

Geranylgeranylacetone の経口投与は前庭有毛細胞を保護する

長門晋平

地域医療機能推進機構徳山中央病院耳鼻咽喉科

山口大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学

(平成 29 年 10 月)

目次

1. 要旨	3
2. 諸言	5
3. 実験材料と方法	6
4. 結果	11
5. 考察	13
6. 結語	15
7. 参考文献	16
8. 図表	19
9. 図表の説明	23

1. 要旨

目的

我々は様々なストレスから有毛細胞を保護するために熱ショック応答が重要な役割をもつことを報告している。熱ショック誘導剤 Geranylgeranylacetone (GGA) の経口投与は強大音から有毛細胞を保護した。本研究では、GGA の経口投与がアミノグリコシドによって誘導される前庭毛細胞死に及ぼす影響を調べた。

方法

4-6 週齢の CBA/N マウスを使用した。マウスを GGA 群と対照群の 2 群に分けた。GGA 群は GGA (0.5%) を含む飼料で飼育した。内耳における Hsp70 の発現を検討するために、PCR と免疫組織化学的分析を行った。両群の実験動物の卵形嚢を摘出し、ネオマイシンと共に培地中で 24 時間培養して有毛細胞死を誘導した。培養終了後、前庭有毛細胞を Calmodulin に対する免疫組織化学で標識し、有毛細胞の生存について評価した。

結果

GGA 群のマウスの前庭毛細胞は Hsp70 を発現していた。さらに、培養中のネオマイシン曝露による有毛細胞障害後の前庭毛細胞の残存率は対照群よりも GGA 群で高かった。

結論

我々の結果は、GGA の経口投与が前庭における熱ショック応答を誘導し、感

覚細胞を保護し得ることを示した。

キーワード：有毛細胞；アミノグリコシド；熱ショック応答；

geranylgeranylacetone

2. 緒言

感覚有毛細胞は、アミノグリコシドへの曝露，感染，虚血によって容易に障害される[1]。有毛細胞の障害後，聴覚障害および前庭機能障害は哺乳類では修正持続することになる。よって内耳疾患患者では有毛細胞の障害を可能な限り防ぐことは臨床的に重要となる。

熱ショックタンパク質（HSP）は細胞ストレスに対する保護機構として細胞内に誘導されることが知られている。熱ショック応答は熱ショック転写因子（HSF）によって調節されている。最近の研究では哺乳動物の感覚器官を維持するための HSP や HSF の役割が明らかにされている[2, 3]。抗潰瘍薬である geranylgeranylacetone（GGA）は HSF1 を活性化し HSP 発現を誘導することが報告されている[4]。GGA の投与は，胃粘膜，小腸，脊髄神経，肝臓，心臓，脳，および網膜などの様々な器官において HSP の発現を増強し，保護効果を示す[5]。内耳については GGA の経口投与が HSP の発現を促進し，モルモットの強大音曝露による有毛細胞障害，聴覚障害を抑制することや加齢性難聴のモデルにおける進行性難聴を軽減することが以前に示されている[6, 7]。本研究では，ネオマイシンによって誘導される前庭有毛細胞障害に対する GGA の経口投与の保護効果を調べるために，卵形囊培養を用いて研究を行った。

3. 実験材料と方法

動物の使用とケア

本研究には九州動物株式会社（熊本，日本）より購入した 4～6 週齢でプライエル反射正常な雄マウス（CBA/N）を用いた。実験プロトコールは，山口大学医学部動物実験倫理委員会により審査され，承認された。

GGA の経口投与

GGA 顆粒（登録商標 Selbex; Eisai, Tokyo, Japan）を 400-600mg / kg / 日の用量に対応するように，粉末飼料に 0.5%混合した[8]。GGA 群では卵形嚢を摘出する 30 日前より GGA を投与した。対照群では，動物に通常の飼料を与えた。

