

Title	感音難聴への治療戦略
Sub Title	
Author	山下, 大介(Yamashita, Daisuke)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2008
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.85, No.1 (2008. 4) ,p.39- 45
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	受賞記念講座(三四会奨励賞)
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20080400-0039

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

受賞記念講座（三四会奨励賞）

感音難聴への治療戦略

慶應義塾大学耳鼻咽喉科

やま した だい すけ
山下 大介

Key Words : sensorial hearing loss, noise exposure, apoptosis, regeneration, drug delivery system

はじめに

感音難聴とは内耳感覚器細胞の障害により生じる疾患で、原因は老人性・騒音性・薬剤性・先天性など非常に多岐にわたる。QOL（Quality of Life）に深く関わり感覚器障害のうち最も重要なものの一つである。日常診療において、突発性難聴などの急性感音難聴に対しては、ステロイドやビタミン剤、循環改善剤などを主に用いるがその治療効果には個人差もあり、決してEBM（Evidence Based Medicine）に基づいたものとは言えない。一方、老人性難聴などの慢性感音難聴に対しては補聴器や、最近適応の拡大もみられる人工内耳など依然として根治的治療法のないのが現状である。そこで、この難治性である感音難聴に対して多角的に基礎研究から臨床応用へと我々が行ってきた研究について概説し、さらに今後の展望を述べたい。

治療戦略に向けた研究デザイン

ヒトにおいては側頭骨病理標本による形態学的評価を除いて、感音難聴の原因となる内耳感覚器細胞（主に外有毛細胞）を直接調べることによって、その病態を解明するという手段がない。この点が感音難聴の治療を困難にしている要因と考えられる。そこで、我々はまず動物を用いた基礎的研究にて感音難聴における内耳細胞死のメカニズムを詳細に解明し、その結果に基づき治療へのアプローチを検討している。最終的にそれらの結果からEBMに基づいたヒトへの臨床応用（Translational Research）を目標としている（図1）。

Translational Research

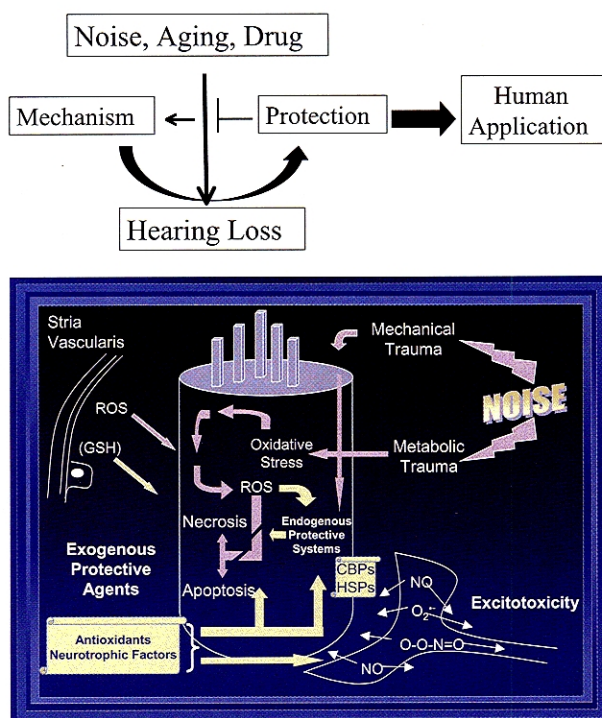


図1 感音難聴への治療戦略に向けた研究デザイン

感音難聴モデル動物の確立

我々は感音難聴モデル動物として、強大音響を負荷した難聴モデルを確立した。機能的な難聴のレベルは現在臨床でも用いられているABR（Auditory Brainstem Response：聴性脳幹反応）にて行い、形態的な細胞死の程度はヒトでは不可能である内耳有毛細胞をsurface preparation法にて直接取り出し、残存する細胞をカウ

