感音難聴の克服に向けた新規治療薬の開発に関する研究

氏　　　　　　　名	山口　太郎
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第９０
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第４条第１項）
学位授与の題目	感音難聴の克服に向けた新規治療薬の開発に関する研究
論文審査委員	主査　檜井　栄一
	副査　金田　勝幸
	副査　小川　数馬
	副査　中西　猛夫
	副査　猪部　　学

学位論文要旨

Most of sensorineural hearing impairment, which causes the inner ear dysfunction, is irreversible and has become a serious social problem of global dimensions because there is no treatment of sensorineural hearing impairment. Under physiological conditions, maintenance of the potassium ion concentration in the endolymph by gap junction in the cochlear lateral wall is important for hearing. We found using noise-induced hearing impairment model mice and primary cultures of spiral ligament fibrocytes that intense noise exposure produced disruption of gap junction through oxidative stress-induced connexin degradation prior to hair cell damage. Therefore, the collapse of ion balance in the inner ear through degradation of connexin is one of the causes of hair cell damages. Moreover, we identified that β-catenin is a cytoplasmic adaptor protein of gap junction composed of connexins, which are internalized and degraded by calcium-sensitive cysteine proteases, calpains. In addition, calpain inhibitors prevented disruption of gap junction, noise-induced hearing impairment and noise-induced hair cell loss. Taken together, the disruption of gap junction by oxidative stress is involved in one of the pathogenesis of sensorineural hearing impairment and calpain inhibitors could be a new therapeutic drug for sensorineural hearing impairment.

【背景・目的】

人間のコミュニケーションの中核を担う聴覚機能の障害（難聴）は、個人の生活の質（Quality of life, QOL）を著しく低下させるだけでなく、それを契機として認知機能異常や抑うつ状態などの高次脳機能障害をもたらすことが示唆されており、深刻な世界的健康課題の一つであるといえる。難聴は、外耳・中耳の障害による伝音難聴、内耳・聴神経の障害による感音難聴に分けられる。伝音難聴は、外科的療法や薬物療法が奏功することから、治療によりそのほとんどが元の聴力にまで回復する。一方、感音難聴は、根本的な治療法が確立されておらず、治療薬としてステロイド性薬や内耳循環改善薬が広く用いられているが、治療効果を示すエビデンスは限りなく少ない。感音難聴発症の要因として騒音曝露歴、加齢、遺伝、感染症、耳毒性薬剤使用歴などが挙げられ、その多くが内耳蝸牛障害に起因するとされるが、その詳細なメカニズムは不明である。したがって、この感音難聴発症メカニズムの解明および治療法の確立は刻下の急務である。

強大音響曝露、耳毒性薬物投与、加齢などにより内耳蝸牛において脂質過酸化物が増加することが数多く報告されていることから、活性酸素ラジカル産生に起因した内耳蝸牛細胞障害が音響外傷性難聴の原因の一つとして考えられている。また、我々は、マウスへの強大音響曝露が蝸牛外側壁らせん靭帯（spiral ligament, SL）において酸化ストレス産物である4-hydroxynonenal（4-HNE）を増加させ、これに引き続き、蝸牛外側壁におけるGap junction（GJ）構成タンパク質connexins（Cxs）を持続的に減少させることを明らかにした。また、これらの現象は抗酸化剤の投与によって有意に抑制されたことから、強大音響曝露後の感音難聴発症のメカニズムに酸化ストレスを介したCxsの発現減少が関与することを報告した。しかしながら、酸化ストレスを介したCxsの減少やGJへの影響についての詳細は明らかではない。

感音難聴治療ターゲットの一つであるSLは、音刺激を電気信号に変換する有毛細胞の働きに必要不可欠な蝸牛内リンパ電位（Endocochlear potential, EP）の形成に重要な役割を果たしており、EPの変動は聴覚機能へ鋭敏に反映されることが知られる。そこで本研究では、蝸牛外側壁らせん靭帯障害に焦点を当て、らせん靭帯由来培養細胞および音響外傷性難聴モデル動物を用いて感音難聴発症メカニズムの解明および新規治療薬の開発を目指して検討を行った。

【方法】

① *in vitro* における解析

4-HNE曝露による細胞内酸化ストレスレベルへの影響：らせん靭帯由来培養細胞において4-HNE曝露後60分後の4-HNE付加タンパク質（酸化ストレス産物）について、免疫細胞化学法およびウエスタンブロッティングにより解析した。

4-HNE曝露によるGJへの影響：4-HNE曝露がGJに及ぼす影響を明らかにする目的で、らせん靭帯由来培養細胞における4-HNEを曝露後のギャップ結合細胞間コミュニケーション（GJ-IC）への影響について、GJ-IC評価法の一つであるdye-transfer assayを用いて解析した。4-HNEもしくはvehicleを60分曝露し、新しいmediumに置換して4-HNE非存在下とした。その後、donor cellを播種し、一定時間経過後に緑色蛍光陽性領域を観察した。

