Title	新規自己免疫性難聴モデルマウスの解析による革新的な感音難聴治療法の探索
Sub Title	Exploring novel therapeutic targets by using a newly generated autoimmune hearing loss transgenic mouse model
Author	小川, 郁(Ogawa, Kaoru) 藤岡, 正人(Fujioka, Masato) 神崎, 晶(Kanzaki, Sho) 原田, 竜彦(Harada, Tatsuhiko) Edge, Albert
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	内耳性難聴の原因のひとつに古くから自己免疫の関与が考えられており, 自己抗体や標的タンパクの同定を中心に国内外で多くの基礎的･ 臨床的検討がされてきている。当研究では自己免疫発症の実態である免疫寛容の破綻に焦点を当て, 発生工学を駆使して新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルを樹立し解析した。CD4陽性T細胞による内耳有毛細胞に対する自己免疫は早期より難聴を呈した。3週齢より低音部の一側性変動性難聴で発症し, 徐々に両側で中高音へと進行した。ほとんどの個体で高齢では前庭機能障害を発症し一連の症候はメニエール病に酷似していた。今後このマウス蝸牛の組織学的解析をさらに進め, 治療標的を探索する。 Sensorineural hearing loss due to the dysfunction in the inner ear is intractable. Both clinical and experimental evidences, for instance autoreactive antibody or target antigens, suggest autoimmunity may result in the deafness. We have developed a transgenic mouse model that recapitulate the disruption of tolerance to the inner ear hair cells by using HA-antigen overexpression systems. Data demonstrated that the CD4 positive T-cell mediated autoimmunity to hair cells resulted in cochlear hearing loss with vestibuler dysfunction. Further analyses will be examined for finding therapeutic targets.
Notes	研究種目 : 基盤研究(B) 研究期間 : 2012～2014 課題番号 : 24390390 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_24390390seika

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４３９０３９０

研究課題名（和文）新規自己免疫性難聴モデルマウスの解析による革新的な感音難聴治療法の探索

研究課題名（英文）Exploring novel therapeutic targets by using a newly generated autoimmune hearing loss transgenic mouse model

研究代表者
小川　郁（Ogawa, Kaoru）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：００１６９１７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,100,000円

研究成果の概要（和文）：内耳性難聴の原因のひとつに古くから自己免疫の関与が考えられており、自己抗体や標的タンパクの同定を中心に国内外で多くの基礎的・臨床的検討がされてきている。当研究では自己免疫発症の実態である免疫寛容の破綻に焦点を当て、発生工学を駆使して新規自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルを樹立し解析した。CD4陽性T細胞による内耳有毛細胞に対する自己免疫は早期より難聴を呈した。3週齢より低音部の一側性変動性難聴で発症し、徐々に両側で中高音へと進行した。ほとんどの個体で高齢では前庭機能障害を発症し一連の症候はメニエール病に酷似していた。今後このマウス蝸牛の組織学的解析をさらに進め、治療標的を探索する。

研究成果の概要（英文）：Sensorineural hearing loss due to the dysfunction in the inner ear is intractable. Both clinical and experimental evidences, for instance autoreactive antibody or target antigens, suggest autoimmunity may result in the deafness. We have developed a transgenic mouse model that recapitulate the disruption of tolerance to the inner ear hair cells by using HA-antigen overexpression systems. Data demonstrated that the CD4 positive T-cell mediated autoimmunity to hair cells resulted in cochlear hearing loss with vestibuler dysfunction. Further analyses will be examined for finding therapeutic targets.

研究分野：耳科学、聴覚医学

キーワード：自己免疫性難聴　メニエール病　感音難聴

１．研究開始当初の背景

突発性難聴やメニエール病に代表される内耳性難聴は、働きざかりの健常人が突然コミュニケーション障害に襲われる疾患で、21 世紀を迎えた現代でも我々人類はこの病気に対する十分な治療法を有していない。専門医は経験知に基づきステロイドホルモンを大量投与するが、多彩な副作用にもかかわらず寛解率は約 1/3 に過ぎず、原因究明と治療標的の同定に基づいた新規治療法の開拓が急務である。

原因不明の当疾患に対し多くの病態仮説が挙げられる中、自己免疫の関与は比較的古くから提唱されてきた説であり、自己抗体や標的タンパクの同定、炎症関連バイオマーカーの上昇、HLA 型の SNP と難聴の相関など、retrospective にこの説を支持する状況証拠が蓄積されているが、実際に「なぜ」「どのように」難聴が生じるかという内耳への自己免疫反応と感音難聴発症との因果関係を prospective に直接証明する試みはこれまでにない。そこで今回、発生工学を駆使し新規モデルマウスを作成する試みをスタートさせた。

