

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890057

研究課題名（和文） アミノ配糖体抗菌薬などによる内耳障害に対する蛋白治療
～臨床応用への基礎的研究～

研究課題名（英文） Application of protein therapy for the cochlear hair cell damage induced by Aminoglycoside

研究代表者

榎尾 明憲（KASHIO AKINORI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20451809

研究成果の概要：

今回我々はアポトーシス抑制活性強化型蛋白 FNK に PTD (Protein Transduction Domain) を付加した PTD-FNK 蛋白を作成し、PTD-FNK 蛋白が通常高分子タンパクは通過困難といわれている内耳蝸牛窓膜を通過し内耳有毛細胞へ到達することを確認した。さらに到達した PTD-FNK でアミノ配糖体による急性内耳障害が予防できることを確認した。この成果はより副作用の少ない鼓室内局所投与での蛋白治療への発展につながると考える。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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

キーワード：アポトーシス・アミノ配糖体・蛋白治療

1. 研究開始当初の背景

アミノ配糖体は幅広い抗菌力を有し、かつ安価であり極めて有用な抗菌薬であるが反面、聴器毒性・腎毒性などを有しその使用に制限がある。アミノ配糖体による耳毒性は蝸牛有毛細胞のアポトーシスにあることが分かっている。したがってアポトーシスの制御がアミノ配糖体耳毒性に有効である。アポトーシス抑制の蛋白として Bcl-2 や Bcl-XL などが知られている。実際これら蛋白の遺伝子を導入することでアミノ配糖体に対する蝸牛有毛細胞の障害予防が報告されてきた。

しかしながら、遺伝子導入はそれ自体の危険性があり、かつ発現時間・発現量などの調節も困難で急性障害の予防への応用は難しい。蛋白自体を投与するいわゆる「蛋白治療」が可能となれば問題が解決するが、高分子タンパクは血液内耳関門・蝸牛窓膜などを通過することができず有毛細胞への到達が困難である。

これに対して我々のグループでは PTD 付加技術を導入した。PTD は HIV ウイルス TAT 蛋白の一部 Protein Transduction Domain の略である。付加することで様々なたんぱくが分

子量非依存的に細胞膜を通過することが可能となることが示されている。そこで Bcl-XL 蛋白の活性を強化した蛋白 FNK に PTD を付加した PTD-FNK を作成した。PTD-FNK は腹腔内投与で、血液脳関門や血液内耳関門を通過し脳神経細胞・蝸牛有毛細胞へ取り込まれることも確認された。また、われわれの先行研究では腹腔内投与により硫酸カナマイシン・エタクリン酸による難聴・有毛細胞障害モデルで優位に聴力閾値上昇・有毛細胞の障害を防ぐことができることを確認した。

本研究では PTD-FNK 蛋白による内耳に対する蛋白治療の臨床応用に向けて基礎的研究をさらに深めてゆくことを目的とした。

2. 研究の目的

PTD-FNK 蛋白による内耳に対する蛋白治療の臨床応用に向けての基礎的研究を行う

- (1) アミノ配糖体投与難聴動物モデルにおけるアポトーシスの発現経路の解明
- (2) より副作用の少ない鼓室内投与による PTD-FNK の効果の確認。

3. 研究の方法

(1) モルモットに対して硫酸カナマイシン皮下注、エタクリン酸静脈内投与を行い、6, 12, 24, 36, 48, 60 時間後における蝸牛有毛細胞での Tunnel 陽性細胞の確認をパラフィン切片・サーフェスプレパレーションテクニックによる Hole Mount 標本を用いて行った。

(2) 鼓室内投与での PTD-FNK の効果

PTD-FNK に myc tag を付加した PTD-myc-FNK を作成した。モルモット蝸牛骨包を全身麻酔下に開放しゼラチンスポンジに浸した PTD-myc-FNK を蝸牛窓小窩に静置した。1, 3, 6, 12, 24, 48 時間後における取り込みを myc 染色を行い免疫組織学的に確認した。

硫酸カナマイシン 200 mg/kg 皮下注・エタクリン酸 40mg/kg 静脈内投与内耳障害モルモットモデルに薬剤投与 1 時間前に PTD-FNK を 6 mg/ml 3ul をゼラチンスポンジに浸し蝸牛膜小窩に静置した。2 週間後聴力の閾値変化、有毛細胞の障害を確認した。

4. 研究成果

(1) Tunnel 染色の確認

硫酸カナマイシン・エタクリン酸投与 48 時間目で Tunnel 反応陽性の細胞が確認できた。(図 1, 2) 60 時間後の標本では陽性細胞は確認できず、48 時間前後で活発にアポトーシス反応が認められることが推測できた。

