴発症の病態に HO-1 の活性化が関与することを証明した。また音響外傷モデル動物にフリーラジカルスカベンジャーを投与して、内耳障害を抑制しうることを報告した。

急性音響外傷などの急性内耳性難聴の発症には細胞死制御に関連する MAP キナーゼである Erk が関連する可能性を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 3. 鈴木宏隆, 松延毅, 佐藤泰司, 細谷誠, 藤岡正人, 渡部高久, 大久保公裕
2. 発表標題 内耳性耳鳴におけるErkシグナルの機能的役割.
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大久保 公裕 (Okubo Kimihiro) (10213654)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	佐藤 泰司 (Satoh Yasushi) (10505267)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生化学・教授 (82406)	
研究分担者	藤岡 正人 (Fujioka Masato) (70398626)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------