Hsp70 発現の RT-PCR

各群 4 匹のマウスに，ペントバルビタールの過剰量で深麻酔として断頭した。側頭骨を直ちに摘出し，液体窒素中で保存した。Trizol（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて全 RNA を単離し，cDNA 合成キット（Invitrogen）を用いて 2 μ g の全 RNA から cDNA を合成した。Ex Taq ポリメラーゼ（Takara, Japan）および各逆転写産物 1 μ L を用いて 30 サイクルの PCR を実施した。以下のプライマーを PCR に使用した：Hsp70, (5'-AACCAAGATCACCATCAC-3'), 5'-TCCACCTCCTCGATGGT-3')； β -アクチン，

(5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',
5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3')。増幅した PCR 産物はアガロースゲル
電気泳動を用いて分離, エチジウムブロマイドで染色し, Epi-Light UV FA1100
(Asian Cosmos, Japan) を用いて記録した。半定量のための mRNA レベル
は, 画像処理プログラム ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) を
用いてバンドの濃度測定によって評価した。

卵形嚢培養および有毛細胞死の誘導

全ての動物はペントバルビタールによる新麻酔の後、断頭された。側頭骨を摘出し、イーグル培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) と Earle 溶液 (Invitrogen) 混合培地 (2 : 1) の中で、清潔操作のうちに卵形嚢を摘出した。単離した卵形嚢は、5%ウシ胎仔血清 (Invitrogen) を添加したイーグル培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) と Earle 溶液 (Invitrogen) 混合培地に移した。卵形嚢は 24 ウェル組織培養プレートの中で 37°C, 5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。有毛細胞死を誘発するために、ネオマイシン溶液 (10mg / mL; Sigma, St. Louis, MO) を培養ウェルに添加して 1.0mM の最終濃度とした。培養プロトコールが完了した後、卵形嚢は 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて室温で 1 時間固定した。28G の針とシリンジを用いてリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中で卵形嚢より耳石を除去し、免疫組織科学の試料とした。

Hsp70 の免疫組織化学的染色

熱ショック応答の誘導を評価するために、Hsp70 の発現を調べた。ブロッキング液（1%ウシ血清アルブミン，0.4%正常ヤギ血清，0.4%正常ウマ血清，および0.4%Triton X-100 in PBS）に4時間浸漬した後，試料を抗Hsp70抗体[9]（1:100希釈），抗Calmodulin抗体（1:150希釈; Sigma）混合液で12時間反応させた。ブロッキング液で洗浄した後，試料をブロッキング溶液で希釈した二次抗体：Alexa 488 結合ヤギ抗マウス IgG（1:500）およびAlexa 594 結合ヤギ抗ウサギ IgG（1:500）（Molecular Probes, Eugene, OR）と反応させた。試料をブロッキング溶液で洗浄し，Vectashield®（Vector Laboratories）にマウントした。蛍光顕微鏡（BZ-8100, KEYENCE, 大阪, 日本）で観察した。Hsp70 に対する蛍光強度を ImageJ で評価した。培養卵形囊の蛍光強度の平均値を GGA 群と対照群のそれぞれ6つので検討した。

有毛細胞標識のための免疫組織化学

固定された卵形囊を4℃で一晩ブロッキング溶液中に浸漬した。有毛細胞を標識するために，抗Calmodulin（1:150希釈; Sigma）抗体および抗Calbindin抗体（1:250希釈; Chemicon, Temecula, CA）の混合液に4℃で一晩反応させ，ブロッキング溶液で洗浄し，前述のブロッキング溶液で希釈した二次抗体混合液で反応させた。ブロッキング溶液で洗浄後，Vectashield®にマウントし，残存有毛細胞数を評価した。

