

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659309
 研究課題名（和文） 免疫寛容破綻による自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルの樹立とその解析
 研究課題名（英文） Mouse models of Autoimmune hearing loss generated by a transgenic approach and its implication
 研究代表者
 小川 郁（OGAWA KAORU）
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：00169179

研究成果の概要（和文）：

内耳性難聴の原因のひとつに古くから自己免疫の関与が考えられており、自己抗体や標的タンパクの同定を中心に国内外で多くの基礎・臨床的検討がされてきた。当研究では自己免疫発症の実体である免疫寛容の破綻に焦点を当て、発生工学を駆使して新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルを樹立し解析した。その結果、キラーT細胞による内耳有毛細胞に対する急性の自己免疫性難聴によって、発症12時間で高音急墜型の感音難聴が生じることが示された。他方骨髄より常に内耳有毛細胞を攻撃する自己免疫性キラーT細胞が産生される慢性の自己免疫性難聴モデルでは、生後すぐ（3週齢）には難聴は測定限界外だが、高音部より徐々に難聴が進行することが示された。以上より自己免疫発動によって感音難聴が生じることが因果関係をもって prospective に免疫学的手法で直接証明された。今後は病態生理の詳細な解析を通して新規治療標的や治療薬候補を探索・検討し、臨床応用へつなげる予定である。

研究成果の概要（英文）：

Autoimmune hearing loss models were established by generating a transgenic mouse (*Math-HA*) that specifically expresses HA antigen in the inner ear hair cells. By an adoptive transfer of lymphocytes derived from *CLA* mice, the mice suffered hearing loss at high frequency and the deafness became stable within 12 hours after the transfer. On the other hand when two mice strains were mated, the double transgenic offspring gradually developed high-tone dominant hearing loss. The results demonstrate that the autoimmunity can be a cause of deafness including acute sensorineural hearing loss and chronic bilateral idiopathic sensorineural hearing loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,000,000	0	8,000,000
2011年度	20,000,000	6,000,000	26,000,000
総計	28,000,000	6,000,000	34,000,000

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：耳科学・トランスレーショナルリサーチ・自己免疫・難聴・免疫学

1. 研究開始当初の背景

急性高度難聴は年間受療者数 35,000 人を数える難治性疾患である。内耳性難聴の原因のひとつに古くから自己免疫の関与が考えら

れており、自己抗体や標的タンパクの同定を中心に多くの基礎的・臨床的検討がなされてきた。

内耳性難聴への自己免疫の関与は、患者血清中の自己抗体 (Arnold 1985 など 7 報) や

蝸牛組織攻撃性 T 細胞 (Harris 1987 など 4 報) の存在から提唱され、欧米では自己免疫性内耳炎、本邦ではステロイド依存性難聴として診断基準が提唱された (Kanzaki J, and S, 2009 総説)。さらに近年蝸牛特異的ペプチドで免疫した T 細胞が難聴を誘導すると報告され、免疫担当細胞が内耳に到達し、蝸牛組織を攻撃することによる難聴という概念が確立した (Solares 2004)。

他方、免疫系発動と深く関わっている炎症反応、とくに炎症細胞の局所浸潤について蝸牛傷害でも知見が蓄積してきた (Hirose 2005; Ledrich 2007; Okano 2008)。我々も音響外傷モデルで蝸牛局所に炎症細胞が誘導され炎症性サイトカインが傷害依存的に産生されることを世界に先駆けて発見し (Fujioka, 2006)、インターロイキン 6 (IL-6) の阻害により炎症細胞数が劇的に減少して、聴力悪化が有意に改善されることを報告した (Wakabayashi, 2010)。これらの結果は蝸牛傷害における局所炎症の普遍性と治療標的としての重要性を示唆する。免疫系における細胞傷害が局所炎症の発動と表裏一体に連動することを考えあわせると、蝸牛傷害への免疫系の関与も十分あり得ると示唆されるが、自己免疫性難聴のモデルとして二次的な炎症反応を解析するのは本末転倒であり、免疫寛容破綻を発端とする疾患モデルの樹立が必要と考えられた。

