

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791771

研究課題名(和文)プロスタグランジンE受容体サブタイプEP2、EP3の聴覚機構における役割の解明

研究課題名(英文)Roles of prostaglandin E-type receptor 2 and 3 in the auditory function

研究代表者

松永 麻美(MATSUNAGA, Mami)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：00599524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蝸牛におけるプロスタグランジンE受容体サブタイプの役割を生理的条件下および病的条件下で解析することにより、蝸牛におけるプロスタグランジンEシグナルの役割を解明し、新規治療法開発に応用可能な知見を得ることを目的とした。EP2ノックアウトマウスを用いた解析により、生理的条件下ではEP2遺伝子欠損が聴覚機能に大きな影響を及ぼさないこと、音響外傷および加齢に伴う難聴を増強する効果がないことが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to explore the physiological roles of prostaglandin E-type receptor or subtypes in auditory function. First, we examined auditory function of EP2-deficient mice in normal condition in comparison with littermates, which showed no significant effect of genetic deletion of EP2 on auditory function in normal condition. Next, effects of noise exposure and aging in EP-deficient mice were investigated. EP2 deficiency did not accelerate either noise-induced or age-related hearing loss. These findings indicate that EP2 may not play key roles in the development and maintenance of auditory function.

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：感音難聴 トランスレーショナル研究 プロスタグランジン 有毛細胞

## 1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン E 製剤が突発性難聴治療に使用されているが、その作用機序には不明な点が多い。本研究では、蝸牛におけるプロスタグランジン E 受容体サブタイプの役割を生理的条件下および病的条件下(音響外傷)で解析することにより、蝸牛におけるプロスタグランジン E シグナルの役割を解明し、新規治療法開発に応用可能な知見を得ることを目的とする。

プロスタグランジン E1 製剤は、これまでに突発性難聴治療に用いられてきた薬物である。しかし、これまでに行われた臨床研究では、その治療効果について否定的な結果を示すものが多い(Agarwal and Pothier 2009)。しかしながら、Ogawa et al.は、高音域の回復が良好である傾向と著明回復を示す症例が存在することを報告しており(Ogawa et al., 2002)、明確なエビデンスにサポートされた治療法とはいえないが、その臨床的な効果を完全に否定することはできないというのが現状である。過去のプロスタグランジン E1 および 2 の蝸牛に対する効果は、循環障害改善を中心として、展開されてきた(Nakashima et al., 2003)。

プロスタグランジン E については、受容体のサブタイプとして EP1-4 の 4 つが存在することが報告されている(Sugimoto and Narumiya 2007)。これらの受容体は、細胞内情報伝達系、効果発現について、ユニークな特徴を持つ。EP1 は、細胞内カルシウム濃度を上昇させ、血管系に対しては収縮効果を示す。EP2 と EP4 は、細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、血管拡張の方向に働く。一方、EP3 は、細胞内 cAMP 濃度を低下させ、血管収縮を誘導する。このように、各サブタイプは、時に拮抗的に働くことから、これらの受容体の発現パターンがプロスタグランジン E の各器官での主たる効果を決定づけると考えられている(Legler et al., 2010)。神経系での EP1-4 の働きについて注目すると、EP1 および EP3 は toxic に働き、EP4 は protective に働くことが多い(Anderasson 2010)。EP2 については、詳細な検討がなされており、興奮性アミノ酸毒性や虚血などの急性傷害においては protective に作用するが、慢性炎症では toxic に働くことが知られている(Anderasson 2010)。このように、病態に応じて効果が変化する場合があるが、主たるメカニズムとしては、病態に応じて、標的となる細胞が変化することが指摘されている。EP2 は神経細胞に直接働く場合 protective だが、慢性炎症では microglia に作用し、炎症反応が増強される。

蝸牛におけるプロスタグランジン研究は、十分になされているとはいえないが、いくつかの報告が認められる(review by Nakagawa 2011)。蝸牛で最も多く作られているプロスタグランジンは、プロスタグランジン E2 とされている(Kawata et al., 1988)。プロ

