

Title	耳鳴の病態解明、治療予後予測のためのBDNFを用いた客観的評価法の開発
Sub Title	The application of objective measurement of tinnitus using BDNF to clarify the pathomechanism of tinnitus
Author	斎藤, 知子(Saito, Tomoko)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>内耳培養細胞HEI-OC1細胞を用いて、耳鳴内耳細胞モデル作製を試みた。まず、小胞体ストレスの細胞内誘導物質であるツニカマイシンをHEI-OC1細胞に暴露した。その後、control細胞とツニカマイシン処理細胞の間に有意差のある細胞生存率の条件(濃度100<math>\mu</math>g/ml、処理時間0-48h)を耳鳴内耳細胞モデルとした。この条件で、western blot法によるBDNFの発現は、時間依存性に低下することを確認した。さらに、この条件下で、内耳マーカーであるAtoh1も、時間依存性に低下することを確認した。</p> <p>We try to establish the tinnitus model with inner ear cultured cell line HEI-OC1. At the beginning tunicamycin as endoplasmic reticulum stress was applied to HEI-OC1. After that inner ear tinnitus model was designed as the condition (concentration of 100 microgram/ml, and processing time of 0-48 hours), in which the cell validity was significantly different between the control and tunicamycin (+) condition. In this condition, the time dependant gradual reduction of appearance of BDNF was confirmed by western blot. In addition with this unique condition Atoh1, inner ear marker was also time dependently reduced.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2013 課題番号：24791805 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791805seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791805seika</a>

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.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791805

研究課題名(和文) 耳鳴の病態解明、治療予後予測のためのBDNFを用いた客観的評価法の開発

研究課題名(英文) The application of objective measurement of tinnitus using BDNF to clarify the patho mechanism of tinnitus

研究代表者

斎藤 知子 (Saito, Tomoko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90458886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：内耳培養細胞HEI-OC1細胞を用いて、耳鳴内耳細胞モデル作製を試みた。まず、小胞体ストレスの細胞内誘導物質であるツニカマイシンをHEI-OC1細胞に暴露した。その後、control細胞とツニカマイシン処理細胞の間に有意差のある細胞生存率の条件(濃度100 $\mu$ g/ml、処理時間0-48h)を耳鳴内耳細胞モデルとした。この条件で、western blot法によるBDNFの発現は、時間依存性に低下することを確認した。さらに、この条件下で、内耳マーカーであるAtoh1も、時間依存性に低下することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We try to establish the tinnitus model with inner ear cultured cell line HEI-OC1. At the beginning tunicamycin as endoplasmic reticulum stress was applied to HEI-OC1. After that inner ear tinnitus model was designed as the condition (concentration of 100 microgram/ml, and processing time of 0-48 hours), in which the cell validity was significantly different between the control and tunicamycin (+) condition. In this condition, the time dependant gradual reduction of appearance of BDNF was confirmed by western blot. In addition with this unique condition Atoh1, inner ear marker was also time dependently reduced.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳鳴 BDNF autophagy

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはストレスや精神疾患と耳鼻咽喉科疾患についての臨床研究を行い、その臨床経験から、特に心理社会的ストレスが、様々な内耳疾患の発症において重要な働きをしていることに着目し、耳鳴患者に、抑うつ状態の高い患者が多く含まれていることを報告した。そして、これらの患者に、抗うつ薬を投与すると、抑うつ傾向が強いほど、耳鳴の自覚症状が改善することを報告した (Gen Hosp Psychiatry 2011)。

### (1) 鳴と BDNF

脳由来神経栄養因子 (BDNF; Brain-derived neurotrophic factor) は神経細胞の成長を調節する液性蛋白質である。うつ病では血中 BDNF が低下しており、うつ病のバイオマーカーとして臨床応用が試みられている。申請者は耳鼻咽喉科の外来患者の抑うつレベルと血漿 BDNF 濃度は有意な相関を示すことを報告した。耳鳴患者にはうつ状態が高率に認められることから、この BDNF を耳鳴患者の客観的尺度として応用することを発案した。

### (2) 耳鳴と抗うつ薬

耳鼻咽喉科において抗うつ薬投与は一般的ではない。抗うつ薬の投与前に、有効例が予想できれば、治療上の大きな進歩となる。耳鳴りとうつ病の密接な関係から、BDNF が耳鳴患者に対する抗うつ薬の投与尺度として使用できるのではないかと考えた。

