

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791177

研究課題名（和文） 急性感音難聴におけるステロイド Target gene 作用点の解明

研究課題名（英文） The action points of genes induced by the glucocorticoids in acute sensorineural hearing loss .

研究代表者

廣瀬 由紀 (HIROSE YUKI)

筑波大学・附属病院・レジデント

研究者番号：00436049

研究成果の概要（和文）：今回の検討において、グルココルチコイドは細胞質受容体を介して保護効果を発現している可能性が示唆された。また、音響外傷において細胞質型ホスホリパーゼ A2 が関与している可能性が示唆された。以上より、グルココルチコイドは作用機序の一つとしてアラキドン酸カスケードを阻害することで内耳の保護に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present findings suggest that glucocorticoid may exert protective effects against cochlear injury by binding glucocorticoid cytoplasmic receptors, and that activation of cytoplasmic phospholipase A2 may be involved in the generation of acoustic injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：内耳性難聴 ステロイド アラキドン酸カスケード 内耳保護効果 音響外傷

1. 研究開始当初の背景

急性内耳性難聴は、現時点では治癒させることができる唯一の感音難聴である。

Glucocorticoids (GCs) は突発性難聴・自己免疫性難聴・音響外傷といった急性内耳性難聴の治療の Gold standard である。GCs は予防的に投与することで強大音による内耳障害を軽減できるということが実験的に示唆されている。しかし、その作用機序の詳細についてはいまだ明らかにされていない。

GCs は主に genomic pathway (GP) ,

non-genomic pathway (non-GP) を介して作用することが知られている。GP においては、細胞質内レセプターを介して target gene に作用し、種々の GCs 応答タンパク質が産生されることで遅延型の反応をおこす。また、non-GP においては、neurotransmitter や peptide hormone を介して即時型の反応をおこす。

本申請者はこれまで、GCs を音響負荷直前の投与による内耳の保護効果を in vivo で示してきたさらに GCs 細胞質レセプター阻害薬投

与により、GCs 保護効果を打ち消すということがわかった。これは、GCs が細胞質レセプターを介して内耳の保護効果に関与する可能性を示唆している。さらに、PLA2inhibitor を音響付加直前に投与することで、内耳の保護効果を示すとの結果も得ている。これはアラキドン酸カスケードを阻害することは、内耳の保護に関与する可能性を示唆している。これらの結果より、GCs の内耳保護効果はGP を介して作用している可能性があること、さらに GP を介して産生される Lipocortin によるアラキドン酸カスケードの阻害により内耳の保護に関与する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

内耳障害に直結するアラキドン酸カスケードの阻害物質を検討することにより、GCs の内耳保護効果の機序・作用を解明する。

3. 研究の方法

実験方法は原則的に下記の手順で行うものとする。

(1)8 週令メス DDY マウスを使用

(2)Pentobarbital sodium 麻酔下に ABR 閾値を測定 (Tone bursts 4, 8, 16kHz pure tones. rise decay time 1ms, duration 10ms in an open field system)

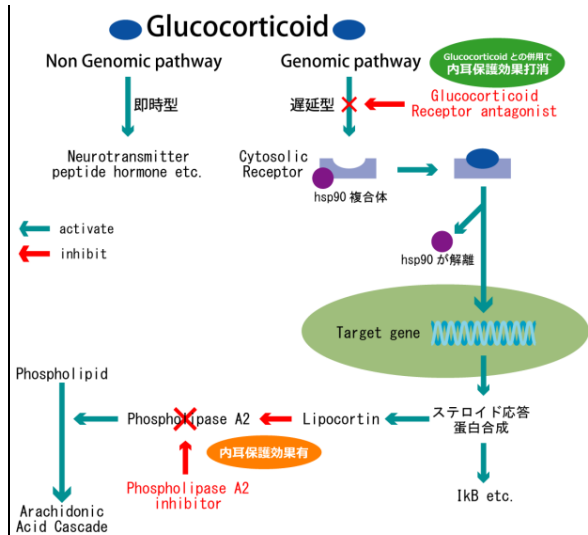
(3)薬剤を音響負荷直前に腹腔内投与

(4)4kHz pure tone 128dB SPL にて 4 時間音響負荷 (無麻酔)