残存感覚毛細血管細胞数の評価

試料を蛍光顕微鏡（BZ-8100）で観察し，有毛細胞の生存を評価した。Calbindin 陽性細胞および Calmodulin 陽性細胞を Striolar 領域および Extrastriolar 領域での有毛細胞として，それぞれ無作為に決定した 2 つの $20\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$ の正方形内の残存数を計測し，これを平均してその試料の残存有毛細胞密度とした。3 匹のマウスから 6 個の卵形嚢を摘出し評価した。すべてのデータを平均±標準誤差として表した。データは，Macintosh 用 StatView 5.0J（SAS Institute Inc., Cary, NC）を用いて分析した。有毛細胞密度を有意な値を決定するために Mann-Whitney の U 検定を用いて比較した。P < 0.05 を統計的に有意であると判定した。

4. 結果

卵形嚢有毛細胞における HSP 発現について

我々は、Hsp70 の高発現が有毛細胞の生存を促進し得ると推測した。この仮説を調べるために、マウスに GGA を経口投与した。RT-PCR 分析は、内耳における Hsp70 の mRNA 発現が 0.5%GGA 飼料によって誘導されることを明らかにした (図 1A)。さらに、ImageJ を用いた半定量的評価では、対照群よりも GGA 群で高い mRNA 発現レベルが明らかになった (図 1B)。

次に GGA により誘導された Hsp70 の局在を推定するために、我々は、GGA を投与されたマウスから摘出した卵形嚢を用いて、Hsp70 および Calmodulin に対する免疫組織化学的染色を行った。Calmodulin に対する蛍光信号を有する有毛細胞層 (図 2A, B), Hsp70 に対する免疫反応を評価した (図 2C, D)。Hsp70 に対する蛍光強度は、GGA 群では対照群よりも強かった。Hsp70 に由来する蛍光強度について ImageJ を用いて定量的に評価したところ、対照群よりも GGA 群の卵形嚢において有意に強かった (図 2E)。したがって、GGA の経口投与は、前庭の有毛細胞における Hsp70 発現を増強すると考えられた。

GGA の経口投与は前庭毛細胞死を抑制できる

培養した有毛細胞の生存に及ぼす GGA の影響を評価するために、培養卵形嚢をネオマイシン (1mM) と共に 24 時間培養した。Calmodulin および Calbindin を免疫標識して、残存有毛細胞を検出した (図 3)。

ネオマイシンを含む培地では有毛細胞密度は 24 時間後に減少したが、GGA 群では対照群よりも多くの有毛細胞が生存した。培養された卵形囊における有毛細胞の密度を図 4 に示す。GGA の経口投与は、ネオマイシンで誘導される有毛細胞密度の減少を有意に抑制した。

5. 考察

内耳の有毛細胞が障害されると、結果として生じる機能障害は永続的なものとなる。よって有毛細胞の維持機構を理解することは治療戦略として重要である。HSFによって調節される熱ショック応答は、感覚細胞の維持機構の1つである。温熱療法は内耳に熱ショック反応の誘導し有毛細胞を保護することが報告されている[3, 10]。さらに経口抗潰瘍薬 GGA は、胃粘膜、脊髄神経、肝臓、脳、網膜および蝸牛に対して組織毒性効果を示さずに HSP を誘導することができることが知られている[4, 5, 11]。本研究では、アミノグリコシドにより誘導される有毛細胞障害に対する GGA 経口投与の効果を評価した。培養卵形嚢を使用することで有毛細胞障害を正確に評価することが可能であった。

GGA 経口投与は内耳の Hsp70 mRNA を高発現することが示された。GGA は市販の抗潰瘍薬であり、生体組織中の毒性が低い。この研究で使用された GGA の用量 (400~600mg/kg/日) は、ヒトの治療に使用された用量よりも 100 倍以上高かったが、マウスの致死量 (LD50) の中央値は 15000mg/kg であるので、この用量は比較的安全と考えられる。したがって、今回の GGA の投与量は内耳障害の治療として検討しうると考えた。

以前の研究では、GGA が内耳感覚細胞を保護することは報告されている[11-13]。しかし、経口投与された薬剤は血液内耳関門の存在により、内耳に移行できない可能性がある[14]。GGA は低分子量と親油性の分子であることから、血液内耳関門を通過することができると考えられた。我々の以前の研究でも

