

学位論文

IGF-1, サブスタンス P の最小ペプチドによる
有毛細胞保護効果について

吉田 周平

山口大学大学院医学系研究科
情報解析医学系専攻 耳鼻咽喉科学分野

(平成26年 12月)

目 次

1. 要旨	2
2. 研究の背景	3
3. 研究の目的	4
4. 方法	5
5. 結果	7
6. 考察	8
7. 結語	10
8. 参考文献	11
9. 図表	13
10. 図表の説明	17

1. 要旨

結語：我々のデータは、SSSR あるいは SSSR と FGLM-NH₂ の混合物が前庭上皮における感覚有毛細胞をネオマイシン耳毒性から保護することを示した。結果は SSSR と FGLM-NH₂ がアミノグリコシド系内耳毒性に対する保護薬剤として使える可能性を示した。目的：本研究において我々はアミノグリコシドによって誘導される哺乳類前庭性有毛細胞死におけるこれらのペプチドの役割を検討した。方法：成熟 CBA/N マウスから作成された培養卵形嚢を用いた。培養卵形嚢は、5 つのグループ（対照グループ、ネオマイシン・グループ、ネオマイシン+SSSR グループ、ネオマイシン+FGLM-NH₂ グループとネオマイシン+SSSR + FGLM-NH₂ グループ）に割り当てられた。ネオマイシンに曝露した 24 時間後に、免疫組織化学染色によって有毛細胞を同定した。前庭有毛細胞の生存率は蛍光顕微鏡を使って評価した。結果：前庭有毛細胞の残存率はネオマイシン・グループより、ネオマイシン+FGLM-NH₂ + SSSR あるいはネオマイシン+SSSR のほうが高かった。これらの結果は、SSSR が有毛細胞をアミノグリコシドの内耳毒性より保護できることを示唆した。

2. 研究の背景

インスリン様成長因子-1 (IGF-1) は、内耳における感覚有毛細胞保護作用をもつ。実際 IGF-1 がマウス蝸牛有毛細胞をアミノグリコシド系内耳神経毒性から保護することが知られている[1]。また我々はサブスタンス P (SP) が AMPA の局所投与に対する前庭感覚上皮を保護することを報告した[2]。近年、IGF-1 (SSSR) と SP (FGLM-NH₂) の最小限のペプチドが角膜の成長因子として機能して、創傷治癒を進めると報告された[3]。さらに SSSR と FGLM-NH₂ の混成は、角膜潰瘍の治療のために、臨床応用されている。我々は、SSSR + FGLM-NH₂ が有毛細胞をアミノグリコシド系内耳神経毒性から保護することができるかと仮定し、本研究を行った。

3. 研究の目的

IGF-1 を構成するペプチドである SSSR あるいはサブスタンス P を構成するペプチドである FGLM-NH₂ がアミノグリコシド系内耳毒性から内耳感覚細胞を保護することができるかどうか検討する。

4. 方法

(1) 前庭器官培養

プライエル反射正常な成熟 CBA/N マウス (6 週齢) は, 九動株式会社 (日本) から入手した。動物はペントバルビタールで深麻酔し, すぐに断頭した。速やかに側頭骨を摘出し, 前庭器はイーグル基礎培地 (Invitrogen 社) アール緩衝塩類溶液 (Invitrogen 社) の 2:1 混合培地中に入れ, 前庭器を顕微鏡下に摘出した。卵形囊のみをイーグル基礎培地 (Invitrogen 社), アール緩衝塩類溶液 (Invitrogen 社), 5%胎児ウシ血清 (Invitrogen 社) の混合培地に入れた。卵形囊は, 37°C と 5%CO₂ の条件で 24 時間培養された。この方法は過去に発表した論文[4]と同様に行った。