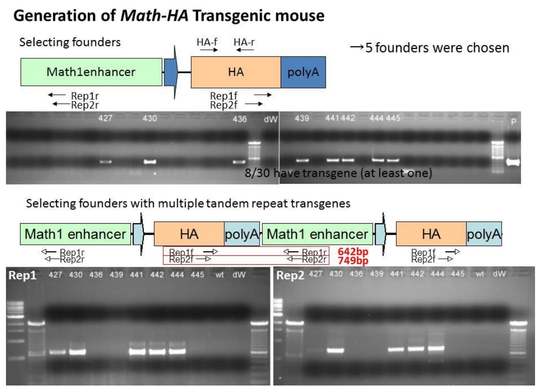
２．研究の目的

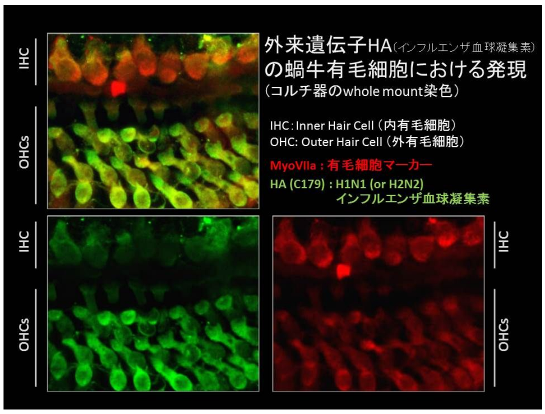
内耳性難聴の原因のひとつに古くから自己免疫の関与が考えられており、自己抗体や標的タンパクの同定を中心に国内外で多くの基礎的・臨床的検討がされてきている。当研究では自己免疫発症の実態である**免疫寛容の破綻**に焦点を当て、発生工学を駆使して新規**自己免疫性難聴トランスジェニックマウスモデルを樹立し解析**することとした。これにより自己免疫発動と感音難聴の因果関係を prospective に免疫学的手法で直接証明することを目指すと同時に、病態生理の詳細な解析を通して新規治療表的や治療候補を探索・検討し、臨床応用へつなげることをめざしている。他臓器での自己免疫疾患モデルに倣った、耳科領域では発の本格的な個体レベルでの内耳自己免疫性疾患モデル遺伝子改変動物の作製と解析を通して、耳鼻咽喉科領域における次世代トランスレーショナルリサーチのモデルケースとなることをめざしている。

３．研究の方法

この目的を達するため、これまでに文科省挑戦的萌芽研究などのサポートを得て、米国ハーバード大学耳科・喉頭科（アルバート・エッジ研究室）、マサチューセッツ総合病院、トランスジェニックコア（Lin Wu 博士）の協力の下で、自己免疫性難聴トランスジェニックマウスを樹立した。

内耳に対する免疫寛容は、内耳血液関門により内耳が体循環系と免疫学的に隔絶されているためと考えられている（隔絶抗原説）がこの仮説を検証した実験系はこれまで存在しない。我々はこの問題にアプローチするため、内耳有毛細胞に外来抗原 HA（Hemagglutinin）を強制発現するトランスジェニックマウス(Tg) Math-HA を樹立した。外来抗原 HA を用いた免疫学的実験系は古典的に用いられた経緯があり、HA 抗原を特異的に認識する CD4+ T 細胞、CD8+T 細胞を有する Tg (6.5TCR,CL4-TCR)が汎用されている。Math-HA マウス用の外挿遺伝子作製には、Hemagglutinin (A/PR/8 H1N1 (PR8), HA512-520 ペプチド)遺伝子を米国カリフォルニア大学リバーサイド校スクリップス研究所(Monica Carlson 博士)から供与を受け、内耳有毛細胞特異的遺伝子発現には過去に定評のある Math1 遺伝子 J2X enhancer を UT Southwestern 医学センター，Jane Johnson 博士から供与を受けて用いた。Math-HA 遺伝子を作製したのち、マサチューセッツ総合病院・トランスジェニックコアにて遺伝子改変動物を産出した。CL4-TCR マウスはノースウェスタン大学 Khashayarsha Khazaie 博士より、6.5TCR マウスはハーバード大学医学部の Harald von Boehmer 研究室より導入した。