GGAの経口投与が脳および内耳における熱ショック応答を誘発することを報告している[6]。

多くの研究が有毛細胞の細胞ストレスに対する保護を研究してきた。本研究では培養された卵形嚢の有毛細胞が GGA の経口投与によって保護されていることを示した。内耳疾患の治療選択肢は現在のところ十分ではなく、本研究の結果は内耳疾患の新しい治療となる可能性があると考えた。

6. 結語

本研究では GGA の経口投与がネオマイシンによる障害から前庭有毛細胞を保護できることを示した。この結果からは GGA が内耳の保護薬物として有用であることを示唆した。

7. 参考文献

1. Duckert LG, Rubel EW. Morphological correlates of functional recovery in the chicken inner ear after gentamycin treatment. *J Comp Neurol.* 1993;331(1):75-96. doi: 10.1002/cne.903310105. PubMed PMID: 8320349; PubMed Central PMCID: PMC8320349.
2. Neely JG, Thompson AM, Gower DJ. Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. *Hear Res.* 1991;52(2):403-6. PubMed PMID: 2061228.
3. Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, Takemoto T, et al. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear Res.* 2003;182(1-2):88-96. Epub 2003/09/02. PubMed PMID: 12948605.
4. Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology.* 1996;111(2):345-57. PubMed PMID: 8690199.
5. Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, Niino M, et al. Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res.* 2002;69(3):373-81. doi: 10.1002/jnr.10298. PubMed PMID: 12125078.

6. Mikuriya T, Sugahara K, Sugimoto K, Fujimoto M, Takemoto T, Hashimoto M, et al. Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. *Brain Res.* 2008;1212:9-17. Epub 2008/05/01. doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.031. PubMed PMID: 18445491.
7. Nakamoto T, Mikuriya T, Sugahara K, Hirose Y, Hashimoto T, Shimogori H, et al. Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. *Auris Nasus Larynx.* 2011. Epub 2011/07/29. doi: 10.1016/j.anl.2011.06.001. PubMed PMID: 21794995.
8. Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, et al. Pharmacological induction of heat shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(46):16801-6. doi: 10.1073/pnas.0506249102. PubMed PMID: 16260738; PubMed Central PMCID: PMC1275598.
9. Kawazoe Y, Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Nakai A. HSF3 is a major heat shock responsive factor during chicken embryonic development. *Eur J Biochem.* 1999;265(2):688-97. PubMed PMID: 10504401.
10. Yoshida N, Kristiansen A, Liberman MC. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *J Neurosci.* 1999;19(22):10116-24.

PubMed PMID: 10559419.

11. Mikuriya T, Sugahara K, Takemoto T, Tanaka K, Takeno K, Shimogori H, et al. Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. *Brain Res.* 2005;1065(1-2):107-14.

Epub 2005/11/29. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.045. PubMed PMID: 16309629.

12. Sano H, Yoneda S, Iwase H, Itoh A, Hashimoto D, Okamoto M. Effect of geranylgeranylacetone on gentamycin ototoxicity in rat cochlea

culture. *Auris Nasus Larynx.* 2007;34(1):1-4. Epub 2006/08/29. doi:

10.1016/j.anl.2006.05.020. PubMed PMID: 16934423.

13. Takumida M, Anniko M. Heat shock protein 70 delays gentamicin-induced vestibular hair cell death. *Acta Otolaryngol.*

2005;125(1):23-8. Epub 2005/04/01. PubMed PMID: 15799569.

14. Trune DR, Nguyen-Huynh A. Vascular Pathophysiology in Hearing Disorders. *Seminars in hearing.* 2012;33(3):242-50. Epub 2012/08/01. doi:

10.1055/s-0032-1315723. PubMed PMID: 25346568; PubMed Central

PMCID: PMC4208101.

