

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592474

研究課題名(和文)高脂血症治療薬スタチン・プロブコールによる内耳障害抑制効果の検討

研究課題名(英文)ProbucoI attenuates gentamicin-induced cochlear hair cell loss by inhibition of apoptosis.

研究代表者

坂本 幸士(Sakamoto, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50323548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸の排泄促進作用をもつ抗脂血症治療薬プロブコールには抗炎症作用、抗酸化作用、神経保護作用を有することが知られている。本研究ではプロブコールのアミノグリコシド系抗生剤によって惹起される内耳有毛細胞死に対する抑制効果を検討した。蝸牛器官培養系で有毛細胞をゲンタマイシン0.3mMに暴露したところプロブコールには有毛細胞のアポトーシスを抑制し有毛細胞の生存率を上昇させる効果があることが判明した。その効果には至適濃度があり100μMのプロブコールが最も効果があった。本研究の結果からすでに臨床で使用されているプロブコールによって種々の蝸牛有毛細胞死を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：ProbucoI is one of the representative lipid-lowering agent with anti-inflammatory and antioxidant properties that has a long history of clinical application for the treatment and prevention of cardiovascular diseases. Recently, several studies have revealed its neuroprotective property. However, to date, protective effect of probucoI for cochlear hair cell remains to be elucidated. In the present using cochlear explant culture for 24 h, probucoI attenuated hair cell loss and apoptosis induced by 0.3 micro M of gentamicin. Moreover, 100 micro M of probucoI was most effective, suggesting that there is an optimal concentration for protective effect. These results revealed the neuroprotective effect of probucoI in cochlear hair cells.

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

キーワード：内耳有毛細胞 抗脂血症薬 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

代表的な抗脂血症治療薬には HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンと胆汁酸の排泄促進作用をもつプロブコールがある。両者の血中コレステロール減少効果の作用機序は異なるが神経保護作用を有することが知られている。内耳有毛細胞の細胞死抑制効果について検討した報告はほとんどない。本研究ではアミノグリコシド系抗生剤によって惹起される内耳有毛細胞障害に対する抑制効果を検討した。実験施行中にスタチンについては先行研究により内耳障害予防の効果があることが論文発表されたため、対象薬剤をプロブコールのみ限定した。

2. 研究の目的

蝸牛コルチ器を用いた器官培養系においてゲンタマイシンによる有毛細胞障害を誘発し、プロブコールによる細胞死抑制効果の有無を検討すること。

3. 研究の方法

実験動物は ICR マウスを用いた。生後 3~4 日目の新生児を断頭し中耳骨胞を採取した。中耳骨胞から蝸牛を採取し、側壁の骨を除去して蝸牛管を分離した。蝸牛管から血管条のある側壁とらせん神経細胞のある軸を除去した。分離したコルチ器を器官培養系で用いた。24 時間前培養することで培養メッシュに蝸牛を接着させた。内耳有毛細胞障害を惹起する薬剤としてゲンタマイシンを用い、過去の報告を参考にして外有毛細胞の約 50% の障害を誘発する濃度として 0.3mM を用い 24 時間培養した。プロブコールも過去の報告を参考にして 1 μ M、10 μ M、100 μ M、1mM の濃度系列で効果を検討した。

実験群としてはコントロール (CTR) 群、ゲンタマイシン (GM) 群、ゲンタマイシン + プロブコール群 (GM+PB) (4 群) の計 6 群となった。培養 24 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで 15 分固定し、0.2%Triton X-100 により 30 分間浸透化処理を行った。F-actin に結合性のある rhodamine

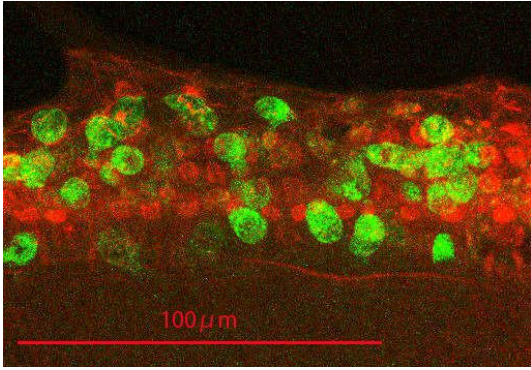
phalloidin により有毛細胞の hair の染色(赤色)を行い有毛細胞の消失率を評価した。hair が観察されない場合に有毛細胞消失と判定した。同時に rabbit polyclonal activated (cleaved) caspase-3 抗体と 2 次抗体 Alexa Fluor 488 (緑色) による免疫染色を行いアポトーシスの誘発の程度を評価した。いずれの染色もアミノグリコシド系抗生剤に感受性が高いとされている基底回転について評価し 1 蝸牛について基底回転の 200 μ m の 2 箇所をカウントした。各群のサンプル数は 10 蝸牛とした。

