

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591880
 研究課題名（和文） siRNA を用いた急性感音難聴治療モデル

研究課題名（英文） Therapeutic model for acute sensorineural hearing loss using siRNA

研究代表者
 前田 幸英（YUKIHIDE MAEDA）
 岡山大学・岡山大学病院・助教
 研究者番号：00423327

研究成果の概要（和文）：現在開発中の急性感音難聴治療薬の標的分子である MAP kinase 群が、急性感音難聴発症時の蝸牛でどの様な時間経過で活性化しているか明らかにした。また siRNA 等による蛋白合成レベルでの治療介入モデルの構築にむけて、リン酸化 MAP kinase 群の量的変化と MAP kinase 蛋白総量の発現変化を個別に解析した。マウス内耳において phospho-MEK1/ERK/P90RSK カスケードは、らせん神経節と感覚上皮で騒音暴露後 3-6 時間をピークに活性化していた。この際 total-MEK1/ERK/P90RSK には増加を認めず、一時的なリン酸化によるもので蛋白合成を伴わないものと考えられた。JNK, p38MAPK については 48 時間後のらせん神経節での遅発性活性化を認めた。p38MAPK の遅発性増加には蛋白合成を伴っていた。これらの所見は siRNA による蛋白合成抑制など、新たな急性感音難聴治療戦略の基盤となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The involvement of MAP kinase in noise-induced hearing loss (NIHL) has been implicated in the cochlea; however, it was unknown how expression levels of MAP kinase change after the onset of NIHL and whether they are regulated by transient phosphorylation or protein synthesis. In the data of the present study, the phospho-MEK1/ERK/p90RSK signaling pathway was activated in the spiral ligament and the sensory and supporting cells of the organ of Corti, with peaks at 3-6 h and independently of regulations of total-MEK1/ERK/p90RSK. The expression of phospho-JNK and p38MAPK showed late upregulation in spiral neurons at 48 h, in addition to early upregulations with peaks at 3 h after noise trauma. Phospho-p38MAPK activation was dependent on upregulation of total-p38MAPK. The present data provide a significant basis for future therapeutic strategies for acute sensorineural hearing loss, including those utilizing siRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
23 年度	500,000	150,000	650,000
24 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学

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：急性感音難聴、MAP kinase、騒音性難聴モデルマウス

1. 研究開始当初の背景
感音難聴は現在でも治療困難な難治性疾患

の一つであり、その病態の多くは蝸牛感覚上皮あるいは外側壁の不可逆性変化による。

JNK/c-Jun カスケードを含む MAP kinase カスケードはアポトーシスに至る分子機構の引き金であり、蝸牛においてこの発現をタイミングよく制御することができれば、アポトーシスを抑制し、蝸牛の構造、機能も維持されると考えられる。また、siRNA 投与等を用いた蛋白レベルでの治療介入モデルの構築のためには、難聴発症時の MAP kinase タンパク質活性化機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

主要な MAP kinase カスケードを構成する MEK1/ERK/p90RSK カスケード、p38 MAPK カスケード、JNK/c-Jun カスケードが難聴発症時の蝸牛においてそれぞれどの様な時間経過で活性化されるかを明らかにした。また siRNA 等による蛋白合成レベルでの治療介入モデルの構築のため、リン酸化蛋白量と総蛋白発現量の変化を解析するとともに、蝸牛のどの様な部位に発現しているかを明らかにした。

3. 研究の方法

10 週齢 CBA 雄マウスを 120dB オクターブバンドノイズに 2 時間暴露し、暴露直後、12 時間後、24 時間後、48 時間後、14 日後に聴性脳幹反応により難聴の発現を確認した。騒音暴露前 (コントロール)、直後、3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後に蝸牛を剖出し (各々 $n=8$)、Bio-plex suspension array system 法をもちいて phospho-MEK1/ERK/p90RSK および total-MEK1/ERK/p90RSK、phospho-p38MAPK および total-p38MAPK、phospho-JNK、phospho-c-Jun、total-c-Jun の発現量を経時的に解析した。また、phospho-p90RSK、phospho-p38MAPK、phospho-JNK について、その発現量が最大となる時間経過で、免疫染色法により内耳のどの様な部位で発現しているかを明らかにした。

4. 研究成果

騒音暴露後のマウスは、暴露後 12 時間 (73.6 ± 14.4 dB SPL 1, $n=8$) をピークとする難聴を呈し、24 時間後 (48.6 ± 15.7 , $n=7$) での部分的回復と、14 日後 (40.0 ± 13.8 , $n=6$) での有意な ($p < 0.01$) 永続的難聴をみとめた。(図 1)

