

博 士 学 位 論 文

内耳蝸牛有毛細胞の障害メカニズムの解明 に関する薬理学的研究

摂南大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻 博士課程

薬理学研究室

学 籍 番 号 15D401

氏 名 西山 徳人

主任指導教員名 荻田 喜代一

目次

第 1 章 はじめに

1.1 緒言.....	4
1.2 聴覚機能と有毛細胞	5
1.2.1 音響性難聴.....	6
1.2.2 薬剤性難聴.....	8
1.2.3 加齢性難聴.....	10
1.3 略語.....	11

第 2 章 マウス蝸牛外有毛細胞に対する酸化ストレスの影響

2.1 序文.....	12
2.2 方法.....	13
2.2.1 試薬	13
2.2.2 実験動物の取り扱い	13
2.2.3 薬物投与.....	14
2.2.4 蝸牛コルチ器器官培養法.....	15
2.2.5 組織学的評価.....	16
2.2.6 データ分析	16
2.3 結果.....	17
2.3.1 強大音響曝露誘発蝸牛外有毛細胞死.....	17
2.3.2 蝸牛コルチ器器官培養の確立	18
2.3.3 培養コルチ器の外有毛細胞に対する酸化ストレス誘発剤曝露の影響.....	19
2.3.4 外有毛細胞に対する酸化ストレス誘発剤内耳内投与の影響.....	20
2.4 考察.....	21

第 3 章 マウス蝸牛外有毛細胞に対するギャップ結合機能破綻の影響

3.1 序文.....	22
3.2 方法.....	24
3.2.1 試薬	24

3.2.2 実験動物の取り扱い	24
3.2.3 薬物投与	24
3.2.4 蝸牛コルチ器器官培養法	24
3.2.5 組織学的評価	24
3.2.6 聴性脳幹反応 (ABR) 測定	24
3.2.7 光褪色後蛍光回復法 (FRAP 法)	25
3.2.8 データ分析	25
3.3 結果	26
3.3.1 培養コルチ器の外有毛細胞に対する CBX 曝露の影響	26
3.3.2 CBX 内耳内投与のラセン靱帯における GJIC に対する影響	27
3.3.3 聴力に対する CBX 内耳内投与の影響	29
3.3.4 外有毛細胞に対する CBX 内耳内投与の影響	30
3.4 考察	31

第 4 章 おわりに

4.1 結語	33
--------------	----

謝辞	34
----------	----

引用文献	35
------------	----

第 1 章 はじめに

1.1 緒言

耳は、外耳、中耳、内耳に分けられ、聴覚機能に必須の器官である。聴覚機能の障害である難聴は、対人コミュニケーション障害をもたらし、個人の生活の質を著しく低下させる。また、近年、難聴者では認知症のリスクが健常者の 1.9 倍となることが報告されており、衆目を集めている (Livingston G, et al., 2017)。世界保健機構 (World health organization: WHO) のファクトシート (Deafness and hearing loss, 2018) によると、全世界ではおよそ 4 億 6,600 万人が日常生活に支障を来すほどの聴覚障害を抱えており、これは世界人口の 5%を超えている。本邦においても、障害者認定基準を満たす難聴患者は約 43.6 万人であり、軽度な難聴患者を含めると 600 万人を超える (Goto F, et al., 2007)。

難聴は、外耳、中耳の障害による伝音難聴と聴覚伝導路の内耳以降の障害による感音難聴とに分けられる。現時点の医療で根治が困難である感音難聴は、その多くが内耳を構成する蝸牛の障害に起因し、不可逆的に聴覚機能が障害される。感音難聴の原因には、音響曝露や耳毒性薬物、加齢などがあるが、モデル動物を用いた基礎研究やヒト検体において、その原因が有毛細胞の脱落であることが報告されている。蝸牛には、直接音の信号を中枢へと伝達する内有毛細胞と内有毛細胞の働きを調整する外有毛細胞の 2 種類の有毛細胞があるが、いずれも一度障害を受けると再生しない。感音難聴における聴覚機能障害の不可逆性は、この有毛細胞の再生能力が無いことに起因する。このことから、有毛細胞の障害メカニズムの解明が感音難聴予防・治療に重要である。

これまでに当研究室では、有毛細胞死を引き起こす音圧レベルの音響をマウスに曝露することで、有毛細胞死が誘導される以前に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)/活性窒素種 (reactive nitrogen species: RNS) が蝸牛各部位において発生すること、および蝸牛内イオンバランスを司る外側壁ラセン靱帯のギャップ結合による細胞間コミュニケーション (gap junction intercellular communication: GJIC) の破綻がタンパク質分解酵素であるカルパインによって引き起こされることを見出した (Nagashima R, et al., 2010, Yamaguchi T, et al., 2014)。本研究では、強大音響曝露後での蝸牛内変化：①ROS/RNS の発生、②GJIC の破綻に着目し、それらの有毛細胞死への関与について解析した。本研究の成果は、感音難聴に対する治療標的を決定する上で重要な知見となり、これまで予後不良であった感音難聴に対する新たな予防・治療法の確立に寄与することが期待される。

本論文は、まず第 1 章で主要な難聴に対するこれまでの知見を概説し、第 2 章では有毛細胞に対する酸化ストレス誘発剤の影響について、第 3 章では有毛細胞に対する GJIC 阻害薬の影響について得られた知見を報告する。最後に、第 4 章では、第 2 章および第 3 章で得られた知見を基に有毛細胞死メカニズムについて考察するとともに、今後の展望について述べる。

1.2 聴覚機能と有毛細胞

聴覚は、音に対する感覚であり、外耳、中耳で構成される伝音系と内耳、蝸牛神経で構成される感音系の仕組みで成り立っている。聴覚機能の障害である難聴は、その障害の部位や程度によって分類される。程度による分類として、WHO や日本聴覚医学会では、聴覚閾値に応じて、軽度難聴、中程度難聴、高度難聴、重度難聴の4段階に分類される(表1)。

表1) 難聴の程度と聴覚閾値

難聴の程度	聴覚閾値
正常	25 dB 以下
軽度難聴	26 ～ 40 dB
中程度難聴	41 ～ 60 dB
高度難聴	61 ～ 80 dB
重度難聴	81 dB 以上

Grades of hearing impairment (WHO) より引用

一方、部位による分類では、伝音系の障害による伝音難聴と感音系の障害による感音難聴に分けられる。伝音難聴は手術等で聴力を回復させることが可能であるケースが多い。しかしながら、感音難聴は、発症メカニズムに不明な点が多く、現時点の医療で根治が困難である。感音難聴の多くが内耳を構成する蝸牛の障害に起因し、不可逆的に聴覚機能が障害される。

内耳蝸牛は、主にコルチ器、蝸牛軸、外側壁の三つの部位で構成されている。コルチ器は、有毛細胞やその周囲に存在する支持細胞などで構成される。有毛細胞は、空気の振動である音を神経信号に変換する働きを有する。蝸牛軸は、聴覚伝導路の一次ニューロンであるラセン神経節細胞の集合であり、有毛細胞にて変換された神経信号を中枢に伝達する働きを有する。外側壁は、ラセン靱帯と血管条で構成され、チャンネルやトランスポーターなどのイオン輸送体を多く含み、中央階を満たす内リンパ液中を、高 K^+ 濃度に維持する。

感音系の中心的な役割を果たす有毛細胞には、内有毛細胞と外有毛細胞の二種類がある。これらは、ともに、音を受容する上で必要不可欠な細胞であるが大きく役割が異なる。内有毛細胞はその多くがラセン神経節細胞とシナプスを形成しており、音、すなわち空気の振動が原因で脱分極し、グルタミン酸を放出することにより神経を興奮させる。一方、外有毛細胞は、細胞膜にプレスティンと呼ばれるモータータンパク質を有し、音の振動の強弱によって細胞が伸縮することで内有毛細胞に伝わる音の振動を調節し、音の感受性を調節する。感音難聴の原因は、音響曝露や耳毒性薬物、加齢などによる有毛細胞死であることがモデル動物を用いた基礎研究やヒト検体において多く示されている。

そこで、音響曝露や耳毒性薬物、加齢が引き起こす、騒音性難聴、薬剤性難聴、加齢性難聴について以下に概説する。

1.2.1 音響性難聴

音響性難聴は、強大音響曝露による急性音響外傷と慢性的な騒音曝露によって生じる騒音性難聴があるが、両者ともに騒音性難聴とされることもしばしばある。急性音響外傷は、爆音や射撃音、花火の炸裂音などの瞬間的に強大な音圧レベルに達する衝撃音などが原因となることが多い。急性音響外傷では、受傷機会を予測しやすい難聴であるため、ある程度の予防策を立てることも可能と考えられる。例えば、騒音環境下での職業であれば耳栓などの防音保護具を着用することや、騒音レベルを測定し、騒音の除去、低騒音化、遮音などの対策を立てることなどである。騒音性難聴では、コンサートや音楽プレーヤーなどで騒音に長時間曝露されることが原因となる症例が増加している。騒音性難聴の発症には個人差があり、音響曝露が長時間になればより発症しやすく、難聴が早く進行することが知られる。

音響性難聴の発症機序の 1 つとして、内耳の虚血再灌流による有毛細胞障害が挙げられる。騒音曝露により、内耳血流量が一時的に低下し (Yamane H, et al., 1991)、再還流に伴い内耳蝸牛で ROS が増加、血管条や有毛細胞で酸化ストレスの蓄積が認められ、有毛細胞死や内耳組織の障害に影響する (Usami S, et al., 1996, Le Prell CG, et al., 2007, Chang NC, et al., 2007, Basner M, et al., 2013)。また、有毛細胞死は他の蝸牛構成細胞より生じやすいこと、さらに蝸牛頂回転より基底回転の有毛細胞の方が障害されやすいという特徴を有する (Shah SH, et al., 2001)。

音響曝露による有毛細胞死は、アポトーシスとネクローシス経路で生じることが示唆されている。アポトーシスは、その実行因子であり、システイン-アスパラギン酸プロテアーゼに分類される蛋白分解酵素のカスパーゼが種々の蛋白質を分解することで細胞死が進行する。アポトーシスが誘導される要因には、内因性と外因性がある。内因性経路の活性化の要因は、DNA の損傷、がん遺伝子の活性化、成長因子の欠乏、小胞体ストレス、ミトコンドリアの崩壊などがあり、ミトコンドリア蛋白質である B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ファミリー蛋白質を介して制御されている。ミトコンドリア外膜の透過性が上昇すると、シトクロム c をはじめとする様々なタンパク質がミトコンドリアより漏出し、カスパーゼ-3、-7 を切断・活性化する。このカスパーゼの活性化は、他に、ROS や、endonuclease G (EndoG) および apoptosis inducing factor (AIF) 作用を介したカスパーゼ非依存的な活性化、ネクローシスを介しても生じることが報告されている (Fetoni AR, et al., 2013, Yamashita D, et al., 2004, Bohne BA, et al., 2007)。さらに、音響曝露後の蝸牛組織変化の研究において、蝸牛における貪食細胞の出現を含む炎症性応答も報告されており、蝸牛有毛細胞脱落の一端を担っている (Fredelius L, et al., 1990, Hirose K, et al., 2005)。しかしながら、その実態については不明な点が多く、一定の見解は得られていない。

他の音響性難聴の原因として、蝸牛外側壁のラセン靱帯線維細胞の障害が挙げられる。この蝸牛外側壁のラセン靱帯線維細胞の障害は有毛細胞死に先立って生じることが知られている (Hequembourg S, et al., 2001, Ichimiya I, et al., 2000, Spicer SS, et al., 1997)。ラセン靱帯線維細胞は、 Na^+ , K^+ -ATPase、 Na^+ , K^+ , 2Cl^- 共輸送体、およびギャップ結合などのイオン輸送機構を含み、内耳イオン環境および蝸牛内電位の維持において重要な役割を果たす (Crouch JJ, et al., 1997, Spicer SS, et al., 1996, Schulte BA, et al., 1989)。当研究室ではこれまでに強大音響曝露がギャップ結合構成タンパク質であるコネキシンの局在変化およびダウンレギュレーションを引き起こし、GJIC がラセン靱帯線維細胞にて破綻することを示した (Yamaguchi T, et al., 2014)。このように蝸牛有毛細胞だけでなく、内耳内の他の細胞型、例えば、血管条、ラセン神経節細胞、および他の支持細胞の細胞もまた、蝸牛有毛細胞死および難聴に寄与し得ると考えられているが詳細は明らかとなっていない。

