

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19791252
 研究課題名 (和文) 急性内耳小胞体ストレスによる難聴の病態解析と新規治療法開発のための基礎的研究
 研究課題名 (英文) Analysis of an animal model of permanent moderate hearing loss due to endoplasmic reticulum stress in the cochlea, and development of novel therapy.

研究代表者
 藤波 義明 (FUJINAMI YOSHIAKI)
 松本歯科大学・歯学部・助手
 研究者番号：80392801

研究成果の概要：

ツニカマイシン (TM) 投与ラットの聴力低下は比較的緩徐に進行し、回復しなかった。TM 投与で外有毛細胞が変性し、続いてコルチ器が変性した。TM 投与量依存的に傷害部位が拡大し、内耳細胞間で TM 感受性の差が判明した。内有毛細胞、神経節の細胞内小器官に異常が認められ、TM 投与での聴力低下に内有毛細胞も関与している可能性が示唆された。小胞体ストレス関連遺伝子の発現量を解析し、遺伝子発現上昇を確認した。

内耳細胞の小胞体ストレスが難聴の病態に関与している可能性が推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：小胞体ストレス、難聴、モデル動物、細胞傷害、内耳、Tunicamycin、CHOP、シヤペロン

1. 研究開始当初の背景

感音難聴は発症頻度が高く、社会生活を送るうえで大きな影響を与えるコミュニケーション障害である。しかしながら、現在行われている治療では奏効しない場合も多い。そこで我々は内耳では報告されておらず、また細胞死に関わる一般的なストレスとして小胞体ストレスに着目した。小胞体ストレスは、細胞が ATP 低下などの刺激を受ける事により小胞体内に不良タンパク質や折りたたみ不全タンパク質が蓄積する事により引き起

こされる。小胞体ストレスはアルツハイマー病やパーキンソン病、脳虚血などの虚血性疾患に関与しているとして解明が進んでいる。当研究室では突発性難聴の病態解明を目的としてミトコンドリアトキシシン 3-nitropropionic acid (3-NP) の内耳局所投与により急性内耳エネルギー不全モデル動物を作成し解析を行っている。本モデル動物においては蝸牛外側壁が主な傷害部位であることを報告した (*Neuroreport* 2004; 15: 1597-1600, *Audiol Neurotol* 2005; 10:

220-233)。また現在までにこの傷害は蝸牛外側壁線維細胞の劇的なアポトーシスにより引き起こされ、これらの線維細胞が再生することにより聴力が回復することを明らかにした。蝸牛外側壁は聴力に必須である内リンパ液の K^+ 勾配を多くのエネルギーを消費して維持している。近年、ミトコンドリアと小胞体がクロストークしていることは明らかとなってきた (*Oncogene*. 2003; 22: 8608-8618, *J Chem Neuroanat*. 2004; 28: 101-105.)。我々の研究成果では 3-NP 投与モデルラットの外側壁においても傷害部位と一致して小胞体ストレス由来のアポトーシスに関与する分子の発現に増強が見られており、本モデル動物での蝸牛外側壁の細胞死に小胞体ストレスが関与していることが示唆された。

臨床でも小胞体ストレスが関与しているであろう難聴も明らかになりつつある。低音障害型感音難聴 (DFNA6/14/38) は *wfs-1* の遺伝子変異を原因としており、また同遺伝子の変異を原因とする Wolfram 症候群は若年性糖尿病や進行性両側性視神経萎縮、躁うつ病様精神症状を主徴とする疾患であり加齢と共に難聴、尿崩症など多彩な症状を呈する。DFNA6/14/38 や Wolfram 症候群の原因となる WFS-1 タンパク質は小胞体膜上に存在し、小胞体内の Ca^{2+} の恒常性に寄与している (*J Biol Chem*. 2003; 278: 52755-52762)。 *wfs-1* 遺伝子変異により小胞体の恒常性が崩れ、続いて引き起こされる小胞体ストレスが Wolfram 症候群発症の原因であることについても説明が進んでいる (*Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325: 250-256)。上記疾患のように小胞体ストレスの関与が明らかとなりつつある難聴もあるが、感音難聴にはまだまだ不明な点も多い。我々はより詳細に難聴に対する小胞体ストレスの影響について解析するため、N 型糖鎖修飾阻害により小胞体ストレスを惹起する Tunicamycin (TM) を内耳局所に投与し難聴モデル動物を作成する事に成功した。その結果、緩徐な聴力閾値の上昇が認められる永続性の内耳小胞体ストレス難聴モデル動物を、世界で初めて作成することに成功した。また、投与量の増加によって傷害部位が拡大し、細胞ごとに TM による小胞体ストレスに対する感受性が異なる事も明らかとなった。