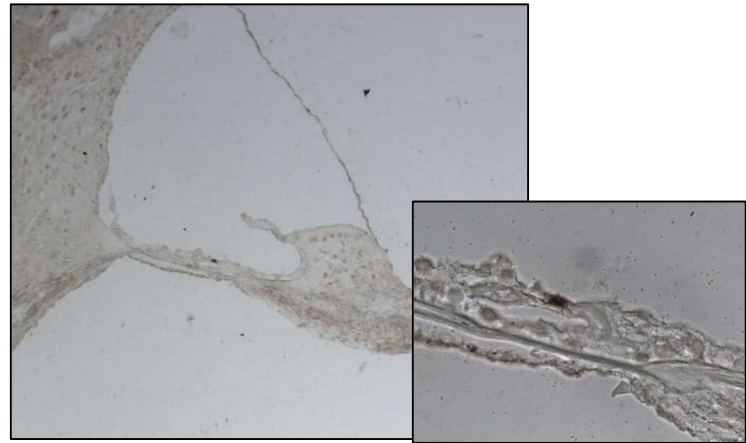


図 1 . 48 時間後パラフィン切片における Tunnel 陽性有毛細胞。

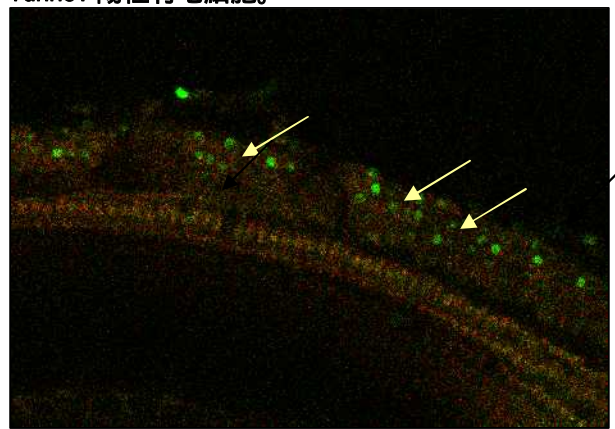


図 2 . 48 時間後サーフェスプレパレーションによる Hole Mount 蝸牛 Tunnel 陽性細胞

(2) PTD-FNK 鼓室内投与

鼓室内投与による取り込み確認

PTD-FNK は蝸牛窓膜静置 1 時間後には蝸牛有毛細胞、神経節などに取り込まれることがわかった(図 3)。一方で PTD を付加しない myc-FNK 蛋白の取り込みはほとんど認められなかった。また、取り込みは 24 時間後まで続くことがわかった。