Phospho-MEK1/ERK/p90RSK は内耳らせん靭帯および感覚上皮において (図 2) 暴露後 3-6 時間を最大とする 2 倍から 3 倍以上の有意 ($p < 0.01$) な増加をみとめたが、この間 total-MEK1/ERK/p90RSK の変化はコントロールの $100 \pm 20\%$ 以内にとどまっており (図 3)

、騒音暴露後早期にみられる Phospho-MEK1/ERK/p90RSK 活性化は *de novo* 蛋白合成をともなわないことが判った。

Phospho-p38MAPK (図 4 左)、phospho-JNK (図 5) はらせん神経節において (図 2、最下段) 相音暴露 48 時間後での有意な遅発性増加をみとめたが、同時に total-p38 MAPK も有意に増加しており (図 4 右)、らせん神経節における p38 MAPK の遅発性増加は *de novo* 蛋白合成を伴うことが判った。Phospho-JNK, total-p38MAPK, phospho-c-Jun, total-c-Jun は騒音暴露 3 時間後をピークとする早期の増加もみとめたが、同時に c-Jun 総蛋白量の増加も認め (図 6)、この過程には *de novo* 蛋白合成をともなうものと考えられた。これらの所見は siRNA による蛋白合成抑制などの急性感音難聴治療モデルの基盤となると考えられる

図 1 騒音負荷後のマウス聴力

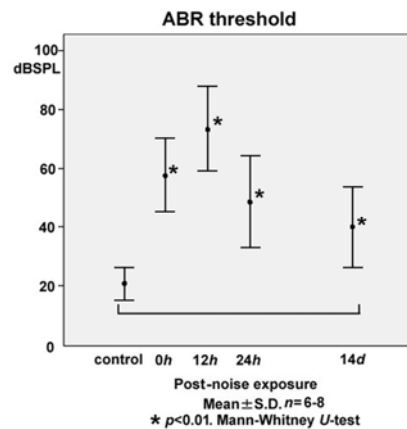


図 2 騒音負荷後の内耳における MAP kinase 発現部位

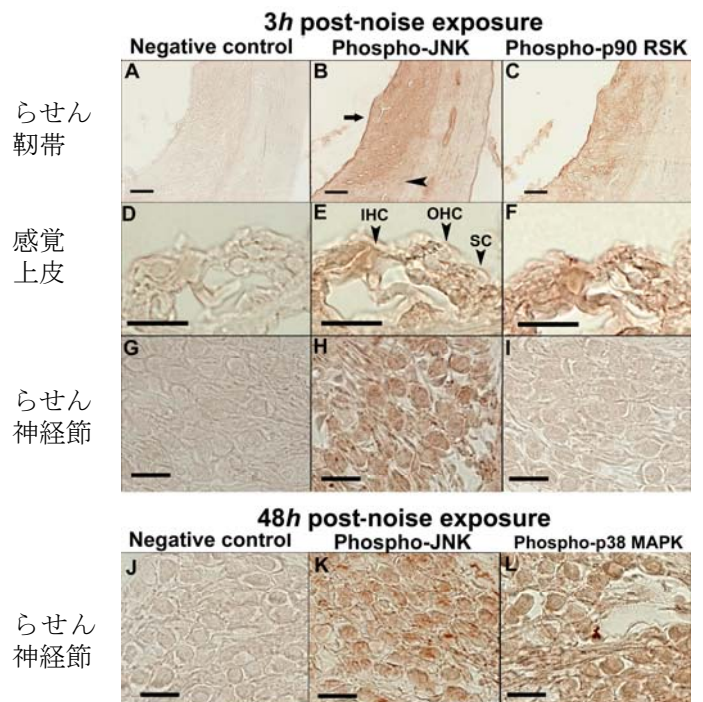


図3 騒音負荷後の蝸牛における phospho-MEK1/ERK/p90RSK (左) と total-MEK1/ERK/p90RSK (右) 発現量の経時的変化。

