

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861395

研究課題名(和文) マウスラセン神経節細胞におけるTis21の細胞保護作用

研究課題名(英文) Protection of spiral ganglion cells by adenoviral mediated overexpression of Tis21 in rodent.

研究代表者

伊勢 桃子 (Momoko, Ise)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20573596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス蝸牛正円窓に対する注入処置が困難であったため、モルモットを用いた。また、難聴化についてはシスプラチンを扱う実験環境が整わなかったため、ゲンタマイシン筋肉注射とエタクリン酸静脈注射による難聴化処置を行った。難聴化処置を行い、Ad-Tis21-GFPを蝸牛正円層より投与し、処置1日後、2週間後、1か月後に聴力評価を行った。2週間後には大きな差異は認めなかったが、1か月後には改善を認めた。また、らせん神経節細胞数カウントを行うと、2週間後、1か月後に明らかな差を認めた。すなわちTis21を内耳に導入することでらせん神経節細胞の保護効果を認め、ひいては難聴の進行抑制効果をもたらすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Our research plan was obliged to modify by technical issues. First, we injected the adenoviral vector into the round window in guinea pig not mouse, because it was difficult for us to inject into the round window in mouse. Second, deafening was demonstrated by gentamicin and ethacrynic acid not cisplatin because of our laboratory environment. Auditory thresholds at one month after deafening were protected by adenoviral mediated overexpression of Tis21, but not at two weeks. The number of spiral ganglion cells in treated group at two weeks and one month after deafening was maintained compared to that in non-treated group. Our results showed Tis21 had an important role to protect spiral ganglion cells against drug-induced hearing loss in guinea pig

研究分野：内耳基礎研究

キーワード：Tis21遺伝子 ラセン神経節細胞 アデノウイルスベクター 遺伝子導入による難聴治療

### 1. 研究開始当初の背景

ラセン神経節細胞は、蝸牛有毛細胞によって機械的エネルギーから電気的エネルギーへと変換された音情報を脳へ伝達するという、聴覚機能において極めて重要な役割を担っている。このラセン神経節細胞は、哺乳類において、一旦傷害を受けると再生することはなく、結果として永続的な感音難聴を引き起こすこととなる。現在実地臨床の場では、高度の内耳性難聴に対して、ラセン神経節細胞を直接刺激する人工内耳が聴覚獲得のために用いられている。つまり、ラセン神経節細胞の生存の有無が人工内耳埋め込み術後の聴取能を握る重要な鍵となる。そこで本研究では、ラセン神経節細胞の発生に関わる因子であり、神経細胞に対して抗アポトーシス作用を有する Tis21 (el-Ghissassi F et al, Oncogene, 2002, Giuseppina C et al, Neuroreport, 2002) に着目し、Tis21 によるラセン神経節細胞の傷害に対する抑制効果について検討を行うこととした。

Tis21 は BTG/Tob ファミリーと呼ばれる増殖抑制遺伝子の一つであり、現在までに癌の増殖抑制、転写因子の制御、細胞周期の制御、神経細胞の分化誘導、抗アポトーシス作用などの働きが報告されている (Lim IK et al, J Cancer Res Clin Oncol, 2006)。申請者らはこれまでの研究で、Tis21 がラセン神経節細胞の発生・分化に関わる遺伝子であることを明らかにしている (Hayashida M et al, Neuroreport, 2009, Yamada T et al, Neuroscience Letters, 2015)。Tis21 に着目した研究は、脳の発生、癌関連の研究として、海外の複数の研究室において精力的に行われている。しかし、耳科領域については、当教室の研究以外には皆無である。当教室では既に、Tis21 が胎生期のラセン神経節細胞の形成に不可欠であることを明らかにしており、本研究は

