

別紙 1

博 士 論 文 要 旨

論 文 題 目 : 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

申 請 者 西山 徳人 印

専 攻 分 野 臨床薬学

研究指導分野 臨床薬理学

指 導 教 員 荻田 喜代一

耳は、外耳、中耳、内耳に分けられ、聴覚機能の中心的な役割を果たす器官である。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、難聴を契機として認知機能低下などの高次脳機能障害をもたらすことが報告され、衆目を集めている。本邦において、障害者認定基準を満たす難聴患者は約 37 万人であり、軽度な難聴患者を含めると 600 万人をも超えるといわれている。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。

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、音受容細胞である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し、音受容の実質を担う部分である。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。

音は、有毛細胞の頂側面にある聴毛を屈曲させる。これにより、聴毛に存在する機械電気変換チャネルが解放し、内リンパ液内の K^+ が有毛細胞内に流入する。 K^+ の流入により有毛細胞が脱分極し、神経伝達物質を放出することで、ラ

セン神経節細胞が興奮し、中枢へと音情報が伝えられる。これら三つの部位のいずれが障害されてもこの一連の流れが破綻し感音難聴が発症する。

感音難聴の原因は、音響曝露や耳毒性薬物、加齢などがあるが、これらのモデル動物を用いた基礎研究やヒト検体において、有毛細胞の脱落が生じてい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の原因は、この有毛細胞の再生能力の乏しさにある。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。

本研究では、強大音響曝露後での蝸牛内変化：①reactive oxygen species (ROS) / reactive nitrogen species (RNS) の発生、②ラセン靱帯のギャップ結合 (GJ) による細胞間コミュニケーション (GJIC) 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。

①ROS/RNS の発生

我々はこれまでに、強大音響曝露が蝸牛内において 4-hydroxynonenal (4-HNE、脂質過酸化産物) や nitrotyrosine (ペルオキシナイトライト発生の指標) の発現増加とともに外有毛細胞死を引き起こすことを明らかにした。また、この強大音響曝露により引き起こされる外有毛細胞死がラジカルスカベンジャーや nitric oxide 合成酵素阻害剤の投与により抑制されることを報告している。そこで、コルチ器器官培養法および内耳内投与法により *in vitro*・*in vivo* 両実験系において、4-HNE、ペルオキシナイトライト発生剤 (3-(4-Morpholinyl) sydnonimine, hydrochloride、SIN-1)、 H_2O_2 の外有毛細胞への影響について解析した。

コルチ器器官培養への酸化ストレス誘発剤曝露の影響

生後 4 日齢の ddY 系マウスから蝸牛を摘出し、コルチ器を分画後、培養液中で 1 日間静置した。その後、培養液を交換、薬物を曝露し、曝露 1 および 7 日後に myosin-VIIa (有毛細胞マーカー) の免疫染色および phalloidin (聴毛に多量に存在する F-アクチンのマーカー) 染色によって有毛細胞を可視化した。その結果、培養コルチ器への 4-HNE、 H_2O_2 または SIN-1 (各 2-50 μM) の 1 日間曝露は、外有毛細胞の有意な脱落率の増加は認められなかった。また、4-HNE および SIN-1 の高濃度 (250 μM) 薬物の 7 日間曝露においても有意な外有毛細胞の脱落率の増加はみられなかった。これらの結果から、4-HNE およびペルオキシナイトライトは、少なくとも本器官培養実験下では外有毛細胞の脱落率に直接的な影響を及ぼさないことが示唆される。

酸化ストレス誘発剤の内耳内投与の影響

5 週齢 ddY 系雄性マウスの蝸牛後半規管から 4-HNE あるいは SIN-1 (各 1.25

nmol/耳)を内耳内投与し、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。4-HNE および SIN-1 のいずれを内耳内に投与しても外有毛細胞の脱落率の増加は認められなかった。

これらの結果から、感音難聴の主要因となる ROS/RNS が蝸牛における外有毛細胞の直接的な障害起因物質である可能性は低いことが示唆される。

②ラセン靱帯の GJIC の破綻

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。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。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を有する。そこで、GJ 阻害薬であるカルベノキソロン (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。

コルチ器器官培養への CBX 曝露の影響

培養コルチ器に CBX を 7 日間曝露したところ、CBX ($300 \mu M$) は外有毛細胞死を引き起こさないことが明らかとなった。このことから、少なくとも本実験条件下では CBX が有毛細胞に対して直接的な障害作用を示さないことが示唆される。