1.2.2 薬剤性難聴

薬剤性難聴は、薬物の副次的影響により発症する聴覚障害の総称である。耳毒性を有する薬物には、現在でも一般的に使用されている薬剤が多く、アミノグリコシド系抗菌薬やループ利尿薬、シスプラチンなどが代表的な薬物である（表 2）。耳毒性薬物は、有毛細胞死および難聴の原因であることが知られている。

表 2) 副作用に難聴が記載されている医療用医薬品

分類・一般名	分類・一般名
アミノグリコシド系抗菌薬	ループ利尿薬
Amikacin	Bumetanide
Arbekacin	Furosemide
Dibekacin	
Fradiomycin (Neomycin)	PDE5阻害薬
Gentamicin	Sildenafil
Isepamicin	Tadalafil
Kanamycin	Vardenafil
Paromomycin	
Streptomycin	その他
Tobramycin	Clarithromycin
	Erythromycin
抗腫瘍薬	Quinine
Carboplatin	Salicylates
Cisplatin	Teicoplanin
Nedaplatin	Vancomycin
Vinblastine	
Vincristine	

(Sasaki A, 2017 より改変)

アミノグリコシド系抗菌薬の歴史は古く、現在でも結核や緑膿菌感染症の治療に用いられており、耳毒性についても古くから知られている。アミノグリコシド系抗菌薬は、蝸牛有毛細胞に選択的に取り込まれ、蝸牛の基底回転の外有毛細胞から始まり、徐々に頂回転に広がることで難聴を起こす。このようなアミノグリコシド系抗菌薬の内耳有毛細胞傷害には、酸化ストレスや一酸化窒素が関与することが示唆されている。（Jiang H, et al., 2006, Priuska EM, et al, 1995, Sunami K, et al., 1999, Takumida M, et al., 1999, Watanabe KI, et al., 2000）。一酸化窒素は活性酸素の発生源となりうることが知られており、内耳における活性酸素発生との関連性も考えられている。しかし一酸化窒素は、アポトーシスの促進と抑制の二方向の作用があることが知られており（Li J, et al., 2000）、有毛細胞死への関与の詳細は明らかになっていない。

アミノグリコシド系抗菌薬による耳毒性は鉄キレート剤や抗酸化物質などにより予防可能であることが報告されているが、臨床的に予防のために薬剤を使うことは一般的ではなく、予防の適応をもつ医療用医薬品も現在のところ存在しない。

抗腫瘍薬であるシスプラチンやカルボプラチンは、その一定量以上の使用により進行性かつ両側性の感音難聴を比較的高確率に誘発することが知られ、注意を要する薬剤である (Kopelman J, et al., 1988)。白金製剤による難聴は、その多くが不可逆的であるため、聴力検査を定期的に実施し、早期に難聴を発見し、薬剤を変更することなどが必要である。しかしながら、抗腫瘍効果が優先されることから白金製剤を変更できない場合もよくある。白金製剤による有毛細胞障害はまず基底回転側の OHC が障害され、徐々に頂回転側に及ぶ。また支持細胞や、血管条、ラセン靱帯、ラセン神経節細胞にも細胞死が生じる。アミノグリコシド系抗生物質とも共通する点が多く、ROS の生成、抗酸化グルタチオンの枯渇、脂質過酸化の増加、カスパーゼの活性化による核酸損傷などにより蝸牛内電位の変化とコルチ器有毛細胞の障害が生じることが報告されている (Rybak LP, et al., 2007, Chirtes F, et al., 2014, Goncalves MS, 2013)。

ループ利尿薬による難聴は、静脈内投与によって短時間で生じ、一過性であることが多いが、腎障害がある患者においてループ利尿薬の使用により不可逆的な難聴が生じた症例も報告されている (Chiodo AA, et al., 1994)。またアミノグリコシド系抗菌薬との併用により耳毒性が増強されることが知られている (Matz GJ, 1990)。ループ利尿薬は、腎臓のヘンレ係蹄の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$ 共輸送体を阻害することによって利尿作用を発揮するが、内耳蝸牛の血管条にも $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$ 共輸送体があり、ループ利尿薬により阻害されるため、内リンパ液の電解質組成が崩れ、蝸牛内電位を保てず、難聴となると考えられている (Pike D, et al., 1980)。またループ利尿薬は、その投与直後から血管条に可逆性の浮腫が見られることが報告されており (Rybak LP, et al., 1992, Rybak LP, 1993)、ループ利尿薬による難聴の発症には外側壁の機能障害が考えられる。

ホスホジエステラーゼ (PDE) 5 阻害薬の中では、シルデナフィルの使用による難聴の報告が多い (McGwin G Jr, 2010)。その原因として PDE5 阻害により蝸牛での一酸化窒素の発生が難聴の原因であると推察されている (Maddox PT, et al, 2009)。事実、難聴モデル動物を用いた研究において、一酸化窒素の発生が難聴発症に関与することが報告されている (McGwin G Jr, 2010, Watanabe K, et al., 2000)。

サリチル酸系薬剤の代表的な医薬品であるアスピリンは、高用量で難聴や耳鳴を引き起こすことが知られているが、アスピリンの使用を中止することで回復することが多く可逆的であると考えられている (Myers EN, et al., 1965)。蝸牛の血流障害や有毛細胞の活動電位の変化、酸化ストレスによるラセン神経節細胞の選択的障害などがアスピリンの使用により引き起こされることが報告されている (Guitton MJ, et al., 2003, Deng L, et al., 2013, Cazals Y, 2000)。

1.2.3 加齢性難聴

加齢性難聴は、加齢以外に特別な原因がみられない難聴をいい、難聴の症例の約 80%は高齢者に起こるといわれるほど、高齢者に高頻度に出現する身体症状の 1 つである (Davis AC, 1990)。加齢による難聴は 30 歳代で始まるが、実際には個人差が大きい。65~74 歳の米国人口では、およそ 3 人に 1 人が難聴となり、75 歳以上の人のうち、半数近くが難聴となっている。日本では、平成 18 年厚生労働省の身体障害者実態調査において、聴覚障害者のうち半数以上を 70 歳以上が占めており、平成 24 年度盲ろう者に関する実態調査によると聴覚障害者の聴覚障害の発症年代は 10 歳未満が 3 割弱、次いで 60 歳代、70 歳代が 1 割強と報告されており、高齢者での聴覚障害の発症頻度が高いことがわかる。

加齢性難聴は上述のとおり、加齢以外に特別な原因がみられない難聴をいうが、その実態は、騒音曝露歴、喫煙歴、耳毒性薬物の使用、心疾患や脳血管障害などの循環障害の有無、糖尿病の既往、ストレスと相関する (Gates GA, et al., 2005, Gopinath B, et al., 2009, Sprinzl GM, et al., 2010, Uchida Y, et al., 2010)。

加齢性難聴は蝸牛の老化と考えられ、有毛細胞の変性が感音難聴の主な要因であるが、ラセン神経節や血管条、ラセン靱帯を含む蝸牛外側壁の変性や有毛細胞数の減少も認められる (Keithley EM, et al., 1989, Hequembourg S, et al., 2001, Gates GA, et al., 2002)。その原因として、加齢に伴いミトコンドリア機能が低下することによって ROS の増加をもたらし、有毛細胞やラセン神経節細胞において、細胞死を引き起こすことや (Wallace DC, 2005, Gates GA, et al., 2005)、酸化ストレスが、培養蝸牛細胞において、B cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2) ファミリーに属するミトコンドリアプロアポトーシス遺伝子である BCL2 antagonist/killer 1 (Bak) を増加させること、Bak の欠損により外有毛細胞死および加齢性難聴が予防可能であることが報告されている (Someya S, et al., 2009)。その他に、細胞死を引き起こす caspase-3、-7、および-9、BCL2 associated X protein (Bax) の増加や細胞死を抑制する Bcl-2 の減少が加齢により生じることが報告されている (Alam, SA, et al., 2001, Nevado J, et al., 2006, Someya S, et al., 2009)。蝸牛の老化の詳細は未だ不明な点が多く、老化による難聴は単一の病態で説明できるものではないとするのが現状の見解であるが、加齢性難聴も前出の難聴と同様に、内耳の酸化障害説が最も有力である (Yamasoba T, et al., 2013)。さらに、抗酸化物質である coenzyme Q₁₀や α -lipoic acid の投与が、Bak の働きを抑制することで蝸牛内のアポトーシスを減少させ、加齢性難聴の発症時期を遅延させること (Someya S, et al., 2009) や、糖尿病では、エネルギー需要の高い聴覚器が酸化ストレスの標的臓器になりやすく、糖尿病性微小血管症性変化とともに、代謝障害や炎症性サイトカインを介した細胞傷害がもたらされると報告されており (Frisina ST, et al., 2006)、加齢性難聴による有毛細胞変性には酸化ストレスが関与していることを支持している。

1.3 略語

本論文に使用した略語は以下の通りである。

4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal
ABR, auditory brainstem response
AIF, apoptosis inducing factor
Bcl-2, B-cell lymphoma-2
Bak, BCL2 antagonist/killer 1
Bax, BCL2 associated X protein
CBX, carbenoxolone
CO₂, carbon dioxide
Cx, connexin
DMEM, Dulbecco's modified eagle medium
DNA, deoxyribonucleic acid
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
EP, endocochlear potential
FBS, fetal bovine serum
FRAP, fluorescence recovery after photobleaching
GJ, gap junction
GJIC, gap junction intercellular communication
H₂O₂, hydrogen peroxide
HC, hair cell
NOS, nitric oxide synthase
Nrf2, NF-E2-related factor-2
OHC, outer hair cell
PBS, phosphate buffered saline
PBST, phosphate buffered saline with Tween[®] 20
PDE, phosphodiesterase
PFA, paraformaldehyde
ROS, reactive oxygen species
RNS, reactive nitrogen species
SIN-1, 3- (4-morpholinyl) sydnonimine, hydrochloride
SPL, sound pressure level
TBST, Tris buffered saline with Tween[®] 20
WHO, world health organization

第 2 章 マウス蝸牛外有毛細胞に対する酸化ストレスの影響

2.1 序文

加齢性難聴や、薬剤性難聴、音響性難聴の発症には、多くの場合、蝸牛内の酸化ストレスの増加とともに有毛細胞死が観察される (Priuska EM, et al., 1995, Yamane H, et al., 1995, Kopke RD, et al., 1997)。また、酸化ストレス応答を調節し、炎症を抑制する転写因子 NF-E2-related factor-2 (Nrf2) や抗酸化物質が難聴や有毛細胞の脱落を抑制する (Garetz SL, et al., 1994, Yamasoba T, et al., 1998, Honkura Y, et al., 2016)。これらの事実から、酸化ストレスが有毛細胞死に関与していることが考えられてきた。酸化ストレスは、一酸化窒素や ROS をはじめとするフリーラジカルがその本体であり、さまざまな疾患や老化との関連性が示されている (Neri S, et al., 2006, Yamane H, et al., 2004)。フリーラジカルは、不対電子をもつ原子や分子あるいはイオンのことであり、非常に反応性の高い物質である。

当研究室では以前からさまざまな種類の難聴動物モデルを確立し、これまでに、強大音響曝露により誘発される感音難聴モデル動物において、ペルオキシナイトライトや一酸化窒素により生成される RNS 修飾ニトロチロシンや ROS 誘発 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE、脂質過酸化産物) の増加が蝸牛外側壁やコルチ器において認められることを報告した。また、ラジカルスカベンジャーおよび NOS 阻害剤の投与により聴覚障害を抑制するのみならず、OHC の脱落を抑制する結果が得られた (Nagashima R, et al., 2010, Yamaguchi T, et al., 2017)。一方で、蝸牛における ROS の発生源については、有毛細胞だけでなくラセン靱帯線維細胞のミトコンドリアを多く含む II 型線維細胞であるとも報告されている。しかしながら、抗酸化剤により耳毒性が減少する報告は多く存在するものの、ROS がどの細胞を標的とし、どのように影響を与えるかなど詳細に解析された報告は無い。

したがって、本章では、音響曝露により障害の受けやすい外有毛細胞について、強大音響曝露後での主要な蝸牛内変化である、ROS/RNS の発生に着目し、酸化ストレスの蝸牛外有毛細胞に対する影響について、*in vivo* 実験系、*in vitro* 実験系を用いて解析した。

