

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：23791880
研究課題名(和文)内耳治療に向けてのウロキナーゼ抗アポトーシス作用の検討

研究課題名(英文)Application of urokinase for inner ear therapy

研究代表者

榎尾 明憲 (Kashio, Akinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20451809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ウロキナーゼは血栓溶解薬として臨床応用されている薬剤であるが、近年その抗アポトーシス効果が報告されるようになってきた。今回我々は、ウロキナーゼの内耳アポトーシス予防効果を検討した。内耳有毛細胞培養系にてアミノ配糖体によるアポトーシスをウロキナーゼが予防することを示した。同時にウロキナーゼ投与がアポトーシス経路のP38を活性化することを示しメカニズムの一部を示した。らせん神経節培養系を用い、グルタミン酸投与によるアポトーシスも抑制することも証明した。以上の結果は今後の内耳治療の一つの選択肢として期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Urokinase is a drug used clinically as a thrombolytic agent. Recently, the anti-apoptotic effect of the urokinase has been reported. In this study, we have examined whether urokinase has the anti-apoptotic effect to the inner ear cells. We have shown that urokinase attenuated the inner ear hair cell death caused by aminoglycoside using the cochlear organotypic cultures. Expression of P38 could be seen in those who had given urokinase concomitantly with aminoglycoside, which suggested that urokinase showed antiapoptotic effect by activating the p38 MAPK pathway. We also showed that urokinase decreased the spiral ganglion cells death caused by glutamate. These result showed that urokinase could be one of a promising drug for the inner ear therapy in future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：ウロキナーゼ アポトーシス MAPK 内耳有毛細胞 らせん神経節細胞

1. 研究開始当初の背景

内耳障害は騒音、薬剤（アミノ配糖体・シスプラチン製剤）、血流不全、手術中の機械的損傷など様々な原因によって起こるが、いずれにおいてもアポトーシスによる有毛細胞の障害が重要な役割を果たしていることが最近の研究から分かってきている（Forge and Schah 2000, Matusui et al 2002, Adrien a et al, Clifford RE 2009）。内耳領域の治療戦略としてのアポトーシスの制御は極めて重要な課題であるといえる。今回我々は、ウロキナーゼに着目し、その効果を検討する。ウロキナーゼ(uPA)は血栓溶解剤として臨床応用されている薬剤である。この薬剤は近年の研究でウロキナーゼレセプター（uPAR）に作用後、MAPK/ERK経路に作用してアポトーシスを抑制することが解明されつつある。具体的には乳がん細胞でのアポトーシス抑制が示されており(Maz et.al 2001)、逆に uPAR の阻害剤にてメラノーマのアポトーシスが促進されることが報告されている（Besch R et.al. 2007）。ただし、腎臓メサンギウム細胞を用いた実験での場合は uPA はアポトーシスの刺激によりアポトーシスを抑制する場合も促進する場合もありうると報告されておりこの薬剤のアポトーシスに対する効果はまだ解明すべき点が残されている（Tkachuk N et.al. 2008）。

2. 研究の目的

1. ウロキナーゼの内耳有毛細胞に対するアポトーシス抑制効果・作用機序の確認。

内耳培養細胞系を用いて、アミノ配糖体によるアポトーシス障害モデルを作製し、ウロキナーゼ・ウロキナーゼ阻害剤を添加した際の、細胞障害の変化。アポトーシス関連酵素の発現の変化を確認する

2. ウロキナーゼのらせん神経節細胞に対するアポトーシス予防効果の確認。

らせん神経節に対してグルタミン酸を投与、アポトーシスを起こさせここにウロキナーゼを投与した場合らせん神経節の障害を軽減できるかを検討する。

3. 研究の方法

1-1.

ウロキナーゼ投与下、内耳有毛細胞のアミノ配糖体に対する傷害性の比較

P4 幼若SDラットを用い蝸牛、コルチ器を摘出培養を行った。コントロール、硫酸カナマイシン（KM）+ウロキナーゼ投与群、KM+ウロキナーゼ・ウロキナーゼインヒビター投与群そしてKMのみ投与群の4群に分けて12時間30分の細胞培養を行った。コントロール群は通常の培養液で培養。KM+ウロ

キナーゼ投与群・KMのみ投与群は実験開始30分後より3.5mg/mlの濃度のKM・および2μMのウロキナーゼ濃度化の培養液に変更の上12時間培養を継続した。KM+ウロキナーゼ・ウロキナーゼインヒビター投与群では、先ず30分間ウロキナーゼインヒビター濃度10μg/mlの培養液にて培養後、KM+ウロキナーゼと同等の培養液に変更し12時間培養を継続した。培養後ホルマリンにて固定、ロダミン・ファロイジンにて染色を行い顕微鏡下に生存有毛細胞をカウントした。

1-2.

