

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791226

研究課題名（和文）：内耳炎症メカニズムの解明とインターロイキン6阻害による難聴治療に関する基礎的検討

研究課題名（英文）：Elucidation of inner ear inflammation and basic research of therapeutic strategy for hearing impairment with a blockade of interleukin 6

研究代表者：北里大学・北里研究所病院・研究員 若林 健一郎

研究者番号：40348743

研究成果の概要（和文）：難聴治療に応用するため、音響外傷モデルマウスに対してインターロイキン6阻害剤を投与し、その効果を機能的、組織学的に解析し、機序について検討した。薬剤投与群では非投与群と比較して有意な聴力の改善（機能的効果）とらせん神経節細胞（中枢へ神経刺激を伝達）の変性の抑制（組織学的な効果）を確認した。その機序には炎症細胞のひとつであるマクロファージの関与が示唆された。さらなる詳細な検討は必要だがインターロイキン6阻害剤が難聴治療に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：For clinical application of hearing loss therapy noise-exposed mice were treated with MR16-1 and evaluated. Improved hearing was noted in noise-exposed mice treated with MR16-1. Histological analysis revealed the decrease in spiral ganglion neurons was ameliorated in the MR16-1-treated group. A remarkable reduction of activated cochlear macrophages in spiral ganglions compared to the control group was observed when treated with MR16-1.

Thus, MR16-1 had protective effects both functionally and pathologically for the noise-damaged cochlea. IL-6 blockade would be a feasible novel therapeutic strategy for hearing loss.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：難聴治療、マクロファージ、インターロイキン6、炎症反応、聴力の改善

1. 研究開始当初の背景

老人性難聴、突発性難聴をはじめとする感音難聴に対する治療として、現在、臨床では急性期にはステロイドなどの薬物療法が行われ、慢性期には人工内耳、補聴器の装用などが行われている。突発性難聴における完治率は30%と低く、満足な成績とは言えない。また、人工内耳についても諸問題から広く普及した治療とは言いがたく、補聴器に関してもアンケート調査から判断すると満足度はあまり高くない。以上のように感音難聴治療に関して現状は閉塞状態にあると言わざるを得ない。一方で近年、内耳障害において炎症反応の関与を示す報告があり、内耳における過度の炎症反応が不可逆的難聴の原因となっている可能性が考えられる。

これまで我々の研究グループでは音響外傷モデル動物において炎症性サイトカインに関する検討を行い、インターロイキン6（以下IL-6）が騒音負荷後一過性に上昇することを報告した（Fujioka et al., *Neurosci Res.*, 2006）。この研究成果からIL-6が内耳炎症メカニズムにおいて中心的なサイトカインのひとつであると考え、IL-6阻害による機能的・組織学的変化とその作用機序について検討することを着想した。

2. 研究の目的

本研究ではIL-6阻害による聴覚機能、内耳の組織変性に及ぼす影響を検討し、内耳炎症メカニズムを解明する。そして、新たな感音難聴治療へ発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

音響外傷モデルマウスに対して抗IL-6受容体中和抗体（MR16-1）を投与し、聴覚機能、組織学的変化、機序について検討する。

(1) 内耳へのドラッグデリバリーの確認：腹腔内投与された薬剤が内耳に到達しているか確認する必要がある。具体的には抗IL-6受容体中和抗体（MR16-1）をビオチン化し、免疫染色で確認する予定である。

(2) 聴覚機能の検討：ABRを用いて検討する。検討例数を増やし、より信頼度の高い結果を導く。

(3) 組織学的変化の解析：音響外傷による組織学的変化として、外側壁細胞数の減少、血管条の変性、コルチ器有毛細胞の減少な

どが報告されている（Hirose et al., *Assoc Res Otolaryngol.*, 2003 / Yang et al., *Assoc Res Otolaryngol.*, 2002）。抗IL-6受容体中和抗体（MR16-1）投与によりこのような組織学的変化がどのような影響を受けるか、ABRの結果とも比較しながらエポキシ樹脂包埋によるplastic sectionを用いて解析する。