2. 研究の目的

当研究では自己免疫発症の本質である免疫寛容の破綻に焦点を当て、分子生物学、遺伝子工学を駆使して、その病態生理と関連する重要分子を探索する系を確立することにあつた。他臓器における自己免疫性疾患モデルに倣って、内耳への免疫寛容が破綻する新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルを樹立し、その解析を行うことを目的とした。耳科領域では初の本格的な個体レベルの内耳自己免疫性疾患モデル遺伝子改変動物の樹立を通して、病態生理の詳細を解明するとともに新規治療標的や治療剤の候補を探索・検討し臨床応用へとつなげる、耳鼻咽喉科学領域における次世代トランスレショナルサーチのモデルケースとなることを最終目標としている。

3. 研究の方法

研究では免疫寛容の破綻を *in vivo* で再現する実験系として他臓器で実績のある血球凝集素 (HA) 強制発現系を内耳に応用し、自己免疫性難聴遺伝子改変動物の作成を進めた。(1) 内耳有毛細胞に外来抗原 HA を発現する Math-HA マウスの樹立

(2) キラー T 細胞が同抗原を認識する TCR-CL4 マウスを用いた急性自己免疫性難聴モデルの樹立

(3) 同マウスを用いた慢性自己免疫性難聴モデルの樹立

以上を通して、内耳有毛細胞への免疫寛容破綻モデルを樹立し、それにより難聴が誘導されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) キラー T 細胞による有毛細胞への突然の免疫寛容破綻 (自己免疫) により 12 時間以内に完成する高音漸減型の難聴が誘導された:

TCR-CL4 由来のリンパ球の静注により、Math-HA の体内ではそれまで「自己」だった HA 陽性の有毛細胞を突然「非自己」と認識するキラー T 細胞が出現することになる。当検討ではリンパ球移入から 12 時間という短時間で難聴が完成し、急性の自己免疫の発動により突発性難聴に酷似する経過をたどる内耳性難聴が生じることが示された。

(2) キラー T 細胞において有毛細胞への免疫寛容破綻が慢性的に持続する系では、緩徐進行性で高音急墜型の内耳性難聴が誘導された:

直接交配で得た Math-HA; TCR-CL4 二重マウスでは、体内のキラー T 細胞の 40% がつねに HA 発現細胞 = 内耳有毛細胞を常に非自己として攻撃する状態になる。このマウスでは生後すぐでは高音部にごく軽度の難聴を認めるのみで、その後月単位で高音部より中音域へ徐々に進行する、緩徐進行性の感音難聴を呈した。難聴は高音に優位で基底回転の外有毛細胞が特に減少しており、日常臨床における両側性特発性難聴と酷似する病態・経過を呈していた。

(3) 齧歯類用 OAE (耳音響反射) 測定装置の樹立

(1) の結果から、充分量の自己攻撃性免疫細胞が生じたときの難聴完成は、比較的早い経過で起こることが明らかになった。そこで聴力測定においても、速やかに、かつ末梢内耳の機能が測定できる装置が必要と考えられた。そこで、内耳感覚上皮傷害の機能評価のために、既に当研究室で有している ABR に加えて、OAE 測定機器の整備を進めた。プローブにはハーバード大 Liberman 博士の指導の下同研究室で実績のある EPL Acoustic System Assembly を作成した。検討は OAE の専門家である国際医療福祉大学の原田竜彦博士、(株) バイオテックリサーチと共同で行い、このシステムに Ethimotic Research 社の ER4 を用いて音響提示を行うシステムを

開発した。現在この機器を用いて実際に動物での基礎データを収集中である。

(1) (2)の結果は自己免疫の発動が難聴の原因となることを prospective に証明する初の結果であり、予備実験ながらも急性・慢性双方の内耳性難聴モデルが得られたことは意義深い。突発性難聴や特発性難聴の原因解明が期待されると同時に、分子生物学・発生病学を駆使した現代的手法による自己免疫性難聴へのアプローチとして大きなインパクトが見込まれる。

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 14 件)