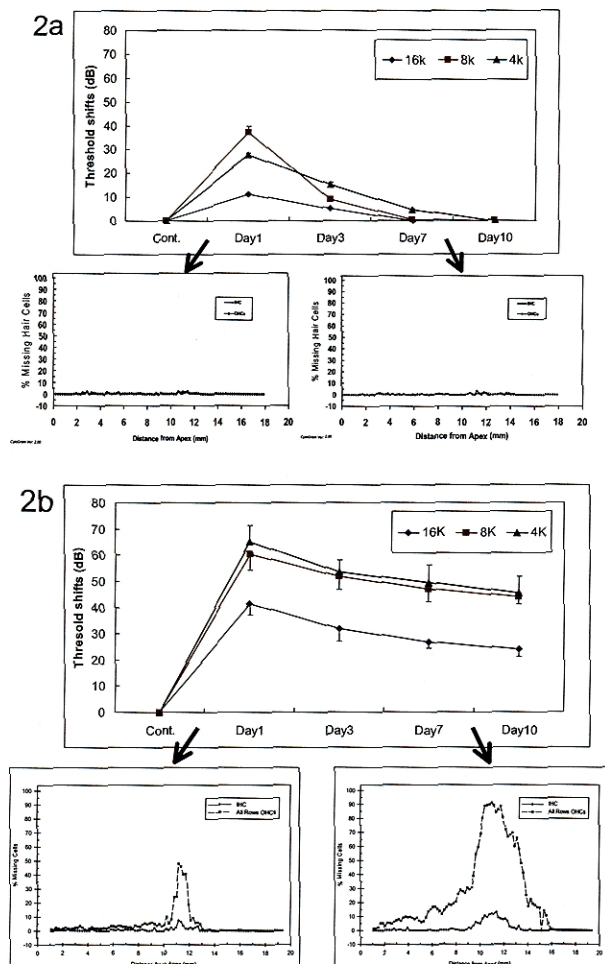


図2 感音難聴モデル動物の確立

TTSモデル（音響負荷条件：4 kHz OBN, 100 dB SPL, 1時間）では、一時的に難聴になるが最終的には完全に難聴が回復し、形態的にも細胞死を認めない（図2a）。一方、PTSモデル（音響負荷条件：4 kHz OBN, 120 dB SPL, 5時間）では、難聴が残存し形態的にも細胞死が進行する（図2b）。図は上段が聴覚機能評価（ABR）を、下段が形態的細胞死の定量評価を示す。（Yamashita D. et al; J Neuroscience Res. Oct 17, 2007のFigureを一部改変し、許可を得て転載）

ントする手法を用いて定量評価を行っている¹⁾。音響負荷条件によって、一時的に難聴になるが最終的には聴力が完全に回復するTTS（Temporary threshold shift）モデル（図2a）と難聴が残存するPTS（Permanent threshold shift）モデル（図2b）を確立した。それぞれの音響負荷条件はTTSモデル：4 kHz OBN, 100 dB SPL, 1時間負荷、PTSモデル：4 kHz OBN, 120 dB SPL, 5時間負荷である。形態的変化の検討においては、TTSモデルでは終始細胞死は認めず（図2a）、一方PTSモデルでは進行する細胞死がみられた（図2b）。この両モデル間での細胞内シグナル伝達機構やアポトーシス制御関連因子の発現等を比較することによって、そ

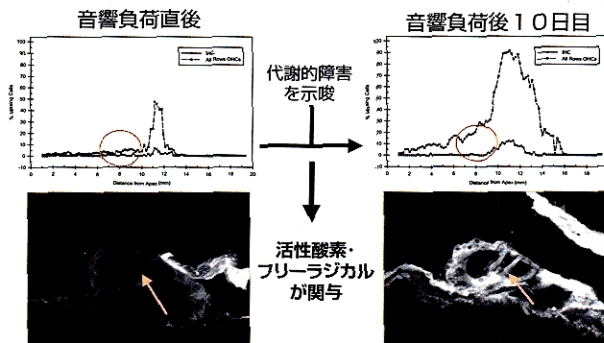


図3 内耳における遅発性フリーラジカルの発現
強大音響曝露後に拡大する障害と一致した部位に活性酸素・活性窒素のマーカ（4-HNE, NT）の発現が認められた。（Yamashita D. et al; Brain Res. 1019: 201-209, 2004のFigureを一部改変し、許可を得て転載）

