慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスを用いた革新的治療法の開発
Sub Title	Development of novel therapeutics for autoimmune inner ear disorder by using new transgenic mouse model
Author	小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 三枝, 智香(Saegusa, Chika) 神崎, 晶(Kanzaki, Shō) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 細谷, 誠(Hosoya, Makoto)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	内耳性難聴の原因のひとつに自己免疫の関与が古くから提唱されており、自己抗体や標的タンパクなど多くの知見が蓄積している。我々は蝸牛感覚上皮への免疫寛容の破綻が生じる新規トランスジェニックマウスモデルを作製し、内耳感覚上皮に対するT細胞の免疫学的監視機構を検討してきた。本研究ではその分子生物学的な病態を明らかにすべく、網羅的遺伝子発現解析を行った。CD4+T細胞による自己免疫発動個体においては、マウス蝸牛での有毛細胞上の抗原はT細胞による監視下にあり、その抗原提示は蝸牛内で行われていること、遺伝子発現の変化は内リンパ嚢で最も著名であり、内リンパ嚢中でアポトーシスが亢進していることを見出した。 The involvement of autoimmunity has long been proposed as one of the causes of inner ear hearing loss. We have generated a novel transgenic mouse model in which immune tolerance to the cochlear sensory epithelium is disrupted, and have investigated the immunological surveillance mechanism of T cells against the cochlear sensory epithelium. In the present study, we performed comprehensive gene expression analysis to clarify the molecular pathogenesis of this phenomenon. Evidences showed that while antigen presentation was occurred in the cochlea under T-cell surveillance in CD4+ T-cell autoimmunity, gene expression changes are most prominent in the endolymphatic sac and includes apoptosis related genes.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2018～2020 課題番号：18H02952 研究分野：耳科学･聴覚医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18H02952seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｈ０２９５２

研究課題名（和文）新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスを用いた革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutics for autoimmune inner ear disorder by using new transgenic mouse model

研究代表者
小川　郁（Ogawa, Kaoru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：００１６９１７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,600,000円

研究成果の概要（和文）：内耳性難聴の原因のひとつに自己免疫の関与が古くから提唱されており、自己抗体や標的タンパクなど多くの知見が蓄積している。我々は蝸牛感覚上皮への免疫寛容の破綻が生じる新規トランスジェニックマウスモデルを作製し、内耳感覚上皮に対するT細胞の免疫学的監視機構を検討してきた。本研究ではその分子生物学的な病態を明らかにすべく、網羅的遺伝子発現解析を行った。CD4+T細胞による自己免疫発動個体においては、マウス蝸牛での有毛細胞上の抗原はT細胞による監視下にあり、その抗原提示は蝸牛内で行われていること、遺伝子発現の変化は内リンパ嚢で最も著名であり、内リンパ嚢中でアポトーシスが亢進していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
自己免疫性内耳炎・難聴は、臨床的にステロイド剤に効果があることや炎症反応関連バイオマーカーの上昇、HLA型のSNPと難聴の相関などを根拠に提唱されてきた古くも新しい疾患概念であるが、一連の既報は、内耳組織の抗体産生能や、自己抗原の同定、内耳ペプチド摂取リンパ球による難聴誘導など、内耳組織は必ずしも免疫系に隔絶されてはいないことを示す状況証拠の蓄積であった。
本研究により、個体遺伝子操作による本格的な免疫学モデルにより、自己免疫＝免疫寛容の破綻と感音難聴の因果関係がprospectiveに直接証明され、蝸牛ー内リンパ嚢という免疫反応の「軸」が内リンパ嚢恒常性の破綻を引きおこすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The involvement of autoimmunity has long been proposed as one of the causes of inner ear hearing loss. We have generated a novel transgenic mouse model in which immune tolerance to the cochlear sensory epithelium is disrupted, and have investigated the immunological surveillance mechanism of T cells against the cochlear sensory epithelium. In the present study, we performed comprehensive gene expression analysis to clarify the molecular pathogenesis of this phenomenon. Evidences showed that while antigen presentation was occurred in the cochlea under T-cell surveillance in CD4+ T-cell autoimmunity, gene expression changes are most prominent in the endolymphatic sac and includes apoptosis related genes.