(4) 機序に関する検討：我々のこれまでの研究報告（Fujioka et al., *Neurosci Res.*, 2006）において音響外傷後、マクロファージの活性化が認められており、IL-6を介した炎症反応にマクロファージが関与している可能性が示唆されている。抗IL-6受容体中和抗体（MR16-1）によりマクロファージにどのような影響がもたらされるのか評価する。具体的には活性型マクロファージのマーカーであるIba-1、骨髄由来の白血球系細胞のマーカーであるCD45を用いた免疫染色により時間的・空間的に内耳におけるマクロファージの分布および数に薬剤による影響が見られるか解析する。また、下流シグナルに関する検討も行う。具体的にはSTAT、ERK、AktなどのIL-6の下流シグナルの薬剤投与による変化をウェスタンブロットで解析する。以上のように多角的に内耳における炎症反応と抗IL-6受容体中和抗体（MR16-1）の機序について検討する予定である。

4. 研究成果

(1) 内耳におけるMR16-1のドラッグデリバリー：MR16-1が内耳に到達していることを確認するため、ビオチン化MR16-1を投与し、内耳における分布を免疫染色で評価した。ビオチンの活性はらせん神経節、コルチ器、血管条、外側壁で観察され、頂回転から基底回転まですべての回転で染色が認められ、明らかな差はなかった。これらの結果から騒音負荷後のマウスの内耳へのMR16-1の到達が確認された。

ウェスタンブロットではIL-6の下流シグナルであるSTAT3、Erk1のレベルはコントロール、MR16-1群間で変化が観察されなかったが、リン酸化体（p-STAT3、p-Erk1）のレベルはMR16-1投与群ではコントロール群に比べて減少していた。

(2) 聴力の改善：ABRを用いて聴力の評価を行った。騒音負荷後、4および20kHzの周波

数においてそれぞれ、コントロール群では 49.4 ± 2.1 dB および 55.6 ± 3.3 dB、MR16-1 投与群では 33.3 ± 5.8 dB および 50.8 ± 7.1 dB であった。MR16-1 投与群では 4kHz においてコントロール群と比較して有意な聴力の改善が観察された。頂回転は低音域、基底回転は高音域に相当することから聴力改善は特に頂回転で認められた。

- (3) MR16-1 によるらせん神経節の保護：音響外傷による障害はらせん神経節細胞を含む様々な細胞において観察される。これまでの報告によると障害の強さ、広がり、騒音のレベル、周波数、時間によるとされている。特にらせん神経節細胞の空胞化や腫脹は騒音の強さによると報告されている。本研究では騒音負荷後のマウスではらせん神経節細胞の消失による神経細胞濃度の現象が観察された一方で、MR16-1 投与群では神経細胞が保護されていた。有意に保護効果が観察されたのは頂回転のみで、中回転、基底回転では MR16-1 投与群においてもコントロール群と同様に神経細胞は消失していた。

有毛細胞の評価をするために、サーフェスプレパレーション法を用いて細胞数のカウントを行ったが、すべての回転において MR16-1 投与群とコントロール群間に有意差は認められなかった。

- (4) MR16-1 は内耳の炎症を抑制した：MR16-1 が内耳の炎症細胞に影響を与えているか調べるため、Iba 1/CD45 二重陽性細胞数を検討した。騒音負荷後、らせん神経節のすべての回転において二重陽性細胞は 3 日目をピークに増加し、その後 7、14 日目には減少していた。MR16-1 投与により騒音負荷後 3 日目のすべての回転で二重陽性細胞は有意に増加が抑制されていた。すべての群のらせん神経節においてほぼすべての陽性細胞は CD45 および Iba 1 の両方を発現しており、CD45 あるいは Iba 1 のいずれかのみを発現している細胞はほとんど観察されなかった。これらの結果から MR16-1 が騒音負荷後、らせん神経節へのマクロファージの遊走を抑制した可能性が示唆された。

外側壁においても騒音負荷後、マクロファージの遊走が観察された。二重陽性細胞は騒音負荷前は外側壁下方に主に観察され、負荷後に外側壁全体に広がった。しかし、コントロール群と比較して MR16-1 による二重陽性細胞の増加の有意な抑制は認められなかった。

- (5) 研究成果の位置づけとインパクト

- ① 騒音難聴モデルにおける MR16-1 の保護効果：本研究のデータから IL-6 を阻害することで蝸牛の炎症反応が弱められることが示された。一般に騒音難聴の病理組織は

