Title	急性感音難聴のprecision medicineに向けたコンパニオン診断開発
Sub Title	A precision medicine for acute sensorineural hearing loss
Author	小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 三枝, 智香(Saegusa, Chika) 神崎, 晶(Kanzaki, Sho) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、「突然の聴力低下」という症候で定義されたバスケットネーム疾患である「難聴」患者から、自己免疫を病態とする症例を鑑別し、ステロイドや抗体医薬による抗炎症治療へつなげる簡易コンパニオン診断薬の創出を最終目的とする。当研究室で10年来研究してきた、自己免疫性難聴遺伝子改変動物（H24, 27, 30年基盤研究(B)）の内耳および末梢血の遺伝子発現の網羅的解析から、末梢血では一部の炎症· 免疫関連遺伝子に限局してその変動を認め、特にCD4陽性T細胞による自己免疫性難聴のモデルで大きな発現プロファイル変化を認めた。組織学的解析では、同モデルの内リンパ嚢上皮内でアポトーシスが亢進していた。 The ultimate goal of this study is to create a companion diagnostic agent that can differentiate cases with autoimmune pathology from those with "sudden hearing loss", a basket name disease defined by the symptom and lead to anti-inflammatory treatment with steroids and antibody drugs. Comprehensive analysis of gene expression in the inner ear and peripheral blood of animals with genetically engineered autoimmune hearing loss (Grant-in-Aid for Scientific Research (B)), which has been studied in our laboratory for 10 years, revealed that the expression profile of some inflammation- and immunity-related genes in the peripheral blood was significantly changed, especially in a CD4 positive T cell model of autoimmune hearing loss. Histological analysis showed increased apoptotic cells within the endolymphatic sac epithelium.
Notes	研究種目 : 挑戦的研究 (萌芽) 研究期間 : 2020～2021 課題番号 : 20K21661 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_20K21661seika

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４年　５月３０日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ２１６６１
研究課題名（和文）急性感音難聴のPresicion Medicineに向けたコンパニオン診断開発

研究課題名（英文）A precision Medicine for acute sensorineural hearing loss

研究代表者
小川　郁（OGAWA, Kaoru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・名誉教授

研究者番号：００１６９１７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「突然の聴力低下」という症候で定義されたバスケットネーム疾患である「難聴」患者から、自己免疫を病態とする症例を鑑別し、ステロイドや抗体医薬による抗炎症治療へつなげる簡易コンパニオン診断薬の創出を最終目的とする。当研究室で10年来研究してきた、自己免疫性難聴遺伝子改変動物（H24, 27, 30年基盤研究(B)）の内耳および末梢血の遺伝子発現の網羅的解析から、末梢血では一部の炎症・免疫関連遺伝子に限局してその変動を認め、特にCD4陽性T細胞による自己免疫性難聴のモデルで大きな発現プロファイル変化を認めた。組織学的解析では、同モデルの内リンパ嚢上皮内でアポトーシスが亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
末梢血での転写レベルでの発現解析による急性感音難聴のコンパニオン診断で、ヘルパーT細胞依存的な自己免疫性難聴を鑑別し得る可能性があることが、本研究によって明らかになるとともに、そのような難聴における病態発現の機序の一部が、明らかになった。
原因不明の突発性難聴患者に対しては経験知からステロイド（海外では抗体医薬による抗炎症療法）などを投与するが、その効果は一部の症例に限られる。本研究成果を元に、ヘテロな集団である急性難聴患者から、自己免疫、炎症関連症例を投薬前にピックアップすることで、副作用のある薬剤や高額薬の無駄な投薬を減らし、リスク・コスト/ベネフィットを高められるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The ultimate goal of this study is to create a companion diagnostic agent that can differentiate cases with autoimmune pathology from those with "sudden hearing loss", a basket name disease defined by the symptom and lead to anti-inflammatory treatment with steroids and antibody drugs. Comprehensive analysis of gene expression in the inner ear and peripheral blood of animals with genetically engineered autoimmune hearing loss (Grant-in-Aid for Scientific Research (B)), which has been studied in our laboratory for 10 years, revealed that the expression profile of some inflammation- and immunity-related genes in the peripheral blood was significantly changed, especially in a CD4 positive T cell model of autoimmune hearing loss. Histological analysis showed increased apoptotic cells within the endolymphatic sac epithelium.

