

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462626

研究課題名(和文) イノシトール3リン酸レセプターをレドックス制御する新規タンパクの内耳発現形態

研究課題名(英文) Oxidative stress and redox regulation - a brand new protein in an inner ear -

研究代表者

高橋 克昌 (Katsumasa, Takahashi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30326839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体において酸化と抗酸化のバランスが崩れ、活性酸素が蓄積する状態を酸化ストレスと言う。レドックス制御は生体の恒常性を保つのに不可欠であり、新規タンパクの内耳での発現を調べた。癌や感染症では、白血球の産生する過剰な活性酸素のために酸化ストレスが蓄積する。癌患者と中耳炎手術患者において酸化ストレスの状態を評価した。血清中の酸化ストレスはdROMで、抗酸化力=還元力はBAPで測定した。癌は中耳炎と比較して、有意にdROMが高値を示した。BAPは両者に差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is an imbalance between the production and the elimination of oxidant species. In cancer and infection, white blood cells overproduce reactive oxygen species, causing the oxidative stress. In the present study, we evaluated the oxidative stress in patients with cancer, and compared the relationship between the oxidative stress and the number of white blood cells (WBC). The diacron-reactive oxygen metabolite (dROM), which indicated the concentration of hydroperoxides in serum, was measured as an index of oxidative stress. The biological antioxidant potential (BAP), which indicated the concentration of deoxidized iron ion in serum, was also measured as an index of anti-oxidative status. We compared head and neck carcinoma patients (HNC) who were treated by chemotherapy and otitis media patients (OM) who had surgery. The dROM was significantly high in HNC, although dROM in OM was normal.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：レドックス 酸化ストレス イノシトール3リン酸レセプター 活性酸素 dROM BAP

1. 研究開始当初の背景

細胞への過剰なストレスは、アポトーシスを引き起こす。ストレス応答装置として、細胞内小器官である小胞体が重要な役割を果たしている。特にイノシトール3リン酸レセプター (IP3R) は、細胞外刺激に応じて小胞体内に蓄積されるカルシウムイオンを細胞質へ放出するが、ストレスに反応して神経細胞死を防御することが明らかになった。

近年報告された新規タンパク質 ERp44 は、細胞内の酸化還元調節 (レドックス制御) によって IP3R 活性を制御することが分かっていた。細胞内の反応を生体レベルで調べるために、血清中のタンパクでレドックス制御を推測するマーカーが必要とされていた。

2. 研究の目的

(1) ミクロな視点では、細胞のストレス応答と酸化還元の関係性を明らかにし、(2) マクロな視点では、疾患と酸化還元ストレスの関わりを調べようとした。

(1) 内耳有毛細胞における IP3R と ERp44 の発現を、免疫染色とカルシウムシグナルの可視化で明らかにする。

(2-1) 患者血清の酸化ストレス状態を把握し、疾患の重症度との関係性を明らかにする。

(2-2) 唾液中ヘルペスウイルス DNA 量を測定し、肉体的ストレスを定量化する。

3. 研究の方法

(1) IP3R と ERp44 の内耳発現

ネブタール腹腔内投与で麻酔した生後 1 か月の BALB/c マウスを断頭し、顕微鏡下で内耳有毛細胞を膜迷路ごと摘出した。4%パラフォルムアルデヒドで 4 時間の固定後、Surface preparation 法で有毛細胞を 1 次抗体と反応させた。1 次抗体は抗 IP3R 抗体と抗 ERp44 抗体を使用し、冷暗所で一晚反応させた。Buffer 洗浄後に FITC 蛍光標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。退色防止剤でスライドグラスに封入し、蛍光倒立顕微鏡で観察した。

(2-1) 酸化ストレスの測定

活性酸素によって血清タンパクが酸化されて生じたヒドロペルオキシド (ROOH) 濃度を、呈色反応で計測した (dROM)。単位は CARR-U で、1 CARR-U は過酸化水素水 0.08mg/ml の持つ酸化力に相当した (正常 200-300 CARR-U)。血清タンパクが持つ活性酸素に抗する還元力を計測した (BAP)。単位は $\mu\text{Eq/L}$ で、健康人の平均値は 2124 $\mu\text{Eq/L}$ であった。酸化ストレスが蓄積している対象症例として頭頸部癌患者を、酸化ストレスが弱い比較症例として中耳炎の手術

患者を比較検討した。

dROM は、活性酸素によって血清タンパクが酸化されて生じたヒドロペルオキシド (ROOH) 濃度を、呈色反応で計測するものである。血清を酸性緩衝液で希釈すると、酸化ストレスで生じた ROOH が分解され、ROO- が産生される。これに無色の呈色液クロモゲン (芳香族アミン N, N-ジエチルパラフェニレンジアミン) を加えると、呈色液が酸化されて有色 (紫) のラジカル陽イオンになる。光度計を備えた専用機器で 505nm の吸光度の変化量を測定し、標準曲線と比較することで血清の ROOH 濃度が計測される。

BAP は、血清タンパクが持つ活性酸素に抗する還元力を計測するものである。血清を有色 (赤茶) の 3 価の鉄イオンを含む呈色液 (チオシアン酸塩) と混ぜると、呈色液が還元されて無色透明な 2 価の鉄イオンに変わる反応を、505nm の吸光度の変化量で測定することで、血清が還元した鉄イオンの量を推測し、抗酸化力の指標になる。

(2-2) 肉体的ストレスの定量

身体に肉体的ストレスが蓄積すると疲労を感じる。疲労の原因は分かっていないが、ホメオスターシスの破綻によって免疫機能が低下し、細胞内に潜んでいるヘルペスウイルスの増殖を抑えきれず、唾液中にその DNA が排出されることが分かっている。特にヒトヘルペスウイルス 6 型と 7 型 (HHV6-7) は、疲労ストレスに特異的である。

ストレスが原因で発症する疾患としてメニエール病 (n=9) をモデルとし、めまい発作時の患者から唾液 2ml を採取した。食後 2 時間以上経過、30 秒の口すすぎの後、1 分間サリベットコットン (Sarsted 社) を噛み、スポンジが吸収した唾液を遠心分離した。QIAmp Virus DNA 抽出キット (Quiagen 社) でウイルス DNA を調整し、HHV6-7 特異プライマーで LAMP 法を用いて増幅した (反応温度 63 度 60 分)。吸光度 0.1 以上を陽性とした。ストレスのない健康成人 (n=6) をコントロールとして比較した。

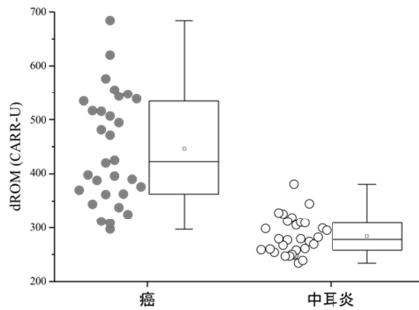
4. 研究成果

(1) IP3R と ERp44 の内耳発現

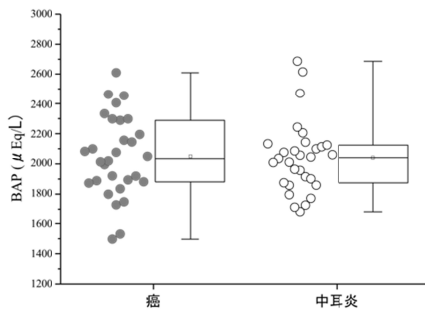
IP3R は内耳有毛細胞の細胞質に発現を認めしたが、支持細胞では染まりが弱かった。IP3R が存在する小胞体の局在と一致すると考えた。ERp44 は、有毛細胞も支持細胞も染まらず、内耳に発現していなかった。脳では両者の染色が同一細胞に見られることから、中枢神経とは異なる発現パターンで、内耳のレドックス制御は、異なる機序が働いていると考えた。

(2-1) 酸化ストレスの測定

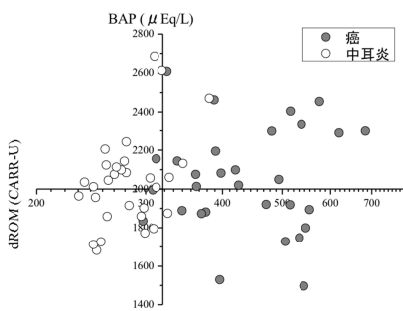
dROM 平均値は癌 450 CARR-U、中耳炎 290 CARR-U で両者は統計学的に有意差があった ($p < 0.001$)。



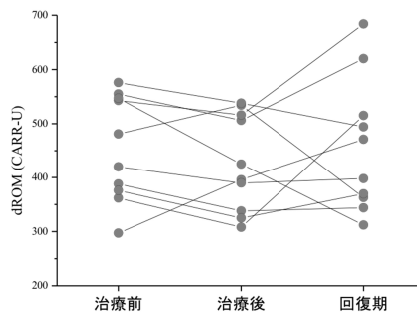
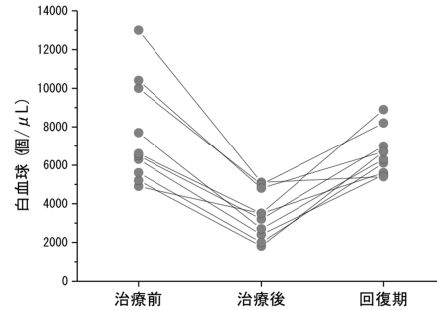
BAP 平均値は癌 2100 μ Eq/L、中耳炎 2190 CARR-U で両者に差はなかった ($p = 0.79$)。