多様性があり、1 次的な物理的な組織障害だけでなく、興奮毒性を含む 2 次的な障害もあると報告されている。炎症細胞特にマクロファージの浸潤は 2 次的な障害の機序に関する新たな病態生理となる可能性がある。今回、実験結果から、MR16-1 はもっとも音響のエネルギーの強い部位 (4kHz) において機能的かつ組織学的に保護効果を持つことが示された。一方で有毛細胞数には変化が観察されず、このことは MR16-1 が遅発性の有毛細胞消失を防止できない可能性を示唆している。ここ数年、蝸牛の障害が少なくとも部分的には有毛細胞の障害とは独立してらせん神経節細胞の消失により 1 次的に起こるとの報告がある (これまで有毛細胞の消失に続発してらせん神経節細胞が消失するとの考えが通説であった)。本研究では有意な組織学的な変化が観察されたのはらせん神経節のみであった。同時に、神経細胞の存在するらせん神経節では Iba 1/CD45 二重陽性細胞の有意な現象が観察された。外側壁においてもわずかな変化は観察されたものの有意ではなかった。以上より騒音難聴に対する MR16-1 の効果は免疫細胞の遊走を強力に抑制し、その結果 1 次的ならせん神経細胞の消失を軽減することで発揮されたと考えられた。

- ② MR16-1 の投与における蝸牛マクロファージの関連：いくつかのグループにより騒音負荷、薬剤、手術侵襲などを含むいくつかのタイプの障害後、内耳への炎症細胞の浸潤は 3 から 7 日にピークを迎えると報告されている。これらの中にはマクロファージの浸潤の強力な抑制に関する報告はないが、浸潤のピークの時期に関しては本研究結果もこれらの報告に合致する。Hirose らは騒音負荷後の CD45 あるいは Iba 1 をマーカーとした炎症細胞の増加は体循環からの移動により生じていると報告し、これらの細胞を「蝸牛マクロファージ」とよぶことを提案している。Lang らはこれらの細胞が骨髄からリクルートされたと報告しており、Tan らは CD45 を発現し、やはり骨髄からリクルートされたと報告している。このような報告から CD45 および Iba 1 は蝸牛マクロファージの最適なマーカーであると判断し、二重陽性細胞のカウントを行った。本研究ではこれらの細胞濃度は騒音前と比較して 4 から 5 倍に増加しており、MR16-1 の投与により 90% 以上抑制することができた。脊髄損傷モデルではいくつかの報告で血管系のマクロファージは細胞障害性があり、これらの細胞の過度の浸潤はむしろ有害であるとされている。聴力低下を軽減できた今回の結果から、減少した蝸牛マクロファージはおそらく

くらせん神経節細胞に対して細胞障害性があり、MR16-1でIL-6シグナルを阻害したことで遊走してくるマクロファージを減少させ、その結果機能的かつ組織学的に騒音難聴を改善させたと推測される。

MR16-1がマクロファージの数を減少させたメカニズムは十分に解明されているわけではない。IL-6は、B細胞の活性化を介した抗体産生、T細胞の分化、局所障害部位へのマクロファージの遊走など免疫反応において様々な役割を持つ多機能な炎症性サイトカインとして知られている。中枢神経系では炎症反応におけるIL-6の強いインパクトが示されており、以下のような報告がなされている。脊髄損傷モデルにおいてMR16-1でIL-6を阻害したところ炎症細胞が減少し、グリオシスが軽減し、結果として機能回復できた、あるいはIL-6-nullマウスはアブレーションによる脳外傷により傷つきにくく、また、実験的に発生させた自己免疫脳脊髄炎に対して炎症反応の有意が低下のため抵抗性を持つといった報告である。この古典的なサイトカインに関する知見が増えるにつれて徐々に新たな概念が形成されつつあるが、このような現象はまだ完全には解明されていない。新しい概念として我々が考えているのは、炎症性サイトカインIL-6が「定常状態」の免疫システムを「炎症期」へ、CD4陽性T細胞を「静止状態」から「攻撃状態」いわゆるTh17細胞（ケモカインの分泌など多彩に炎症反応を強調する機能を持っている）へ移行させるというものである。同時にB細胞も影響を受け、抗体産生は増加すると思われる。本研究ではIL-6シグナルの阻害が障害を受けた蝸牛において劇的に炎症反応を抑制したことを証明した。完全なエビデンスはないが、我々のモデルにおいても中枢神経系と同様の現象が生じ、騒音難聴モデルに対してMR16-1が「抗炎症」剤として作用したと考えられる。この問題についてはさらなる研究が必要と思われる。