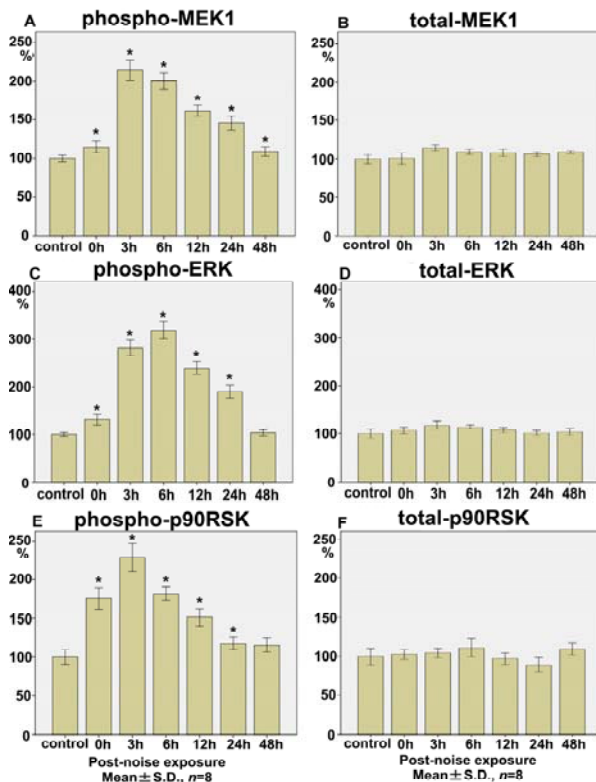


図4 騒音負荷後の蝸牛における phospho-p38MAPK (左) と total-p38MAPK (右) 発現量の経時的変化。

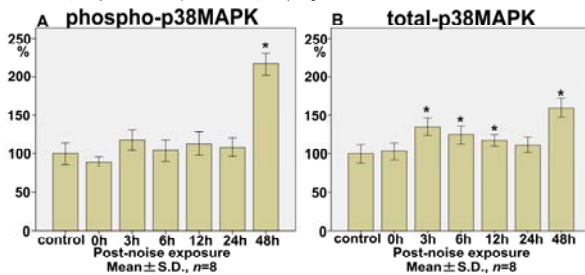


図5 騒音負荷後の蝸牛における phospho-JNK 発現量の経時的変化。

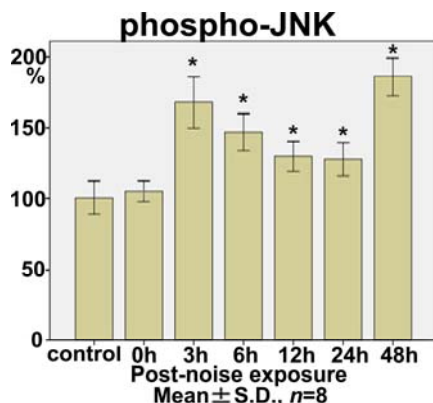
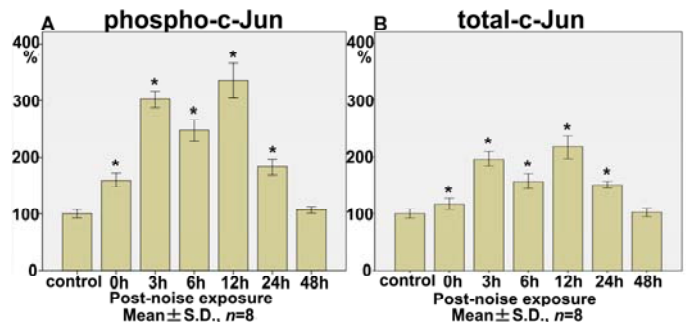


図6 騒音負荷後の蝸牛における phospho-c-Jun (左) と total-c-Jun (右) 発現量の経時的変化。



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4件)

1) Maeda Y, Fukushima K. A commentary on 'TECTA mutations in Japanese with mid-frequency hearing loss affected by Zona Pellucida domain protein secretion'. J Hum Genet. 2012 Oct;57(10):619-20. 査読無 doi: 10.1038/jhg.2012.89.

2) Maeda Y, Fukushima K, Kariya S, Orita Y, Nishizaki K. Intratympanic dexamethasone up-regulates Fkbp5 in the cochlea of mice in vivo. Acta Otolaryngol. 2012 Jan;132(1):4-9. 査読有 doi: 10.3109/00016489.2011.619571.

3) Hirai M, Maeda Y, Fukushima K, Sugaya A, Kataoka Y, Nishizaki K. Expression analysis of microRNAs in murine cochlear explants. Neuroreport. 2011 Sep 14;22(13):652-4. 査読有 doi: 10.1097/WNR.0b013e32834a0273.

4) Maeda Y, Fukushima K, Hirai M, Kariya S, Smith RJ, Nishizaki K. Microarray analysis of the effect of dexamethasone on murine cochlear explants. Acta Otolaryngol. 2010 Dec;130(12):1329-34.

査読有 doi:

10.3109/00016489.2010.498836.

〔学会発表〕（計1件）

1) 前田幸英、福島邦博、假谷伸、西崎和則、騒音負荷後のマウス蝸牛におけるMAPキナーゼ発現とリン酸化の経時的解析、日本耳科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋市、平成24年10月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 幸英 (YUKIHIDE MAEDA)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：00423327

(2) 研究分担者

福島 邦博 (KUNIHIRO FUKUSHIMA)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：50284112

片岡 祐子 (YUKO KATAOKA)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：10362972

(3) 連携研究者

なし