P3-4 幼若SDラット蝸牛コルチ器を摘出し、KM・ウロキナーゼ投与下で培養6時間後にホルマリンにて固定。MAPK経路の代表的シグナルであるERK・P38・JNK抗体で染色を行いその発現を検討した。KMは3.5mg/mlの濃度、ウロキナーゼは2μMとした。

1-3.

P3-4 幼若SDラット蝸牛コルチ器を摘出し、KM・ウロキナーゼ投与と同時にP38インヒビターの投与を行った。P38投与群は10μM(低濃度群)もしくは100μMのP38濃度の培養液で培養開始より2時間培養した。非投与群は通常培養液下で2時間培養。その後ウロキナーゼ(2μM)・KM(3.5mg/ml)投与下で12時間培養。ホルマリンにて固定、ロダミン・ファロイジンにて有毛細胞を染色・有毛細胞の障害に変化があるかどうかを検討した。

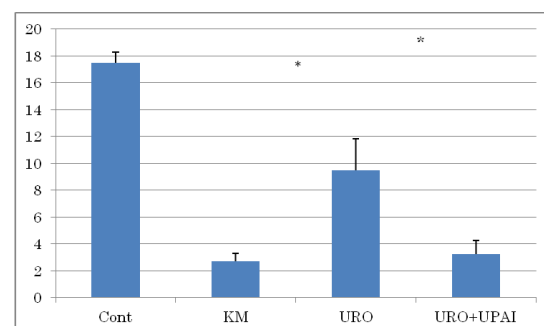
2.

P3-4 幼若SDラット蝸牛らせん神経節を摘出、分散培養を行った。12時間の培養の後、3時間、ウロキナーゼ1μg/mlの濃度の培養液下で培養する群と、通常の培養液で培養した群を作成し、その後グルタミン200μMの濃度の培養液で培養。12時間後にホルマリンにて固定残存らせん神経節細胞数を比較検討した。

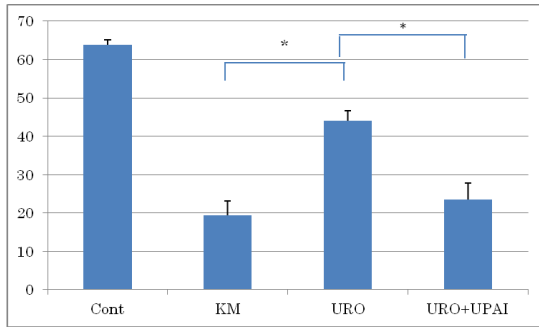
4. 研究成果

1-1.

内毛細胞・外毛細胞ともに、ウロキナーゼ(URO)の投与によりKMによる細胞障害の軽減を認めた。一方でウロキナーゼインヒビター(UPAI)を投与した場合はKMによる細胞障害の軽減は認められなかった。



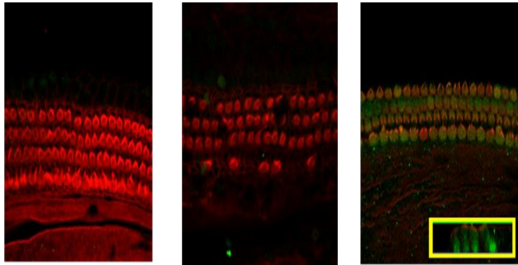
内毛細胞カウント



外有毛細胞カウント

1-2.

ウロキナーゼ投与下で P38 の発現を認めた。ERK, JNK については有意な染色を見つけることができなかった。このことからウロキナーゼが P38 の経路を活性化させることで、KM によるアポトーシスに対して抑制的に働くことが示唆された。ただし、アミノ配糖体において P38 はアポトーシス促進的に働くシグナルであるという報告もあり、この解釈には今後さらなる検討が必要と思われる。



Control

KM投与群

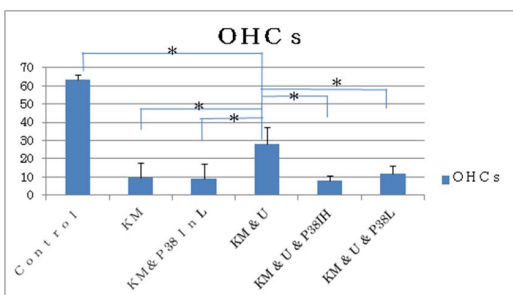
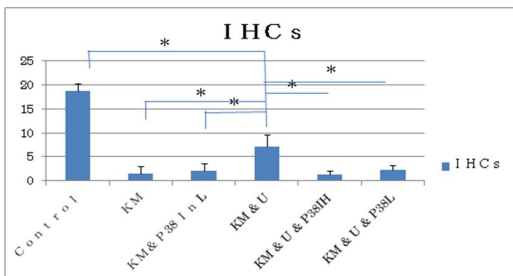
KM+ウロキナーゼ
投与群