研究分野：耳科学･聴覚医学

キーワード：自己免疫　耳科学　難聴　メニエール病

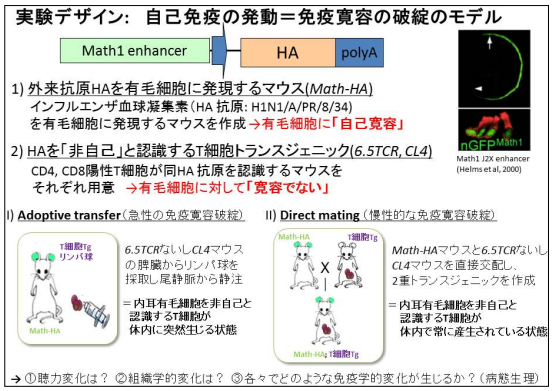
※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

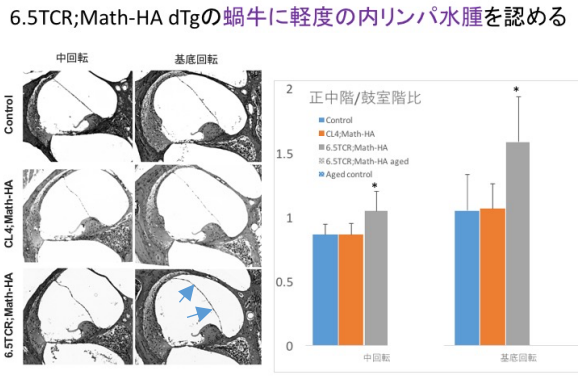
自己免疫性内耳炎・難聴は、臨床的にステロイド剤に効果があることや末梢血における炎症反応関連バイオマーカーの上昇、HLA 型の SNP と難聴の相関などを根拠に提唱されてきた古くも新しい疾患概念である。しかしながら自己免疫＝免疫寛容の破綻と感音難聴の因果関係を prospective に免疫学的手法で直接証明する試みは依然乏しく、動物実験レベルの検討も、内耳組織の抗体産生能(Harris JP ら)や、自己抗原の同定(CTL2: Nair S, 2004 など複数)、内耳ペプチド摂取リンパ球による難聴誘導(Solares, 2004)など、内耳組織は必ずしも免疫系に隔絶されてはいないことを示す状況証拠の蓄積であった。この状況において我々は個体遺伝子操作により内耳免疫研究に本格的な免疫学を導入する、初の自己免疫難聴モデルトランスジェニックマウス(Math-HA)を樹立し、解析してきた。

我々は蝸牛感覚上皮への免疫寛容の破綻が生じる新規トランスジェニックマウスモデルを作製し、内耳感覚上皮に対する T 細胞の免疫学的監視とその病態生理を明らかにしてきた。まずは、内耳有毛細胞のマスター遺伝子である Math1 遺伝子の有毛細胞特異的エンハンサー(J2X-enhancer: Helms 2000)による発現調節下で、内耳感覚上皮特異的に外来抗原を発現するトランスジェックマウス(Math-HA) を作成した。Math-HA マウス自身においては、HA 抗原陽性の有毛細胞は「自己」と認識（＝免疫寛容）されるが、この個体に対して同抗原を「非自己」と認識する“遺伝子改変 T 細胞”を移入すると、自己免疫性 T 細胞が HA を「非自己」と認識する。すなわち内耳有毛細胞に対する自己攻撃性 T 細胞が出現する状態が作り出されることになり、「有毛細胞に対する免疫寛容の破綻」が個体レベルで再現されるモデルが作成されることになる。

HA 抗原を特異的に認識する遺伝子改変 TCR を CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞に強制発現するトランスジェニックマウス(6.5TCR, CL4TCR マウス)をそれぞれ導入し、ヘルパーT 細胞による自己免疫性難聴と、キラーT 細胞による自己免疫性難聴の２種を作成した。さらに各々について、T 細胞を静注で移入することによる急性の免疫寛容破綻モデルと、両者を交配して局所寛容を観察する慢性の免疫寛容破綻モデルを樹立した。この２ x 2＝4 種類につき観察をした。