研究分野：耳科学 聴覚医学

キーワード：コンパニオン診断　難聴　聴覚医学　Precision Medicine　自己免疫

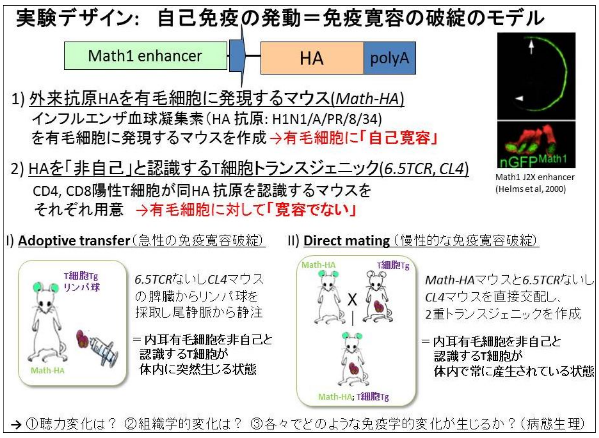
様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

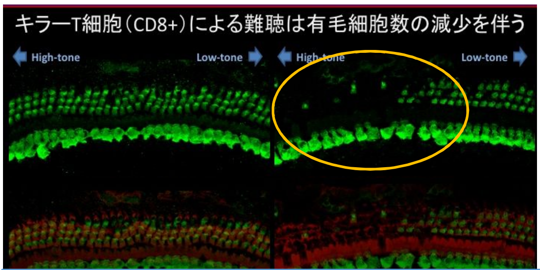
１．研究開始当初の背景

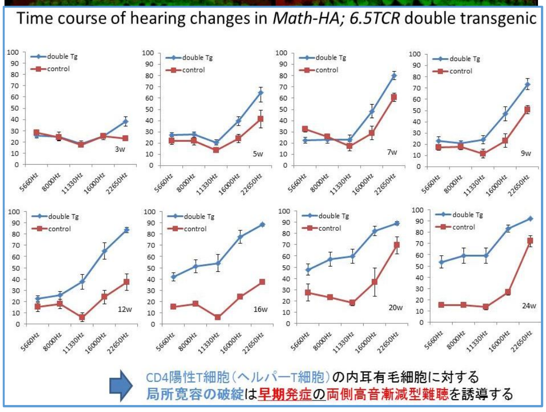
自己免疫性内耳炎・難聴は、臨床的にステロイド剤に効果があることや末梢血における炎症反応関連バイオマーカーの上昇、HLA 型の SNP と難聴の相関などを根拠に提唱されてきた古くも新しい疾患概念である。しかしながら自己免疫＝免疫寛容の破綻と感音難聴の因果関係を prospective に免疫学的手法で直接証明する試みは依然乏しく、動物実験レベルの検討も、内耳組織の抗体産生能(Harris JP ら)や、自己抗原の同定(CTL2: Nair S, 2004 など複数)、内耳ペプチド摂取リンパ球による難聴誘導(Solares, 2004)など、内耳組織は必ずしも免疫系に隔絶されてはいないことを示す“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。

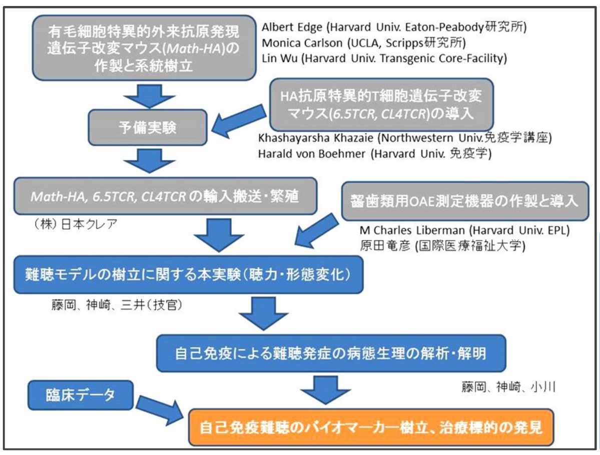
我々は蝸牛感覚上皮への免疫寛容の破綻が生じる新規トランスジェニックマウスモデルを作製し、内耳感覚上皮に対する T 細胞の免疫学的監視とその病態生理を明らかにしてきた。まずは、内耳有毛細胞のマスター遺伝子である Math1 遺伝子の有毛細胞特異的エンハンサー(J2X-enhancer: Helms 2000)による発現調節下で、内耳感覚上皮特異的に外来抗原を発現するトランスジェックマウス(Math-HA) を作成した。Math-HA マウス自身においては、HA 抗原陽性の有毛細胞は「自己」と認識（＝免疫寛容）されるが、この個体に対して同抗原を「非自己」と認識する“遺伝子改変 T 細胞”を移入する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