2.2 方法

2.2.1 試薬

4-HNE は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。Neomycin は Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA) から購入した。Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody、Alexa Fluor 568TM Phalloidin、N-2 supplement (×100)、B-27 supplement (×50) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。Anti-myosin VIIa rabbit polyclonal antibody は Proteus BioSciences Inc. (Ramona, CA, USA) から購入した。Dako REAL Antibody Diluent は Dako Denmark A/S (Glostrup, Denmark) から購入した。Blocking One Histo は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) から購入した。VECTASHIELD は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) から購入した。使用した他のすべての化学物質は、商業的に入手可能な最高純度であった。

2.2.2 実験動物の取り扱い

実験動物の取扱いは、すべて日本薬理学会動物実験指針に則って、摂南大学動物実験規定に基づき、承認のもと、規定に遵守し行った。動物は、清水実験材料 (京都) より ddY 系雄性マウス (26-28 g) を購入し、自由摂食および自由摂水下、気温 $23.0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ および湿度 $55 \pm 2\%$ で、12 時間の明暗サイクル下で飼育した。また、使用する動物は最小限にとどめ、動物に苦痛を与えないよう最大限配慮した。

2.2.3 薬物投与

マウスへの薬物投与は全て、既報の後半規管から内耳内へ薬液を局所投与する手法 (Nakagawa T, et al., 2003) を用いた。抱水クロラル (500 mg/kg、腹腔内) による麻酔下で、マウスの耳介後方を切開し、後半規管を露出させた。顕微鏡下で、後半規管の骨壁に細孔をあけて、石英ガラス針 (EiCOM, Kyoto, Japan) を後半規管内に挿入した。Vehicle、4-HNE (1.25 nmol/耳) または SIN-1 (1.25 nmol/耳) のいずれかを、マイクロシリンジポンプを用いて 1 μ L/分の流速で 5 μ L を注入した。処置後に、筋膜を側頭筋より摘出し、細孔を塞ぐことによりリンパ液の漏出を回避した。投与された薬物の容量は「mol/耳」として示した。

In vivo study (蝸牛内投与)

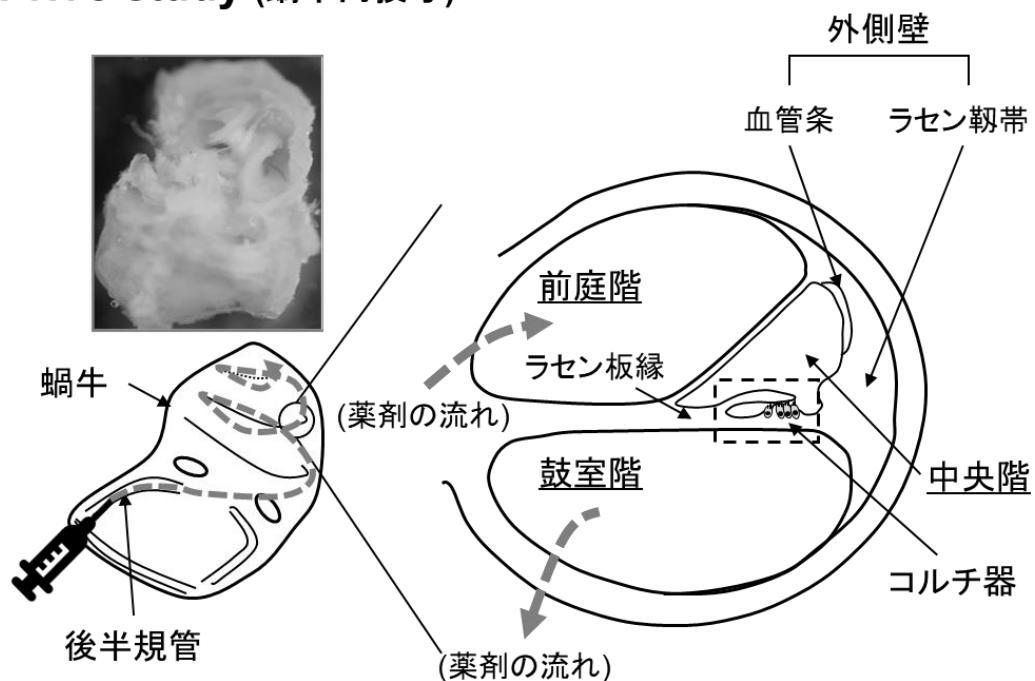


図 1) 内耳内投与による薬液の流路

後半規管から薬液を内耳内投与すると、矢印で示すように薬液が半規管、前庭、蝸牛の順で浸透し、前庭階および鼓室階の外リンパ液に分布する。分布した薬液は、最終的にくも膜下腔に開口する蝸牛小管から脳脊髄液と合流する。(Nishiyama N, et al., 2019 から改変)

2.2.4 蝸牛コルチ器器官培養法

コルチ器器官培養は、既報の手法を参考に行った (Parker M, et al., 2010, Driver EC et al., 2010)。蝸牛コルチ器を顕微鏡下で、生後 4 日齢の ddY マウスの蝸牛から分画し、培地交換による培養細胞へのストレス軽減のために、セルカルチャーインサート上に静置し、500 μ L/well の DMEM、0.3%w/v グルコース、および 0.03%w/v ペニシリン G からなる培養培地を含む 24 well 培養プレート中でコルチ器を培養した。培養のため、分画したコルチ器を加湿インキュベーター内に 37°C、5% CO₂/95% air で 24 時間静置し、薬物曝露実験では、各種薬剤を含む同培地と交換し、その 24 時間後の組織学的評価を行った (図 2)。

また、7 日間のコルチ器器官培養をするために、DMEM、0.3%w/v グルコース、0.03%w/v ペニシリン G、B-27 サプリメント、および N-2 サプリメントからなる培養培地を使用した。

培養コルチ器を 37°C、5% CO₂/95% air の加湿インキュベーター内に培養期間中静置し、薬物曝露実験の際は各種薬剤を含む同培地を 1 日おきに置換した後、組織学的評価を行った。

In vitro study (コルチ器器官培養)

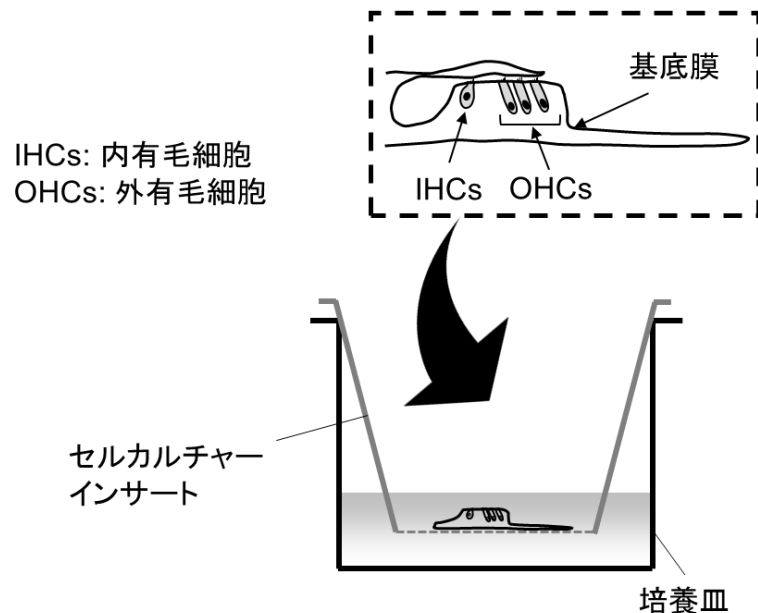


図 2) コルチ器器官培養法

生後 4 日齢の蝸牛コルチ器を分画し、培養液で満たしたセルカルチャーインサート上で培養した。略語: OHCs: 外有毛細胞、IHCs: 内有毛細胞。(Nishiyama N, et al., 2019 から改変)

2.2.5 組織学的評価

マウスを頸椎脱臼後、速やかに蝸牛を摘出し、分画した。正円窓、卵円窓および蝸牛頂点に小孔を開け、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) 中の 4%パラホルムアルデヒドで灌流し、4℃で一晩浸漬固定した。固定した蝸牛をリン酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.4) で 3 回洗浄し、次いで脱灰のために 10%EDTA 溶液中で少なくとも 2 日間反応させた。脱灰後、0.03% トリス緩衝生理食塩水 (TBST) で希釈した Alexa Fluor 568™ Phalloidin (1 : 200) を室温で 30 分間、暗所で反応させた。0.03%TBST で 3 回洗浄した後、スライド上に載せ褪色防止剤である VECTASHIELD を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW-FV1000、OLYMPUS, Tokyo, Japan) 下で観察した。蝸牛の中回転における脱落した外有毛細胞数を計測し、測定領域の全ての外有毛細胞に対する脱落した外有毛細胞の割合を百分率で表した。

培養コルチ器を 4%パラホルムアルデヒド中で室温 20 分間固定し、0.2%PBST で 3 回洗浄した。その後、Blocking One Histo を用いてブロッキングし、myosin-VIIa (1 : 200) に対する一次抗体を用いて 4℃で一晩反応させた。0.2%PBST で洗浄し、Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG 二次抗体 (1 : 200) と共に室温で 2 時間反応させた。0.2%PBST で洗浄した後、Alexa Fluor 568™ Phalloidin (1 : 200) と共に暗所で 20 分間反応させた。最後に、蛍光褪色防止剤 (VECTASHIELD) を用いて封入し、を用いて共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW-FV1000、OLYMPUS, Tokyo, Japan) 下で観察した。共焦点画像は、各コルチ器を 0.75 μm の深さ間隔で 8~12 枚を一連で撮影した。画像は Z 軸上の 8~12 枚を合成して使用した。

2.2.6 データ分析

すべてのデータを平均 \pm 標準誤差として表し、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後、Bonferroni または Dunnett を post hoc test として用いて、あるいは両側 Student's t-test を行うことにより統計的有意差を判定した。

2.3 結果

2.3.1 強大音響曝露誘発蝸牛外有毛細胞死

我々はこれまでに、強大音響 (110 dB、1 時間) への曝露は、曝露後少なくとも 4、12 および 20 kHz の周波数で少なくとも聴覚障害を引き起こす可能性があることを示した。(Nagashima R, et al., 2010, Nagashima R, et al., 2011, Yamaguchi T, et al., 2017) 、110 dB で1 時間曝露した後の外有毛細胞の脱落を評価するために、Alexa Fluor™ 568 Phalloidin を用いて、曝露直後 (時間 0) から 14 日後まで蝸牛コルチ器を染色した (図 3)。

強大音響曝露は、2 日目以降の蝸牛の中回転において有意な外有毛細胞の脱落を引き起こし、その脱落は徐々に増加し、曝露 7 日後および 14 日後にピークに達した。これらの結果は、本実験条件下での騒音曝露は、蝸牛の中回転で曝露数日後に永久的な外有毛細胞の脱落を引き起こす可能性があることを示唆している。

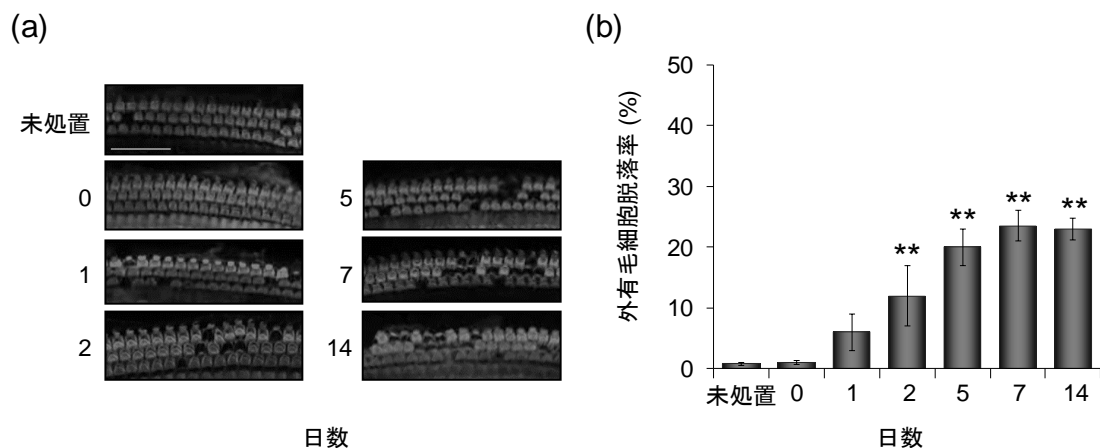


図 3) 音響曝露による外有毛細胞の脱落

マウスに 8 kHz オクターブバンドノイズ、110 dB の音圧レベルの騒音を 1 時間曝露し、Alexa Fluor 568™ Phalloidin で染色したコルチ器の解剖のために音響曝露後の一定期間経過後に 4%パラホルムアルデヒドで固定した。(a) 蝸牛の中回転の典型的な顕微鏡画像。スケールバー=50 μm。 (b) 蝸牛中回転領域における外有毛細胞の脱落率 (平均±標準誤差) (n=5) 。**p < 0.01 vs 未処置動物。(Nishiyama N, et al., 2019 から改変)