スタグランジン産生の上流にある COX-1,2 が蝸牛に発現していることが示されており、蝸牛の生理的機能および病態にプロスタグランジン E が関与していることが推察できる。また、プロスタグランジン E 受容体のサブタイプである EP1-4 の蝸牛での発現も報告されており(Stjernschantz et al., 2004; Hori et al., 2009; 2010)。中枢神経系と同様に、蝸牛の様々な病態に EP1-4 が関与していることが推察される。EP1-4 は、蝸牛感覚上皮、ラセン神経節、血管条といった蝸牛機能において重要な役割を果たす細胞に発現している。われわれは、これまでに主に EP4 の蝸牛における役割についての研究を、循環改善ではなく、有毛細胞など蝸牛の細胞に対する直接的な効果に着目した研究を展開してきた。EP4 ノックアウトマウスは、生理的条件下で、軽度ではあるが有意の聴力低下を示し、音響外傷による聴力低下および外有毛細胞喪失が増強された(Hamaguchi et al., 2012)。薬物で EP4 を抑制した場合にも、同様に音響外傷が増強される結果が認められ、EP4 作動薬投与では逆に音響外傷が軽減されることが判明した(Hamaguchi et al., under review)。これらの結果は、EP4 が蝸牛機能に関与しており、音響外傷に対する防御機構に重要な役割を果たすことを示している。EP4 作動薬による音響外傷に対する防御効果は、モルモットでも認められている(Hori et al., 2009)。さらに、EP4 作動薬によりラセン神経節細胞での vascular endothelial cell growth factor の産生が増加することが報告されている(Hori et al., 2010)。

## 2. 研究の目的

本研究では、EP2 および EP3 に焦点をあて、蝸牛における EP2、EP3 の役割を解析することにより、プロスタグランジン E-EP シグナルの蝸牛における役割を解明することにある。これまでの蝸牛における EP4 の役割に関する研究結果は、同じシグナル伝達経路を持つ EP2 も同様の作用を持つことを示唆し、逆向きのシグナル経路を持つ EP3 が拮抗的な作用を持つことを想起させる。生理的条件下での EP2 および EP3 ノックアウトマウスの聴覚機能解析に加え、EP2 ノックアウトマウスにおいて EP4 阻害薬を投与した場合の聴覚機能を解析する。また、音響外傷モデルを用いて、遺伝的欠損の効果に加え、薬物による活性化、阻害を組み合わせ、音響外傷におけるプロスタグランジン E-EP シグナルの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

1) EP2 ノックアウトマウスの聴覚機能解析  
4-10 週齢の EP2 ノックアウトマウス、ヘテロ、ワイルドタイプを用い、聴性脳幹反応、誘発耳音響放射による聴覚機能解析を行い、蝸牛採取し、有毛細胞を中心とした形態学的解析を行った。

## 2) EP2 ノックアウトマウスの音響外傷に対する脆弱性解析

音響外傷モデル構築のために 8 kHz の純音を用い、110 dB, 1h; 105 dB, 1h; 100 dB, 2h; 100 dB, 1h の合計 4 モデルをワイルドタイプマウスを用い、各群 3 - 4 匹を用いて、聴性脳幹反応閾値の経時的变化を評価し、ワイルドタイプでの一過性閾値上昇を示す条件を策定することを目的とした。一過性閾値上昇クライテリアとして、音響曝露 24 時間後に 15 dB 以上の閾値上昇が認められ、2 週間後に 10 dB 以内に閾値が回復している状態と定義づけた。

上記実験で決定した音響曝露条件を用い、EP2 ノックアウトマウス、ワイルドタイプを用いた実験を行った。音響曝露 2 週間後の聴覚閾値を聴性脳幹反応にて決定し、同時に誘発耳音響放射による聴覚機能解析を行った。機能解析終了後、蝸牛有毛細胞に関する形態学的解析を行い、残存有毛細胞数の比較を行った。