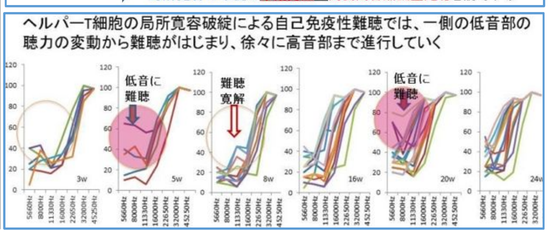
このモデルにおいては、例えば蝸牛感覚上皮への CD4+T 細胞による自己免疫発動は低音の変動性難聴とめまい行動を引き起こし、組織学的には内リンパ水腫を呈していた。このように、我々の自己免疫難聴モデルトランスジェニックマウスはヒト自己免疫関連急性感音難聴の分子レベルでの理解とそれに基づく疾患発症予測や治療標的同定に有用であると考えられた。

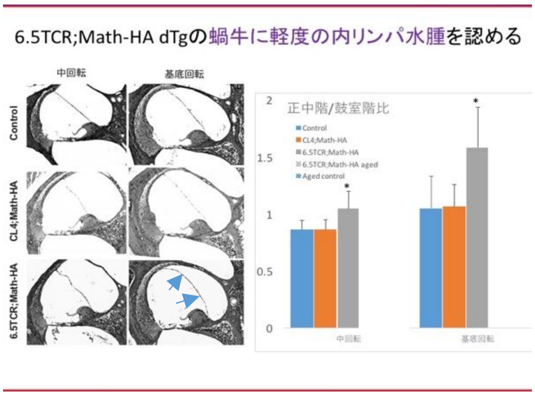


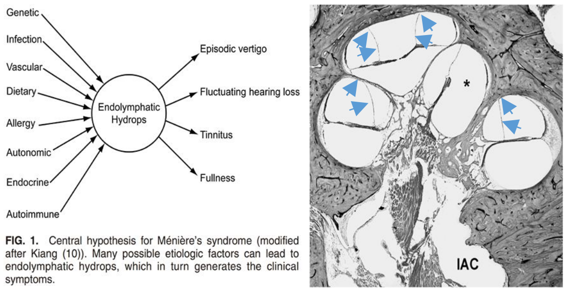






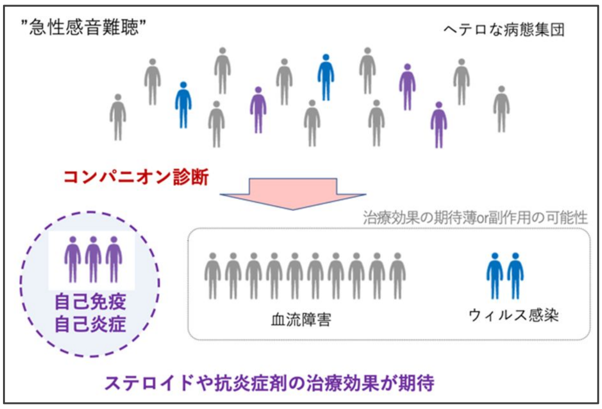






内リンパ水腫の組織像と病態に関する代表的仮説
Merchant SN et al. *Otology & Neurotology* 26:74–81 2005

２．研究の目的



急性高度難聴は年間受療者数 35,000 人を数える難治性疾患である。「突然の聴力低下」という症候で定義されたバスケットネーム疾患である本難聴は、その病態に局所循環障害やウィルス感染、自己免疫などが混在していると考えられている。本研究では、当研究室が過去 10 年従事してきた新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルの基礎研究から発見した自己免疫性難聴特異的発現遺伝子群の知見に基づき、簡便・簡易に測定可能な自己免疫性難聴マーカー検査キットを樹立することを最終目標とし、そのための遺伝子発現情報の網羅的開発を行った。原因不明の突発性難聴患者に対しては、経験知からステロイド（海外では抗体医薬による抗炎症療法）などを投与するが、その効果は一部の症例に限られる。本研究成果により、ヘテロな集団である急性難聴患者から、これらの治療法に反応し得る症例を投薬前にピックアップすることを目指す。これにより、副作用のある薬剤や高額薬の無駄な投薬を減らし、リスク・ベネフィット/コスト・ベネフィットを飛躍的に高める、急性感音難聴では初のコンパニオン診断を可能にし、難聴領域における Precision medicine の第一歩へとつなげることが最終目標である。