- 1) Oishi N, Shinden S, Kanzaki S, Saito H, Inoue Y, Ogawa K. Role of Tinnitus Handicap Inventory in Evaluating Tinnitus Severity and Estimating Comorbid Depression and Anxiety J Int Audiology 2011 査読有
- 2) Goto F, Nakai K, Ogawa K. Application of autogenic training in patients with Meniere disease. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011 査読有
- 3) Oishi N, Inoue Y, Ogawa K 他 3 名 Pure tone auditory thresholds can change according to duration of interrupted tones in patients with psychogenic hearing loss. Acta Otolaryngol. 2011 査読有
- 4) Oishi N, Shinden S, Kanzaki S, Saito H, Inoue Y, Ogawa K. Influence of depressive symptoms, state anxiety, and pure tone thresholds on the Tinnitus Handicap Inventory in Japan. Int J Audiology 2011 査読有
- 5) Kanzaki S, Ogawa K, Momose A, Matsuo K 他 5 名 Impaired vibration of auditory ossicles in osteopetrotic mice. Am J Pathol. 2011 178(3):1270-8. 査読有
- 6) Fujioka M, Jeon SJ, Kim SC, Edge AS (*equally contributed first authors) Notch Signaling Alters Sensory of Neuronal Cell Fate Specification of Inner Ear Stem Cells (2011) *J.Neurosci.*31(23):8351-8 査読有
- 7) Fujioka M, Tokano H, Fujioka SK, Okano H, Edge AS. Generating mouse models of degenerative diseases using Cre/lox-mediated in vivo mosaic cell ablation (2011) *J. Clin. Invest.* 121(6):2462-9. 査読有
- 8) Hosoya M, Fujioka M, Matsuda S, Ogawa K, Okano HJ, Okano H 他. Expression and Function of Sox21 During Mouse Cochlea Development. (2011) *Neurochem Res.* 36(7):1261-9 査読有
- 9) Minami SB, Shinden S, Kanzaki S, Inoue Y, Ogawa K 他 5 名 Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treatment of chronic tinnitus. Auris Nasus Larynx. 2011 Jun;38(3):301-6. 2010 査読有
- 10) Oishi N, Kanzaki S, Ogawa K 他 3 名 Effects of selective serotonin reuptake inhibitor on treating tinnitus in patients stratified for presence of depression or anxiety. Audiol Neurootol. 2010;15(3):187-93. 査読有
- 11) Oishi N, Kanzaki S, Ogawa K 他 3 名, Long-term prognosis of low-frequency hearing loss and predictive factors for the 10-year outcome, Otolaryngol Head Neck Surg (2010) 査読有
- 12) Ide R, Harada T, Kanzaki S, Ogawa K. Physical and physiological effects on otoacoustic emissions in hypobaric hypoxia. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2010;72(4):225-32 査読有
- 13) Oishi N, Kanzaki S, Ogawa K Long-term prognosis of low-frequency hearing loss and

predictive factors for the 10-year outcome
Otolaryngol Head Neck Surg 2010 142(4):565-9 査
読有

- 14) Wakabayashi K, **Fujioka M**, **Kanzaki S**,
Okano HJ, **Ogawa K**, Okano H 他. Blockade
of interleukin-6 signaling suppressed
cochlear inflammatory response and
improved hearing impairment in
noise-damaged mice cochlea. (2010)
Neurosci Res. 66(4):345-52 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- 1) A transgenic mouse model for
autoimmune hearing loss due to a
“failure” of immunologic tolerance to
the inner ear hair cell, **Fujioka M**,
HMS-Keio-Northwestern Joint
meeting for inner ear autoimmunity
Boston, MA 平成 23 年 3 月 22 日 (招待
講演)
- 2) 内耳基礎研究の基礎講座「内耳トランス
レーショナルリサーチの心強いツールた
ち～分子生物学から実験動物まで～」**藤
岡正人**, 第 29 回聴覚生理研究会 平成 22
年 10 月 7 日愛媛県松山: 耳科学会 (招
待講演)

[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]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 郁 (OGAWA KAORU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 00169179

(2) 研究分担者

藤岡 正人 (FUJIOKA MASATO)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 70398626

神崎 晶 (KANZAKI SHO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 50286556