この知見をベースとして発展的研究を行うものであり、極めて特色のある独創的な研究であると考えられる。

### 2. 研究の目的

申請者らはこれまでの研究で、BTG/Tob ファミリーと呼ばれる増殖抑制遺伝子群の一つである Tis21 がラセン神経節細胞の発生・分化に関わる遺伝子であることを明らかにしてきている (Hayashida M et al, Neuroreport, 2009, Yamada T et al, Neuroscience Letters, 2015)。本研究では Tis21 の抗アポトーシス作用に着目し、in vivo におけるマウスのラセン神経節細胞に対する Tis21 の内耳保護作用について研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、Tis21 遺伝子導入を行うため、レポーター遺伝子として GFP を用い、Tis21 を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-Tis21-GFP) を用いる。コントロールには Tis21 を組み込んでいないアデノウイルスベクター (Ad) を用いる。

内耳への遺伝子導入法としては、キシラジンおよびケタミンで全身麻酔後、顕微鏡下にマウスの耳後部を切開し、骨包を開放後、蝸牛正円窓を確認する。その後マウス蝸牛正円窓膜を介してへ 30G 針を装着したマイクロシリンジを用いて、ワンショットで外リンパ腔へ注入する。

Lee らの報告 (Lee JE et al, Laryngoscope, 2003) に従って、マウスをキシラジンおよびケタミンで全身麻酔したのち、顕微鏡下に耳後部 approach で後半規管と外側半規管を露出させ、後半規管に小孔を開け、そこにシスプラチンを注入することによってマウスの難聴化処置を行い、内耳傷害の程度について聴性脳幹反応 (ABR) や蝸牛電位、免疫組織染色を用いて聴覚機能評価および形態学的評価した後、

アデノウイルスベクターに組み込んだ Tis21 遺伝子を難聴化処置前、難聴化処置後それぞれの時点で導入し、内耳保護効果および難聴治療効果について、聴覚機能評価および形態学的評価を行う。評価のタイミングとしては、処置の 24 時間前、処置後の 1 日、3 日、7 日に行うこととした。

#### 4. 研究成果

これまでの実験において、当初予定していなかった実験に関するいくつかの変更があった。一つ目は、マウス蝸牛正円窓に対する注入処置が困難であったため、操作性を重視し、より大型の動物種であり、蝸牛正円窓を観察しやすいモルモットへ実験対象を変更し、実験を継続した。二つ目は、シスプラチンによる難聴化処置を行う予定であったが、シスプラチンを扱う実験環境が整わなかったため、ゲンタマイシン筋肉注射(125mg/kg)とエタクリン酸静脈注射(40mg/kg)による難聴化処置を行った。同方法による難聴化処置により、有毛細胞脱落 2 週間後にはラセン神経節細胞数は 64% まで減少し、1 か月後には 30% まで減少することが報告されている (McFadden, 2004)。以上のことより、Ad-Tis21-GFP 注入 (治療もしくは内耳保護作用) 時期を再検討し、難聴化処置 1 日後に治療を行い、2 週間後、1 か月後に評価を行うことで治療効果判定を行うこととした。治療効果判定の評価として、聴性脳幹反応 (ABR) および免疫組織学的染色を行うこととした。

Tis21 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターである Ad-Tis21-GFP をモルモット蝸牛正円窓膜より 30G 針マイクロシリッジを用いて注入することで、処置後 24 時間後には有毛細胞、支持細胞、血管条、ラセン神経節細胞に GFP 蛋白のシグナルが確認され、免疫組織学的染色でも Tis21

が導入されていることが確認できた(図 1 参照)。次に別の個体を用いて、薬剤による難聴化処置を行い、処置 1 日後、2 週間後、1 か月後に聴力評価を行った。その結果、薬剤による難聴化処置 2 週間後には大きな差異は認めなかったが、薬剤による難聴化処置 1 か月後には聴力閾値の改善を認め、治療効果があることが示された (図 2A,B 参照)。また、それぞれの時期に聴覚測定後に、動物を屠殺し蝸牛を摘出した後、4% パラホルムアルデヒドで固定を行い、脱灰処置をおこなったのち、OCT コンパウンドで包埋した。その後、蝸牛凍結切片を作製し、抗 Tuj1 抗体で免疫組織染色を行い、ラセン神経節細胞数カウントを行うと、2 週間後、1 か月後にコントロール群と比較して、明らかな差を認めた (図 3 参照)。

