

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791642

研究課題名（和文） 音響外傷性難聴の病態解明および新しい治療法の開発

研究課題名（英文） Elucidation of mechanism and development of a new therapy against noise-induced hearing loss

研究代表者

山下 大介（YAMASHITA DAISUKE）

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60306785

研究成果の概要（和文）：

はじめに強大音響に曝露されることにより、難聴になる動物モデルを作製した。次にその難聴モデル動物において、内耳有毛細胞（聴覚を司る神経細胞）の細胞死（アポトーシス）に至るメカニズムを詳細に解明した。最後にその結果に基づき、難聴を治療する方法を種々のアプローチで検討し、聴覚機能・内耳形態の両面において難聴を治す可能性のある結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We first manufactured the animal models that became hearing loss induced by intense noise. In the hearing loss animal model, we elucidated the mechanism which led to the cell death (apoptosis) of inner hair cells. Finally, based on these results, we examined the method that hearing loss was treated by various kinds of approaches, and the results that might cure hearing loss in the both sides where were in hearing function / inner ear morphology were obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：内耳、再生、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

音響性聴器障害による内耳性難聴は感音難聴の主な原因の一つで、その多くが難治性である。特に先進国では難聴の3分の1以上が過剰な騒音によると言われている。また、騒音性難聴は多くの国において、国が補償する最も大きな職業疾患の1つである。実際に先進国では、GNPの

約0.2～2%が騒音の対策費となっている。そこで音響性聴器障害の際、内耳蝸牛にどのような病態生理的、形態的、生化学的变化が生じているかを基礎的に研究することによって、強大音響曝露より聴覚系を保護する研究は臨床上、非常に大きなインパクトがあると考えた。

## 2. 研究の目的

音響外傷性難聴における内耳細胞死のメカニズムを詳細に解明し、その結果に基づき治療へのアプローチを多角的に検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 騒音難聴モデルの作製

種々の音響負荷条件（音圧、周波数、曝露時間）で動物（モルモット・マウス）に強大音響を曝露する。音圧は100～125 dB SPL、周波数は4 kHz OBNもしくはBBN（ブロードバンド）、曝露時間は1～5時間の範囲とする。

### (2) 聴力の機能評価

音響曝露後、経時的に機能評価（難聴の程度）を聴性脳幹反応（ABR: Auditory Brainstem Response）を用いて施行する。

### (3) 有毛細胞の形態的評価

機能評価と同様に形態的変化も経時的に追って定量する。surface preparation法により rhodamine 蛍光色素標識 phalloidin にて細胞骨格を染め、欠損細胞をカウントする。

### (4) PTS と TTS モデルの確立

上記音響負荷条件から機能及び、形態的に一過性閾値変化（TTS: temporary threshold shift）と永続性閾値変化（PTS: permanent threshold shift）の両動物モデルを確立する。

### (5) アポトーシス関連因子の検討

PTS・TTS 両モデルにおいて、アポトーシス関連因子である Bcl-2 family の発現を免疫組織学的に検討する。アポトーシス抑制因子として Bcl-xL を、アポトーシス促進因子として Bak を用いて検討した。音響曝露後、各タイムポイント（負荷直後、1, 3, 7, 10 日目）において内耳蝸牛を摘出し4%パラホルムアルデヒドで固定の後、8%EDTAで脱灰、凍結切片を作製し免疫染色を行う。

(6) 超常磁性体酸化鉄による内耳移植細胞の生体内検出システムの検討

SPIOラベリングは、骨髄由来間葉系幹細胞を10% FBS - DMEM培地に終濃度 0.1% の Resovist（日本シェーリンガー：SPIOの親水性コロイド液 粒径約 57nm 24.9mg Fe/mL）を加え24時間培養し、PBSにて洗浄後に酵素処理にて細胞を回収し、細胞・組織評価、Spectrometry、MRI以上3点の検討を行う。

次にvivo研究として、音響外傷モデル動物に対して、神経細胞へ分化誘導した骨髄由来間葉系幹細胞の内耳移植実験を行う。注入細胞は、マウスKUSA-A1細胞を神経誘導培地（DMEM/F12+B27, bFGF, BDNF, NGF）で培養後、回収24時間前にResovist最終0.2%含有神経誘導培地に交換し、最終的に $1 \times 10^5$  cells/ $\mu$ lの濃度に調整したものをを用いる。PTSモデルにおいて、第2回転の蝸牛管内に細胞注入を行う。注入後2, 9, 30日後に蝸牛を摘出し、Berlin Blue（鉄）及びNeurofilament (NF)の2重染色を行う。

### (7) 内耳保護研究

ブライエル反射が正常なハートレー系白色モルモット（オス、200～250g）を用いる。PTS (permanent threshold shift)モデルに対して、種々の薬剤の内耳保護効果を検討する。コントロール群（蒸留水）と薬剤投与群に分け、各種濃度における2群間での聴覚閾値及び、有毛細胞死を検討する。