### (3) 耳鳴と BDNF 遺伝子

遺伝子レベルの変化 (DNA メチル化) を耳鳴の遺伝子診断へ応用することができると考えた。

これらを臨床的、遺伝子的に検討しようとしたことが研究の背景である。

## 2. 研究の目的

耳鳴りは耳鼻咽喉科では非常に一般的に見られる症状である。その原因は不明なものが多いが、感音性難聴に伴うものの頻度が比較的高い。そしてその耳鳴の重症度や苦痛度は心理的な要因が強く関連しており、心理的要因による耳鳴りの悪化は vicious circle として広く知られている。今回の検討では、外来耳鳴患者において耳鳴苦痛度、抑うつレベルと BDNF の関係を明らかにし、BDNF のバイオマーカーとしての臨床応用を試みる。

BDNF はうつ状態によって減少し、抗うつ薬治療によって増加することが知られている。耳鳴患者から採血を行い血漿 BDNF 濃度を測定し客観的尺度として応用可能か検討する。次に、耳鳴患者に抗うつ薬を投与しその治療効果と BDNF 濃度の関係を明らかにし抗うつ薬による治療指標として血漿 BDNF 濃度が利用可能か検討する。これまでの結果では耳鳴の苦痛度と抑うつレベルが相関することが分かった。これらの結果をふまえ、より多数例での検討を行うと共にさらに、BDNF 遺伝子における DNA メチル化と耳鳴苦痛度との関係に

ついて検討する。

## 3. 研究の方法

耳鳴患者における血漿 BDNF 濃度測定を行った。

耳鳴患者に対して純音聴力検査、ラウドネスバランステストを行う。耳鳴の苦痛度を THI (tinnitus handicap inventory) 日本語版を用いて評価する。抑うつ評価は HADS (Hospital Anxiety and Depression scale) 日本語版を用いる。患者から同意の上、採血を行い血漿 BDNF 測定を行う (倫理委員会承認済み)。またコントロールとして健常者から採血を行う。血漿 BDNF 測定は ELISA キットを用いて測定する。

耳鳴苦痛度と血漿 BDNF 濃度について検討を行う。また、実際の耳鳴の大きさと耳鳴苦痛度の関係についても検討する。

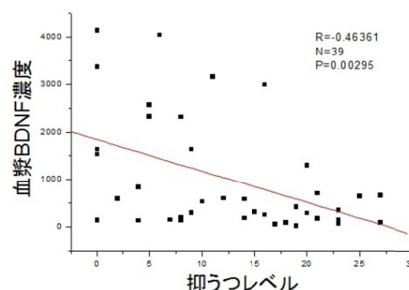
内耳培養細胞 HEI-OC1 を用いて、小胞体ストレス誘導剤 (ツニカマイシン) を投与し、Cell viability assay を行い、細胞生存率を測定し、ツニカマイシンの指摘濃度、時間を決定し、小胞体ストレスによる内耳感覚細胞死モデルを作製する。

そのツニカマイシンの指摘濃度、時間で、細胞を処理、回収し、蛋白を抽出する。その蛋白を用いて、Western blot 法を行い、BDNF の発現検討、さらには、内耳マーカーとして Atoh1 の発現検討を行う。

## 4. 研究成果

耳鳴患者ではコントロールと比較して血漿 BDNF 濃度が有意に上昇しており、苦痛度の軽い症例では高い症例に比べて高値であった (図1)。これらの結果より血漿 BDNF が耳鳴のバイオマーカーとして応用可能である可能性が考えられた。しかし血漿 BDNF 濃度は抑うつ状態とも相関し、耳鳴苦痛度そのものを反映しているのか、抑うつの結果を反映しているかは、引き続きの検討が必要であると考えられた。また今後の課題として治療による血漿 BDNF の変化がどうなるのか?、治療内容による影響はどのようなものかなどについても検討が必要である。今回、ある程度の数の臨床患

図1 抑うつレベルとBDNFの関係

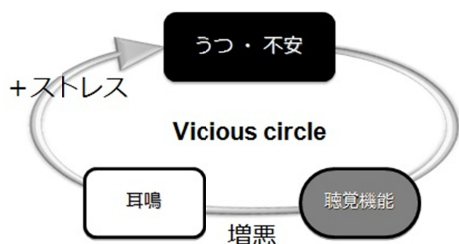


者から血液検体を採取し、検討を行うことができた。その結果血漿BDNFが、バイオマーカーとして応用可能である可能性が示唆された。

しかし臨床検査として確立するためにはさらに多数検体の検討、また性別、年齢についても幅広い層からの検体収集が必要である。

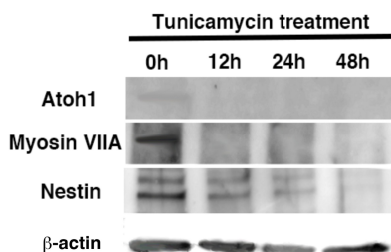
これまで得られた結果は心理的要因による耳鳴りの悪化はvicious circleとして広く知られている(図2)がそれを裏付ける結果であった。