(5)音響負荷 1. 2weeks 後に付加然と同様の条件で ABR 閾値を測定し、負荷前値よりの閾値変化を測定し、生理学的に検討する。

(6)2weeks 後の ABR 閾値測定後、深麻酔下に断頭し蝸牛を摘出。脱灰後 propidium iodine にて有毛細胞を染色。破損した細胞数を count し、組織学的に検討する。

GCs は音響外傷において Phospholipase A2 を阻害することにより、Arachidonic Acid cascade を阻害し保護効果を示している (図)。より下流の物質の阻害で内耳の保護効果が得られるかどうかを検討する。



使用薬剤

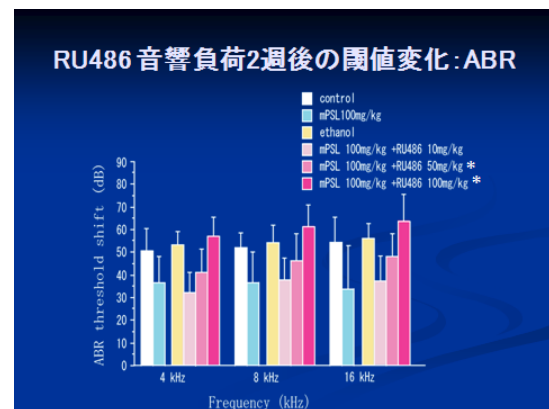
- (1) グルココルチコイド : methylprednisolone
- (2) 細胞質型グルココルチコイドレセプター阻害薬 : RU486 (mifepristone)
- (3) PLA 2 阻害薬
 - 非選択的阻害薬 : quinacrine
 - 細胞質型阻害薬 : AACOCF3
 - 分泌型阻害薬 : sPLA2inhibitor
- (4) コントロール :
 - mPSL を溶解した生理食塩水
 - RU486 を溶解したエタノール
 - 各種 PLA2inhibitor を溶解した 30%DMSO

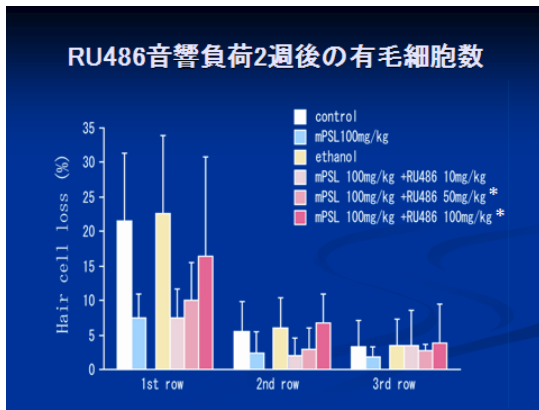
4. 研究成果

(1) RU486 のグルココルチコイド阻害効果

ABR の計測結果では RU486 はメチルプレドニゾロンの保護効果を阻害することが示唆された。

組織学的検討においても、RU486 が mPSL の保護効果を阻害することが示唆された。

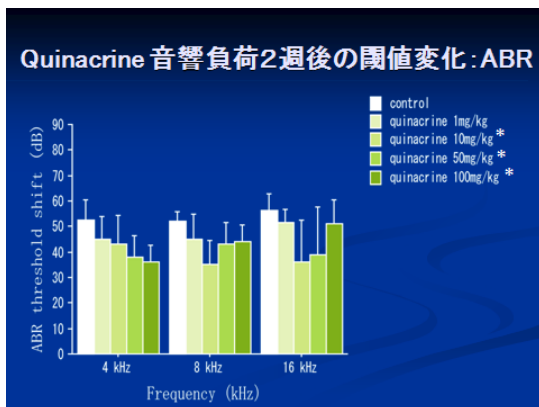
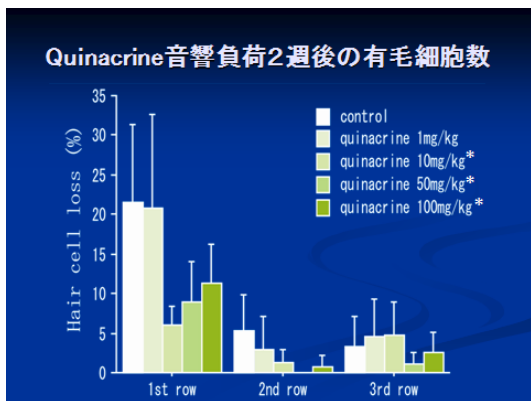