## 4. 研究成果

平成21年度：

(1) 騒音難聴モデル動物作製として、難聴が回復しない永続的閾値変化（PTS: permanent threshold shift）と、難聴が最終的には完全に回復する一過性閾値変化

（TTS: temporary threshold shift）の両モデルを作製した。両モデルに対して、聴力の機能評価として聴性脳幹反応（ABR: Auditory Brainstem Response）にて、また内耳有毛細胞の形態的評価として surface preparation

法を用いて欠損細胞数をカウントした。これらのデータをもとに両モデル間でのアポトーシス関連因子である Bcl-2 ファミリーの発現を検討した。

(2) 内耳再生研究に関連して、移植細胞の生体内動態モニタリングの検討を行った。具体的には MRI の造影剤である超常磁性体酸化鉄(super paramagnetic iron oxide: SPIO) を細胞に取り込ませた後、in vitro において細胞ラベリング効果を検討した。またその結果から次に音響外傷性難聴モデル動物において、神経に分化誘導した骨髄由来間葉系幹細胞を内耳に移植し、その内耳組織内での生着・発現を検討した。その結果は日本耳科学会(第19回)およびARO(第33回)にて報告した。

平成22年度:

(3) DNA の酸化障害である 8-オキシグアニン除去する酵素(8-オキシグアニン-DNA グリコシラーゼ) をコードする *Ogg1* 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて、内耳障害のメカニズム解析について検討した。強大音響負荷後のノックアウトマウスと野生型マウスでは、聴覚機能(聴性脳幹反応: ABR) および外有毛細胞数(surface preparation 法による hair cell count) に有意差がみられた。これらの結果は日本耳科学会(第20回)にて報告した。

(4) 内耳防御研究に関して、シグマ受容体に選択的に作用する新規の低分子化合物で、神経保護作用や抗うつ作用が期待される創薬 SA4503 の内耳保護効果を検討した。音響外傷性難聴モデル動物において、聴覚機能および内耳における形態的細胞死が防御できることを証明した。この薬剤は現在、アメリカにおいてすでに脳梗塞患者を対象に第IIa

相臨床試験の段階にあるもので、感音難聴に関してもより臨床応用に結び付く研究と考えられる。この結果は日本耳鼻咽喉科学会総会(111回)およびARO(第34回)にて報告した。

#### 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3件) すべて査読有

- ① Cui Y, Sun G, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujii M, Kaga K, Ogawa K. Noise-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlear spiral limbus of mice. *European Arch. Oto.* 268(7):973-978 2011
- ② Shibata T, Yamashita D, Hasegawa S, Saito M, Otsuki N, Hashikawa K, Tahara S, Nibu K. Oral candidiasis mimicking tongue cancer. *Auris Nasus Larynx* 38(3):418-420 2011
- ③ Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Shibata S, Yamashita D, Masuda M, Mihara M, Ohsugi Y, Ogawa K, Okano H. Blockage of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neuroscience Res.* 66(4):345-352 2010

[学会発表] (計7件)

- ① Yamashita D, Matsunaga T, Takeshi F, Hasegawa S, Nibu K. Neuroprotective effects of SA4503 against noise-induced hearing loss ARO (34回) H23. 2. 21 ボルチモア (アメリカ)
- ② 山下大介, 神崎晶、藤田岳、長谷川信吾、丹生健一、小川郁 内耳における *Ogg1* ノックアウトマウスの機能解析 日本耳科学会(第20回) H22. 10. 7 松山
- ③ 山下大介、和多田有紀子、神崎晶、藤田岳、長谷川信吾、小川郁、丹生健一 内耳移植細胞の生体内動態モニタリング法

の確立 自律神経研究会（第 28 回）

H22. 9. 11 大阪

- ④ 山下大介、松永達雄、藤田岳、長谷川信吾、丹生健一 音響外傷性難聴に対する SA4503 の内耳防御機能 日本耳鼻咽喉科学会総会(111 回) H22. 5. 22 仙台
- ⑤ 山下大介 音響外傷性難聴のメカニズム 解明と聴覚保護 サウンド財団研究助成講演会 H22. 2. 15 浜松
- ⑥ Yamashita D. Watada Y. Kanzaki S. Hasegawa S, Nibu K. Ogawa K. Detection system for transplanted bone marrow stem cells in inner ear by SPIO AR O (33 回) H22. 2. 8 アナハイム (アメリカ)
- ⑦ 山下大介、和多田有紀子、神崎晶、長谷川信吾、丹生健一、小川郁 内耳移植細胞の生体内動態モニタリング法の確立 日本耳科学会（第 19 回）H21. 10. 7 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 大介 (YAMASHITA DAISUKE)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60306785