このモデルにおいては、特に蝸牛感覚上皮への CD4+T 細胞による自己免疫発動は低音の変動性難聴とめまい行動を引き起こし、組織学的には内リンパ水腫を呈していた。



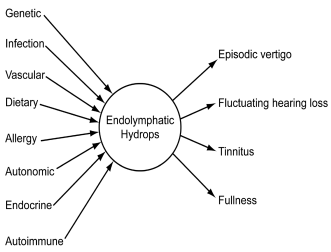
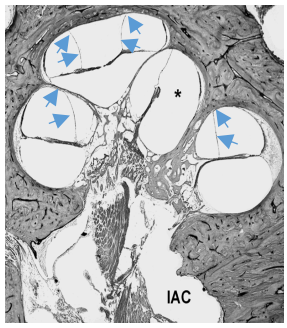


FIG. 1. Central hypothesis for Ménière's syndrome (modified after Kiang (10)). Many possible etiologic factors can lead to endolymphatic hydrops, which in turn generates the clinical symptoms.



内リンパ水腫の組織像と病態に関する代表的仮説
Merchant SN et al. *Otology & Neurotology* 26:74–81 2005

２．研究の目的

本研究では、この一見関係ない感覚上皮への免疫寛容破綻と内耳リンパ液の恒常性破綻を結びつける機序を解明し、急性期から亜急性期の新規治療法とバイオマーカーの探索をすることを目的とした。

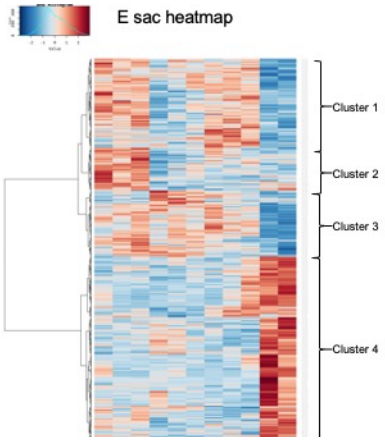
３．研究の方法

上述の目的を達するために、CD4+T 細胞による自己免疫発動モデル、CD8+T 細胞による自己免疫発動モデル、同腹対照群において、網羅的遺伝子解析を行った。蝸牛、内リンパ嚢、全血球

を解析対象とし、遺伝子型間での比較を行った。さらにパスウェイ解析を行い、それぞれの部位でどのような細胞生物学的現象が生じているかを、組織学的解析、免疫組織学的解析によって検討した。

４．研究成果

網羅的遺伝子発現解析の検討結果から、マウス蝸牛での有毛細胞上の抗原は T 細胞による監視下にあり、その抗原提示は蝸牛内で行われていることが示唆された。その一方で、興味深いことに遺伝子発現の変化は内リンパ嚢で最も著名であり、炎症関連遺伝子も含めての遺伝子発現変動量は、内リンパ嚢で最も大きく、変動遺伝子数も多かった。GO（Gene Ontology）解析では、CD4+T 細胞による自己免疫発動個体においては、内リンパ嚢中でアポトーシス関連遺伝子が全般的に発現上昇をしていた。また、末梢血においても複数の遺伝子の発現上昇を認め、この中には分泌型因子も含まれていた。



このことから、蝸牛―内リンパ嚢という免疫反応の軸が、蝸牛内における恒常性と免疫学的監視に強く関与している可能性とともに、その過程は末梢血採血から推定し得ることが示唆された。

上述の結果を踏まえて、まずは内リンパ嚢に注目して、免疫組織学的解析および組織学的解析を行ったところ、CD4+T 細胞による自己免疫発動個体では内リンパ嚢上皮全体でアポトーシスが亢進していた。このことから、蝸牛感覚上皮での提示自己抗原に対する自己免疫反応は、何らかの機序で内リンパ嚢全体での上皮細胞の変性を引き起こし、内リンパ嚢の機能低下が生じることによって、内リンパ水腫という病態を来すものと想定された。

Cluster 4 での上昇率上位10 GO-terms

GO:0006915 [6]: apoptosis
GO:0012501 [5]: programmed cell death
GO:0042981 [6]: regulation of apoptosis
GO:0043067 [5]: regulation of programmed cell death
GO:0045449 [6]: regulation of transcription
GO:0019219 [5]: regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
GO:0007186 [6]: G-protein coupled receptor protein signaling
GO:0006355 [7]: regulation of transcription, DNA-dependent
GO:0006351 [7]: transcription, DNA-dependent
GO:0006350 [6]: transcription
GO:0006139 [5]: nucleobase, nucleoside, nucleotide nucleic acid metabolism
GO:0051242 [5]: positive regulation of cellular physiological process
GO:0008632 [7]: apoptotic program