結論として、Tis21 遺伝子が内耳で発現することにより、薬剤性難聴に対してラセン神経節細胞の保護効果を認め、ひいては難聴の進行抑制効果をもたらすことがわかった。今後、蝸牛内のタンパク質の定量や、有毛細胞数カウント、蝸牛血管条の精査を進め、さらなる知見を深める予定である

図 1 : Tis21 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターである Ad-Tis21-GFP をモルモット正円窓より注入し処置後 24 時間で蝸牛を摘出し、固定脱灰した後、凍結切片を作製した後、抗 Tis21 抗体 (赤) にて免疫染色を行い、GFP (緑)、Hoechst (青) 染色像と Merge (黄) した。有毛細胞、支持細胞、血管条、ラセン神経節細胞に GFP (緑) のシグナルを認め、GFP (緑) と一致した部位に Tis21 (赤) が発現していることがわかる。

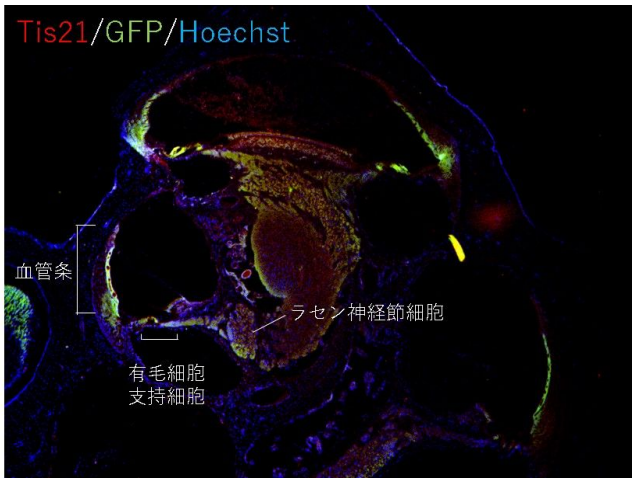


図 2A : 聴力評価 (ABR) の結果を示す。縦軸は聴力閾値、横軸は周波数である。今回は 4000, 8000, 12000, 20000, 32000Hz での聴力閾値を測定した。Tis21 遺伝子を投与していない群 (青 : 治療前、黄色 : 治療なし 1 日目、橙 : 治療なし 2 週間後、灰 : 治療なし 1 か月後) では薬剤による難聴化処置により、翌日から聴力低下を認め、徐々に全ての周波数において難聴が進行する所見を認めた。