2. 研究の目的

種々の小胞体ストレス誘導薬物の投与によって作成した難聴モデル動物の聴力閾値の推移や傷害部位の比較により刺激別の細胞の脆弱性や難聴への関わりを解析する。また、感音難聴モデル動物にケミカルシャペロン等の治療薬候補の薬物を様々な条件で投与する。その条件の一つとして薬物の全身的な

影響を排除するため、また将来的な治療方法の確立に向けて浸透圧ポンプ等を用いた内耳への局所投与および持続投与を検討する。これらによる難聴重症度の低減および予後の回復、傷害部位の変化を解析する。以上の結果をもとにした新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Tunicamycin (TM) の内耳局所投与による小胞体ストレスモデル動物の作成

① 小胞体ストレスモデル難聴の聴力閾値変化の観察

TM を含め Brefeldin A や Thapsigargin 等の小胞体ストレス誘導薬物を半規管から投与し、聴力閾値の推移を観察した。

(2) TM 投与による内耳傷害部位の小胞体ストレス応答分子の動態

① ヘマトキシリン・エオジン染色

TM 投与一定時間経過後に蝸牛を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定、5%EDTA で脱灰した後パラフィン包埋を行った。薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、有毛細胞、神経細胞および外側壁線維細胞などの形態観察を行い、内耳エネルギー不全モデルと比較した。

② TM 局所投与による蝸牛内細胞への影響と組織化学的解析

小胞体ストレス難聴モデルにおける傷害部位を解析するため、組織化学的解析を行った。

(1) で作成した小胞体ストレス難聴モデルラットについて薬物投与一定時間経過後に蝸牛を取り出し、4%パラホルムアルデヒドによる固定・EDTA による脱灰を行った後パラフィン包埋した。薄切した切片について HE 染色を行い、有毛細胞、神経細胞および外側壁線維細胞の形態観察を行った。

③ サーフェイスプレパレーション

TM 投与一定時間経過後に蝸牛を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定、数日間 5%EDTA で脱灰した。Rhodamine-Phalloidin で感覚毛を染色し、コンフォーカル顕微鏡にて感覚毛の形態観察を行った。

④ 電子顕微鏡解析

TM 投与一定時間経過後に蝸牛を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定、5%EDTA で脱灰した後、EPON に包埋した。切片を作成し、電子顕微鏡にて観察した。

⑤ Real-time PCR による小胞体ストレス関連遺伝子 mRNA の定量的解析

蝸牛を薬物処理各時間経過後に蝸牛より採取し、total RNA を抽出した。直後に、oligo (dT) プライマーを使用して cDNA を作成した。小胞体ストレス関連遺伝子について、各遺伝子特異的なプライマーを用いた

Real-time PCR を行い、経時的・定量的に遺

伝子発現量の解析を行った。

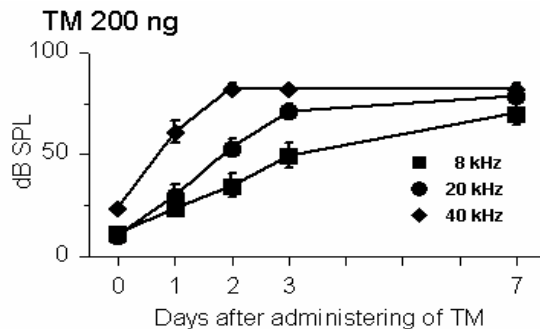
(3) 治療薬の投与経路の検討

① 内耳局所への治療薬持続投与の検討
浸透圧ポンプ等を用いて色素を持続的に投与し、チューブ先端の留置方法を検討する。留置方法が確立された後に Saline 等の治療薬の溶媒となり得る溶液を投与した。

4. 研究成果

我々はこれまでに、急性内耳エネルギー不全モデルの蝸牛外側壁の細胞死に小胞体ストレス関与を報告してきた。一方で、小胞体ストレスを惹起する N 型糖鎖修飾阻害剤 Tunicamycin (TM) の内耳局所投与にて聴力が低下することも報告している。本研究では、感音性難聴の病態および治療法の解明のため、その発症機序として報告されていない小胞体ストレスに着目し、モデル動物の作成およびその病態解析を行った。