内リンパ水腫は内耳内リンパ液組成の恒常性破綻と併存すると考えられる。上述の結果は免疫反応と内リンパ恒常性破綻の間に、内リンパ嚢上皮の機能低下が生じていることを示唆するが、免疫反応と上皮細胞のアポトーシスが、直接的な自己免疫によるものなのか、間接的な何らかの機序を挟むものなのかは、次の課題となる。この視点から、現在、個々の遺伝子発現の変動に注目している。例えば、Preliminary ではあるが、極めて興味深いことに、自己免疫マウスでは内リンパ嚢においては繊毛形成やムチン分泌に関連する遺伝子が誘導されており、免疫反応の結果としてリンパ液の組成や粘稠性に変化を生じ、内リンパ水腫が生じる可能性が示唆される。この仮説は内リンパ水腫に対する新しい治療標的の可能性を示唆するものであり、新規治療法に向けた検討を今後加えていきたい。

また他にも特定のケモカイン誘導なども認め、内耳における免疫の恒常性の重要性と、その破綻によるインパクトの大きさが明らかになった。一部の遺伝子変動を末梢血内で認めており、一般的な感音難聴から自己免疫性難聴を鑑別するバイオマーカー候補を得ることができた。

個体遺伝子操作により内耳における免疫寛容の破綻を prospective に観察するモデルとしては世界初の試みであり、その結果得られた一連の結果についても、過去に報告のない、日本発世界初の結果である。現在、これらについて現在投稿準備中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 藤岡 正人	４．巻 30巻1号
２．論文標題 幹細胞生物学と霊長類モデルを用いた内耳性難聴の治療法開発	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Otology Japan	６．最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 藤岡正人	４．巻 218
２．論文標題 【耳鼻咽喉科における新生児・乳幼児・小児への投薬-update-】 耳鼻咽喉科疾患に対する薬物療法　急性難聴	５．発行年 2018年
３．雑誌名 ENTONI	６．最初と最後の頁 109-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計7件（うち招待講演　3件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 藤岡正人・武内　俊樹・黒川　友哉 ・阿部　圭悟・長倉　晃
２．発表標題 ”新しい治療”を創り出す：産学官の"現場"の若手たち
３．学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 藤岡　正人
２．発表標題 当科におけるアパタイト人工耳小骨を用いた内視鏡下アブミ骨手術症例の検討
３．学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
４．発表年 2019年

１．発表者名 藤岡正人
２．発表標題 難聴治療の最前線：経耳内視鏡下耳科手術（TEES）と幹細胞医学を用いた感音難聴治療
３．学会等名 千代田区耳鼻咽喉科医会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 Sho Kurihara,Masato Fujioka, Tomohiko Yoshida, Makoto Hosoya, Kaoru Ogawa, Hiromi Kojima
２．発表標題 Highly Efficient, Well-reproducible Cochlear Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Cells: A Candidate Method of the Drug Development for Spiral Ganglion Neuron
３．学会等名 European Academy of Otology and Neurotology 2018（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 藤岡正人
２．発表標題 幹細胞生物学を応用した内耳性難聴治療法の開発研究
３．学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
４．発表年 2018年

１．発表者名 細谷誠、藤岡正人、小川郁
２．発表標題 ヒトiPS細胞の内耳病態研究への応用と未来への展望～その長所・短所と位置付け～
３．学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計1件

１．著者名 藤岡正人、細谷誠	４．発行年 2020年
２．出版社 JOHNS	５．総ページ数 128
３．書名 【難聴をなおす-2020年版】感音難聴とiPS創薬	

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室研究紹介 www.ent.med.keio.ac.jp

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	三枝　智香 (Saegusa Chika) (00280800)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教 (32612)	
研究分担者	神崎　晶 (Kanzaki Sho) (50286556)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	藤岡　正人 (Fujioka Masato) (70398626)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

６．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	細谷　誠 (Hosoya Makoto) (30645445)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ハーバード大学	ノースウェスタン大学	UCLA	