３．研究の方法

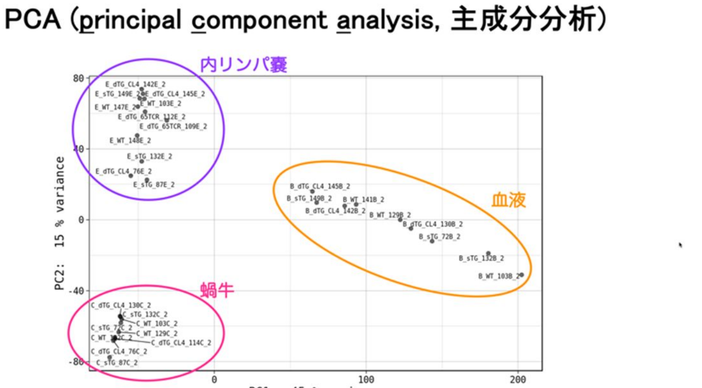
上述の目的を達するために、CD4+T 細胞による自己免疫発動モデル、CD8+T 細胞による自己免疫発動モデル、同腹対照群において、末梢血採血におけるデータを中心に、網羅的遺伝子解析を行った。パスウェイ解析を行うとともに、蝸牛、内リンパ嚢、全血球を解析対象とし、遺伝子型間での比較を行った。それぞれの部位でどのような細胞生物学的現象が生じているかを、組織学的解析、免疫組織学的解析によって検討した。

４．研究成果

1）臓器毎の発現パターンの傾向について

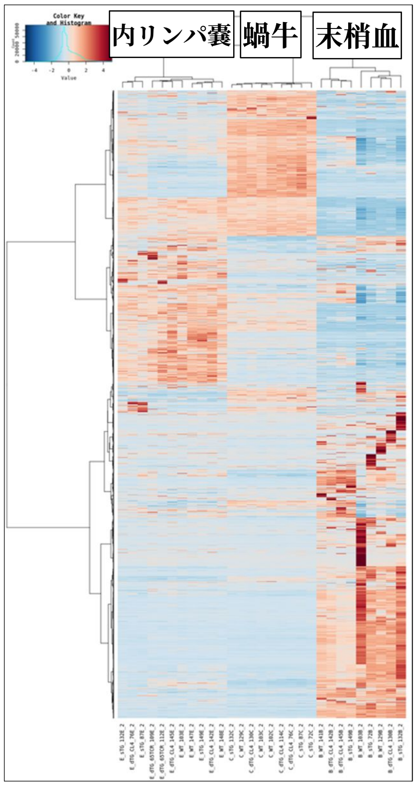
各臓器毎に遺伝子発現のパターンに特徴があることを、PCA 解析にて確認した（右図）。

この基本データを踏まえつつ、同腹正常個体との比較を行い、障害モデルで変動する遺伝子の発現について、heat map を作成して比較した。



遺伝子発現パターンは組織特異的

その結果、①細胞傷害性 T 細胞による内耳障害では蝸牛内で遺伝子が著しく変動し、②ヘルパーT 細胞による自己免疫では内リンパ嚢で遺伝子が著しく変動する一方、③末梢血での遺伝子変動は少なかった。