(図 4) 先行研究からは全身投与の場合 6 時間と比較的早期に代謝されることがわかっており、全身投与に比べ鼓室内投与では比較的長期間効果が

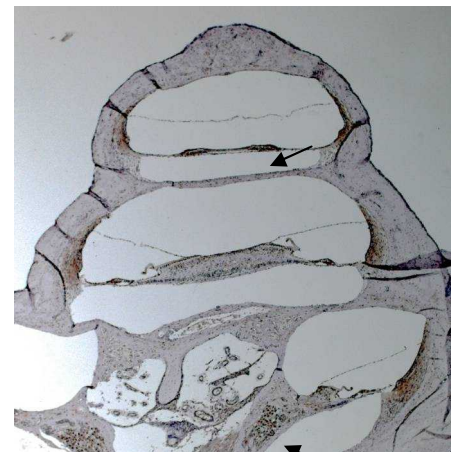


図 3a . 6 時間後における PTD-myc-FNK の取り込み

持続することが予想され、投与回数を減らすことが可能であることが推測された。

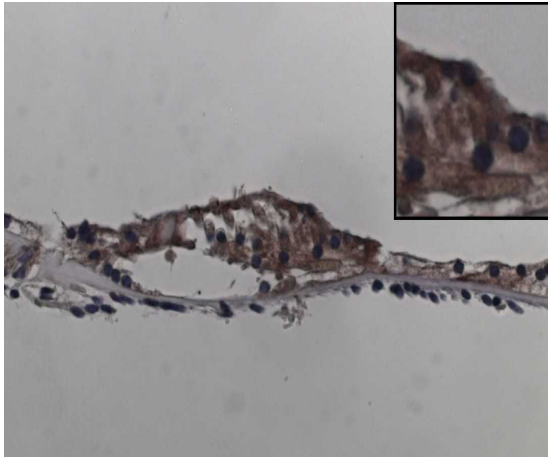


図 3b . コルチ器拡大

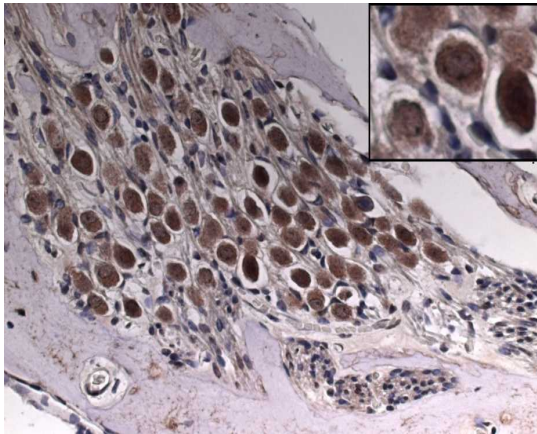


図 3c . らせん神経節拡大図

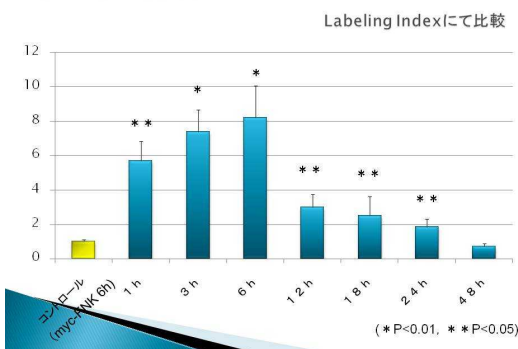
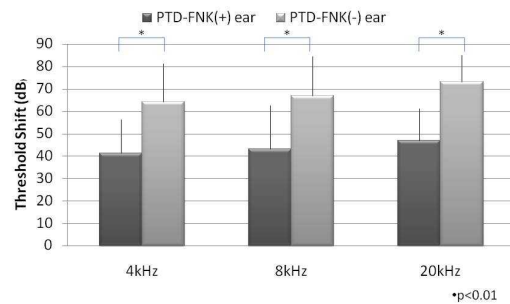


図 4 . 蝸牛内取り込みの時間的経過

(1時間後より染色を認め、24時間後まで持続した。)

PTD-FNK 鼓室内投与によるアミノ配糖体内耳障害予防

PTD-FNK 投与耳では硫酸カナマイシン・エタクリン酸投与前の1回投与で、有意に ABR の閾値上昇を抑えることができ(図5) かつ外有毛細胞の障害を有意に抑制することができた(図6)。全身投与の実験では薬剤投与前後7回に分けて投与することで効果を得ることができたが、これに比べ投与回数を大幅に削減することが可能となった。これは、鼓室内投与では一回の投与での効果の持続時間が全身投与に比べ長いことに起因する



抑制されたアミノ配糖体投与2週間後の閾値変化

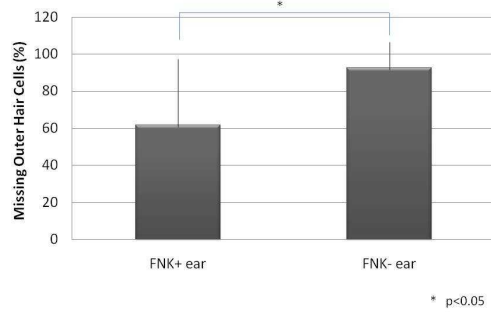


図 6 . PTD-FNK 投与耳と非投与耳での外有毛細胞障害率の比較

内耳に対する蛋白治療の報告は少なく、PTD 技術を用いた高分子蛋白の蝸牛窓膜通過・内示への取り込み・内耳障害予防を示した研究

は我々の研究が初めてである。

〔雑誌論文〕(計2件)

Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Asoh S, Ohta S, Yamasoba T : A protein derived from the fusion of TAT peptide and FNK, a Bcl-X(L) derivative, prevents cochlear hair cell death from aminoglycoside ototoxicity in vivo. J Neurosci Res. 85:1403-12 2007
(査読あり)

榎尾明憲、山岨達也、麻生定光、太田成男：
内耳障害に対する新しい治療法(蛋白治療)
細胞死活性強化因子を用いたアミノ配糖体
抗菌薬による耳毒性の抑制(解説). 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 79 551-560, 2007
(査読なし)

〔学会発表〕(計1件)

榎尾明憲 Protein Transduction Domain を付加した蛋白(PTD-FNK)の蝸牛窓膜通貨、蝸牛内細胞への取り込みについて 経鼓室的蛋白治療の開発 日本耳科学会総会 2008.10.16-18 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎尾 明憲 (KASHIO AKINORI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20451809

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし