

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861380

研究課題名(和文) 色素性乾皮症モデルマウスを用いた進行性感音難聴の病態の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Clarification of pathological condition and therapeutic development of Xeroderma pigmentosum with model mice experiments

研究代表者

小嶋 康隆 (KOJIMA, Yasutaka)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80464270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：色素性乾皮症(XP)における進行性感音難聴の治療戦略をたてる上で、病態を把握するため日本に多いA相補性群(XPA)のモデルマウスを用いて内耳の脆弱性を形態学的および生理学的に評価した。野生型に比べ、XPAマウスは聴性脳幹反応で閾値が上昇し、蝸牛標本においてラセン神経節細胞数も減少していた。これがXPAマウスにおける難聴とラセン神経変性の最初の報告であり、今後の病態解明に多いに資すると考える。

研究成果の概要(英文)：For a treatment strategy for progressive sensorineural hearing loss in Xeroderma pigmentosum (XP), we evaluated a vulnerability of inner ears in XP complementation group A (XPA) model mice morphologically and physiologically. In auditory brainstem response, a hearing threshold of XPA model mice elevated higher than that of control group. In microscopic observation of sacrificed cochlear section, ganglion spiral cochlear cells decreased in XPA model mice. This is a first report on fragile inner ear in XPA model mice, therefore it becomes a cornerstone of inquisition of pathological condition and treatments of progressive sensorineural hearing loss in XP in the future.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：色素性乾皮症 感音難聴 XPAモデルマウス

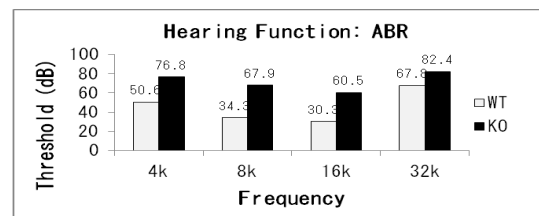
1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum: XP)は紫外線によって生じた DNA 損傷を修復する酵素が欠損しているために、日光露光部に皮膚癌を生じる常染色体劣性遺伝の疾患である。原因となる遺伝子異常の相違から A ~ G の相補性群と variant の計 8 群に分類される。日本に最も多い A 相補性群 (XPA) には、皮膚症状に加え、知能障害、歩行障害、難聴、嚥下障害といった進行性の中樞神経症状・末梢神経症状がみられ、予後も不良である。XPA 群の遺伝子異常による欠損蛋白は、DNA のヌクレオチド除去修復の初期に必要であることが知られており、皮膚症状に関しては前述のように紫外線の影響が明らかであり、遮光や皮膚癌の早期切除といった対処法がある。しかし、神経障害の発生機序については現在も不明であり、有効な治療法は確立されていない。これら神経障害の病態を解明できれば、神経障害の進行を抑える治療法の開発へとつながることが期待される。

XP における進行性感音難聴に対する研究は、これまで生理学的検査と剖検による病理学的検査を基に行われてきた。語音聴力検査と聴性脳幹反応の結果からは内耳性、電気眼振図等からは後迷路性の所見がそれぞれ得られ¹⁾、XPA 群の剖検例では、蝸牛神経のニューロンの萎縮とともに蝸牛基底回転と中回転前半のコルチ器の消失、血管条やらせん神経節の変性も報告されており²⁾、臨床的にも、病理学的にも内耳性と後迷路性との両方に障害がある可能性が指摘されているが、未だ結論は得られていない。

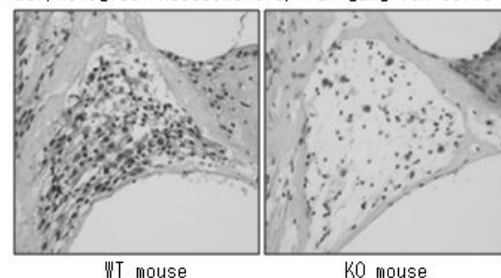
2. 研究の目的

本研究は色素性乾皮症における進行性感音難聴の病態を明らかとし新たな治療法の開発を目的とする。XPA モデルマウスを用いて、内耳障害の脆弱性を形態学および生理学的に評価する。今回の研究で用いる XPA モデルマウスは、DNA ヌクレオチド除去修復を司る色素性乾皮症 A 相補性群遺伝子をノックアウトされた個体であり、実際に紫外線により皮膚癌が発生しやすいという点でヒト症例と同様の特徴を有している³⁾⁴⁾。内耳機能障害をはじめとする神経症状に関する研究は未だ報告されていないが、我々の予備実験において、XPA モデルマウスは野生型マウスに比し聴力閾値の上昇及びラセン神経節細胞死の増加傾向を認めた (図 1、図 2)。