まずは聴力の低下を引き起こす最小の TM 投与量を検討した。その投与量は 200 ng であった。TM 200 ng 投与では聴力閾値の上昇は 3-7 日かけて 70 - 80 dB まで比較的緩徐に進行した。一部を引き続き 30 日後まで経過観察したが聴力の回復は認められなかった。

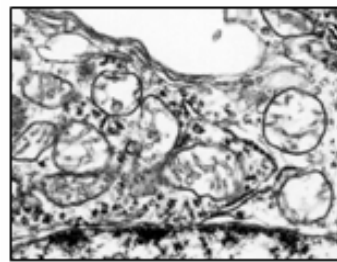


TM 200 ng より多い投与量では、聴力閾値の上昇はほぼ 3 日以内に進行し、全ての周波数でほとんどの個体が検出限界を超えた。TM 200 ng 未満の投与量では投与時の侵襲が原



因であると思われる一過性の聴力閾値上昇はみられたものの、1 週間後には回復した。薄切したパラフィン切片を用いてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

TM 200 ng 投与 7 日後で外有毛細胞の一部脱落を含む変性が見られ、30 日後には内有毛細胞も含めてコルチ器が変性していた。また、投与量依存的に傷害部位が外側壁繊維細胞、神経節へと拡大し、内耳細胞で TM による小胞体ストレスの感受性に差があることが判明した。サーフェイスプレパレーションでは、TM 投与により外有毛細胞の感覚毛の脱落が見られた。しかしながら、外有毛細胞のみの傷害で 70-80 dB の聴力低下は考え難いため、内有毛細胞および蝸牛神経節について電子顕微鏡解析を行った。TM 200 ng 投与 7 日後では内有毛細胞、蝸牛神経節ともに細胞死は



引き起こされていなかったが、小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官は膨潤しているなど異常

をきたしていた。TM 200 ng 投与 7 日後での聴力閾値上昇に、外有毛細胞の細胞死の他に、内有毛細胞や蝸牛神経節の機能障害が関与している可能性が示唆された。TM と同経路での小胞体 - ゴルジ体間輸送阻害剤 Brefeldin A や小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤 Thapsigargin といった小胞体ストレス誘導薬投与では聴力閾値の上昇は起こらなかった。TM 以外の小胞体ストレス誘導薬では難聴にならなかったことから、内耳細胞は小胞体ストレスの中でも N 型糖鎖修飾阻害による立体構造形成不良タンパク質の蓄積に特異的に脆弱である可能性が考えられた。

小胞体ストレスの指標となる遺伝子 (*chop*, *atf-4*, *grp78*, *grp94*) の発現量を Real Time PCR にて解析し、そのうちの

3 種類の遺伝子発現が上昇していた上昇していることを確認した。

以上の結果から、TM 投与により蝸牛では小胞体ストレスが引き起こされており、TM 投与による聴力閾値上昇に小胞体ストレスの関与が示唆された。この聴力閾値上昇および聴力の固定は外有毛細胞の変性および内有毛細胞の機能障害に起因すると考えられる。電子顕微鏡解析では蝸牛神経節神経細胞の細胞内小器官も障害されていたが、TM 200 ng 投与 30 日後でも蝸牛神経節神経細胞は存在していたことから、少なくとも上昇した聴力閾値の固定には関与していないと考えられる。小胞体ストレスは様々な外因性刺激によっても引き起こされることから、内耳細胞

の小胞体ストレスは急性あるいは亜急性に発症し回復しない難聴の一部の病態に関与している可能性が推察される。

浸透圧ポンプを使用した内耳局所への投与方法の確立を試みた。半規管へのチューブの留置は2週間まで試み、成功した。治療薬投与を試みる前に、まず色素を持続投与し、蝸牛内への蝸牛頂回転までの色素到達を確認した。しかしながら、本投与方法では生理食塩水投与においても聴力閾値の低下が起きた。従って、内耳局所への持続投与を臨床応用させるためには投与方法の改良あるいはさらに小流量の浸透圧ポンプあるいはプログラム式シリンダーポンプが必要と考えられた。今後は、内耳細胞を用いた *in vitro* 実験系でのケミカルシャペロンの効果の確認と、これに平行しての内耳局所投与方法の確立を行う必要があると考える。これが確立できなかった場合は全身投与になるが、本研究で用いたTM内耳局所投与による難聴モデルラットにケミカルシャペロンを投与し、その効果を検討する。

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1件)

- ① Yoshiaki Fujinami, An animal model of permanent moderate hearing loss due to ER stress in the cochlea、第81回日本薬理学会年会、2008年3月17-19日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤波 義明 (FUJINAMI YOSHIAKI)

松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：80392801

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書