2.3.2 蝸牛コルチ器器官培養の確立

コルチ器器官培養法の確立を目的に、以下の検討を行った。培養コルチ器に vehicle もしくはネオマイシンを 24 時間曝露し、myosin-VIIa (有毛細胞マーカー) および phalloidin (F-アクチン結合ペプチド) で染色を行った。ネオマイシンは、*in vivo* および *in vitro* 実験条件下で蝸牛外有毛細胞に損傷を与えることが知られている (Liu L, et al., 2016, Selimoglu E. et al., 2007)。その結果、対照群では外有毛細胞が myosin-VII および phalloidin 両陽性の細胞が検出され、外有毛細胞が確認されたが、ネオマイシン曝露は両陽性の細胞を著しく減少させた。このことから、培養コルチ器の外有毛細胞はネオマイシンに感受性な細胞であることが示唆された (図 4)。

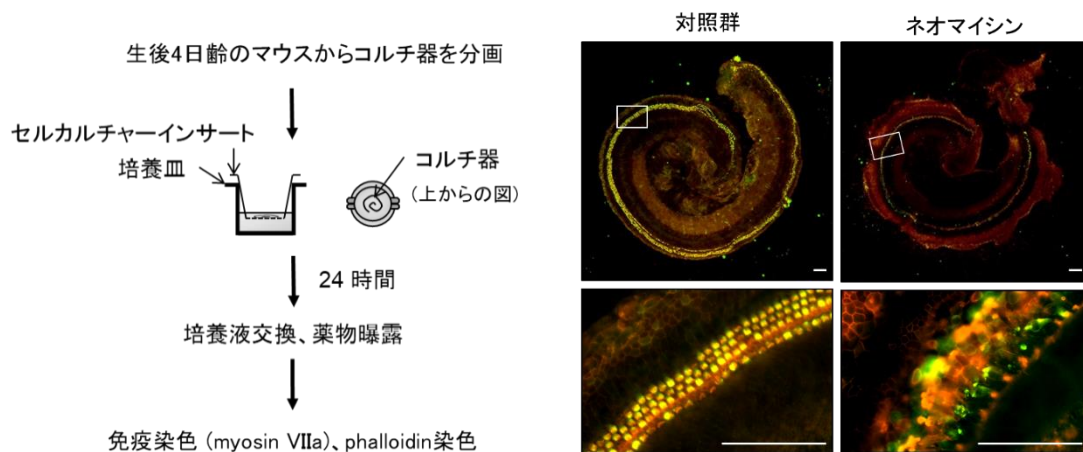


図 4) コルチ器器官培養における有毛細胞脱落の検出

生後 4 日齢のマウス蝸牛からコルチ器を分画し、セルカルチャーインサート上に静置し、培養液中にて 24 時間培養した。次いで、vehicle またはネオマイシン (1 mM) とともに 24 時間曝露した。培養コルチ器の有毛細胞は、myosin-VIIa (緑色) の免疫染色および phalloidin 染色 (赤色) によって可視化した (n=3)。スケールバー=100 μ m。 (Nishiyama N, et al., 2019 から改変)

2.3.3 培養コルチ器の外有毛細胞に対する酸化ストレス誘発剤曝露の影響

活性酸素の中でも比較的安定な H_2O_2 、脂質過酸化物である 4-HNE またはペルオキシナイトライト発生剤である SIN-1 を用い、これら酸化ストレス誘発剤が外有毛細胞の脱落を引き起こすかどうかを明らかにするために以下の検討を行った。生後 4 日齢のマウスから分離したコルチ器を器官培養し、培養コルチ器に 4-HNE、 H_2O_2 および SIN-1 を 2~50 μM で 24 時間曝露した。その結果、すべての薬剤、すべての濃度で外有毛細胞脱落率の有意な増加は認められなかった (表 3)。また、4-HNE および SIN-1 について高濃度 (250 μM) で長期間曝露 (7 日間) を行ったが、外有毛細胞の脱落率の増加は認められなかった。[OHC loss (% of control) : vehicle, 5.4 ± 0.6 ; 4-HNE, 7.3 ± 0.8 ; SIN-1, 6.5 ± 1.2]。これらの結果から、少なくとも本実験条件下では、4-HNE およびペルオキシナイトライトは、外有毛細胞の脱落を引き起こさないことが示唆された。

表 3) 培養コルチ器への酸化ストレス誘発剤曝露の影響

培養コルチ器を 4-HNE、 H_2O_2 、および SIN-1 のいずれかとともに表中に示す濃度で 24 時間曝露した。曝露後、培養コルチ器を固定し、Alexa Fluor 568TM Phalloidin で染色して外有毛細胞脱落率を算出した。(平均 \pm 標準誤差) (n=3~5) N.S., 有意差なし vs vehicle alone。

濃度 (μM)	外有毛細胞脱落率(%)		
	4-HNE	H_2O_2	SIN-1
0	5.7 ± 1.1	5.8 ± 1.6	4.8 ± 2.0
2	8.1 ± 1.7 N.S.	4.2 ± 1.8 N.S.	4.5 ± 1.9 N.S.
10	4.6 ± 1.0 N.S.	6.4 ± 3.2 N.S.	6.1 ± 2.0 N.S.
50	9.1 ± 3.5 N.S.	5.1 ± 1.5 N.S.	7.2 ± 2.9 N.S.

(Nishiyama N, et al., 2019 より改変)

2.3.4 外有毛細胞に対する酸化ストレス誘発剤内耳内投与の影響

次に、4-HNE と SIN-1 の内耳内投与が蝸牛 OHC 脱落を引き起こすか否かについて検討した。4-HNE (1.25 nmol/耳) または SIN-1 (1.25 nmol/耳) を内耳内投与し、投与 7 日後に 2.2.5 に従って、4%パラホルムアルデヒドで固定後、phalloidin 染色した。その結果、少なくとも投与後 7 日目において、4-HNE または SIN-1 のいずれも、コルチ器の中回転における OHC 脱落を引き起こさなかった (図 5)。[OHC loss (% of total): 対照群, 2.2 ± 0.5 ; 4-HNE, 5.6 ± 2.9 ; SIN-1, 3.9 ± 2.2 (n=4, 有意差なし)]。

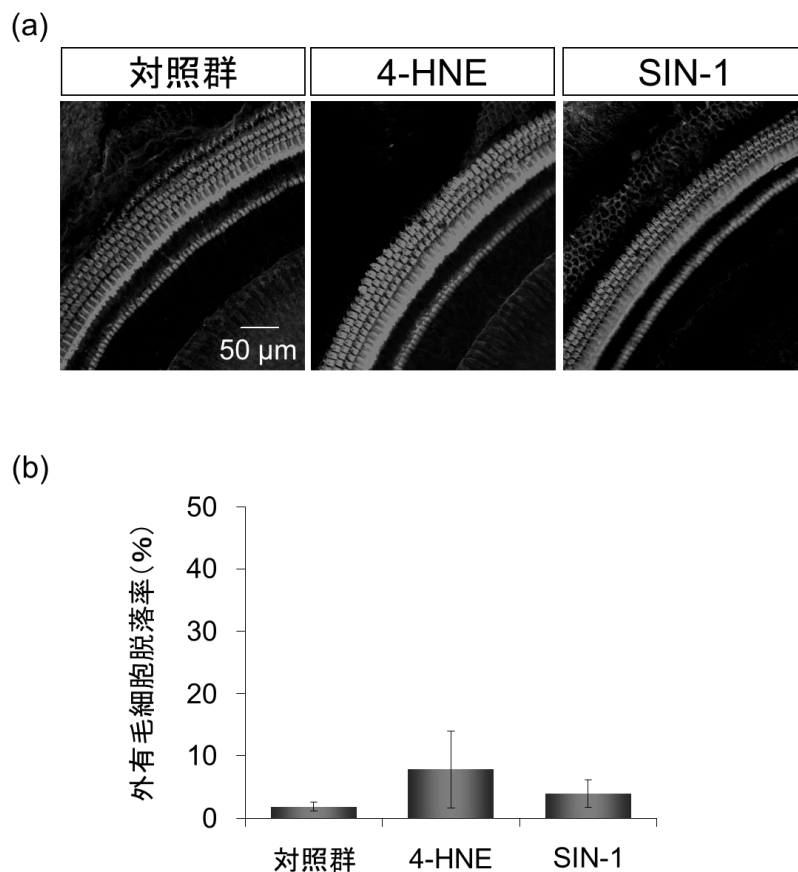


図 5) 4-HNE および SIN-1 の内耳内投与による外有毛細胞への影響

5 週齢 ddY マウスの内耳後半規管から 4HNE、SIN-1 (各 1.25 nmol/耳) および vehicle を投与し、7 日後にコルチ器を分画後、有毛細胞を phalloidin 染色で可視化した。(a) 蝸牛の中回転の典型的な顕微鏡画像。スケールバー=50 μ m。(b) 蝸牛中回転領域における外有毛細胞の脱落率 (平均 \pm 標準誤差) (n=3)。

2.4 考察

本研究の第一歩として、強大音響曝露後、蝸牛で発生する ROS と RNS に焦点をあて、酸化ストレス誘発剤である 4-HNE、ペルオキシナイトライト発生剤である SIN-1 をコルチ器への曝露 (*in vitro* 実験系) もしくは内耳内投与(*in vivo* 実験系) により、それぞれの薬剤が与える直接的な影響を解析した。しかしながら、両実験系において、4-HNE および SIN-1 の直接曝露では、蝸牛外有毛細胞の脱落が生じないことが示された。

これまで当研究室では、ROS 捕捉剤または NOS 阻害剤を用いた *in vivo* による投与が、強大音響曝露による蝸牛外有毛細胞の脱落から外有毛細胞を保護することを実証した (Nagashima R, et al., 2010) 。ほかにも強大音響曝露によって誘発された蝸牛内に発生した過剰な ROS/RNS の外有毛細胞脱落に対する関与については多数報告されている (Bottger EC, et al., 2013, Kamogashira T, et al., 2015, Han WJ, et al., 2018) 。ROS/RNS が外有毛細胞脱落に関与するというこれらの知見は、本検討にて得られた知見と対立するように思われる。しかし、これら対立する知見に対しては以下のような解釈ができる。音響曝露によって外有毛細胞の脱落が生じる前に、多くの事象が誘発される。例えば音響曝露後、蝸牛における抗酸化能が低下する (Yamasoda, et al., 1998) 。そのため、蝸牛において ROS/RNS と他の事象との相乗作用により外有毛細胞の脱落が増加するかもしれない。この場合、騒音性難聴の外有毛細胞の脱落に ROS/RNS が必要となるかもしれない。しかしながら、本研究では、上記のジレンマに対して完全に解決されてはいないが、4-HNE や SIN-1 が蝸牛における外有毛細胞の直接的な損傷に関与していないという証拠が示唆された。

第 3 章 マウス蝸牛外有毛細胞に対するギャップ結合機能破綻の影響

3.1 序文

ギャップ結合 (gap junction: GJ) とは、細胞間接着結合の一つであり、細胞間を貫通する孔である。GJ は、イオンやセカンドメッセンジャーなどの小分子を授受することに寄与し、細胞間の情報伝達として機能する。GJ はコネキシンタンパク質ファミリーによって形成され、哺乳動物では、そのうち 20 種類以上のタンパク質が様々な組織で同定されている (表 4)。