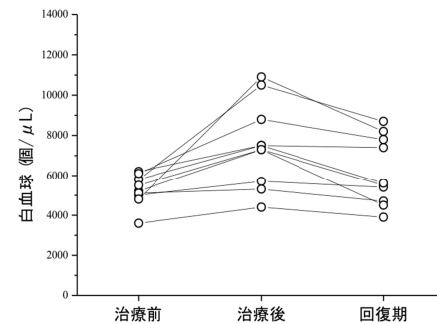
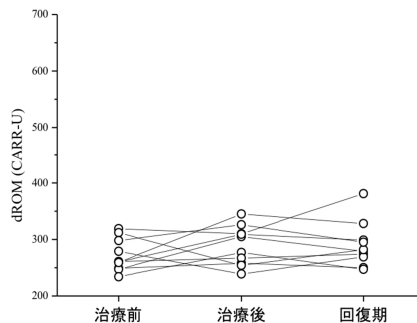
よって、中耳炎と比較して癌では強い酸化ストレスに晒されていることが確かめられた。還元力には差がなかった。



横軸に dROM を縦軸に BAP を取り、軸の交点をそれぞれの正常値としてプロットすると、癌は右側の酸化ストレスが強い面に、中耳炎は左側の酸化ストレスの弱い面に分布した。



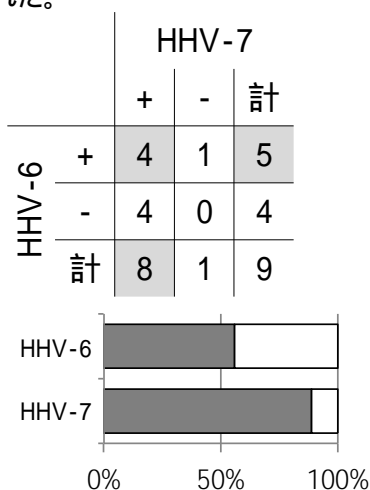
癌では抗癌剤治療に伴い dROM が変化しますが、症例により様々で、治療前、治療後、回復期の比較で差がなかった ($p = 0.790$)。抗癌剤投与による副作用のため治療後は白血球が有意に減少し、2 週間後の回復期には再び増加に転じた ($p < 0.001$)。



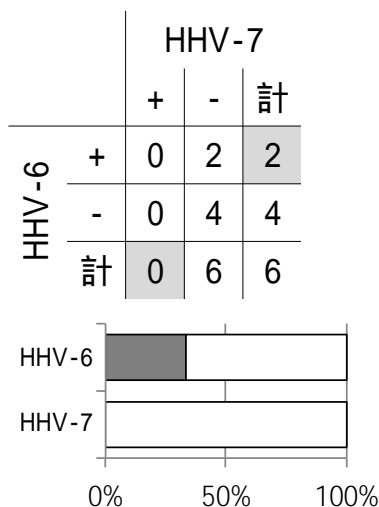
中耳炎では治療に伴う dROM の変化は僅かで、治療前、治療後、回復期の比較で有意差がなかった ($p = 0.468$)。治療 (手術) 後には白血球は増加し、回復期には再び低下する傾向にあったが有意差はなかった ($p = 0.054$)。

(2-2) 肉体的ストレスの定量

メニエール病 9 名中、HHV6 は 5 名、HHV7 は 8 名に陽性だった。両者とも陽性は 4 名だった。多くの症例で唾液中にウイルス DNA が検出された。



健康成人コントロールでは 6 名中 2 名に HHV6 が陽性のみで、多くは唾液中にウイルス DNA が存在しなかった。



ストレスによって唾液中にヘルペスウイルス DNA が検出される様は、沈没船から逃げ出すネズミに例えられる。すなわち、ホメオスターシスの破綻によって細胞死が近づくと、感染していたヘルペスウイルスは急に増殖して、沈没船から逃げだそうとする。メニエール病で顕著だったことから、細胞レベルでのストレスも加わっていることが明らかになった。

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 3 件)

高橋克昌、高安幸弘、近松一朗、頭頸部癌における酸化ストレスの評価、KMJ

THE KITAKANTO MEDICAL JOURNAL、査読有、66、2016、117-121、<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kmj/-char/ja/>

高橋克昌、岡本彩子、新國撰、岡宮智史、紫野正人、高安幸弘、近松一朗、唾液中ヘルペスウイルス DNA 測定によるメニエール病発作の肉体的疲労測定を試み、Equilibrium Research、査読有、74、2015、8-14、

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsr/74/1/74_8/article-char/ja/

高橋克昌、ストレスと耳鼻咽喉科・頭頸部外科、JOHMS、査読なし、31、2015、329-333、

http://www.tokyo-igakusha.co.jp/f/b/index/zc01/7/oa_table/b_z_top.html

〔学会発表〕(計 1 件)

高橋克昌、岡本彩子、新國撰、岡宮智史、紫野正人、高安幸弘、近松一朗、唾液中ヘルペスウイルス DNA 測定によるメニエール病発作の肉体的疲労測定を試み、第 72 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、2013 年 11 月 13 日-15 日、大阪国際交流センター、大阪

〔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

高橋 克昌 (TAKAHASHI、Katsumasa)
群馬大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30326839