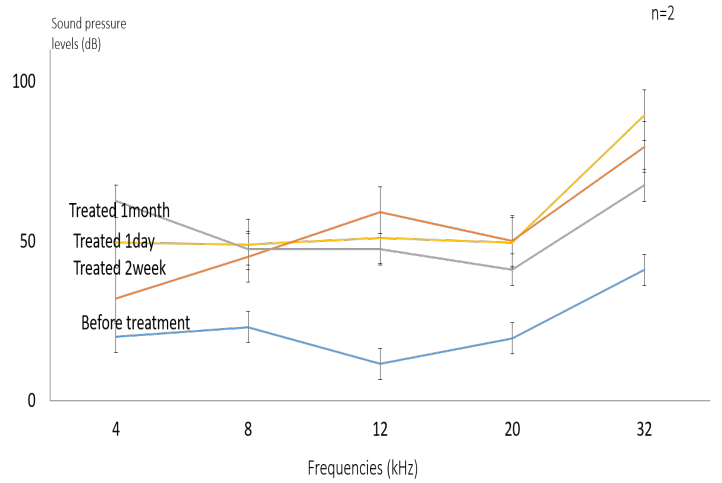


図 3 : 各時期 (治療前、1 日後、2 週間後、1 か月後) の蝸牛を摘出し、固定脱灰し、凍結切片を作製した後、抗 Tuj1 抗体を用いて免疫染色を行い、処置群とコントロール群のそれぞれで頂回転 (apical)、中回転 (middle)、基底回転 (basal) 毎にラセン神経節細胞のカウントを行った。縦軸はラセン神経節細胞数、横軸は処置前、処置後 2 週間、処置後 1 か月の各時期に処置側のラセン神経節細胞 (青) は非処置側 (黄) の比較を示す。処置側のラセン神経節細胞 (青) は非処置側 (黄) よりもラセン神経節細胞の減少が少なく、Tis21 が薬剤性難聴に対して治療効果を示すことが示唆された。

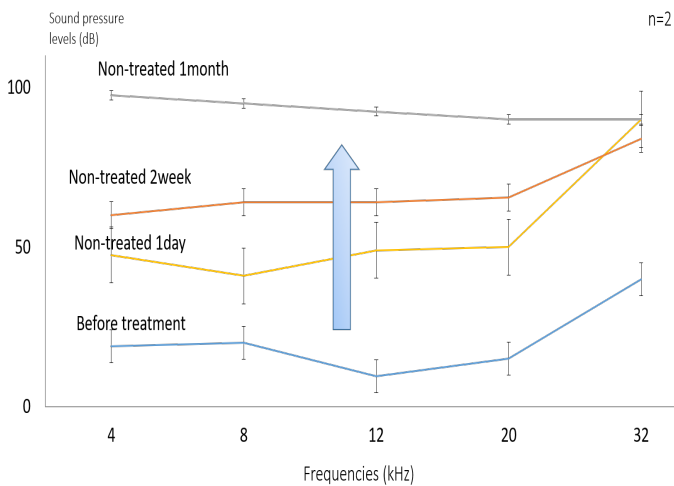
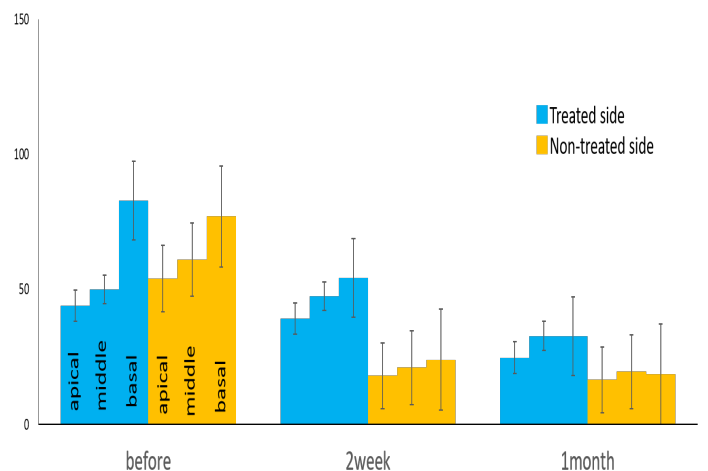


図 2B : 聴力評価 (ABR) の結果を示す。図 2A と同様に、縦軸は聴力閾値、横軸は周波数である。Tis21 遺伝子を投与した群では、難聴化処置により、翌日より聴力低下を認めたが、その後難聴は進行しなかった。(青 : 治療前、黄色 : 治療後 1 日目、橙 : 治療後 2 週間後、灰 : 治療後 1 か月後)



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 1 件)

Yamada, Takao, Minoda, Ryosei, Miwa, Toru, Ise, Momoko, Takeda, Hiroki, Yumoto, Eiji Neurogenesis of the spiral ganglion cells in the cochlea requires the transcriptional cofactor TIS21. Neuroscience Letters 584; 265-9, 2015

〔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

伊勢 桃子(ISE, Momoko)

熊本大学医学部附属病院

耳鼻咽喉科 頭頸部外科・助教

研究者番号：20573596

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者