

Title	Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation
Sub Title	強大音曝露後のマウス蝸牛NF-κBの細胞核内移行
Author	増田, 正次
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.3 (2006. 9) ,p.6-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060902-0006

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.

Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation

(強大音曝露後のマウス蝸牛NF-κBの細胞核内移行)

増田 正次

内容の要旨

強大音曝露後に生じる蝸牛音響障害には様々なメカニズムが関与している。よって、蝸牛音響障害の治療のためには、単一の障害経路を治療のターゲットにするより、複数の経路をターゲットに治療をした方が効果的であると考えられる。その点、転写因子は一つのストレスに応じて複数のストレス応答因子の発現を調節しており、治療の良いターゲットになる可能性がある。そこで、我々は転写因子の一つであるnuclear factor-kappa B (NF-κB) に注目した。NF-κBは、p65やp50等、数種の分子のホモまたはヘテロ二量体からなり、阻害蛋白が結合しているために細胞質に不活性化された状態で存在し、細胞にストレスが加わると阻害蛋白が分解され核内へ移動後、特定のDNA領域に結合し下流の遺伝子の発現を調節する。例えば、inducible nitric oxide synthase (iNOS) はNF-κBにより発現が亢進し、過剰なiNOSの発現が一酸化窒素の発生を惹起し組織障害を引き起こすことが知られている。今回我々は、強大音曝露後の蝸牛におけるNF-κBのDNA結合活性の経時的変化をゲルシフト分析 (electrophoretic mobility shift assay : EMSA) により、p65またはp50のいずれがDNA結合活性に関与しているかをスーパーシフト法により、NF-κB活性化の局在とiNOS発現との関係を免疫組織染色により分析し、NF-κBが蝸牛音響障害においてどのような役割を担っているかを検討した。

5週齢のC57BL/6Jマウスを強大音に曝露させた。曝露前、曝露後2、6、12、24、72時間後に蝸牛を摘出し、EMSAを用いたところ2時間をピークに6時間まで騒音曝露前と比較し有為にNF-κBのDNA結合活性が上昇していた。また、スーパーシフト法によりp65を含む二量体がこのDNA結合活性上昇に寄与していることが示唆された。2時間後の検体を用いた免疫組織学的検討でも、EMSAの結果に一致してNF-κBの核内陽性像が確認された。このようなNF-κBの活性化は蝸牛外側壁で生じており、感覚細胞を含むコルチ器では観察されなかった。また、NF-κB核内陽性像を示す細胞に局限してiNOSの陽性像も認めており、蝸牛音響障害においてNF-κBがiNOSの発現を調節している可能性が示唆された。よってNF-κBがiNOS発現を通して、蝸牛に障害的な役割を果たしていると考えられた。一方で、NF-κBの核内陽性像が見られた外側壁の細胞では明らかな形態的变化を認めなかったのに対し、核内陽性像が見られなかったコルチ器の感覚細胞では細胞の変性を認めた。

このことは、NF-κBが蝸牛という器官のレベルでは障害的に機能している一方で、細胞個々のレベルでは保護的に機能している可能性を示唆しており、NF-κBが治療のターゲットになり得るか否かはさらなる検討を要すると考えた。

論文審査の要旨

蝸牛の音響障害は様々なメカニズムにより生じるため、その治療では複数のメカニズムをターゲットにしたほうがより効果的であると予想される。その点、NF-κBは約200の遺伝子の発現をコントロールしており、音響障害においても良い治療のターゲットとなり得る。本研究は、強大音曝露時間後にマウス蝸牛外側壁において活性化されたNF-κBが、iNOSの発現を上昇させることでコルチ器の外有毛細胞障害を含めた蝸牛障害つまりは感音難聴の出現に関与している可能性を示した。一方で、蝸牛外側壁ではNF-κBの活性化が細胞保護に働いている可能性も示唆した。

審査では、まず本研究の実験方法に関して、iNOSがNF-κBの転写制御を受けていることを明確に示すためにクロマチン免疫沈降法を用いるべきであるとの指摘があった。また、蝸牛におけるゲルシフト移動法の至適条件、免疫組織染色で使用した抗体の抗原特異性について更に検討を加えるべきであるとの指摘があった。次に、音響障害におけるNF-κBの役割に関する考察について以下の議論があった。蝸牛外側壁においては、NF-κBの活性化が細胞障害に働くiNOSだけではなく、細胞保護に働く蛋白の発現も促進しているのではないかと質問に対しては、NF-κBが蝸牛内グルタチオンの上昇に寄与しているという報告もあり、NF-κBが蝸牛に対して保護的に働く可能性も考えられるため、なるべくNF-κBの外有毛細胞障害作用を抑え、蝸牛外側壁における細胞保護作用を失わないような投与薬剤、方法、量の検討を要すると回答した。このような作用の二面性という点ではiNOSもまた組織保護にも障害にも働く可能性があるが、蝸牛においてはiNOS阻害薬が蝸牛保護に働くという報告がある。今後、他臓器において示されているステロイドのNF-κB抑制機序、NF-κB decoy 利用によるNF-κB抑制効果応用の可能性について検討したいと回答した。また、蝸牛外側壁でNF-κBが活性化を示す細胞が線維細胞なのか、蝸牛内に浸潤するマクロファージなのかを明確にするためCD45等の白血球マーカーの免疫染色を用いる必要があることを述べた。次いで、本研究におけるNF-κBのサブユニット構成の違いの意義、すなわちp65を含む二量体とp50を含む二量体のDNA結合能の差は、構成蛋白の異なるNF-κBが異なる機能を有している可能性を示唆するのではないかと指摘を受けた。これに対しては、NF-κBの構成の違いによりDNA結合能を発揮し易い細胞内酸化ストレス強度や塩基配列が異なり、結果として標的遺伝子の違いを生じるという報告に一致する結果であると回答した。また、細胞種によって、相互作用をきたす他の転写因子、転写補助因子等の活性度や異なることもNF-κBが異なる作用を有する一因になっている可能性があるとして付け加えた。

以上、今後NF-κBをターゲットとした感音難聴の治療を計画するには研究方法の改善を要するが、音響障害にNF-κBを介したiNOSの発現が関与している可能性を示したことは臨床的にも意義深く、更なる発展が期待される研究と評価された。

論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁
生理学 岡野 栄之 内科学 鈴木 則宏
解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者：池田 康夫、岡野 栄之
審査委員長：岡野 栄之

試験日：平成18年4月20日