図2 Vicious circle  
心理因子が耳鳴を悪化させる



これまでに得た「耳鳴患者の血液BDNF値は、耳鳴重症度と逆相関する」という臨床データを基礎研究で裏付けるために、内耳培養細胞HEI-OC1細胞を用いて、耳鳴内耳細胞モデル作製を試みた。まず、躁鬱病患者細胞でもその関与が指摘される小胞体ストレスの細胞内誘導物質であるツニカマイシンをHEI-OC1細胞に暴露した。その後、control細胞とツニカマイシン処理細胞の間に有意差のある細胞生存率の条件(濃度100 $\mu$ g/ml、処理時間0-48h)を耳鳴内耳細胞モデルとした。この条件で、western blot法によるBDNFの発現は、時間依存性に低下することを確認した。さらに、この条件下で、内耳マーカーであるAtoh1も、時間依存性に低下することを確認した。この結果は、小胞体ストレス下での内耳感覚細胞の機能低下とBDNFの発現低下が、相関する可能性を示唆している。

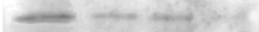
平成24年度までに得た「血漿BDNFが耳鳴バイオマーカーとして応用可能である」という臨床データを、内耳感覚細胞レベルでの実験で証明することができた。これは、耳鳴とBDNF発現低下との関係を、ストレスの内耳感覚細胞へ与える影響から細胞レベルでとらえるという極めて画期的な内容であると自負している。



#### Tunicamycin treatment

0h 12h 24h 48h

BDNF



#### 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 6件)

- 1)GotoF,OishiN,TsutsumiT,Ogawa K:A case of intractable suspected perilymph fistula with severe depression Psychiatry Investig. 査読あり Accepted 2014
- 2)Goto F, Oishi N, Tsutsumi T: Characteristic electroencephalographic findings by photic driving in patients with migraine-associated vertigo. 査読あり Acta Otolaryngol 2013;133:253-6.
- 3)Asama Y, Goto F, Tsutsumi T: Objective evaluation of neck muscle tension and static balance in patients with chronic dizziness. 査読あり Acta Otolaryngol 2012;132:1168-71.
- 4)Goto F, Tsutsumi T, Kabeya M, 他: Outcomes of autogenic training for patients with chronic subjective dizziness. 査読あり J Psychosom Res 2012;72:410-1.
- 5)Goto F, Tsutsumi T, Ogawa K: Lateral semicircular canal plugging with endolymphatic sac decompression as new surgical treatment for intractable Meniere's disease. 査読あり Acta Otolaryngol 2012;132:893-5.
- 6)Goto F, Tsutsumi T, Oishi N, 他: Hidden depression in otolaryngology patients with medically unexplained symptoms. 査読あり Gen Hosp Psychiatry 2012;34:206-8.

〔学会発表〕(計 4件)

- 1)Fumiyuki GOTO, Tomoko TSUTSUMI-SAITO, Kaoru OGAWA: HOW ANXIETY AFFECT ON ANTERO-POSTERIOR POSTURAL STABILITY IN PATIENTS WITH DIZZINESS? IFOS 2013年6月5日 韓国 ソウル
- 2)五島史行、井出里香、神崎晶、堤 知子、小川郁: 耳鳴のバイオマーカー 2013年5月17日日本耳鼻咽喉科学会総会 北海道 札幌
- 3)Fumiyuki Goto, Tomoko Tsutsumi, Kimiko Nakai, Kaoru Ogawa  
Psychotherapy to the patients with intractable meniere disease ドイツ心身医学会 2013年3月6日 ドイツ ハイデルベルグ

4)Fumiyuki Goto, Tomoko Tsutsumi, Keisuke  
Kushiro : The anxiety affects the  
antero-posterior postural stability in  
patients with dizziness 国際バロニー学会  
2012年6月11日 スエーデン ウプサラ

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

斎藤 知子(Saito Tomoko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90458886