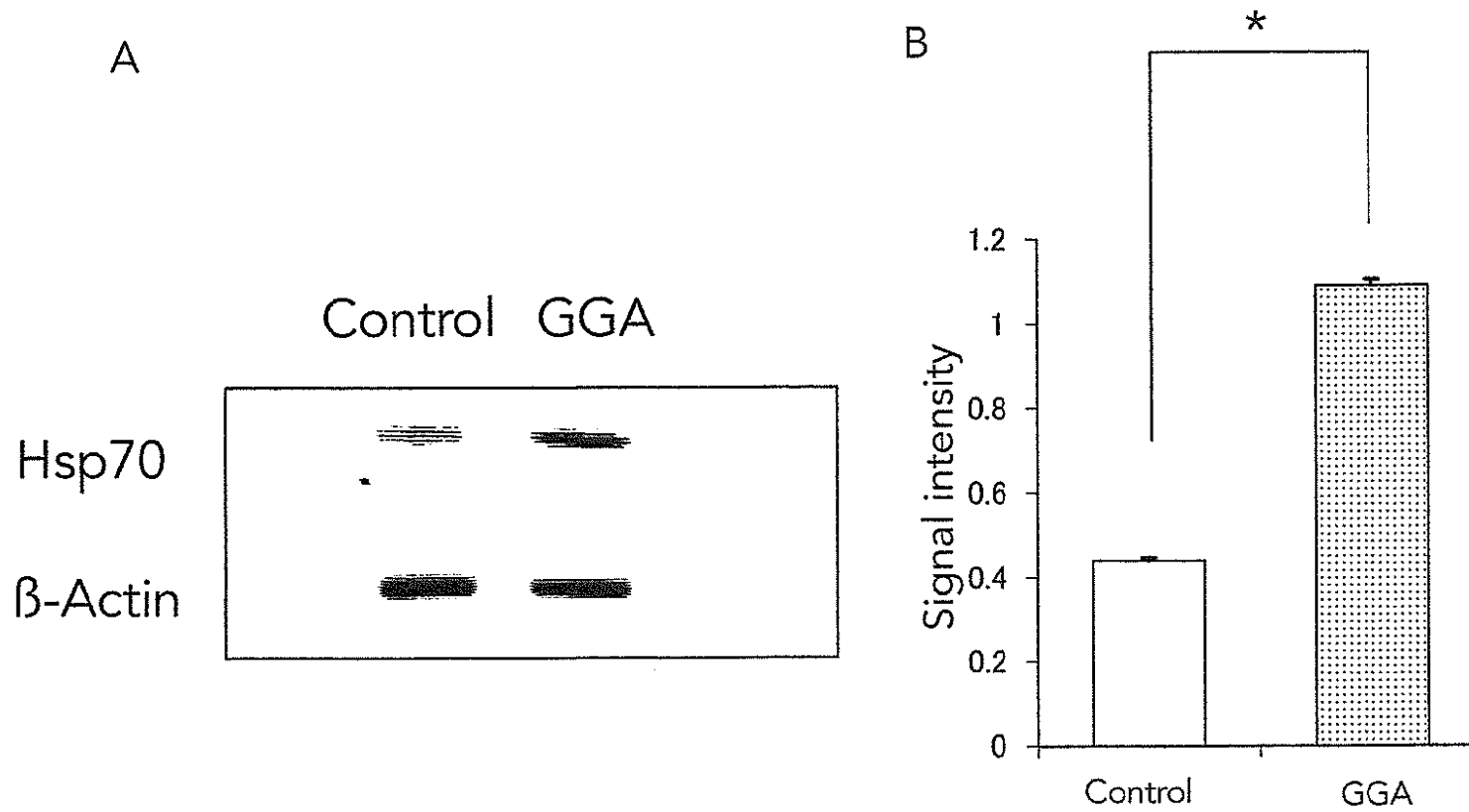


Figure 1.