4. 研究成果

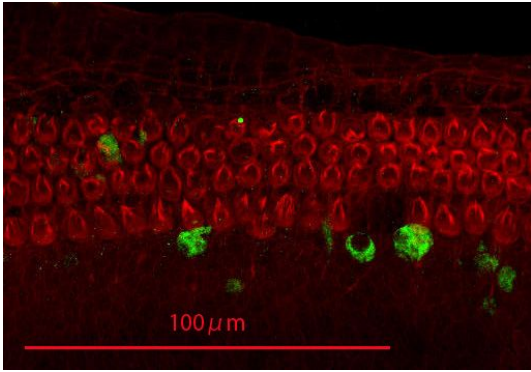
有毛細胞の消失率は CTR 群、GM 群 (Fig 1)、GM+PB (1 μ M) 群、GM+PB (10 μ M) 群、GM+PB (100 μ M) 群 (Fig 2)、GM+PB (1mM) 群でそれぞれ 1.5 ± 0.5 , 40.8 ± 2.3 , 36.9 ± 0.7 , 27.2 ± 1.4 , 16.6 ± 2.4 , $24.1 \pm 2.0\%$ (average \pm SD) であった。

多重比較によるすべての群間の統計学的検討では CTR 群とその他の群間に有意差を認めた。GM 群と GM+PB 群を比較すると GM+PB (100 μ M) 群は他の群より有意に有毛細胞保護効果があった (GM 群と比較して $P = 0.031$) (Fig 3)。アポトーシスの誘発の程度は CTR 群、GM 群 (Fig 1)、GM+PB (1 μ M) 群、GM+PB (10 μ M) 群、GM+PB (100 μ M) 群 (Fig 2)、GM+PB (1mM) 群でそれぞれ 0.5 ± 0.5 , 22.8 ± 6.8 , 19.4 ± 0.6 , 18.3 ± 1.1 , 9.5 ± 2.9 , $15.5 \pm 1.5\%$ (average \pm SD) であった。多重比較によるすべての群間の統計学的検討では CTR 群とその他の群間に有意差を認めた。GM 群と GM+PB 群を比較すると GM+PB (100 μ M) 群は他の群より有意にアポトーシス抑制効果があった (GM 群と比較して $P = 0.035$) (Fig 4)。

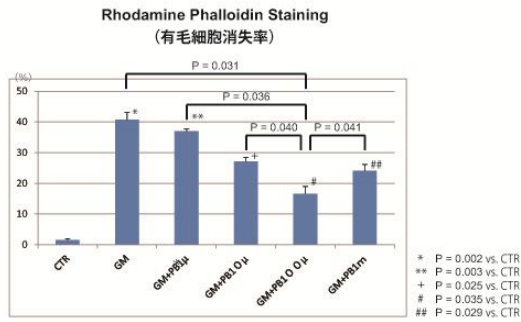
(Fig 1) GM 群: rhodamine phalloidin (赤)、active caspase-3 (緑)



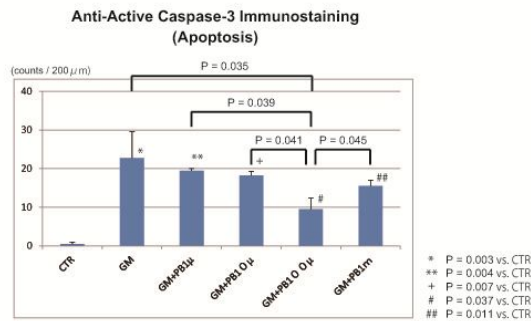
(Fig 2) GM+PB(100 μ M)群 : rhodamine phalloidin (赤) active caspase-3 (緑)



(Fig 3)



(Fig 4)



GM 群と比較して GM+PB (100 μ M) 群で

は統計学的に有意な有毛細胞保護作用、アポトーシス抑制効果を認めた。しかし本研究で (1mM) では完全な容量依存性を示すことはできず、プロブコールの作用には至適濃度があることが示された。プロブコールによるアポトーシス抑制効果はプロブコールの強力な抗酸化作用によって MAPK キナーゼカスケードの活性化が抑制され、アポトーシス誘導が抑制されたものと推測されるが、本研究ではこの具体的証明にまでは至らなかった。今後の検討課題と考えられる。しかしながら本研究ではプロブコールにはアミノグリコシド系抗生剤によって惹起される内耳有毛細胞障害 (アポトーシス) を抑制し内耳有毛細胞保護効果があることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等 (雑誌論文) (計 4 件)

Kakigi A, Takubo Y, Egami N, Kashio A, Ushio M, Sakamoto T, Yamashita S, Yamasoba T. Evaluation of the internal structure of normal and pathological Guinea pig cochleae using optical coherence tomography. *Audiol Neurootol*. 2013;18(5):335-43.

Kinoshita M, Sakamoto T, Kashio A, Shimizu T, Yamasoba T. Age-related hearing loss in Mn-SOD heterozygous knockout mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:325702.

Egami N, Kakigi A, Sakamoto T, Takeda T, Hyodo M, Yamasoba T. Morphological and functional changes in a new animal model of Ménière's disease. *Lab Invest*. 2013 Sep;93(9):1001-11.

Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and

mechanistic pathways. Hear Res. 2013

Sep;303:30-8.

〔学会発表〕(計 1件)

坂本幸士、櫻尾明憲、安井拓也、狩野章太郎、
柿木章伸、山嵜達也
外耳道閉鎖症の術後聴力に影響を及ぼす因子に関する多重ロジスティック回帰分析による検討
第21回日本耳科学会
2011年11月24日-26日 宜野湾市 沖縄県

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 幸士 (Sakamoto Takashi)
東京大学 医学部附属病院 耳鼻咽喉科・講師
研究者番号: 50323548

(2) 研究分担者

柿木 章伸 (Kakigi Akinobu)
東京大学 医学部附属病院 耳鼻咽喉科・講師
研究者番号: 60243820