(2) PLA2 阻害薬の有毛細胞保護効果

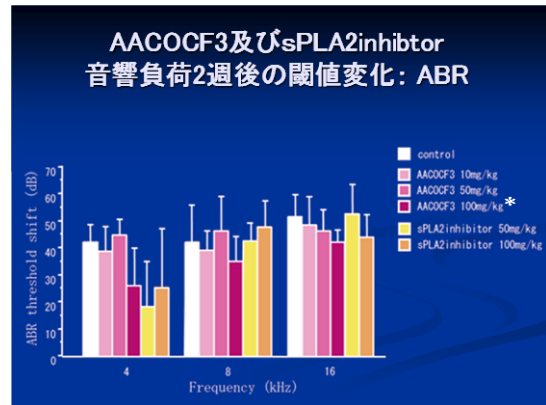
Quinacrine 1mg/kg 投与群はコントロール群と有意差を認めず、Quinacrine 10, 50 or 100mg/kg 投与群では有意な閾値の改善が得られた。これらの結果より、Quinacrine は内耳の保護効果を有することが示唆された。

組織学的検討においても、Quinacrine 10, 50 or 100mg/kg 投与群で有意に有毛細胞の障害が軽減され、Quinacrine 1mg/kg 投与群では有毛細胞の保護効果が得られなかった。このことより組織学的にも Quinacrine は内耳の保護効果を有することが示唆された。

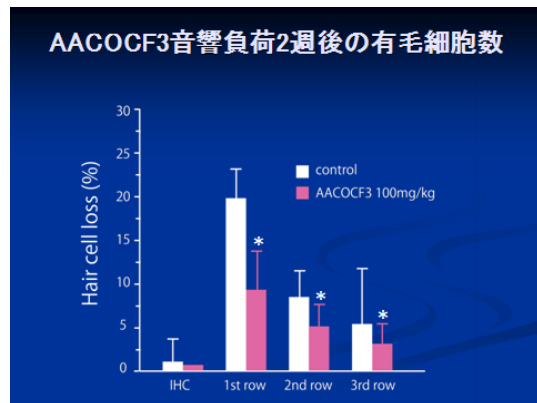


AACOFC3 10, 50mg/kg 投与群はコントロール群と有意差を認めず、AACOCF3 100mg/kg 投与群では有意な閾値上昇を抑える効果が得られた。これらの結果より、AACOCF3 は内耳の保護効果を有することが示唆された。

sPLA2 inhibitor 20, 100 mg/kg 投与群はコントロール群と有意差を認めなかった。よって sPLA2 inhibitor は内耳の保護効果を持たないことが示唆された。



AACOFC3 投与群の組織学的検討においては、100mg/kg 投与群では有意に外有毛細胞消失を抑える効果が得られた。よって、AACOCF3 は組織学的にも保護効果を有することが示唆された。



今回の検討において、Glucocorticoid は細胞質レセプターを介して保護効果を発現している可能性がある。また、音響外傷において細胞質型 PLA2 が関与している可能性がある。以上より、Glucocorticoid は作用機序の一つとしてアラキドン酸カスケードを阻害することで内耳の保護に関与する可能性が示唆された。

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)

- ① Keiji Tabuchi, Bungo Nishimura, Shuho Tanaka, Kentaro Hayashi, Yuki Hirose, Akira Hara
Ischemia-reperfusion injury of the cochlea: Pharmacological strategies for cochlear protection and implication of glutamate and reactive oxygen species
Current Neuropharmacology, Inpress, 査読有

〔学会発表〕(計1件)

- ① 廣瀬由紀, 田渕経司, 上前泊功, 飛田忠道, 辻茂希, 田中秀峰, 中山雅博, 原晃, 音響外傷におけるグルココルチコイドとホスホリパーゼ A2 の保護効果, 日本耳鼻咽喉科学会, 2009年5月16日, ザ・プリンス パークタワー東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 由紀 (HIROSE YUKI)
筑波大学・附属病院・レジデント
研究者番号: 00436049