実験プロトコルは, 山口大学医学部の動物実験倫理委員会によって承認された。実験は, この委員会, 日本の法令, および日本のガイドラインに従って行った。

(2) 薬剤暴露

有毛細胞死を誘導するために卵形囊はネオマイシン (2 mM; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)存在下に 24 時間培養した。4 個のアミノ酸よりなるペプチド FGLM-NH₂ および SSSR は一般財団法人蛋白質研究奨励会 (大阪, 日本) から入手した。卵形囊は 5 つの条件で培養した。すなわち 1) 対照群, 2) ネオマイシン群 (2 mM), 3) ネオマイシン (2 mM) + SSSR (1 μM – 10 nM), 4) ネオマイシン (2 mM) + FGLM-NH₂ (10 μM), 5) ネオマイシン (2 mM) + SSSR (1 μM – 10 nM) + FGLM-NH₂ (10 μM) の 5 群を作成した。SSSR と FGLM-NH₂ の効果を評価するために, これらのペプチドはネオマイシンを加える 2 時間前に培地に添加した。ネオマイシンを加えて 24 時間培養後, 卵形囊を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で固定 (室温で 1 時間) した。固定の後, 耳石は, 28G の針と注射器と PBS を用いて卵形囊より除去した。PBS で洗浄した後, 標本は以下の実験に用いた。

(3) 免疫組織化学

標本は, ブロッキング液 (PBS, 1%ウシ血清アルブミン, 0.4%ヤギ血清, 0.4%馬血清, 0.4%tritonX-100) に加え, 室温で 3 時間反応させた。有毛細胞を標識するために, 抗 calmodulin 抗体 (1:150, Sigma) 中で 4° C で一晩反応させた。ブロッキング液で洗浄した後, 標本は 2 次抗体 (Alexa 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体, 1:500; Molecular Probes, Eugene, OR) 中で反応させた。ブロッキング液で洗浄した後, 卵形囊標本は封入液 (DAPI Fluoromount-G : Sohyernbiotech, Birmingham, AL) にて封入された。

(4) 有毛細胞数

有毛細胞の残存率を評価するために染色された卵形囊標本は蛍光顕微鏡 (BZ-8100, KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて観察された。カルモジュリン陽性細胞を有毛細胞として、20 μm 四方の個数を計測した。卵形囊 1 個あたり 4 箇所の有毛細胞を計測し、平均値をその卵形囊の有毛細胞密度とした。各群 6 個の卵形囊を計測した。すべてのデータは、平均値±標準誤差として表示した。統計分析は、Macintosh 版 StatView 版 4.5J (Abacus Concepts, Berkley, CA, USA) を使用して計算され、有意差検定にはフィッシャー(Fisher) の PLSD 法を用い、P 値が 0.05 以下の場合に統計学的に有意であると判断した。

5. 結果

ネオマイシンによる内耳有毛細胞障害に対する SSSR と FGLM の保護効果を評価するために、培養卵形嚢はネオマイシン (2mM) だけ、またはネオマイシンと SSSR と FGLM-NH₂ が存在する状態で培養された。培養終了時に卵形嚢は固定され、残存有毛細胞を標識するためにカルモジュリンに対する免疫組織化学染色を行った。ネオマイシンのみと卵形嚢を培養すると有毛細胞密度が減少することが観察された (図 1)。有毛細胞密度は、ネオマイシン単独で培養する場合よりもネオマイシンに加えて SSSR と FGLM-NH₂ を加えた群で高かった。SSSR と FGLM-NH₂ を加えた場合だけでなく SSSR 単独で加えた場合も、ネオマイシンによって誘導される有毛細胞数の減少を抑制した (図 2)。追加の実験は、容量反応関係を評価するために行われた (図 3)。結果から SSSR の濃度と残存有毛細胞密度の関係を図 4 に示した。

6. 考察

成熟哺乳動物の内耳有毛細胞は細胞分裂しないことが明らかにされている。内耳疾患の患者ではこの有毛細胞障害によって難聴や平衡障害が生じ、機能障害が終生持続する。よって有毛細胞を保護することは内耳疾患の治療戦略として重要である。IGF-1 は内耳の発生において重要な役割を持つ分裂促進ペプチドであり[5]、内耳有毛細胞の維持、生存にも重要であるとされている[6]。