P38 による染色 (緑)

黄色枠内はコルチ器断面画像

1-3

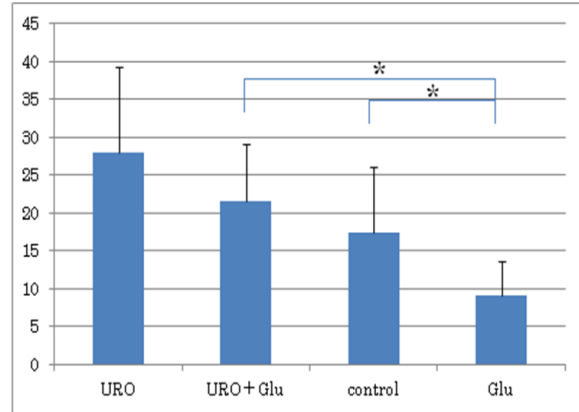
P38 インヒビター投与下では、内毛細胞・外毛細胞いずれにおいても、KM 投与下、ウロキナーゼによる細胞障害の抑制効果が阻害された。このことは P38 がアポトーシス抑制的に働くことを示唆している。



2.

らせん神経節細胞においてもグルタミン酸投与下でウロキナーゼの投与が細胞死抑制的に働くことが分かった。

このことはウロキナーゼが有毛細胞のみならずらせん神経節細胞に対しても有効であることを示唆している。



5 . 主な論文発表など

〔学会発表〕(計 3 件)

樫尾明憲 山嵜達也. 耳科基礎研究のトピックス 内耳タンパク治療 PTD 技術による内耳領域への応用 日本耳科学会総会 2011 年 11 月 24-26 日 沖縄

Akinori Kashio, Takashi Sakamoto, Shotaro Karino, Akinobu Kakigi, Shinichi Iwasaki, Tatsuya Yamasoba. Preoperative evaluation of round window niche visualization from facial recess by high resolution computed tomography. AAO-HNSF 2013 年 9 月 29 日 ~ 10 月 2 日 Vancouver Canada

Akinori Kashio, Viral Tejani, Rachel Schepeler, Carolyn Brown, Paul Abbas. Exploring the Source of Neural Responses in Cochlear Implant Users. AAS 2014 年 3 月 7 日 ~ 3 月 9 日 Arizona USA

〔図書〕(計 11 件)

1. Ichikawa K, **Kashio A**, Mori H, Ochi A, Karino S, Sakamoto T, Kakigi A, Yamasoba T. A new computed tomography method to identify meningitis-related cochlear ossification and fibrosis before cochlear implantation. Otolaryngol Head Neck Surg. 150,646-53, 2014

2. 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 Neurotol.* ;18(5): 335-343, 2013
3. 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 Ahead of print
 4. Narushima M, Yamasoba T, Iida T, Sakamoto T, **Kashio A**, Karino S, Yamamoto T, Kikuchi K, Mihara M, Koshima I. Supermicrosurgical reconstruction for congenital aural atresia using a pure skin perforator flap: concept and long-term results. *Plast Reconstr Surg.* ;131(6): 1359-66, 2013
 5. Yamasoba T, Lin FR, Someya S, **Kashio A**, Sakamoto T, Kondo K. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear*
 6. Suzuki M, Iwamura H, Kashio A, Sakamoto T, Yamasoba T. Short-term functional and morphological changes in guinea pig cochlea following intratympanic application of Burow's solution. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 12,67-72, 2012
 7. Kashio A, Sakamoto T, Kakigi A, Suzuki M, Suzukawa K, Kondo K, Sato Y, Asoh S, Ohta S, Yamasoba T. Topical application of the antiapoptotic TAT-FNK protein prevents aminoglycoside-induced ototoxicity. *Gene Ther.* 191141-9, 2012
 8. Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, Yamasoba T. Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *J Control Release.* 112,152-7,2012
 9. Iwasaki S, Egami N, Fujimoto C, Chihara Y, Ushio M, Kashio A, Yamasoba T. The mitochondrial A3243G mutation involves the peripheral vestibule as well as the cochlea. *Laryngoscope.*, 121.1821-4, 2011
 10. Kashio A, Ito K, Kakigi A, Karino S, Iwasaki S,

Sakamoto T, Yasui T, Suzuki M, Yamasoba T. Carhart notch 2-kHz bone conduction threshold dip: a nondefinitive predictor of stapes fixation in conductive hearing loss with normal tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 137. 236-40,2011

図書

【聴覚-分子機構から先端治療まで】内耳の病態と治療 酸化ストレスと老人性難聴 中外医学社 *Clinical Neuroscience* 1372-1375, 2011

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
 榎尾明憲（KASHIO AKINORI）
 東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 20451809