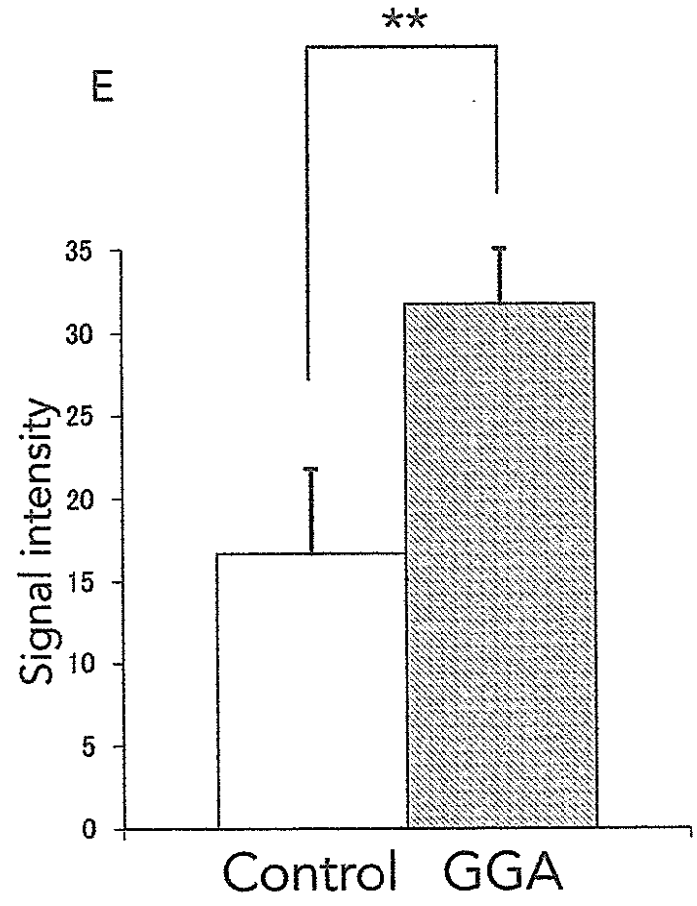
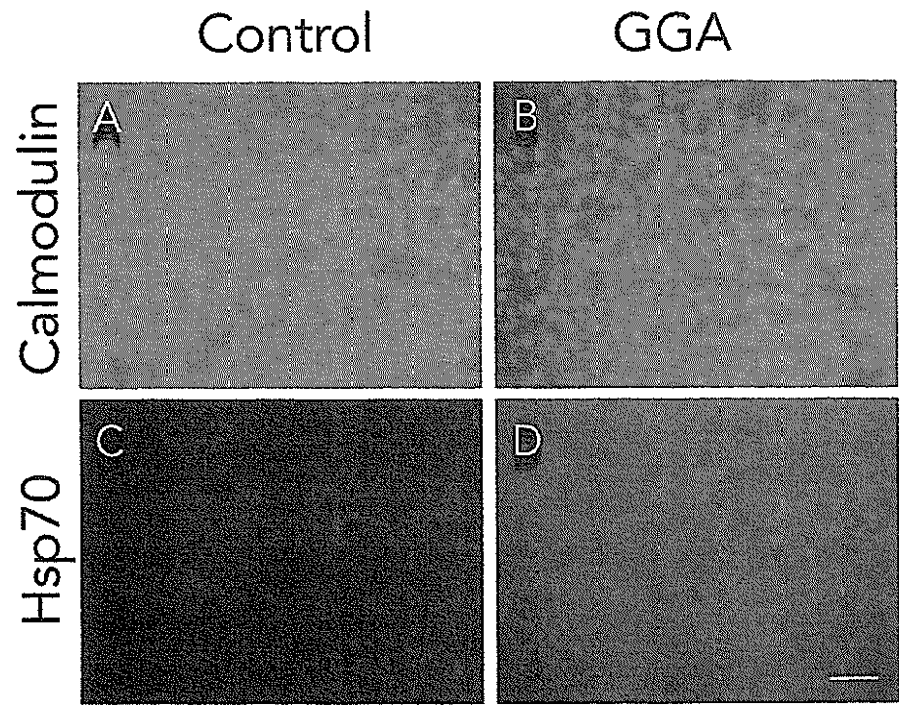


Figure 2.