4-HNE 曝露による Cx43 の局在への影響：らせん靭帯由来培養細胞での Cx43 の局在及びタンパク質レベルについて、4-HNE 曝露後各経過時間に細胞膜タンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行った。また、免疫細胞化学法を用いて同様の処置を行った細胞について Cx43 の局在について解析した。

4-HNE 曝露による calpain 活性への影響：4-HNE 曝露後各経過時間のらせん靭帯由来培養細胞における α-fodrin タンパク質についてウエスタンブロッティングを行い、タンパク質分解酵素である calpain および caspase の活性変動を解析した。

4-HNE 曝露による Cx43 分解および GJ-IC の破綻への calpain の関与：calpain 阻害薬 PD150606（10 μM）および vehicle は、4-HNE 曝露 30 分前に曝露した。4-HNE 曝露 30 分後の Cx43 減少に対する PD150606（10 μM）前処置の影響についてウエスタンブロッティングにより解析した。また、4-HNE 60 分曝露後の GJ-IC 機能低下に対する PD150606 前処置の影響を dye-transfer assay により解析した。

② *in vivo* における解析

音響曝露後らせん靭帯における GJ-IC 破綻に対する PD150606 の効果：PD150606 を音響曝露直後に内耳局所投与し、曝露後 7 日における SL について GJ-IC の破綻が未処置レベルまで回復するか否かについて FRAP assay を用いて解析した。内耳局所投与は 1 μl/min の速度で計 5 μl 投与した。

音響曝露後の聴力悪化および蝸牛有毛細胞死に対する PD150606 の効果：マウスに 8 kHz octave band noise、110 dB SPLs を 1 時間曝露した後、PD150606 を内耳局所投与し、その 1、2、5、7 日後における聴力を ABR により測定した。次に、音響曝露 7 日後に摘出した蝸牛について phalloidin 染色法を用いて蝸牛有毛細胞死に対する PD150606 の効果について解析した。

【結果】

① *in vitro* における解析

4-HNE曝露による細胞内酸化ストレスレベルへの影響：4-HNE（0.1-20 μM）60分曝露vehicle（0 μM）を曝露した細胞と比較して、ほぼすべての細胞において4-HNE曝露濃度依存的な4-HNE付加タンパク質の増加が認められた。また、4-HNE曝露後の細胞において顕著な形態変化や細胞死は認められなかった。

4-HNE曝露によるGJへの影響：播種後1.5時間経過した細胞ではacceptor cellへのcalceinの緑色蛍光の移動は全く認められなかった。しかしながら、4.5時間経過した細胞においてdonor cell周辺のacceptor cellがcalcein陽性となった。これによりdonor cell播種後4.5時間経過するとdonor cellと隣接する細胞間においてギャップ結合が形成されることが示された。また、4-HNEの曝露濃度依存的にdonor cell周辺のcalcein陽性細胞数の著明な減少が認められた。このことから、4-HNE曝露は、GJ-ICを強力に抑制することが示唆された。

4-HNE 曝露による Cx43 の局在への影響：4-HNE（10 μM）曝露は、時間依存的に曝露 10 分後から 60 分後まで Cx43 タンパク質レベルを約 40%減少させた。また、曝露 10 分後において、4-HNE と Cx43 の共局在が増加し、曝露 30、60 分後において細胞膜付近から Cx43 が消失することが明らかになった。4-HNE1 時間曝露後 4-HNE 非存在下で 4.5 時間経過すると細胞内 CX43 タンパク質レベルはほぼ未処置レベルにまで回復したが、細胞膜での Cx43 は未処置細胞と比較して有意に減少した状態が持続していた。ウエスタンブロッティングの結果に加え、4-HNE 曝露後、4-HNE 非存在下で 4.5 時間経過した細胞において、細胞膜での Cx43 の局在が減少していることが免疫細胞化学法でも確認された。

4-HNE 曝露による calpain 活性への影響：細胞骨格タンパク質である α-fodrin は、タンパク質分解酵素である calpain や caspase の基質として知られ、calpain 由来の分解産物（145 kDa）、caspase 由来の分解産物（120 kDa）、両者共通の分解産物（150 kDa）を生じる。4-HNE 曝露 10 分後において 150、145 kDa の分解産物の有意な増加が認められた。しかしながら、4-HNE 曝露は、少なくとも曝露 60 分までに 120 kDa の分解産物に影響を及ぼさなかった。4-HNE 曝露は、calpain 由来の α-fodrin の分解を増強することから、4-HNE 曝露後のらせん靭帯由来培養細胞において caspase ではなく calpain を活性化させることが示唆された。