の細胞内メカニズムを詳細に検討した。

内耳における遅発性フリーラジカルの発現とその防御

一般的に内耳有毛細胞の障害メカニズムには、音そのものによる直接的・機械的ダメージと種々の代謝的ダメージがあると考えられている。代謝的障害の中には活性酸素やフリーラジカルが、内耳における細胞死に重要な役割をもつと考えられている。そこでまず我々は、強大音響負荷後の経時的な形態変化を詳細に検討したところ、徐々にその障害が増加・拡大することを確認した。次にそれと同時に障害部位と一致した部位において活性酸素・活性窒素のマーカ（4-HNE, NT）が発現することを見出した（図3）。この結果は拡大する障害が活性酸素や活性窒素に起因することを示唆するものであった。しかし一般的にフリーラジカルの反応は*in vitro*では数ミリ秒と速いものであり、*in vivo*での音響曝露後に持続する内耳障害を説明できるものではない。そこで我々の仮説は、最初に障害を受けた部位（4 kHz領域）より種々のchemical mediator（アポトーシス関連因子等を含む）が放出され、周囲の隣接細胞に影響を及ぼし、その隣接細胞内で引き続き種々の反応が起こり、細胞死が誘導される。さらにその隣の細胞へとダメージが、空間的・時間的に拡大するというものである²⁾。これらの結果は、老人性難聴や騒音性難聴において、高音から徐々に難聴が拡大していくことを理論的に証明した初めての報告である。次にこれらの結果に基づき、音響曝露後から種々の抗酸化剤やフリーラジカルスカベンジャーを投与することによって、聴覚機能及び外有毛細胞の形態が保護さ

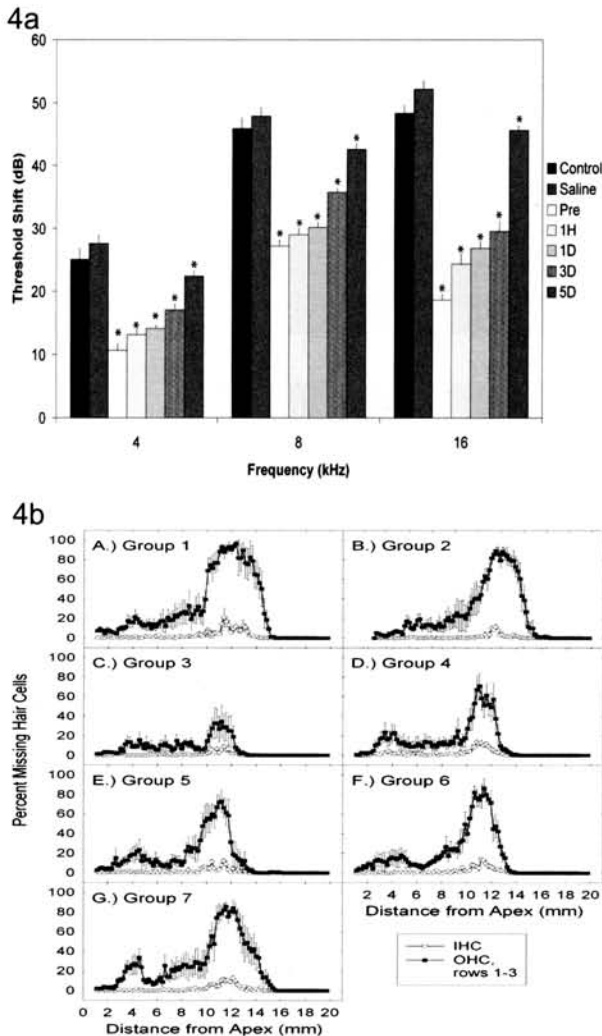


図4 内耳における遅発性フリーラジカルの防御
 強音曝露後3日目から抗酸化剤を投与することによって聴覚機能及び内耳有毛細胞の形態保護を確認した。図4aは各周波数でのABRの閾値変化を、図4bは各グループでの形態的細胞死の平均値を示す。
 (Yamashita D. et al; Neuroscience 134(2): 633-642, 2005 のFigureを許可を得て転載)

れることを見出した(図4a, b)。この成果は突発性難聴など急性感音難聴の発症後も早期に治療することによって改善することを示唆した初めての報告である³⁾。現在はこれらの結果に基づき、より臨床応用に向けアメリカにて特許申請中である。

内耳における細胞死制御

内耳保護に関する基礎研究での報告は多数みられるが、いずれも完全に防御できるものではない。これは内耳障害のメカニズムがさらに複雑であることを意味する。そこで我々は、より詳細に内耳障害のメカニズムを解明し