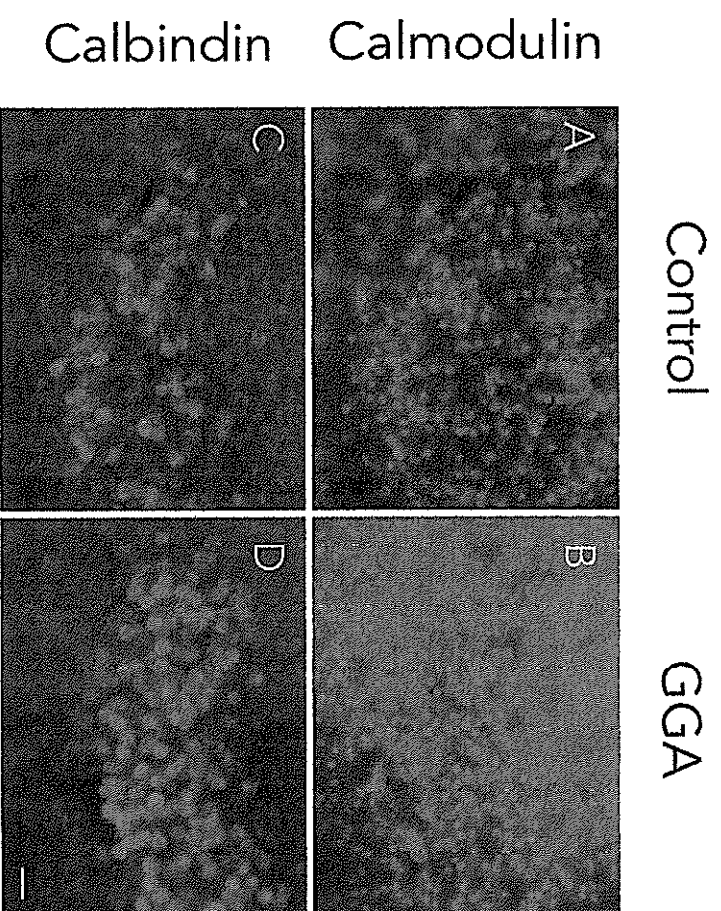


Figure 3.