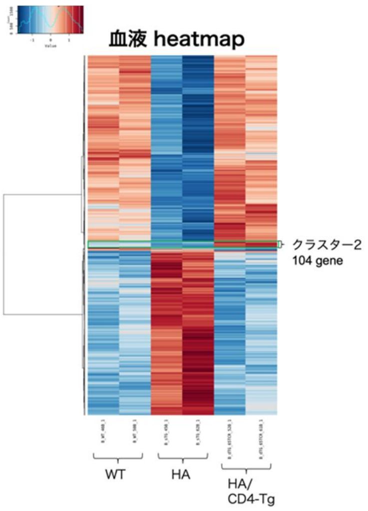


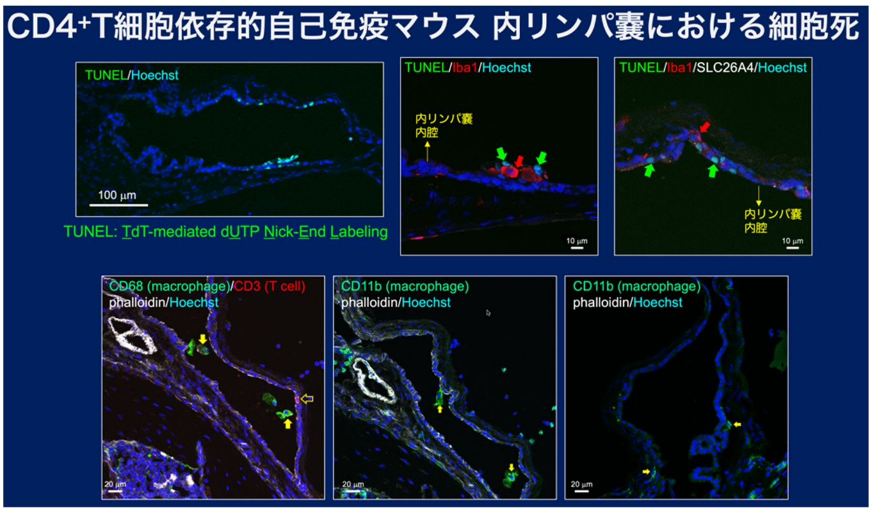
２）末梢血での変動について
上述③における末梢血での遺伝子発現のパターンを検討すると、ヘルパーT 細胞による自己免疫の個体群で、一部の炎症・免疫関連遺伝子に限局して、遺伝子発現に有意な変動が見出された。　すなわち、末梢血での転写制御レベルにおける遺伝子発現パターンからは、ヘルパーT 細胞依存的自己免疫による症例を峻別し得る可能性が見出された。

３）ヘルパーT 細胞依存的自己免疫性内耳傷害の病態メカニズムと治療標的探索

上述１）②の内リンパ嚢で発現変動の認められた遺伝子群について GO エンリッチメント解析を行ったところ、ヘルパーT 細胞による自己免疫発動個体では複数のアポトーシス関連 GO term が有意に濃縮されていた。そこで同モデルの内リンパ嚢を組織学的に解析したところ、その上皮細胞内でのアポトーシスの亢進を認めた。

以上のことから、末梢血での転写レベルでの発現解析を用いた急性感音難聴のコンパニオン診断では、ヘルパーT 細胞依存的な自己免疫性難聴を鑑別し得る可能性があることが、本研究によって明らかになるとともに、そのような難聴における病態発現の機序の一部は
内リンパ嚢内において生じ、しかも上皮のアポトーシスを伴うことが示された。





本研究については、引き続き、海外査読誌への投稿へ向けたデータの追加と解析を行いながら、得られた情報を元に、実臨床でのコンパニオン診断キットとして社会還元を目指し、今後研究を展開していく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Ogawa S, Fujioka M, Hosoya M, Ogawa K	４．巻 -
２．論文標題 Complete removal of stage II congenital cholesteatoma destroying temporomandibular joints using transcanal endoscopic ear surgery with a mirror technique: a case report.	５．発行年 2021年
３．雑誌名 J Int Adv Otol	６．最初と最後の頁 -
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 Ken Kasahara , Makoto Hosoya , Naoki Oishi , Kaoru Ogawa	４．巻 16
２．論文標題 A Rare Case of Bifurcated Chorda Tympani	５．発行年 2020年
３．雑誌名 The Journal of International Advanced Otology	６．最初と最後の頁 141～144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5152/iao.2020.6882	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 Hosoya Makoto、Fujioka Masato、Ogawa Kaoru	４．巻 -
２．論文標題 Hydroxyapatite Prostheses in Endoscopic Transcanal Stapes Surgery for Otosclerosis Cases	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Ear, Nose & Throat Journal	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0145561321989143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 星野有砂、細谷誠、藤岡正人、神崎晶、大石直樹、長谷部夏希、北村充、都築伸佳、小川郁
２．発表標題 当科における内視鏡下耳小骨奇形手術症例17例の検討 抄録登録 [10296]
３．学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会
４．発表年 2020年

1．発表者名 須田悟史、北村充、長谷部夏希、都築伸佳、細谷誠、大石直樹、神崎晶、川井田みほ、亀山香織、藤岡正人、小川郁
2．発表標題 経外耳道的内視鏡下耳科手術により診断、治療を行った中耳腫瘤の一例
3．学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会
4．発表年 2020年

1．発表者名 Mitsuru Kitamura, Makoto Hosoya, Sho Kanzaki , Kaoru Ogawa, Masato Fujioka.
2．発表標題 Tympanoplasty type 1 (TP1) with inlay technique by Transcanal Endoscopic Ear Surgery (TEES)
3．学会等名 AAO-HNSF 2020 Virtual Annual Meeting & OTO Experience
4．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

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)	

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