表 4) コネキシンの組織発現分布

組織名	コネキシンの種類	組織名	コネキシンの種類
血管		内耳	
内皮	Cx40, Cx37	コルチ器	Cx26, Cx30, Cx31
平滑筋	Cx43	神経系	
肝臓	Cx32, Cx26	星状膠細胞	Cx43, Cx30, Cx26
乳腺・汗腺・唾液腺		稀突起膠細胞	Cx32, Cx29, Cx47
腺房細胞	Cx32, Cx26	ミエリン鞘	Cx32
筋上皮細胞	Cx43	上衣細胞	Cx43
脾臓		ニューロン	Cx36
β 細胞	Cx36	心臓	
外分泌腺	Cx32	洞房結節	Cx45
卵胞		心房筋	Cx43, Cx45, Cx40
上皮細胞	Cx43, Cx45	房室結節	Cx45
卵母細胞	Cx37	ヒス束	Cx40
水晶体		プルキンエ線維	Cx40, Cx43
上皮細胞	Cx43	心室筋	Cx43, Cx45
線維	Cx46, Cx50		

(Shibata Y, et al., 2010 より改変)

GJ を介した細胞間コミュニケーション (gap junction intercellular communication: GJIC) は、成長、移動、分化および生存などの様々な細胞機能において必須の役割を果たすことを多くの報告が明らかにしている (Kumar NM, et al., 1996, Saez JC, et al., 2003, Yao J, et al., 2007, Yao J, et al., 2009)。従って、GJIC の機能的変化は、様々な病態に関与することが知られている (Azzam EI, et al., 2001, Krutovskikh VA, et al., 2002, Nakase T, et al., 2003, Garcia - Dorado D, et al., 2004)。

蝸牛の場合、GJ は外側壁に多く、有毛細胞に流入した K^+ を内リンパ液に汲み戻す働きに寄与する。蝸牛における GJ は、主にコネキシン 26 およびコネキシン 30 の 2 種類によって主に形成されている (Ahmad S, et al., 2003, Forge A, et al., 2003)。聴覚に関して、最も一般的なヒトの先天性欠損の 1 つである非症候性遺伝性難聴の症例の多くの割合 (20~50%) が、コネキシン 26 コード遺伝子の突然変異によって引き起こされる。さらに、コネキシン 26 をコードする遺伝子には、聴覚障害に関連した変異の報告が多数存在する。これは、ヒトの蝸牛におけるコネキシンタンパク質の機能を効果的に無効にする突然変異の存在を示す。(Kikuchi T, et al., 1995)。我々の先行研究において、強大音響曝露による聴覚機能障害が外側壁ラセン靱帯の GJIC の破綻によることを報告している。また、この GJIC の破綻は、外有毛細胞死に先立って生じ、これを抑制することで外有毛細胞死の抑制につながることを見出した (Yamaguchi T, et al., 2017)。

そこで、GJ 阻害薬である Carbenoxolone (CBX) を用いて、外有毛細胞死に対する蝸牛外側壁ラセン靱帯の GJIC 障害の関与を *in vitro*・*in vivo* 両実験系により解析した。

3.2 方法

3.2.1 試薬

CBX は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul MN, USA) から購入した。Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody、Alexa Fluor 568TM Phalloidin、N-2 supplement (×100) 、B-27 supplement (×50) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。Anti-myosin VIIa rabbit polyclonal antibody は Proteus BioSciences Inc. (Ramona, CA, USA) から購入した。Dako REAL Antibody Diluent は Dako Denmark A/S (Glostrup, Denmark) から購入した。Calcein-AM、Blocking One Histo は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) から購入した。VECTASHIELD は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) から購入した。使用した他のすべての化学物質は、商業的に入手可能な最高純度であった。

3.2.2 実験動物の取り扱い

2.2.2 に準じて行った。

3.2.3 薬物投与

2.2.3 に準じて行った。内耳内へ局所投与した CBX は 5, 15 あるいは 25 nmol/耳のいずれかを使用した。

3.2.4 蝸牛コルチ器器官培養法

2.2.4 に準じて行った。

3.2.5 組織学的評価

2.2.5 に準じて行った。

3.2.6 聴性脳幹反応 (ABR) 測定

イソフルラン吸入による麻酔下で、スチール針電極を頂点に、左右の耳の腹側に配置した。脳波記録は、細胞外増幅器 Digital Bioamp システム BAL-1 (Tucker-Davis Technologies、FL、USA) を用いて実施し、波形記憶および刺激制御は、Power Lab システム Power Lab 2/20 の Scope ソフトウェア (AD Instruments, Castle Hill, Australia) 、マウスの外耳道に挿入されたカ

スーパー型スピーカーES1spc (Bioresearch Center, Nagoya, Japan) により、音刺激を行った。Programmable Attenuator PA5 (Tucker Davis Technologies, FL, USA) を使用して SPL を指定し、Real Time Processor RP2.1 (Tucker-Davis Technologies, FL, USA) を用いてトーンバースト刺激を生成した。ABR 波形は、100-10,000 Hz 帯域バイパスフィルタ設定を使用して 12.8 ms の間記録され、500 回以上の刺激から得られた波形を加算平均し、波形を得た。閾値 ABR は、最大振幅から 5 dB SPL 最小サイズのステップダウンを使用して、4、12、および 20 kHz で、曝露後 1 日目および 7 日目に測定した。聴力閾値は、信頼性のある I 波 ABR を生成する最も低い刺激強度として定義した。音圧はすべての周波数で 100 dB を上限値とし、重度の聴覚障害のために反応がなかった場合、閾値が 100 dB とした。

3.2.7 光褪色後蛍光回復法 (FRAP 法)

内耳内投与後、各経過時間におけるマウスから蝸牛ラセン靱帯を摘出した。摘出したラセン靱帯を、5% CO₂/95% air、加湿インキュベーター中、37°C、10% ウシ胎仔血清 (FBS) を補充したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を含むポリ-L-リシン被覆皿上に 4 時間静置した。光褪色後蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching: FRAP 法) については、培養ラセン靱帯組織に、ギャップ結合の透過性物質である calcein-AM を用いて加湿インキュベーター中で 20 分間反応させた。Calcein-AM を反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW-FV1000、OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて 15 秒間パルスレーザー (405 nm) 照射により組織を褪色させた。その後、2 秒ごとに 180 秒間、レーザー照射部位の蛍光量を定量した。照射前、照射後 22 秒および 180 秒の蛍光強度を用いて、以下の数式により蛍光強度回復率 (%) を算出した。

$$\text{蛍光強度回復率 (\%)} = \frac{\text{照射後 180 秒の蛍光強度} - \text{照射後 22 秒の蛍光強度}}{\text{照射前の蛍光強度} - \text{照射後 22 秒の蛍光強度}} \times 100$$

3.2.8 データ分析

2.2.6 に準じて行った。

3.3 結果

3.3.1 培養コルチ器の外有毛細胞に対する CBX 曝露の影響

まず、CBX が、蝸牛外有毛細胞の脱落を引き起こすかどうかを検討するために、培養コルチ器に CBX (300 μ M) を 7 日間曝露した。曝露後 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、phalloidin 染色を行った。その結果、少なくとも曝露 7 日後において、CBX は、培養コルチ器の外有毛細胞の脱落を引き起こさなかった (図 6)。

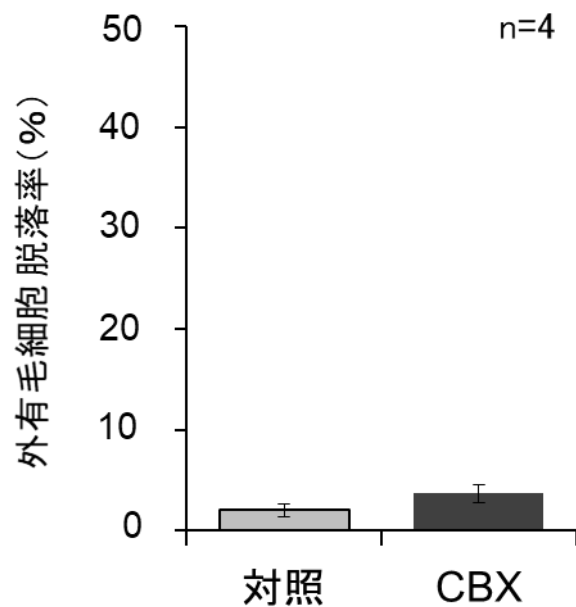


図 6) 培養コルチ器の外有毛細胞に対する CBX 曝露の影響

器官培養のため生後 4 日齢のマウスからコルチ器を分画した。培養コルチ器を vehicle または CBX (300 μ M) のいずれかを含む培地中で 7 日間培養後、OHC の測定のために Alexa Fluor 568TM Phalloidin で染色した (n=4)。(Nishiyama N, et al., 2019 より改変)

3.3.2 CBX 内耳内投与のラセン靱帯における GJIC に対する影響

CBX 投与により、蝸牛ラセン靱帯におけるギャップ結合機能が破綻しているか否かを明らかにする目的で、CBX 内耳内投与後、FRAP 法を用いてラセン靱帯におけるギャップ結合機能を評価した (図 7)。Vehicle 投与群、CBX 投与群において、レーザー照射直後の 22 秒時点で照射領域 (白丸) の calcein-AM による蛍光を褪色させた。Vehicle 投与群では、照射後 180 秒時点において、calcein による蛍光強度は照射前の約 80%まで回復した。これは vehicle 投与群の蝸牛から分画されたラセン靱帯において GJIC が機能していることを示している。一方、CBX 投与群の蝸牛から分画されたラセン靱帯において、calcein-AM による蛍光強度の回復はレーザー照射後 180 秒でほとんどみられなかった。したがって、CBX 内耳内投与により、蝸牛ラセン靱帯における GJIC が破綻することが示唆された。

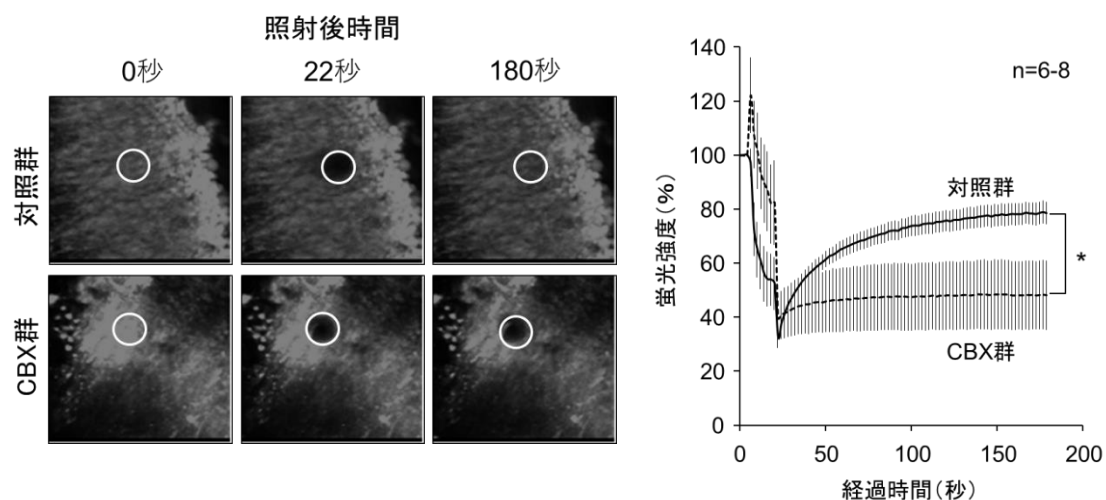


図 7) 蝸牛ラセン靱帯における CBX による GJIC の破綻

蝸牛後半規管から vehicle (実線) または CBX (15 nmol/耳、点線) のいずれかを投与した。投与 24 時間後に、蝸牛の基底回転および中回転のラセン靱帯組織を分画し、次いで GJIC 機能を評価するために FRAP 法を行った。(左) レーザーの照射前または照射一定時間経過後のラセン靱帯の典型的な顕微鏡画像を示している。白丸はレーザーで照射された部分。(右) 照射前 (時間= 0)の蛍光強度に対するレーザー照射一定時間経過後の蛍光強度の百分率 (平均±標準誤差) (n=6~8)。レーザー照射後 180 秒時点の蛍光強度の比較。* $p < 0.05$, vs 対照群。(Nishiyama N, et al., 2019 より改変)