## 3) EP2 ノックアウトマウス聴力に対する加齢の影響

音響外傷以外の病的な条件として加齢性難聴についての検討を行った。週齢 4、12、48 での聴性脳幹反応閾値をワイルドタイプ、ホモの間での比較検討を行った。

## 4) 蝸牛内有毛細胞求心性神経終末変性モデル作製

有毛細胞障害以外でのフェノタイプ解析として、蝸牛内有毛細胞求心性神経終末変性に着目し、invitro でのモデル作製を新生マウス器官培養を用いて行った。蝸牛内有毛細胞求心性神経終末変性誘導のための薬物として興奮性アミノ酸であるカイニン酸および N メチル D アスパラギン酸 (NMDA) を用い、薬物濃度、曝露時間に関する至適条件決定のための解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) EP2 ノックアウトマウスの聴覚機能解析

10、20、40 kHz の周波数について聴性脳幹反応閾値を検討した。ワイルドタイプ (WT) 8 匹、ヘテロ (HT) 17 匹、ノックアウト (KO) 10 匹を用いた。各周波数別の結果を図 1-3 に示す。すべて縦軸は聴覚閾値 (dB SPL) を示す。結果、すべての周波数で各群間に有意の差は認められなかった。

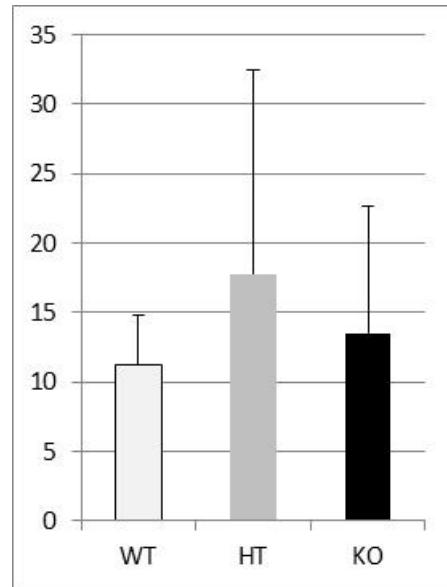


図 1 : 10 kHz

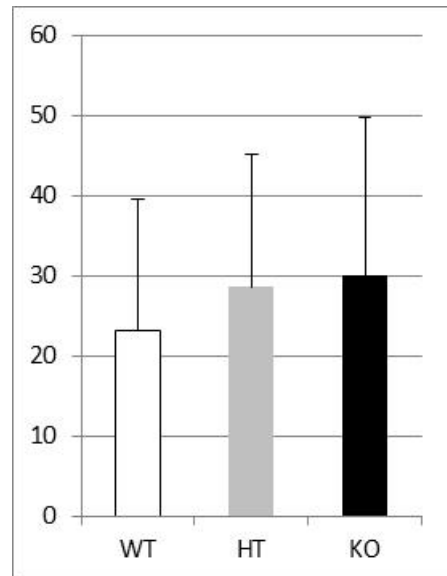


図 2 : 20 kHz

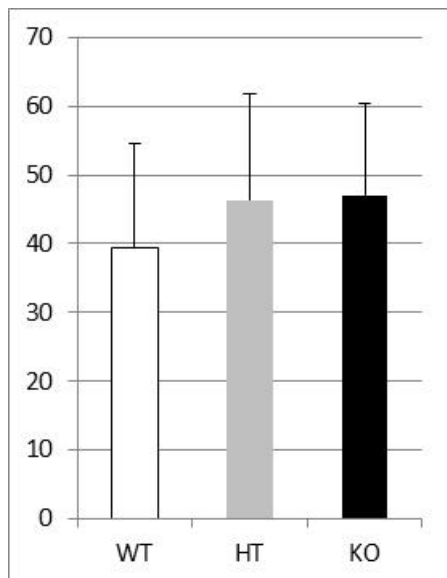


図 3 : 40 kHz

また、誘発耳音響放射でも各群間に差は認められなかった。

以上の結果から、EP2 欠損のみでは、明らかな聴覚機能障害は誘導されないと考えられた。

## 2) EP2 ノックアウトマウスの音響外傷に対する脆弱性解析

ワイルドタイプで一過性閾値上昇が認められる音響曝露条件について解析した。すべて 8 kHz band noise とし、音圧と曝露時間を変えて検討した。音圧は、100-110 dB SPL とし、曝露時間は 1-2 時間とした。結果、100 dB SPL、2 時間が最も安定した条件であることが判明した。