我々は、SSSR と FGLM-NH2 の局所投与がシナプス・リボンと軸索を保護し、障害後の自発眼振の頻度を減少させることを過去に報告した[2]。本研究において SSSR と FGLM-NH2 は内耳有毛細胞を保護することも明らかになった。複数の経路がこれらのペプチドによる細胞保護に関与している可能性がある。アミノグリコシドによる有毛細胞障害は、JUN キナーゼ (JNK) の活性化に関係している [7, 8]。IGF-1 によるシグナルは内耳で JNK の活性化を調節しており[9]、この経路が本研究で観察された SSSR と FGLM による有毛細胞保護に関係している可能性がある。

以前の研究において、2 mM のネオマイシン濃度では 24 時間後に有毛細胞の残存率が約 50%になることが明らかにされていたので、本研究では使用するネオマイシン濃度を 2 mM とした[7]。さらに提供された SSSR と FGLM-NH2 の最大濃度はそれぞれ 1 μ M と 10 μ M であった。我々は本研究では使用できる最大濃度のペプチドを実験に用いた。

SP は三叉神経などの神経伝達物質として知られる。SP だけでは角膜上皮増殖に影響しないが、SP と IGF-1 の組合せは *in vitro* 実験や *in vivo* 実験で上皮分裂を促進することが報告されている[10]。さらに SP の C 末端 (FGLM-NH2) や IGF-1 の C 末端側領域に一致する 4 ペプチド (SSSR) が元の分子の角膜上皮創傷治癒に対する効果と同等の効果を持つことも報告されている。我々は本研究でこれらのペプチドが内耳機能に影響することを示した。SSSR と FGLM は、IGF-1 または SP より非常に小さい分子である[3]。IGF-1 の分子量は 7649 であり、SSSR の分子量は 479 である。いくつかの薬剤 (デキサメタゾン分子量 392, Lidocain 分子量 234) は内耳疾患の治療として正円窓からの局所投与に使用されている。臨床研究であるが IGF-1 はゼラチンハイドロゲルに結合させて突発性難聴患者の正円窓膜に留置され、局所投与治療に使用されている [11-13]。SSSR はより分子量が小さいことから、正円窓経由の内耳疾患治療に適していると考えられた。

今回の研究で残存有毛細胞密度はネオマイシン+SSSR+FGLM 群は、ネオマイシン+SSSR 群と比較して高くはなかった。FGLM を追加することは我々の実験では SSSR の影響を増強していない可能性がある。FGLM は角膜上皮障害からの回復過程においては SSSR の影響を強化することができた[14]。この結果の違いは、組織の感受性の違いによるものかもしれないと考えた。

本研究では，成熟蝸牛の培養に比較して，卵形嚢が容易に安定して培養できることから卵形嚢培養を研究に選択した。蝸牛有毛細胞障害の機序は，活性酸素の生成と関連があり，前庭細胞傷害の機序と共通である。よって今回の結果はペプチドが内耳疾患の新しい治療薬になる可能性を示唆している。

7. 結語

SSSR あるいは SSSR と FGLM-NH₂ の混合物が前庭感覚上皮の有毛細胞をネオマイシン耳毒性から保護することを示した。結果は SSSR と FGLM-NH₂ がアミノグリコシド系内耳毒性に対する保護薬剤として使える可能性を示している。