治療へ結び付けたいと考えている。感音難聴における内耳感覚器細胞内においては、細胞死をコントロールするシステムが複雑に存在する。その中でも、Bcl-2ファミリー蛋白質はアポトーシスを抑制または促進するグループに大別され、両者のバランスにより細胞の生死が調節されている。同タンパク質は主にミトコンドリアの膜透過性を制御し、シトクロムcの放出を調整することによりアポトーシスシグナルのon/offを決定している。このBcl-2ファミリーの感音難聴モデル動物での発現を検討したところ、難聴が完全に回復する(細胞死が生じない)TTSモデルにおいてはアポトーシスを抑制するサブファミリーであるBcl-xLの発現が外有毛細胞にみられた(図5a)。一方、難聴が残存する(細胞死の生じる)PTSモデルにおいてはアポトーシスを促進するサブファミリーであるBakの発現が同様に外有毛細胞に認められた(図5b)。このように障害のレベルでアポトーシスを抑制・促進する両メカニズムが内耳に存在することが明らかとなった¹⁾。

また一般的にアポトーシスの反応においては、カスパーゼと呼ばれる一群のシステインプロテアーゼが細胞死実行に中心的役割を果たしていると考えられている。一方近年、このカスパーゼを経由しないアポトーシスの存在も報告されている^{4, 5)}。そこで我々は、感音難聴における神経細胞死とカスパーゼ非依存的アポトーシス(EndoG: Endonuclease G, AIF: Apoptosis inducing factor)との関連を検討した。その結果、PTSモデルにおいて、EndoGは核への移行(図6a)が、一方AIFは細胞質への移行(図6b)が認められた⁶⁾。最近の報告ではこのAIFは負荷されるストレスや条件によって、一部は核に移行しアポトーシス実行に、一部は細胞質に移行し逆にレドックス因子として抗酸化的に働くとの報告がある⁷⁾。このように非常に面白いことに、同一障害モデルの同一細胞内において、アポトーシスを抑制・促進する両者が存在することが明らかになり、さらにこの感音難聴の障害メカニズムが複雑であることが示唆された。現在は種々のノックアウトマウス解析によって、内耳障害メカニズムの解明を行っている。

内耳再生への試み

従来より哺乳類の成人内耳においては、一度障害を受けて細胞死に陥った感覚器細胞は再生能力が極めて乏しいと考えられている。この点が感音難聴の治療が非常に難治性である一つの大きな要因となっている。しかし近年、分子生物学や遺伝子導入技術などのめざましい進歩

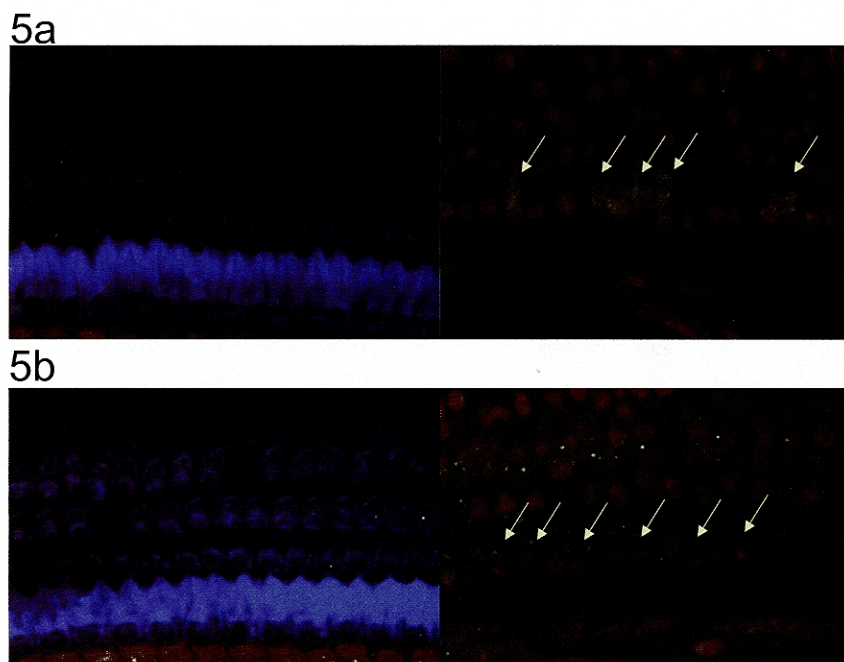


図5 感音難聴における Bcl-2 ファミリーの発現
TTS モデルにおいてアポトーシス抑制因子 Bcl-xL が内耳外有毛細胞に発現し（図 5 a）、PTS モデルにおいてはアポトーシス促進因子 Bak の発現が外有毛細胞に認められた（図 5 b）.
（Yamashita D. et al ; J Neuroscience Res. Oct 17, 2007 の Figure を一部改変し，許可を得て転載）