CBX の内耳内投与の影響

CBX による GJ 障害を確認するため、CBX (15 nmol/耳) の後半規管からの内耳内投与を行い、投与 1 および 7 日後に光褪色後蛍光回復法 (FRAP 法) を用いて、蝸牛外側壁ラセン靱帯における GJIC を評価した。FRAP 法では、外側壁ラセン靱帯を摘出し、GJ 通過蛍光色素 (calcein-AM) を取り込ませた後、レーザーを局所照射して蛍光を褪色させ、照射部位の蛍光強度を経時的に定量した。GJIC が正常な場合には蛍光色素が GJ を通過して褪色部分の蛍光強度が回復するが、GJIC に障害がある場合には褪色部分の蛍光強度は回復しない。CBX の内耳内投与は、投与 1 日後より蛍光強度回復率の有意な低下を引き起こした。その低下は少なくとも投与 7 日後まで継続した。次に、GJIC の障害による聴覚への影響を確認するため、聴性脳幹反応による聴覚閾値を測定したところ、CBX の内耳内投与は投与 1 日後には有意な聴覚閾値の上昇 (聴覚障害) を起こし、その上昇は少なくとも投与 7 日後まで確認された。これらのことから、CBX の内耳内投与はラセン靱帯における GJIC を有意に破綻させるとともに、長期的な聴覚障害を引き起こすことが明らかとなった。さらに、長期的な聴覚障害の要因を検討するため、CBX の内耳内投与 1-7 日後における外有毛細胞への影響を

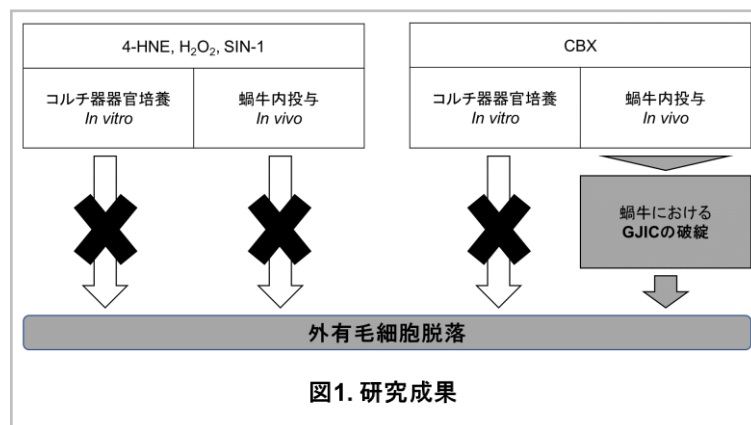
解析した。その結果、CBX の内耳内投与は、投与 1～5 日後まで有意な外有毛細胞の脱落率の増加は認められなかったが、投与 7 日後において外有毛細胞の著しい脱落率の増加がみられた。このことから、CBX による聴覚閾値の長期的上昇（不可逆的聴覚障害）には、GJIC の破綻および外有毛細胞死が関与すると考えられた。

これらの結果は、長期的な GJIC の障害が外有毛細胞死とともに聴覚障害を引き起こす可能性を示唆するものである。

【結語】

感音難聴の予防・治療標的の探索のために、有毛細胞の障害メカニズムの解明を試み、以下の研究成果を見出した（図 1）。

- ① 強大音響曝露後に蝸牛において発現が増加する 4-HNE などの酸化ストレス誘発剤を培養コルチ器への直接曝露および内耳内投与を行ったところ、いずれの実験条件下においても外有毛細胞の脱落を引き起こさなかった。したがって、酸化ストレス誘発剤は有毛細胞死の直接的原因物質である可能性は低いと考えられる。
- ② GJ 阻害薬 CBX の内耳内投与は、ラセン靱帯の GJIC を長期的に破綻させ、聴覚障害および外有毛細胞死を引き起こすが、CBX の培養コルチ器への直接曝露は有毛細胞死を引き起こさなかった。これらの事実から、蝸牛外側壁の GJ の障害が聴覚障害および外有毛細胞死の原因の一つである可能性が示唆される。



本研究では、「蝸牛外側壁ラセン靱帯における GJIC の破綻が外有毛細胞の脱落を引き起こす」という外有毛細胞障害の新規メカニズムを提唱した。また、本研究は聴覚障害の予防・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、GJIC を標的とした医薬品の開発をもたらすことが期待できる。