8. 参考文献

- [1] Park JY, Park YH, Shin DH, Oh SH: Insulin-like growth factor binding protein (igfbp)-mediated hair cell survival on the mouse utricle exposed to neomycin: The roles of igfbp-4 and igfbp-5. *Acta oto-laryngologica Supplementum* 2007;558:22-29.
- [2] Toyota H, Shimogori H, Sugahara K, Yamashita H: A novel treatment for vestibular disorder with fglm-nh2 plus sssr. *Neuroscience letters* 2012;526:128-132.
- [3] Chikamoto N, Chikama T-I, Yamada N, Nishida T, Ishimitsu T, Kamiya A: Efficacy of substance p and insulin-like growth factor-1 peptides for preventing postsurgical superficial punctate keratopathy in diabetic patients. *Jpn J Ophthalmol* 2009;53:464-469.
- [4] Cunningham LL: The adult mouse utricle as an in vitro preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain research* 2006;1091:277-281.
- [5] Varela-Nieto I, Morales-Garcia JA, Vigil P, Diaz-Casares A, Gorospe I, Sánchez-Galiano S, Cañon S, Camarero G, Contreras J, Cediell R, Leon Y: Trophic effects of insulin-like growth factor-i (igf-i) in the inner ear. *Hearing research* 2004;196:19-25.
- [6] Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, Pichel JG, Varela-Nieto I: Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal igf-1-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001;21:7630-7641.
- [7] Sugahara K, Rubel EW, Cunningham LL: Jnk signaling in neomycin-induced vestibular hair cell death. *Hearing research* 2006;221:128-135.
- [8] Murillo-Cuesta S, Rodríguez-de la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, Varela-Nieto I: The role of insulin-like growth factor-i in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci* 2011;4:11.
- [9] Levresse V, Butterfield L, Zentrich E, Heasley LE: Akt negatively regulates the cjun n-terminal kinase pathway in pc12 cells. *J Neurosci Res* 2000;62:799-808.
- [10] Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ: Synergistic effects of substance p with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 1996;169:159-166.
- [11] Nakagawa T, Sakamoto T, Hiraumi H, Kikkawa YS, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ono K, Yamamoto M, Tabata Y, Teramukai S, Tanaka S, Tada H,

Onodera R, Yonezawa A, Inui K-i, Ito J: Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: A prospective clinical trial. *BMC Med* 2010;8:76.

[12] Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, Tabata Y, Yoshida T, Komobuchi H, Takeda S, Hyodo J, Hakuba N, Gyo K: Insulin-like growth factor 1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury. *Neuroreport* 2008;19:1585-1588.

[13] Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim T-S, Tabata Y, Ito J: Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel. *The Laryngoscope* 2006;116:529-533.

[14] Yamada N, Matsuda R, Morishige N, Yanai R, Chikama T-i, Nishida T, Ishimitsu T, Kamiya A: Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from substance p and insulin-like growth factor-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *The British journal of ophthalmology* 2008;92:896-900.