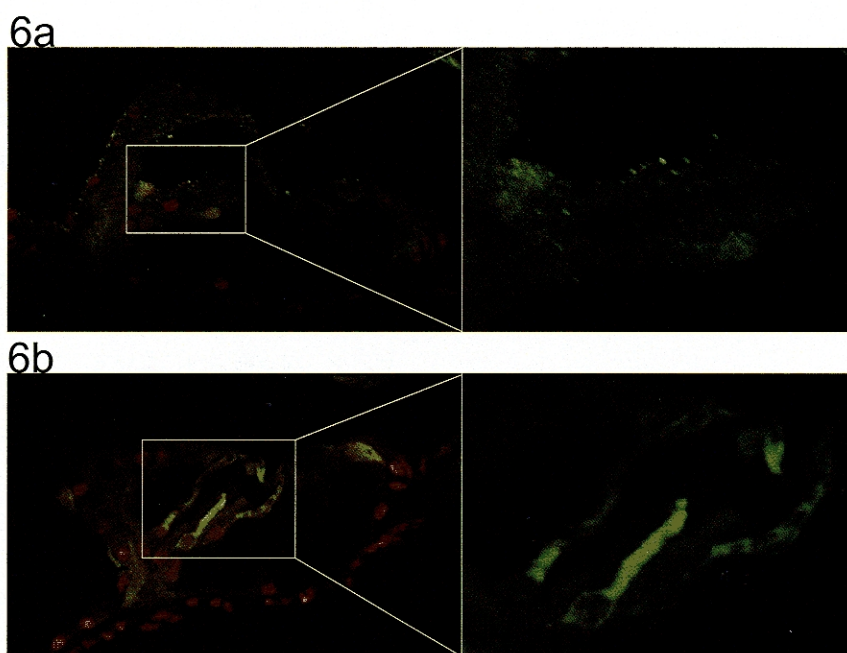


図6 感音難聴におけるカスパーゼ非依存的アポトーシスの発現
PTS モデルにおいて強音響曝露後に EndoG は核への移行を（図 6 a）、一方 AIF は細胞質への移行（図 6 b）を認めた.
（Yamashita D. et al ; Neuroreport 15(18) : 2719-2722, 2004 の Figure を一部改変し，許可を得て転載）

に伴った再生医療研究の発展により、内耳再生も夢ではなくなりつつある。我々は、臨床応用や倫理的な観点から骨髄由来間葉系幹細胞を用いた内耳再生を試みている。まずは、ヒト及びマウスからの骨髄間葉系幹細胞を *in vitro* において神経幹細胞に分化誘導させた。次にこの神経に誘導した幹細胞を用いて、感音難聴モデル動物に移植を試みた。結果として機能的再生には至っていないが、内耳組織での生着が確認できた。また最近では再生医療の進歩に伴い、他臓器では続々と臨床応用が始まりつつある。しかし、ヒトにおいて移植した細胞の生体内動態をモニタリングする方法はいまだ確立されていない。一方、超常磁性体酸化鉄（super paramagnetic iron oxide : SPIO）は、肝臓癌や肝転移の診断に用いられている MRI の陰性造影剤である。肝 Kupper 細胞に取り込まれると T2 緩和時間を短縮し、MRI 信号を低下させることが知られている。そこで我々は既に臨床で使用されている SPIO 製剤を用いて、まず *in vitro* における細胞内ラベリング効果を確認した。次に感音難聴モデル動物へこの SPIO でラベルした神経幹細胞を内耳に移植し、生着・発現を確認した（国立成育医療センター・梅澤研究室との共同研究）。この結果は今後の幹細胞移植での臨床応用に大きく寄与するものと考えている。

また内耳再生へ向けた細胞治療に対して、組織幹細胞に富んだ分画として知られる side population (SP) 細胞での検討を行っている。SP 細胞は DNA 結合蛍光色素である Hoechst33342 の排出能を持った細胞集団で、多臓器においてその多分化能が報告されている⁹⁾。現在 fluorescence-activated cell sorting (FACS) の手技を用いて内耳 SP 細胞の存在を確認した。また強大音響曝露後に SP 細胞の比率が増大することが判明した（図 7）。今後はこの内耳 SP 細胞を用いて感音難聴モデルへの細胞移植を検討している。