【図 1 予備実験における ABR 閾値】

Morphological Assessment spiral ganglion cells



【図 2 予備実験におけるラセン神経節細胞の違い】

このマウスの内耳機能の加齢性変化や音響曝露による脆弱性を生理学的・病理学的に

評価することで、神経障害の病態の解明ならびに治療法の開発の糸口となることを見込める。

3. 研究の方法

11匹のC57BL/6Jアルビノマウス(年齢 38~40週)を本研究で使用する。うち6匹はXPA遺伝子欠損マウスで、当初はXPA遺伝子のエクソン4に neomycin cassette sequence をES細胞の手技にのっとして挿入して作られその後交配してできたものである。残る5匹は対照群の野生型を使用する。

(1) ABRによる聴力評価

38~40週齢のXPA群・対照群それぞれのグループに対し、藤田らの報告⁵⁾と同様の手順でABRを施行し聴力評価を行う。波形がぎりぎり認められる最少の音響レベルを聴力レベルとする。

(2) 蝸牛の形態評価

ABR測定後に両群を屠殺して蝸牛を摘出し、HE染色切片を観察し蝸牛形態の評価を行う。

(3) ラセン神経節細胞

上記の標本のうち、蝸牛軸と軸から30 μ m離れた切片をらせん神経節細胞数の評価に用いる。単位面積あたりの型ラセン神経節細胞数を3切片分カウントし平均を算出した。そしてABRの測定値とラセン神経節細胞密度を統計学的に評価する。

4. 研究成果

(1) XPAと野生型のABR結果

本実験ではXPA群の平均聴力4kHz 8kHz 16kHzすべての音域において野生型よりXPAマウスのほうが統計学的に有意に聴力が低下していた。

(2) 蝸牛の形態評価

ラセン神経節細胞とラセン神経は野生型よりXPAマウスで退行していた。

(3) ラセン神経節細胞

野生型よりXPAマウスで型ラセン神経節細胞が減少していた。

このように、XPAマウスは野生型より難聴が早期に進む傾向があった。蝸牛の形態学的評価でXPAマウスではラセン神経節細胞やラセン神経に変性が強いことがわかった。

本実験に関し、雑誌投稿後に当初の予定になかった追加試験を行っている最中である。追加試験の終了期間が現在未定であり、その為詳細な実験結果や病理標本写真の掲載は今回の報告で差し控えたい。

今後は、このモデルマウスを用いて、加齢や音響外傷に対する内耳保護作用を有する薬剤を見いだしていく予定である。投与薬剤については、フリーラジカルスカベンジャーや抗酸化剤、アポトーシス抑制剤などを想定している。これらを経静脈的に投与または蝸牛窓を経由して局所投与し、聴性脳幹反応や病理学的評価、hair cell countなどの方法を用いて最適な薬剤、投与量、投与方法、投与間隔を検討していく。なお、当施設にはOAE

を除き本研究に必要な設備が全て整っており、音響暴露による内耳障害の研究実績も十分に持ち合わせている⁵⁾。本マウスを聴覚障害モデルとしても活用し、内耳機能障害の病態解明や将来的な遺伝子治療の開発・発展に寄与できると確信する。

本研究と関連する臨床的データを蓄積するため、国内における色素性乾皮症研究の代表的施設である神戸大学医学部附属病院皮膚科と連携している。同院皮膚科には本邦の色素性乾皮症患者の1000~1500人のうち約4%にあたる40~50人が定期的に受診している。これらの症例を対象に継時的に各種聴力検査を行い、その変化を横断的・縦断的に観察している。

XPA群は種々の神経障害を合併することが知られており、進行性の難聴によって重度のコミュニケーション障害を来す。精神発達遅滞の正確な評価やQOL向上のために、聴覚障害をコントロールすることは大変意義がある。神戸大学皮膚科学教授の錦織千佳子教授は我が国を代表する色素性乾皮症の権威であり、多数の症例を対象に長期的に聴力像を経過観察できる施設は国内外を通じて他に類をみず、本研究の遂行に最適の環境にある。

<引用文献>

- 1) 西浦美佐子 他．色素性乾皮症A群の神経耳科学的検査所見．耳鼻 42 : 773~777, 1996.
- 2) Viana LM, *et al.* Histopathology of the

Inner Ear in Patients With Xeroderma Pigmentosum and Neurologic Degeneration. *Otology & Neurotology* 34:1230-1236, 2013.

3) Nakane H, *et al.* : High incidence of ultraviolet-B-or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature* vol 377 : 165-168, 1995.

4) de Vries A, *et al.* : Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature*, 377: 169-173. 1995.

5) Fujita T, *et al.* Increased inner ear susceptibility to noise injury in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2012 61(11):2980-6.

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)

投稿中

〔学会発表〕(計1件)

四宮瞳、山下大介、丹生健一

第33回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、ホテルグランヴィア大阪(大阪府) 2015.8.29

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 康隆 (KOJIMA, Yasutaka)

神戸大学・医学研究科・研究員

研究者番号：80464270

(2) 研究分担者

山下大介 (YAMASHITA, Daisuke)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60306785

藤田岳 (FUJITA, Takeshi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90533711

四宮瞳 (SHINOMIYA, Hitomi)

神戸大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：70623081

(3) 連携研究者

錦織千佳子 (NISHIGORI, Chikako)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50198454