さらに、この CBX の効果の濃度依存性を明らかにする目的で、CBX (5 もしくは 15 nmol/耳) を投与し、投与後 1 および 7 日に FRAP 法により GJIC を評価した。その結果、CBX (15 nmol/耳)投与群では、投与 1 日目に加えて 7 日目においても蛍光強度回復率を有意に減少させた。一方、CBX (5 nmol/耳) 内耳内投与は、投与後 1 日目の蛍光回復率を有意に減少させたが [蛍光回復率 (%) : Vehicle, 82.6 ± 5.7 ; CBX, 62.1 ± 6.2 ($p < 0.05$)]、投与後 7 日目では、蛍光回復率の有意な変化は認められなかった [蛍光回復率 (%) : Vehicle, 80.0 ± 5.6 ; CBX, 77.1 ± 6.1]。低濃度 (5 nmol/耳) での CBX による GJIC の破綻が、CBX 投与後 1 日目の高用量 (15 nmol/耳) によるものよりも軽度であったことから [蛍光回復率 (%) : 5 nmol, 62.1 ± 6.2 ; 15 nmol, 22.6 ± 12.7 ($p < 0.01$)]、本実験条件下において、CBX は用量依存的にラセン靱帯における GJIC を破綻させ、高用量 (15 nmol/耳) の場合には永続的に GJIC を破綻させることが示唆された (図 8)。

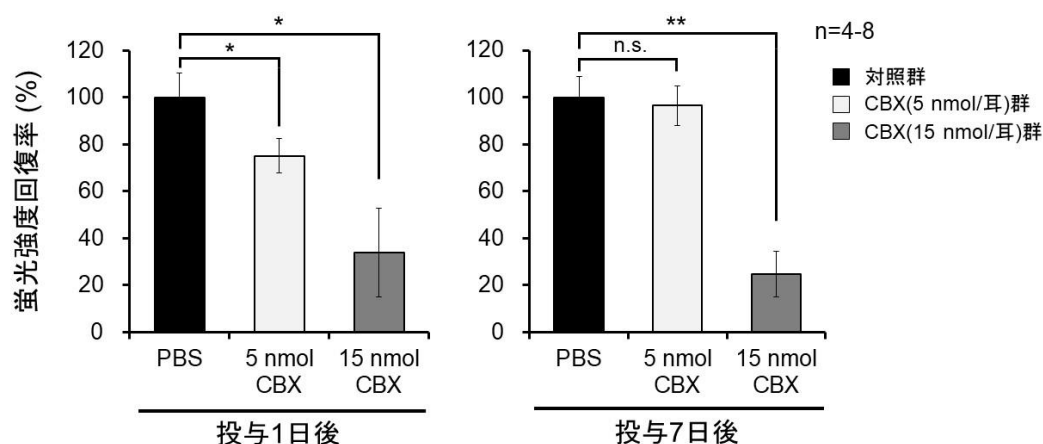


図 8) 内耳内投与による GJIC に対する CBX の用量依存の影響

マウス蝸牛後半規管から vehicle もしくは CBX のいずれかを投与した。投与 1 日後および 7 日後に、蝸牛の基底回転および中回転のラセン靱帯組織を分画し、次いで、GJIC の評価のために FRAP 法をおこなった。レーザー照射後 180 秒の照射部分における蛍光強度回復率の百分率 (平均 \pm 標準誤差) ($n=4\sim 8$)。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s vs. PBS 群。n.s., 有意差なし。(Nishiyama N, et al., 2019 より改変)

3.3.3 聴力に対する CBX 内耳内投与の影響

次に、CBX 内耳内投与による聴力に対する影響を、ABR によって 4、12 および 20 kHz の各周波数において解析した。CBX (5 nmol/耳) 内耳内投与は、投与 1 日後においては有意に聴覚閾値の上昇を引き起こした。しかしながら、投与 7 日後において 4 および 12 kHz において ABR 閾値の上昇が回復した。CBX (15 nmol/耳) のおよび CBX (25 nmol/耳) はより高い上昇をもたらし、投与 7 日後においても有意に上昇が引き続き生じていた。これらの結果より、CBX が、少なくとも 5~25 nmol/耳の用量依存的に永続的な (最大 7 日間) 難聴を引き起こす能力を有することが示唆された (図 9)。

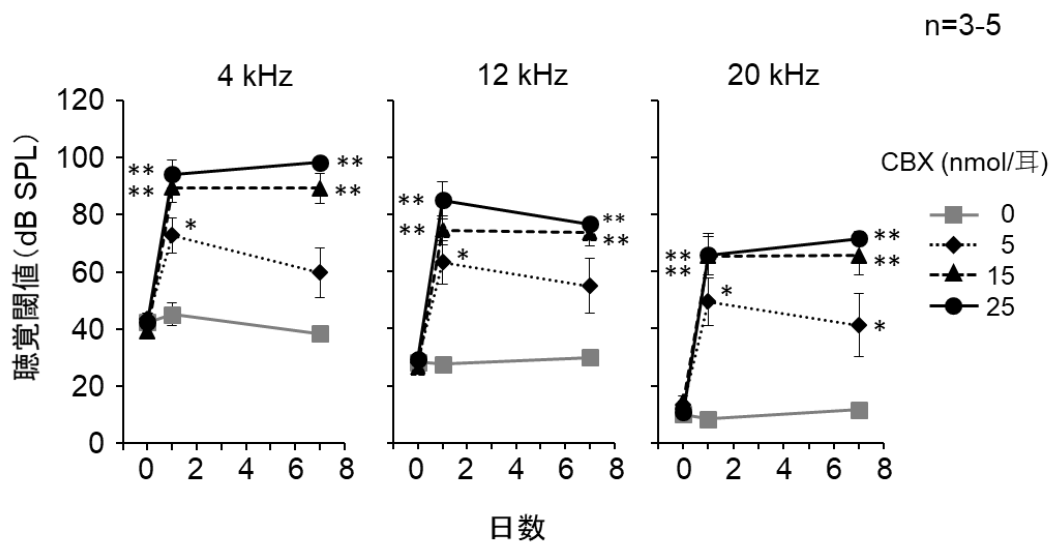


図 9) CBX が聴力に及ぼす影響 (*in vivo*)

蝸牛後半規管から vehicle または CBX の指示された用量をマウスに投与した。ABR は、投与前、投与 1 日後および 7 日後に、4、12 および 20 kHz の周波数で測定した。(グラフ) 各周波数における ABR 閾値シフトの平均 (平均±標準誤差) (n=3~5) 。*p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle。 (Nishiyama N, et al., 2019 より改変)

3.3.4 外有毛細胞に対する CBX 内耳内投与の影響

次に、*in vivo* において、CBX 内耳内投与後による外有毛細胞の脱落の経時的な変化を確認した。投与後 7 日目に外有毛細胞の著しい脱落が観察されたのに対し、少なくとも投与後 1 日目から 5 日目には外有毛細胞の脱落は認められなかった (図 10)。このことから、CBX は蝸牛において遅発性の外有毛細胞の脱落を引き起こす可能性が示唆された。

外有毛細胞脱落

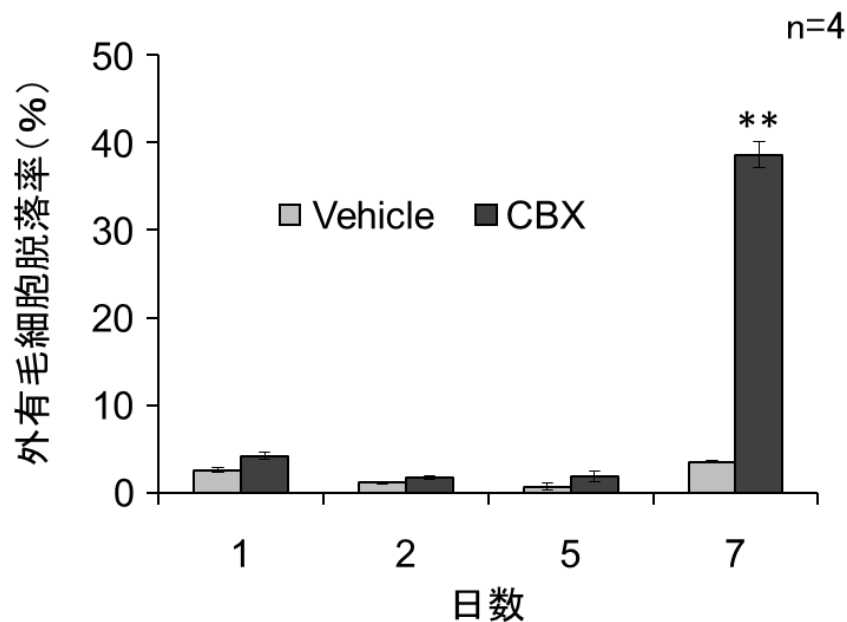


図 10) CBX 投与後の OHC 脱落の経時的変化 (*in vivo*)

マウス蝸牛後半規管から vehicle または CBX (15 nmol/耳) のいずれかを投与した。図に示す日数経過後に、蝸牛を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、コルチ器を分画し、その基底回転および中回転の OHC を Alexa Fluor 568™ Phalloidin で染色した。(グラフ) 蝸牛中回転領域における外有毛細胞の脱落率 (平均±標準誤差) (n=4)。** $p < 0.01$ vs. vehicle. (Nishiyama N, et al., 2019 より改変)

3.4 考察

本検討では、FRAP 法の結果より、ラセン靱帯における GJIC の破綻させることができる CBX の内耳内投与を行った。*In vivo* における CBX の内耳内投与は本実験条件下で少なくとも 2 つの影響が考えられる。1 つは薬剤の外部からの注入による機械的な損傷である。もう 1 つは CBX 自体の薬理学的な影響である。前者については、同実験条件下で対照として vehicle を投与することにより、影響を回避することができると考えられた。後者については、CBX がコルチゾールの可逆的な不活化酵素である 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase を阻害すること (Duax WL, et al., 2000) は、CBX の影響として考えなければならない。しかしながら、これまでの報告によると、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase の蛋白質および mRNA が成熟ラットの内耳組織のいずれにおいても検出されないことが示されている (Terakado M, et al., 2011) 。このことから、CBX による難聴は内耳組織における 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase の阻害によるものである可能性が排除される。したがって、CBX 誘発性の聴力障害は蝸牛における GJIC の破綻のみによる効果である可能性が高い。

ラセン靱帯線維細胞を用いた研究では、4-HNE がプロテアーゼであるカルパインを活性化し、GJ 構成蛋白であるコネキシンを分解することで GJIC を阻害すること (Yamaguchi T, et al., 2015)、また音響曝露前のカルパイン阻害剤による予防は、蝸牛外有毛細胞の脱落および難聴を改善することが示されている (Yamaguchi T, et al., 2017) 。このことから、ラセン靱帯における GJIC の破綻が蝸牛における外有毛細胞脱落を引き起こす可能性を推察させる。予想通り、*in vivo* による CBX の蝸牛後半規管投与は、ラセン靱帯における GJIC の破綻と外有毛細胞の脱落を劇的に引き起こした。しかし、CBX は、*in vitro* によるコルチ器器官培養条件下で外有毛細胞の脱落を引き起こすことはなかった。この結果は、CBX 自体に有毛細胞毒性は小さく、外有毛細胞の脱落は、ラセン靱帯における GJIC の破綻に起因することを示唆するものである。先行研究において、音響曝露後の外側壁ラセン靱帯において GJIC が破綻することが明らかとなっている (Yamaguchi T, et al., 2017) 。加えて、本研究の結果によって、ラセン靱帯における GJIC の破綻が騒音誘発性の外有毛細胞の脱落に必須であるということが考えられた。さらに、*in vivo* による CBX の内耳内投与が重度の難聴を引き起こしたという結果は、ラセン靱帯における GJIC 破綻が騒音誘発性難聴および外有毛細胞の脱落の原因の 1 つであるということを強く支持している。

GJIC は、細胞外および細胞内のイオン組成および多くの組織構造におけるその含量を維持するために重要な役割を果たす。特に、蝸牛ラセン靱帯の GJIC は、聴力機能において重要な役割を果たすことが知られている。内リンパ液には 150 mM の K⁺、2 mM の Na⁺、20 μ M の Ca²⁺が含まれており、+80 mV の蝸牛内電位を維持しており、これは聴力維持に重要である (Von Bekesy G, et al., 1952) 。GJIC の役割は、K⁺を高濃度で蝸牛管の内リンパに保持して蝸牛内電位を発生させることである。