昨年（2007 年 11 月）ついにヒト iPS 細胞が樹立された。従来、胚性幹細胞（ES 細胞）は倫理的な問題や移植後の免疫反応など様々な問題点が存在した。今後はこの iPS 細胞を用いた内耳への再生医療への応用が期待される。

ドラッグデリバリーシステムの開発

基礎研究の成果から、より詳細に内耳障害のメカニズムを解明し、その結果に基づいた治療の効果が確認された後も、次のステップとしてヒトへの臨床応用には内耳へのアプローチという高いハードルが存在する。そこで内耳への DDS (Drug Delivery System) の開発は感

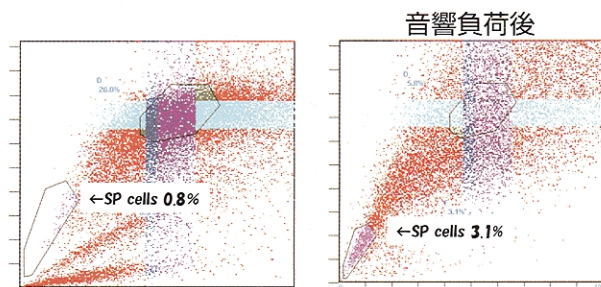


図 7 内耳における SP (side population) 細胞の存在
強大音響曝露後に内耳 SP 細胞の比率が増大。

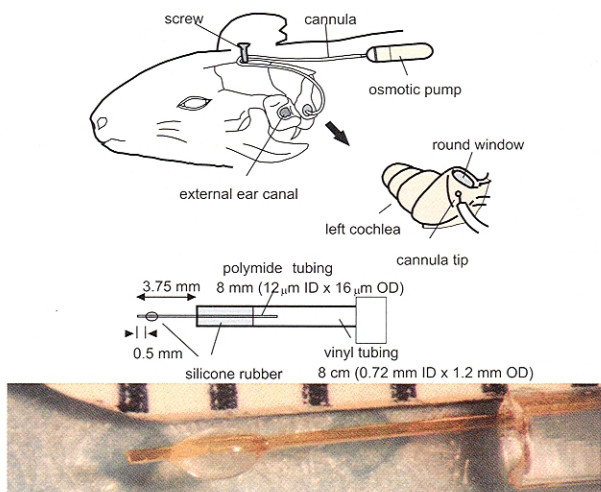
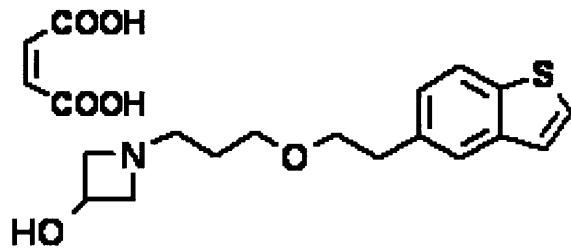


図 8 微小浸透圧ポンプによる内耳への薬剤投与

音難聴の治療に対して非常に重要となる。我々はまず、微小浸透圧ポンプを用いて動物内耳へ直接薬剤を持続的に投与するアプローチを開発し、改良を重ねている（図 8, ミシガン大学 Miller ラボ）。この装置は内耳組織に機能的・形態的障害を与えることなく、薬物を持続的に投与することが可能である^{9, 10)}。これまでに我々は感音難聴モデルに対して、同システムを用いて種々の内耳保護効果を報告している^{11, 12)}。また臨床応用の面では、現在すでに使用されている人工内耳のデバイスを利用するのが有用と考えている。そこで人工内耳デバイスの先端から神経栄養因子やアポトーシス抑制因子、再生関連因子等を投与するアプローチの検討を行っている。一方では、人工内耳は適応が高度難聴患者に限られるため、将来的にはより多くの患者への臨床応用を考える必要がある。その一つとして経鼓膜・正円窓経由での薬物投与を検討している。最近では他大学において、生体吸収性徐放ゲルを用いた細胞増殖因子の感音難聴治療への臨床試



1-{3-[2-(1-benzothiophen-5-yl)ethoxy]propyl}azetidin-3-ol maleate

図9 T-817 MA の化学構造式

験が開始されている。このように今後は単なる経口薬剤の処方のみではなく、耳鼻咽喉科医の専門性を活かし（眼科の白内障手術に匹敵するくらい）簡便に顕微鏡下での外来手術で行えるようなデバイスの開発が重要であると考えている。