次に、この条件での音響曝露をワイルドタイプとノックアウトマウスに行い、音響曝露後の聴性脳幹反応閾値変化を曝露 2 週間後まで経時的に観察した。各群 4 匹とした。結果、実験群が聴覚閾値に有意の影響を与えないことが示唆された。また、ノックアウトマウスにおいても聴覚閾値上昇は一過性であり、音響曝露 2 週間後には、すべての動物で 10-40 kHz の周波数で曝露前閾値に回復が認められた。以上の結果から、EP2 ノックアウトマウスでは、EP4 ノックアウトマウスと異なり、音響外傷に対する脆弱性を持たないことが示唆された。

## 3) EP2 ノックアウトマウス聴力に対する加齢の影響

EP2 ノックアウトマウスとワイルドタイプ各 4 匹を用い、加齢に伴う聴力変化を解析した。各周波数別に図 4-6 に示す。縦軸は聴覚閾値 (dB)。

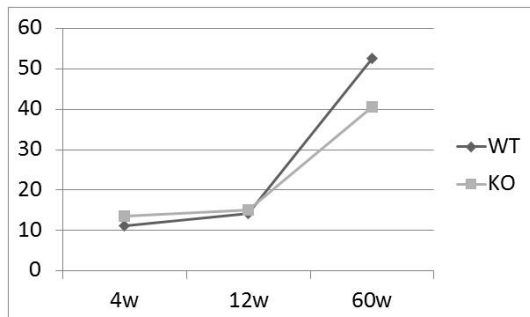


図 4 : 10 kHz

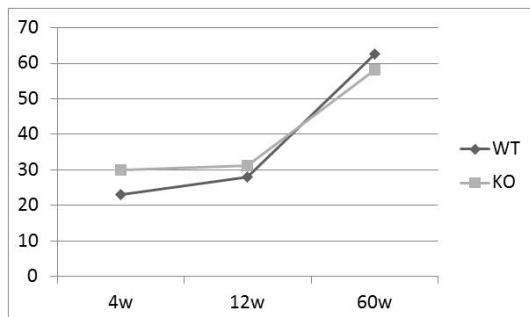


図 5 : 20 kHz

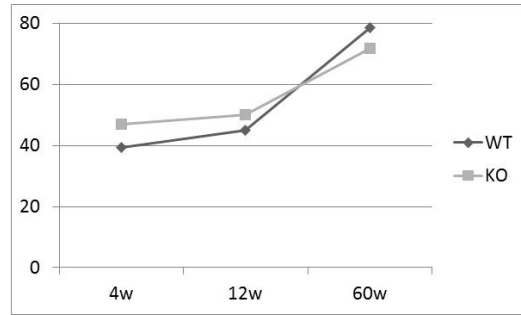


図 6 : 40 kHz

各週端数ともに実験群が聴覚閾値変動に与える有意の効果は認められなかった。したがって、加齢による蝸牛変性にも EP2 は大きな関与をしないことが示唆された。

## 4) 蝸牛内有毛細胞求心性神経終末変性モデル作製

生後 1 日目のマウス蝸牛感覚上皮を摘出した器官培養実験を行った。24 時間培養後、カイニン酸および NMDA を濃度、培養時間を変え、内有毛細胞求心性神経終末におけるリボンシナプス消失と自発的な修復再生の過程を解析した。設定した至適条件は、有毛細胞が残存している、ラセン神経節細胞が減少していない、不可逆的なリボンシナプス減少が生じるという条件である。結果、濃度 0.5mM で 8 時間培養により、上記条件を満たす内有毛細胞求心性終末変性モデルが得られることが分かった。

## 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

松永 麻美 (MAMI, Matsunaga)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：00599524

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：