9. 図表

図 1

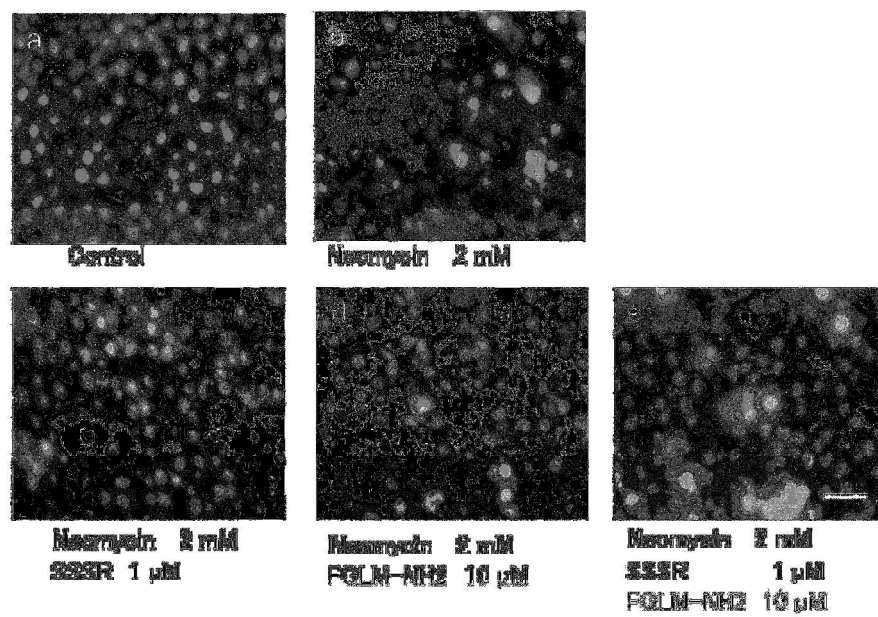
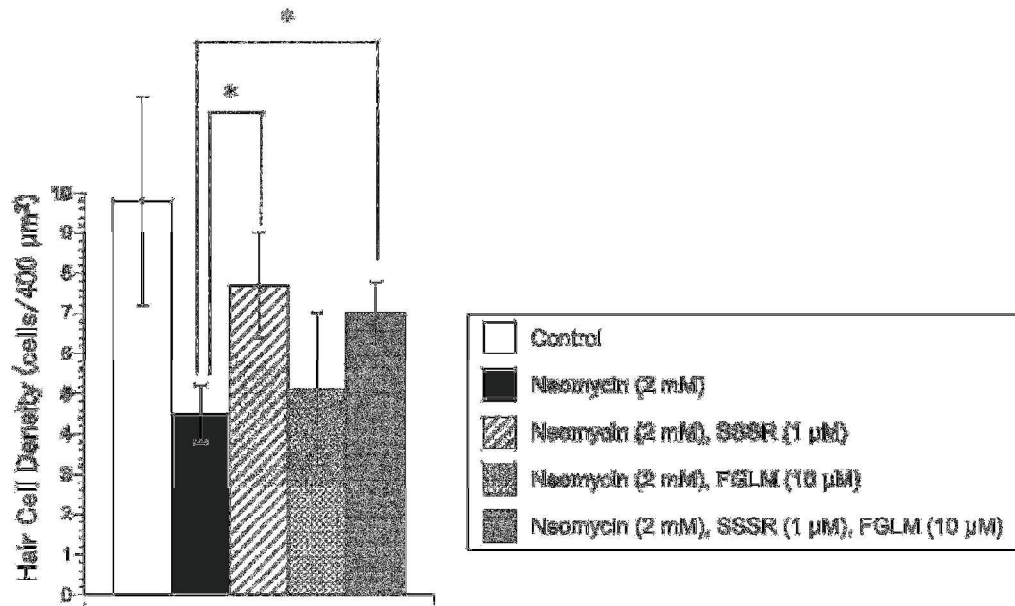
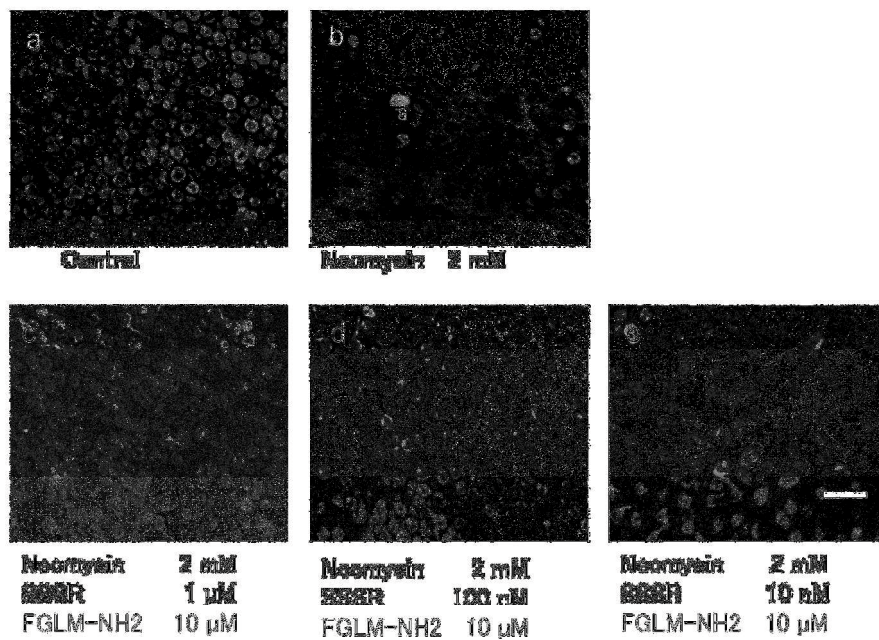