神経変性疾患に対する創薬の感音難聴への応用

近年、アルツハイマー病や脳梗塞など神経変性疾患に対して、様々な新規創薬が盛んに開発されている。それらの中にはすでに、欧米を中心として臨床試験が開始されているものもある。局所投与は副作用が少なく直接薬剤の効果を期待できる半面、上述の如く臨床応用に対しては（特に内耳では）高いハードルが存在する。一方、経口投与によって脳血流関門（BBB：brain-blood-barrier）通過が可能な薬剤は、依然内耳血流関門（CBB：cochlea-blood-barrier）の問題はあるが、臨床応用の面では非常に魅力的である。そこで我々はすでに臨床試験の段階にあるいくつかの神経変性疾患に対しての創薬について感音難聴における効果を検討している。その中で、T-817MA（富山化学：図9）はアルツハイマー病の治療薬として開発され、すでにアメリカでは臨床第Ⅱ相試験の段階にある薬剤である。その薬理作用にはMAPK経路に関連した細胞死抑制や神経突起伸展作用などが証明されている。我々も感音難聴モデル動物において最近、機能的・形態的に内耳保護効果を確認した¹³⁾。また現在、ベンチャー企業との共同研究で新規開発薬剤に対して感音難聴への効果を検討している。

最後に

ポストゲノムの現在、高齢化社会が進みアンチエイジングが注目を浴びている。今後はますますQOLが重要視され、感覚器の1つである聴覚もそのターゲットになるであろう。しかし感音難聴への治療戦略にはまだまだ難題が山積している。今後は遺伝子治療や再生医療などを含めた基礎研究が、安全性や倫理面での課題もあるがより早く臨床に応用されることが期待される。また将来的には、難聴の程度や音に対する感受性の個体差なども考慮したオーダーメイド医療が重要になるであろう。今後もひとつひとつの問題を多角的なアプローチから検討し、感音難聴への治療に結び付けたいと考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を始める機会を与えて下さった神崎仁名誉教授、ご指導頂きました小川郁教授及び神崎晶先生、ミシガン大学 Miller 教授、Schacht 教授ならびに慶應義塾大学耳鼻咽喉科教室の諸先生方に深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Yamashita D, Minami SB, Kanzaki S, Ogawa K, Miller JM : Bcl-2 genes regulate noise-induced hearing loss. *J. Neuroscience Res.* Oct 17, 2007
- 2) Yamashita D, Jiang H-Y, Schacht J, Miller JM : Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 1019 : 201-209, 2004
- 3) Yamashita D, Jiang H-Y, Le Prell CG, Schacht J, Miller JM : Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience* 134(2) : 633-642, 2005
- 4) Li LY, Luo X, Wang X ; Mitochondrial Endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 5 ; 412(6842) : 95-9, 2001
- 5) Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D : Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Science* 22 ; 298(5598) : 1587-92, 2002
- 6) Yamashita D, Miller JM, Jiang H-Y, Schacht J : AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. *Neuroreport* 15(18) : 2719-2722, 2004
- 7) Lipton SA, Bossy-Wetzel E : Dueling activities of AIF in cell death versus survival : DNA binding and redox activity. *Cell* 111(2) : 147-50, 2002
- 8) Redvers RP, Li A, Kaur P : Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc*

- Natl Acad Sci USA*. 103(35) : 13168-73, 2006
- 9) Le Prell CG, Yamashita D, Minami SB, Yamasoba T, Miller JM : Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple Methods of Prevention. *Hearing Res*. 226(1-2) : 22-43 *Review*, 2007
- 10) Miller JM, Yamashita D, Minami SB, Yamasoba T, Le Prell CG : Mechanisms and prevention of Noise-induced hearing loss. *Otol Jpn* 16(2) : 139-153, 2006
- 11) Minami SB, Yamashita D, Schacht J, Miller JM : Calcineurin activation contributes to noise-induced hearing loss. *J. Neuroscience Res*. 78 : 383-392, 2004
- 12) Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Miller JM : Creatine and Tempol attenuate noise-induced hearing loss. *Brain Res*. 1148 : 83-9, 2007
- 13) Yamashita D, Shiotani A, Kanzaki S, Nakagawa M, Ogawa K : Neuroprotective effects of T-817 MA against noise-induced hearing loss. *Neuroscience Res*. 2008 in press
-