

# 論 文 要 旨

Ototoxicity-induced loss of hearing and inner hair cells is attenuated by *HSP70* gene transfer

(内耳毒性難聴モデルモットへの HSP70 遺伝子導入による蝸牛内有毛細胞変性と聴力障害の抑制)

関西医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

(紹介：友田 幸一 学長・耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座講座主任事務取扱)

高 田 洋 平

## 【目的】

感音難聴の原因の最も多い理由としてコルチ器に存在する蝸牛感覚細胞（有毛細胞）の変性、消失があげられる。HSP（ヒートショックプロテイン）はRNAからの翻訳により生成した不安定な新生蛋白質に結合し蛋白質のフォールディングを制御する分子シャペロンとしての機能を持ち、分子シャペロンの多くはHSPである。HSPは細胞が熱などの様々なストレス条件下にさらされた際に発現が上昇することが知られている。ここで我々は過剰発現させたHSP70をカナマイシンとフロセマイドの内耳毒性薬剤で作成した難聴モルモットの蝸牛内に投与し有毛細胞変性や聴力障害を抑制できるかどうか検討した。また、蝸牛内に投与されたHSP70とmCherryがコルチ器でどの部位に発現するのかも検討した。

## 【材料と方法】

Pigment系の正常聴力の有色モルモット（300-400g）を用いた。グループとしてアデノウイルスベクターを用いたHSP70-mCherry (Ad. HSP70-mCherry) とコントロール群としてmCherry (Ad. mCherry) の2群を作成した。さらに対側耳はコントロール耳として比較した。Ad. HSP70-mCherry と Ad. mCherry を蝸牛内の内リンパ腔へ内耳毒性薬剤投与の4日前に先立って注入した。次に内耳毒性薬物による聴力障害を作成するために頸内頸静脈的にフロセマイドを（100mg/kg）静脈投与し、その直後にカナマイシン（400mg/kg）を皮下注射し聴力障害を作成した。ウイルスベクター投与前と聴力障害作成14日後に機能的評価として聴性脳幹反応（ABR）：4. 8. 16kHzを測定し検討した。また組織学的・形態学的評価として免疫染色、whole-mounts preparationを用い有毛細胞の細胞数もABRと同様に検討した。

## 【結果および考察】

カナマイシンとフロセマイド投与による内耳障害14日後に聴力障害を作成した蝸牛内は感覚細胞である有毛細胞は完全に変性消失しており非感覚細胞である支持細胞のみが残存していた。次にAd. HSP70-mCherryを投与し、HSP70とmCherryの発現部位が有毛細胞ではなく支持細胞に発現している事、同部位に発現し両者の位置が一致していることが観察された。

また既述したように内耳障害前にAd. HSP70-mCherryを投与した。投与18日後、蝸牛非感覚細胞内に多くのmCherryの発現が観察され、聴上皮内の内有毛細胞の変性消失が保護されている事が判明した。一方、非投与耳やAd. mCherry投与群のコントロール群では全ての有毛細胞は完全に変性消失しており内有毛細胞の保護は認められなかった。また、内耳障害14日後の内・外有毛細胞の細胞数をmyosin VIIa抗体を用いた免疫染色像で細胞数をカウントしたところ、コントロール群（Ad. mCherry投与耳）とコントロール耳群（非投与耳）においてほとんどの外有毛細胞と内有毛細胞が障害されたのに対してAd. HSP-mCherry投与耳においてはすべての回転において60%以上の内有毛細胞の変性を抑制する事ができた。最後に、Ad. mCherry投与耳と非投与耳と比較してAd. HSP-mCherry投与

耳において聴覚閾値の上昇が有意に抑制されていることも観察された。以上の結果から内耳毒性難聴モルモットに対してアデノウイルスも用いた *HSP70* 遺伝子の内耳へ過剰発現することは聴覚神経の保存に有効であることが示された。今後はアデノ関連ウイルスなどを使用して遺伝子発現期間の延長や他の動物種における効果などを検討する予定である。我々のデータは *HSP70* の増大は内耳毒性薬剤難聴に対して将来的に実際の臨床に応用できる可能性を示唆している。