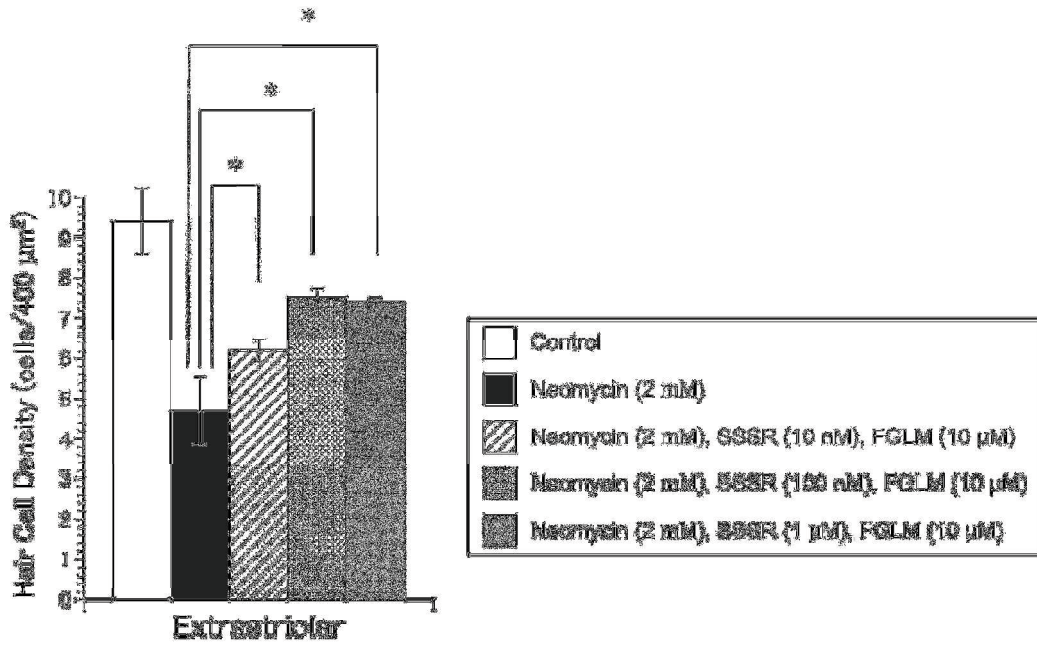
図 2



☒ 3



☒ 4



10. 図の説明

図1 培養卵形嚢の免疫組織化学染色。卵形嚢を通常培地 (a), ネオマイシン 2 mM 存在下 (b), あるいはネオマイシン 2 mM と FGLM-NH2 10 μ M, SSSR 1 μ M 存在下 (c-e) で 24 時間培養し, 有毛細胞を免疫組織化学染色にて同定した。ネオマイシンによる有毛細胞の減少は, SSSR と FGLM-NH2 を加えることで抑制された。スケールバー : 10 μ m。

図2 培養 24 時間後の有毛細胞密度。一定の面積 (400 μ m²) あたりの有毛細胞密度を計測した。SSSR のみ, または SSSR と FGLM-NH2 を加えることで有毛細胞密度の低下が有意に抑制された。* : P < 0.05

図3 培養卵形嚢の免疫組織化学染色。卵形嚢を通常培地 (a), ネオマイシン 2 mM 存在下 (b), あるいはネオマイシン 2 mM と FGLM-NH2 10 μ M, 1 μ M-10 nM の SSSR 存在下 (c-e) で 24 時間培養した。スケールバー : 10 μ m。

図4 ネオマイシンによる有毛細胞障害に対する FGLM-NH2 と SSSR の用量反応関係。SSSR (1 μ M または 100 nM) と FGLM-NH2 (10 μ M) の存在下で, 有意に有毛細胞密度の低下を抑制した。有毛細胞障害に対する SSSR の効果は濃度依存性であった。* : P < 0.05