蝸牛内電位は、外有毛細胞内への K⁺流入および Ca²⁺透過性を増加させることによって、

外有毛細胞の感受性を高める、一方で、毛束の運動性を増幅する (Weber PC, et al., 2001, Wangemann P, et al., 2002, Chan DK, et al., 2005)。 K^+ が有毛細胞に入ると、 K^+ は、支持細胞およびラセン靱帯および血管条を含む外側壁において、 Na^+, K^+ -ATPase イオン輸送体、および GJIC を含むイオン輸送系を介して内リンパ液に戻る必要がある (Wangemann P, et al., 2002)。したがって、CBX による GJIC の破綻は、蝸牛の外側壁におけるラセン靱帯を介して血管条への K^+ サイクリングの減弱および蝸牛内電位の低下を介して難聴をもたらす。これらのことから、CBX による GJIC の破綻が難聴を誘発する可能性が推察される。

グリチルリチン酸、ウルソ酸、およびオレアノール酸などのギャップ結合阻害剤の抗腫瘍活性に関するいくつかの報告がある。グリチルリチン酸はギャップ結合を阻害することが知られており (Davidson JS, et al., 1988)、オレアノール酸およびウルソ酸はギャップ結合構成成分であるコネキシン 32 遺伝子の発現を減少させる (Satomi Y, et al., 2005)。グリチルリチン酸による GJIC の薬理的阻害は、ヒト肝細胞癌において細胞損傷を引き起こす。ヒト網膜色素上皮細胞 ARPE-19 を用いた研究では、GJ 阻害剤であるグリチルリチン酸によって、酸化ストレスに対するコネキシンを介した細胞保護作用が阻害されることが示された (Hutnik CM, et al., 2008)。このように GJIC の阻害が、細胞障害に関与することが報告されている。

逆に、CBX は、種々の細胞における細胞損傷を保護することが知られている (Du ZJ, et al., 2017, Na YJ, et al., 2017)。しかし、本研究による知見では、外有毛細胞以外の組織および細胞における GJIC 阻害剤の直接的な影響によって、CBX は間接的に外有毛細胞の脱落を引き起こした。

GJIC 破綻に起因する外有毛細胞の脱落の根底にある正確なメカニズムを解明するには、さらに詳細な研究が必要である。

第4章 おわりに

4.1 結語

本研究の主な目的は、音響曝露後の蝸牛における OHC 脱落の根底にある機序の解明であった。この目的のために、*in vitro* 実験系として、生後 4 日齢のマウス蝸牛から分画したコルチ器を培養し、培養コルチ器へ薬物を曝露する方法を用い、*in vivo* 実験系としてこれまでの内耳研究において広く使用され、効果が検証されている蝸牛後半規管から内耳内へ薬物を投与する方法を用いた。本研究では、強大音響曝露後での蝸牛内変化である ROS/RNS の生成と蝸牛の GJIC の破綻に焦点をあてた。本検討結果から、GJIC 阻害剤である CBX の内耳内投与により外有毛細胞の有意な脱落が誘発されることが示された。

人間の五感の一つである聴覚は、ヒトが生活する上で非常に重要な機能であり、難聴は“生活の質”に直結している。さらに、難聴はコミュニケーションの破綻だけにとどまらず、認知症のリスク因子として報告されるなど波及効果の大きい疾患である (Livingston G, et al., 2017)。しかし、その治療法が確立していないのは問題であり、早急に解決しなければならない課題の一つである。

有毛細胞に対する治療のアプローチとしては、現在、騒音性難聴後のマウスにて内耳支持細胞を有毛細胞へ再分化させ、聴力改善に成功する (Mizutani K, et al., 2013) など、蝸牛有毛細胞およびラセン神経節再生に向けた内耳再生治療が進みつつあるものの、ただちに臨床応用できるものではない。

本研究では、ROS の一つである H_2O_2 や酸化ストレス代謝産物である 4-HNE、RNS 発生剤である SIN-1 は有毛細胞死に直接的な影響がないことを示し、有毛細胞死のメカニズムの一端に蝸牛 GJIC の破綻が関与することを明らかにした。したがって本研究の結果は、難聴およびその原因となる有毛細胞死を防ぐことができる新規治療法開発の可能性を秘めているものである。

音響曝露後、GJ 構成蛋白質であるコネクシンの発現が、外側壁ラセン靱帯で減少する (Yamaguchi T, et al., 2014)。他の細胞ではあるが、腎がん細胞株や肝がん細胞株で脱メチル化薬のデシタビンやレチノイン酸により、細胞内のコネクシンの発現を上昇させることが報告されており (Takano Y, et al., 2010, Yang Y, et al., 2014)、音響曝露後のコネクシンの減少を抑えることができるかもしれない。

本研究を基に、今後さらに GJIC 機能破綻を含む外側壁機能破綻と有毛細胞障害との関係を明らかにしていくことで、聴覚障害の予防・治療法に対して蝸牛外側壁の GJIC が新たな治療標的となりうる可能性を示すものであり、デシタビンやレチノイン酸のような GJIC を標的とした医薬品の開発をもたらすことを強く期待したい。

謝辞

本論文は、筆者が摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室において行った研究をまとめたものです。本研究の遂行において、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室教授、荻田喜代一先生に心より厚く御礼申し上げます。

学位論文審査において、貴重なご助言とご指導を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室教授、前田定秋先生、並びに、同機能形態学研究室准教授、倉本展行先生に心より感謝申し上げます。

研究を遂行するにあたり、数多くの貴重なご助言とご指導を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室准教授、米山雅紀先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数多くのご助言と綿密なご指導を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室助教、山口太郎先生に心より感謝申し上げます。

また実験の遂行にあたり、惜しみないご協力を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室助教、尾中勇祐先生、並びに、同研究室のみなさまに心より感謝申し上げます。

最後になりますが、社会人大学院進学にあたり、特段のご理解とご配慮を賜りました関西医科大学附属病院薬剤部部長、岡崎和一先生、並びに、関西医科大学附属病院薬剤部前部長、故・廣田育彦先生に心より厚く御礼申し上げます。また仕事と研究の両立にあたり、多大なるご支援とご協力を戴きました薬剤部の先生方に心より感謝申し上げます。

引用文献

- Ahmad S, Chen S, Sun J, Lin X., 2003. Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 362-368.
- Alam, SA, Oshima T, Suzuki M, Kawase T, Takasaka T, Ikeda K., 2001. The expression of apoptosis-related proteins in the aged cochlea of Mongolian gerbils. *Laryngoscope*, 111, 528-534.
- Alamgir H, Turner CA, Wong NJ, Cooper SP, Betancourt JA, Henry J, Senchak AJ, Hammill TL, Packer MD., 2016. The impact of hearing impairment and noise-induced hearing injury on quality of life in the active-duty military population: challenges to the study of this issue. *Mil Med Res.*, 3, 11.
- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB., 2001. Direct evidence for the participation of gap junction - mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha - particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 473-478.
- Basner M, Babisch W, Davis A, Brink M, Clark C, Janssen S, Stansfeld S., 2014. Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet*, 383 (9925), 1325-32.
- Bohne BA, Harding GW, Lee SC., 2007. Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear Res.*, 223, 61-70.
- Böttger EC, Schacht J., 2013. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss. *Hear. Res.*, 303, 12-19.
- Cazals Y., 2000. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol.*, 62 (6) :583-631.
- Chan DK, Hudspeth AJ., 2005. Ca²⁺ current-driven nonlinear amplification by the mammalian cochlea in vitro. *Nat. Neurosci.*, 8, 149-155.
- Chang NC, Yu ML, Ho KY, Ho CK., 2007. Hyperlipidemia in noise-induced hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 137, 603-6.
- Chiodo AA, Alberti PW., 1994. Experimental, clinical and preventive aspects of ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 251, 375-92.
- Chirtes F, Albu S., 2014. Prevention and restoration of hearing loss associated with the use of cisplatin. *Biomed Res Int.*, 925485.
- Connors BW., 2012. Tales of a Dirty Drug: Carbenoxolone, Gap Junctions, and Seizures. *Epilepsy Curr.*, 12, 66-68.
- Crouch JJ, Sakaguchi N, Lytle C, Schulte BA., 1997. Immunohistochemical localization of the Na-K-Cl co-transporter (NKCC1) in the gerbil inner ear. *J Histochem Cytochem.*, 45, 773-8.
- Davidson JS, Baumgarten IM., 1988. Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 246, 1104-1107.

- Davis AC., 1990. Epidemiological profile of hearing impairments: the scale and nature of the problem with special reference to the elderly. *Acta Otolaryngol Suppl.*, 476, 23-31.
- Deng L, Ding D, Su J, Manohar S, Salvi R., 2013. Salicylate selectively kills cochlear spiral ganglion neurons by paradoxically up-regulating superoxide. *Neurotox Res.*, 24, 307-19.
- Driver EC, Kelley MW., 2010. Transfection of mouse cochlear explants by electroporation. *Curr Protoc Neurosci.*, 34, 1-10.
- Du ZJ, Cui GQ, Zhang J, Liu XM, Zhang ZH, Jia Q, Ng JC, Peng C, Bo CX, Shao H., 2017. Inhibition of gap junction intercellular communication is involved in silica nanoparticles-induced H9c2 cardiomyocytes apoptosis via the mitochondrial pathway. *Int. J. Nanomedicine*, 12, 2179-2188.
- Duax WL, Ghosh D, Pletnev V., 2000. Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease. *Vitam. Horm.*, 58, 121-148.
- Fetoni AR, De Bartolo P, Eramo SL, Rolesi R, Paciello F, Bergamini C, Fato R, Paludetti G, Petrosini L, Troiani D., 2013. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *J Neurosci.*, 33, 4011-23.
- Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G., 2003. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assessment of connexin composition in mammals. *J. Comp. Neurol.*, 467, 207-731.
- Fredelius L, Rask-Andersen H., 1990. The role of macrophages in the disposal of degeneration products within the organ of corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol.*, 109, 76-82.
- Frisina ST, Mapes F, Kim S, Frisina DR, Frisina RD., 2006. Characterization of hearing loss in aged type II diabetics. *Hear Res.*, 211, 103-13.
- Furness DN., 2015. Molecular basis of hair cell loss. *Cell. Tissue Res.*, 361, 387-399.
- Garcia - Dorado D, Rodriguez - Sinovas A, Ruiz - Meana M., 2004. Gap junction - mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia - reperfusion. *Cardiovasc. Res.*, 61, 386-401.
- Garetz SL, Rhee DJ, Schacht J., 1994. Sulfhydryl compounds and antioxidants inhibit cytotoxicity to outer hair cells of a gentamicin metabolite in vitro. *Hear Res.*, 77, 75-80.
- Gates GA, Cobb JL, D'Agostino RB, Wolf PA., 1993. The relation of hearing in the elderly to the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 119, 156-61.
- Gates GA, Mills D, Nam BH, D'Agostino R, Rubel EW., 2002. Effects of age on the distortion product otoacoustic emission growth functions. *Hear Res.*, 163, 53-60.
- Gates GA, Mills JH., 2005. Presbycusis. *Lancet.*, 366, 1111-20.
- Gonçalves MS, Silveira AF, Teixeira AR, Hyppolito MA., 2013. Mechanisms of cisplatin ototoxicity: theoretical review. *J Laryngol Otol.*, 127, 536-41.
- Gopinath B, Schneider J, Rochtchina E, Leeder SR, Mitchell P., 2009. Association between age-related