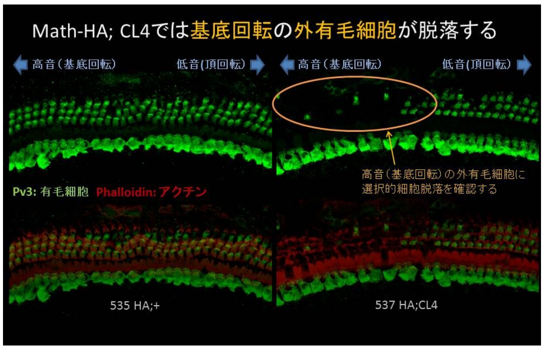
以上３系統を CD1 にて遺伝学的背景を揃えた後に Math-HA と 6.5TCR, CL4-TCR を各々交配させ、その聴力と行動解析を経時的に行った。

また、ハーバード大学 Eaton-Peabody 研究所、Charles Liberman 博士の指導の下、同研究室で実績と定評のある EPL Acoustic System

Assembly の測定プローブを本大学内で作製した。分担研究者の原田により電気回路面を含めたハードウェアの作製、自動キャリブレーションなどを含めたソフト面での化医療を加え、聴力測定には聴性脳幹反応（ABR）と耳音響反射（OAE）の双方を用いた。

４．研究成果

二重トランスジェニックマウスは同腹対照群と比較して進行性の難聴をきたした。特に Math-HA; 6.5TCR は早期より難聴を呈し、3 週齢より低音部の一側性変動性難聴を発症し、徐々に中高音へと難聴が進行した。さらにこれらのマウスのほとんどは高齢になると前庭機能障害を発症し、これら一連の症候はメニエール病に酷似していた。



興味深いことにこれらの二重 Tg では蝸牛外側壁の血管透過性が亢進しており、自己免疫発動における抗原提示やそれに伴う炎症反応などの何らかの現象が外側壁で生じている可能性が考えられた。

本実験系は内耳有毛細胞に対する免疫寛容の隔絶抗原説を支持するものであり、自己抗原の発現量が多ければ内耳有毛細胞に対しても自己免疫が生じる可能性を示唆している。近年、蝸牛内での抗原提示は蝸牛外側壁でなされることを示唆する報告が散見され(Shi X 2010 など)、前述の外側壁の所見はこれらの報告と矛盾しない。特に、蝸牛外側壁は内耳リンパ液の恒常性に寄与し、動物モデルにおいてその機能異常が内リンパ水腫（メニエール病）を引き起こすことと考え合わせると、CD4+陽性 T 細胞による内耳有毛細胞に対する自己免疫の発動はメニエール病の原因となりうる可能性がある。本モデルの蝸牛外側壁における免疫反応の詳細な記述と解析により、新規治療法の探索が期待される。また、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞とによる自己免疫で表現型に若干の違いがあることも興味深い。前者がメニエール病（内リンパ水腫）に類似した表現型を示すのに対し、後者では高音部(基底回転)の外有毛細胞脱落による両側高音漸減型内耳性難聴を呈しており、両側特発性難聴や、Behcet 病、Vogt 小柳原田病などの自己免疫性疾患における内耳性難聴と酷似した経過である。

今後は、自己免疫性難聴の病態生理については引き続きマウスモデルでの検討を進める。昨年までの研究からこの二重 Tg はメニエール病や特発性難聴、自己免疫性難聴の動物モデルとして有用であることが示唆された。本年度中にこのマウスモデルで特許出願を終えると同時に、PVM/Ms の表面抗原、特に同細胞の機能調節を担う抗原を標的として治療薬の探索を進める。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　178　件）

1.<u>Fujioka M</u>, Okano H, Ogawa K, Inflammatory and immune responses in the cochlea: potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss. Frontiers in Pharmacology. 査読有 Dec 23;5:287, 2014. http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00287

〔学会発表〕（計 504 件）

1.<u>Fujioka M</u>, Peripheral intolerance of CD-4 or CD-8 positive T-cells to the inner ear hair cell lead to bilateral gradual hearing loss in CD1 background mice, The 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2013.12.07 台北、台湾

〔図書〕（計　21　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０　件）

○取得状況（計　０　件）

〔その他〕

特になし

６．研究組織

(1)研究代表者
小川　郁（OGAWA, Kaoru）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：００１６９１７９

(2)研究分担者
藤岡　正人（FUJIOKA, Masato）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：　７０３９８６２６

神崎　晶（KANZAKI Sho）
慶應義塾大学･医学部･講師
研究者番号：５０２８６５５６

原田　竜彦（HARADA, Tatsuhiko）
慶應義塾大学･医学部･客員講師
研究者番号：７０３９８６２６

(3)研究協力者
アルバート・エッジ（EDGE, Albert）
ハーバード大学・耳科喉頭科・教授