4-HNE 曝露による Cx43 分解および GJ-IC の破綻への calpain の関与：その結果、vehicle を前処置した細胞では、4-HNE 曝露によって Cx43 が 40%程度まで減少した。それに対して、PD150606（10 μM）前処置は、4-HNE 曝露による Cx43 減少を有意に抑制した。また、dye-transfer assay の結果、4-HNE を曝露した細胞では劇的に GJ-IC の機能低下が認められるのに対し、PD150606 前処置は、この 4-HNE 曝露による GJ-IC の機能低下を抑制することが明らかとなった。

② *in vivo* における解析

音響曝露後らせん靭帯におけるGJ-IC破綻に対するPD150606の効果：PD150606を処置したらせん靭帯では、音響曝露による蛍光回復率の減少を完全に抑制した。対照群であるvehicleを音響曝露直後に内耳局所投与したマウスのらせん靭帯では、音響曝露のみと同程度の回復率であった。PD150606を処置したらせん靭帯では、音響曝露による蛍光回復率の減少を完全に抑制した。

音響曝露後の聴力悪化および蝸牛有毛細胞死に対する PD150606 の効果 : 音響曝露は、12、20 kHz の周波数において直後から劇的に聴覚閾値を上昇させ、その変動値は、それぞれ約 60、70 dB であった。また、曝露 7 日後における聴覚閾値変動は 12、20 kHz で 40-60 dB であった。Vehicle 内耳局所投与は音響曝露のみの聴覚閾値変動に影響しなかったのに対し、PD150606 内耳局所投与は、曝露直後から 2 日目までは聴覚閾値の上昇を抑制しなかったが音響曝露 7 日後における聴覚閾値の上昇を有意に抑制した。音響曝露後 vehicle を内耳局所投与したマウスでは、多くの蝸牛有毛細胞死が認められるのに対し、PD150606 処置群では有毛細胞死が vehicle 処置群の約 75%にまで減少した（vehicle: 37.4±1.2%, PD150606: 10.3±0.5%）。

【考察】

4-HNE は、らせん靭帯由来培養細胞において、細胞内酸化ストレスを増加させるとともに、calpain の過剰な活性化を誘導し、Cx の減少および GJ-IC の破綻に関与することが判明した。Calpain 阻害薬である PD150606 の内耳局所投与は、強大音響曝露による GJ-IC の破綻を抑制し、かつ聴力の悪化を 12、20 kHz の高音域において有意に抑制した。さらに、calpain 阻害薬 PD150606 の内耳局所投与は、音響曝露誘発性有毛細胞死を約 75%程度減少させた。したがって、音響外傷性難聴発症メカニズムの一つに calpain の活性化が関与することが示唆され、calpain 阻害薬が感音難聴新規治療薬として有用であることが推察される。また、我々の予備検討の結果から、聴覚機能障害は、音響曝露直後より引き起こされるのにもかかわらず、蝸牛有毛細胞死は曝露直後ではなく遅発的に生じる。このことから、有毛細胞死が少なくとも音響曝露後初期に生じる聴覚機能障害の直接的要因ではないことが推察される。有毛細胞死は聴覚障害を不可逆とする重要な要因であることから、本検討結果は、蝸牛外側壁障害が音響外傷性難聴治療におけるプライマリターゲットであることを示唆するものである。

Calpain の活性を制御することは虚血や緑内障、加齢性黄斑変性症の治療薬として注目されており、calpain 阻害薬がこれら疾患に加え、感音難聴の克服に向けた薬物治療戦略に寄与することが大いに期待される。

審査結果の要旨

本研究では、蝸牛外側壁らせん靭帯に着目し、感音難聴発症メカニズムの詳細を明らかにすることおよび新規治療薬の開発を目的とした。音響曝露は、曝露直後より聴覚障害を引き起こし、その初期段階に蝸牛各部位の脂質過酸化物 4-hydroxynonenal（4-HNE）付加タンパク質を増加、外側壁らせん靭帯における gap junction-mediated intercellular communication (GJ-IC) の機能低下を引き起こした。続いて、GJ-IC の機能低下に 4-HNE が関与するか否かを明らかにする目的で、蝸牛外側壁らせん靭帯線維細胞培養系の GJ-IC に対する 4-HNE 曝露の影響を解析した。その結果、4-HNE 曝露後、著明な GJ-IC の機能低下、connexin (Cx) の細胞内局在変化および分解、calpain の活性化が生じ、これらの現象はいずれも PD150606 前処置により完全に消失した。さらに、音響曝露後、calpain 阻害薬 PD150606 を内耳内局所投与した結果、音響曝露による GJ-IC の機能低下および聴覚障害はいずれも著明に改善した。

以上の研究成績は、蝸牛外側壁障害が感音難聴治療におけるプライマリターゲットであることを示し、さらに、calpain 阻害薬を用いた感音難聴治療の進歩に貢献できると考えられる点で評価できるため、審査委員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断した。