本研究では頂回転にのみ機能的・組織学的改善が観察された。バンドノイズを選択した場合、らせん神経節細胞の障害は周波数に関連した部位に観察されると報告されている。今回、4kHzのバンドノイズを暴露したため障害は頂回転で最高レベルに達しているものと思われる。頂回転におけるより厳しい障害がサイトカインの発現に変化をもたらした可能性があり、その結果、他の回転に比べて頂回転では血管系のマクロファージの有害性がより強くなったと考えられる。MR16-1はこのより強い有害性を阻害し、聴力、組織学的変性を改善させたとと思われる。

外側壁におけるIba1/CD45二重陽性細胞は主に下方に観察され、騒音負荷後は全体に広がったが、これは過去の報告と合致している。今回、外側壁ではMR16-1投与により炎症細胞の増加の有意な抑制は観察されなかった。このことはMR16-1がマクロファージの浸潤においては効果がなかったことを示しているが、サイトカインレベルでは少なくとも何らかの影響を与えた可能性があると思われる。

- ③ドラッグデリバリー：本研究結果から、内因性のIgGは内耳において極めて低濃度であるにもかかわらず、全身投与したMR16-1が内耳へ到達し、その細胞膜まで運ばれ、障害された蝸牛においてIL-6シグナルの誘導を阻害したことが示された。強大音による障害の後、血管の障害・破綻がしばしば生じることがこれまでに報告されており、今回、MR16-1の進入は血液-内耳関門の破綻により発生したと推測される。現在、20以上のモノクローナル抗体が臨床あるいは治験で使用されている。本研究によりモノクローナル抗体治療が騒音難聴を含む急性内耳障害に効果的である可能性が示唆された。
- ④臨床応用への可能性：この抗IL-6受容体抗体治療の有利な点のひとつに本抗体のヒト化抗体であるMRA(Atlizumab)がすでにキャスルマン病、関節リウマチに臨床応用され、高い効果を得ていることがあげられる。本研究結果は抗IL-6受容体抗体治療の内耳での臨床応用に貢献し、感音難聴治療のリスクの最小化の可能性を示すものと思われる。
- ⑤結語：本研究により急性感音難聴に対する新規治療法として抗IL-6抗体治療の意義を示すことができたと思われる。この治療法は非ステロイド性に炎症反応を抑制し、マクロファージの遊走を減少させる。さまざまな副作用を呈するステロイドと異なり、副作用の少ない治療薬であり、臨床的にステロイドに勝る治療法として将来性をもっているものと思われる。

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)

[雑誌論文] (計2件)

1. Wakabayashi K, et al (他10名、1番目). Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neurosci Res.* 2010;66(4):345-352.

査読有

2. Masuda M, Wakabayashi K, et al (他 6 名、4 番目). GFAP aggregates in the cochlear nerve increase the noise vulnerability of sensory cells in the organ of Corti in the murine model of Alexander disease. Neurosci Res. 2008 Sep;62(1):15-24.

査読有

[学会発表] (計 6 件)

Kenichiro Wakabayashi blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea

33rd The Association for Research in Otolaryngology California U.S.A. 2010 Feb

若林 健一郎 音響外傷蝸牛に対する IL-6 阻害剤を用いた難聴治療への応用
第 54 回 日本聴覚医学会総会・学術講演会
新横浜 2009 年 10 月

若林 健一郎 音響外傷蝸牛に対する抗インターロイキン 6 阻害剤の効果
第 110 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
東京 2009 年 5 月

若林 健一郎 音響外傷蝸牛に対するインターロイキン 6 阻害剤の効果
第 2 回 厚生労働省急性感音難聴調査研究班
会議 東京 2009 年 2 月

若林 健一郎 音響外傷モデルマウスにおける抗可溶性インターロイキン 6 受容体抗体の効果
第 18 回 日本耳科学会総会 神戸 2008 年 10 月

若林 健一郎 音響外傷モデルマウスにおける抗可溶性インターロイキン 6 受容体抗体の効果
第 31 回 日本神経科学会 東京 2008 年 7 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 健一郎 (Wakabayashi Kenichiro)

北里大学・北里研究所病院・研究員

研究者番号：40348743