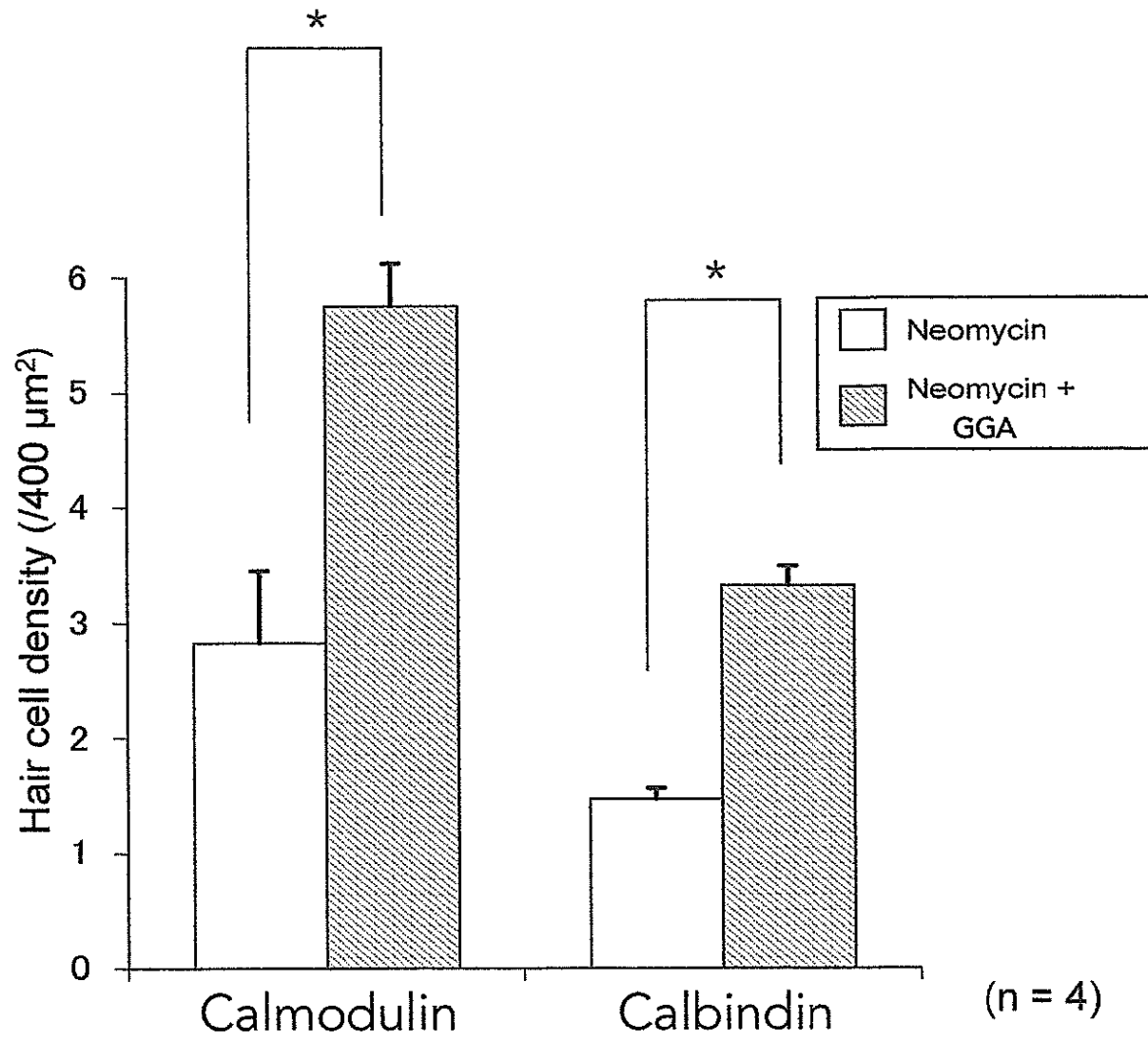


Figure 4.

9. 図表の説明

図 1. GGA 経口投与後の Hsp70 発現 (RT-PCR)

全内耳を用いて RT-PCR を行った。Hsp70 の発現は、対照群よりも GGA 群で高かった。

図 2. GGA 投与後の有毛細胞における Hsp70 発現

GGA の投与後にマウスから摘出した卵形嚢を免疫組織化学に用いた。有毛細胞を抗 Calmodulin 抗体 (A, B) で標識した。Hsp70 の発現は対照群 (C) より GGA 群 (D) において高度であった。画像解析ソフトウェア ImageJ による蛍光強度の評価では Hsp70 の蛍光強度は対照群よりも GGA 投与後の卵形嚢において有意に強かった (E)。** $P < 0.01$ 。D = $10 \mu\text{m}$ のスケールバー。

図 3. ネオマイシンによる有毛細胞障害に対する経口投与 GGA の保護効果

卵形嚢をネオマイシンに 24 時間曝露し、有毛細胞を誘導した。GGA 群では対照群と比較して I 型有毛細胞 (Calbindin 陽性) および II 型有毛細胞 (Calmodulin 陽性) とも障害が軽度であった。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

図 4. ネオマイシンで曝露後の卵形嚢における有毛細胞密度

残存有毛細胞の密度は、対照群よりも GGA 群の utricles において有意に高かった (* $P < 0.05$)。