- hearing loss and stroke in an older population. *Stroke.*, 40, 1496-8.
- Goto F, Yabe H, Ogino T, Ogawa K., 2007. Survey of Patients Wearing Hearing Aids Applied with and without Financial Support from the Hearing-handicapped Approval Law. *耳鼻咽喉科臨床*, 100, 623-628.
- Guitton MJ, Caston J, Ruel J, Johnson RM, Pujol R, Puel JL., 2003. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J Neurosci.*, 23, 3944-52.
- Han WJ, Shi XR, Nuttall A., 2018. Distribution and change of peroxynitrite in the guinea pig cochlea following noise exposure. *Biomed Rep.*, 9, 135-141.
- Hequembourg S, Liberman MC., 2001. Spiral ligament pathology: a major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *J Assoc Res Otolaryngol.*, 2, 118-29.
- Hirose K, Discolo CM, Keasler JR, Ransohoff R., 2005. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J Comp Neurol.*, 489, 180-94.
- Honkura Y, Matsuo H, Murakami S, Sakiyama M, Mizutani K, Shiotani A, Yamamoto M, Morita I, Shinomiya N, Kawase T, Katori Y, Motohashi H., 2016. NRF2 Is a Key Target for Prevention of Noise-Induced Hearing Loss by Reducing Oxidative Damage of Cochlea. *Sci Rep.*, 6:19329.
- Hutnik CM, Pocrnich CE, Liu H, Laird DW, Shao Q., 2008. The protective effect of functional connexin43 channels on a human epithelial cell line exposed to oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49, 800-806.
- Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G., 2000. Age-related changes in the murine cochlear lateral wall. *Hear Res.*, 139, 116-22.
- Jiang H, Sha SH, Schacht J., 2006. Rac/Rho pathway regulates actin depolymerization induced by aminoglycoside antibiotics. *J Neurosci Res.*, 83, 1544-51.
- Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T., 2015. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Biomed Res. Int.*, 617207.
- Keithley EM, Ryan AF, Woolf NK., 1989. Spiral ganglion cell density in young and old gerbils. *Hear Res.*, 38, 125-33.
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC., 1995. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol.*, 191, 101-118.
- Kopelman J, Budnick AS, Sessions RB, Kramer MB, Wong GY., 1988. Ototoxicity of high-dose cisplatin by bolus administration in patients with advanced cancers and normal hearing. *Laryngoscope.*, 98, 858-64.
- Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van de Water TR., 1997. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.*, 18, 559-71.
- Krutovskikh VA, Piccoli C, Yamasaki H. 2002. Gap junction intercellular communication propagates

- cell death in cancerous cells. *Oncogene*, 21, 1989-1999.
- Kumar NM, Gilula NB., 1996. The gap junction communication channel. *Cell*, 84, 381-388.
- Kurabi A, Keithley EM, Housley GD, Ryan AF, Wong AC., 2017. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear Res.*, 349, 129-137.
- Le Prell CG, Yamashita D, Minami SB, Yamasoba T, Miller JM., 2007. Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention. *Hear Res.*, 226, 22-43.
- Li J, Billiar TR., 2000. The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin Perinatol.*, 24, 46-50.
- Liu L, Chen Y, Qi J, Zhang Y, He Y, Ni W, Li W, Zhang S, Sun S, Taketo MM, Wang L, Chai R, Li H., 2016. Wnt activation protects against neomycin-induced hair cell damage in the mouse cochlea. *Cell. Death Dis.*, 7, e2136.
- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafrida SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N., 2017. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*, 10113, 2673-2734.
- Maddox PT, Saunders J, Chandrasekhar SS., 2000. Sudden hearing loss from PDE-5 inhibitors: A possible cellular stress etiology. *Laryngoscope.*, 119, 1586-9.
- Matz GJ., 1990. Clinical perspectives on ototoxic drugs. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.*, 148, 39-41.
- McGwin G Jr., 2010. Phosphodiesterase type 5 inhibitor use and hearing impairment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 136, 488-92.
- Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge AS., 2013. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron.*, 77, 58-69.
- Myers EN, Bernstein JM., 1965. Salicylate ototoxicity: A clinical and experimental study. *Arch Otolaryngol.*, 82, 483-493.
- Na YJ, Choi KJ, Park SB, Sung HR, Jung WH, Kim HY, Rhee SD, Kim KY., 2017. Protective effects of carbenoxolone, an 11 β -HSD1 inhibitor, against chemical induced dry eye syndrome. *Apoptosis*, 22, 1441-1453.
- Nagashima R, Yamaguchi T, Kuramoto N, Ogita K., 2011. Acoustic overstimulation activates 5'-AMP-activated protein kinase through a temporary decrease in ATP level in the cochlear spiral ligament prior to permanent hearing loss in mice. *Neurochem. Int.*, 59, 812-20.
- Nagashima R, Yamaguchi T, Tanaka H, Ogita K., 2010. Mechanism underlying the protective effect of tempol and N ω -nitro-L-arginine methyl ester on acoustic injury: possible involvement of c-Jun N-terminal kinase pathway and connexin26 in the cochlear spiral ligament. *J. Pharmacol. Sci.*, 114, 50-62.
- Nakagawa T, Yamane H, Takayama M, Sunami K, Nakai Y., 1999. Involvement of nitric oxide in

- aminoglycoside vestibulotoxicity in guinea pigs. *Neurosci Lett.*, 267, 57-60.
- Neri S, Signorelli S, Pulvirenti D, Mauceri B, Cilio D, Bordonaro F, Abate G, Interlandi D, Misseri M, Ignaccolo L, Savastano M, Azzolina R, Grillo C, Messina A, Serra A, Tsami A., 2006. Oxidative stress, nitric oxide, endothelial dysfunction and tinnitus. *Free Radic Res.* 40, 615-8.
- Nevado, J., Sanz, R., Casqueiro, J.C., Ayala, A., Garcia-Berrocal, J.R., Ramirez-Camacho, R., 2006. Ageing evokes an intrinsic pro-apoptotic signaling pathway in rat cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 126, 1134e1139.
- Nishiyama N, Yamaguchi T, Yoneyama M, Onaka Y, Ogita K., 2019. Disruption of Gap Junction-Mediated Intercellular Communication in the Spiral Ligament Causes Hearing and Outer Hair Cell Loss in the Cochlea of Mice. *Biol Pharm Bull.*, 42, 73-80.
- Parker M, Brugeaud A, Edge AS., 2010. Primary culture and plasmid electroporation of the murine organ of Corti. *J Vis Exp.*, 36, pii: 1685.
- Pike D, Bosher SK., 1980. The time course of the stria changes produced by intravenous furosemide. *Hear Res.*, 3, 79-89.
- Priuska EM, Schacht J., 1995. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol.*, 50, 1749-52.
- Rybak LP, Whitworth C, Weberg A, Scott V., 1992. Effects of organic acid on the edema of the stria vascularis induced by furosemide. *Hear Res.*, 59, 75-84.
- Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V., 2007. Mechanism of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res.*, 226, 157e167.
- Rybak LP. Ototoxicity of loop diuretics., 1993. *Otolaryngol Clin North Am* 26: 829-844.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC., 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.*, 83, 1359-1400.
- Sasaki A., 2017. 耳鼻咽喉科疾患に対する生活指導・予防・セルフケア 薬剤性難聴. *JOHNS*, 33, 981-984.
- Satomi Y, Nishino H, Shibata S., 2005. Glycyrrhetic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2. *Anticancer Res.*, 25, 4043-4047.
- Schulte BA, Adams JC., 1989. Distribution of immunoreactive Na⁺,K⁺-ATPase in gerbil cochlea. *J Histochem Cytochem.*, 37, 127-34.
- Selimoglu E., 2007. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr. Pharm. Des.*, 13, 119-126.
- Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J., 2001. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res.*, 155, 1-8.
- Shibata Y., 2010. Gap Junctions: Diversity of Connexin Protein Expression—Molecular Anatomy of Tawara's Node—, *Fukuoka Igaku Zasshi*. 101, 1-9.
- Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, Rabinovitch PS, Weindrich R, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Prolla TA., 2009. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is

- mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106, 19432-7.
- Spicer SS, Gratton MA, Schulte BA., 1997. Expression patterns of ion transport enzymes in spiral ligament fibrocytes change in relation to stria atrophy in the aged gerbil cochlea. *Hear Res.*, 111, 93-102.
- Spicer SS, Schulte BA., 1996. The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res.*, 100, 80-100.
- Sprinzel GM, Riechelmann H., 2010. Current trends in treating hearing loss in elderly people: a review of the technology and treatment options - a mini-review. *Gerontology.*, 56, 351-8.
- Sunami K, Yamane H, Nakagawa T, Takayama M, Konishi K. 1999. Glutamate toxicity induced degeneration of outer hair cells with a temporal increase of nitric oxide production in the guinea pig cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 256, 323-9.
- Takano Y, Iwata H, Yano Y, Miyazawa M, Virgona N, Sato H, Ueno K, Yano T., 2010. Up-regulation of connexin 32 gene by 5-aza-2'-deoxycytidine enhances vinblastine-induced cytotoxicity in human renal carcinoma cells via the activation of JNK signalling. *Biochem Pharmacol.* 80, 463-70.
- Takumida M, Popa R, Anniko M., 1999. Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 61, 63-70.
- Terakado M, Kumagami H, Takahashi H., 2011. Distribution of glucocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in the rat inner ear. *Hear. Res.*, 280, 148-156.
- Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Nakashima T, Shimokata H., 2010. Diabetes reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: a population- based study of age-related hearing loss. *Med Sci Monit.*, 16, PH63-8.
- Usami S, Hjelle OP, Ottersen OP., 1996. Differential cellular distribution of glutathione--an endogenous antioxidant--in the guinea pig inner ear. *Brain Res.*, 743, 337-40.
- Von Bekesy G. Resting potentials inside the cochlear partition., 1952. *Nature*, 169, 241-242.
- Wallace DC., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.*, 39:359-407.
- Wangemann P., 2002. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear. Res.*, 165, 1-9.
- Watanabe K, Hess A, Zumeger C, Stennert E, Bloch W, Addicks K, Michel O., 2000. Changes of the compound action potential (CAP) and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea under the inflammatory condition (1) . *Hear Res.*, 145, 149-55.
- Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O., 2000. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs.*, 11, 401-6.
- Weber PC, Cunningham CD 3rd, Schulte BA., 2001. Potassium recycling pathways in the human cochlea. *Laryngoscope*, 111, 1156-1165.
- World Health Organization, Deafness and hearing loss. <<https://www.who.int/en/news-room/fact->

sheets/detail/deafness-and-hearing-loss> (2018) (参照 2018-12-25) .

- Yamaguchi T, Nagashima R, Yoneyama M, Shiba T, Ogita K., 2014. Disruption of ion-trafficking system in the cochlear spiral ligament prior to permanent hearing loss induced by exposure to intense noise: possible involvement of 4-hydroxy-2-nonenal as a mediator of oxidative stress. *PLoS One*, 9, e102133.
- Yamaguchi T, Yoneyama M, Ogita K., 2017. Calpain inhibitor alleviates permanent hearing loss induced by intense noise by preventing disruption of gap junction-mediated intercellular communication in the cochlear spiral ligament. *Eur. J. Pharmacol.*, 803, 187-194.
- Yamaguchi T, Yoneyama M, Onaka Y, Imaizumi A, Ogita K., 2017. Preventive effect of curcumin and its highly bioavailable preparation on hearing loss induced by single or repeated exposure to noise: A comparative and mechanistic study. *J. Pharmacol. Sci.*, 134, 225-233.
- Yamane H, Nakai Y, Konishi K, Sakamoto H, Matsuda Y, Iguchi H., 1991. Strial circulation impairment due to acoustic trauma. *Acta Otolaryngol.*, 111, 85-93.
- Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A., 1995. Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 252, 504-8.
- Yamane H, Takayama M, Sunami K, Iguchi H, Kanazawa A, Tokuhara Y, Nishiura H, Nishimura K, Tao SD., 2004. Nitric oxide induces apoptosis of the hair cells of cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl.*, 554, 6-11.
- Yamashita D, Miller JM, Jiang HY, Minami SB, Schacht J., 2004. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. *Neuroreport.*, 15, 2719-22.
- Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K., 2013. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res.*, 303, 30-8.
- Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, Raphael Y, Miller JM., 1998. Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res.*, 784, 82-90.
- Yang Y, Qin SK, Wu Q, Wang ZS, Zheng RS, Tong XH, Liu H, Tao L, He XD., 2014. Connexin-dependent gap junction enhancement is involved in the synergistic effect of sorafenib and all-trans retinoic acid on HCC growth inhibition. *Oncol Rep.* 31, 540-50.
- Yao J, Oite T, Kitamura M., 2009. Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol.*, 29, F939-F946.
- Yao J, Zhu Y, Morioka T, Oite T, Kitamura M., 2007. Pathophysiological roles of gap junction in glomerular mesangial cells. *J. Membr. Biol.*, 217, 123-130.
- Zheng HW, Chen J, Sha SH., 2014. Receptor-interacting protein kinases modulate noise-induced sensory hair cell death. *Cell Death Dis.*, 5: e1262.