シリーズ教育講座「末梢前庭器から前庭神経核へー最近の知見ー」

---

3. 有毛細胞死におけるシグナル伝達と保護機構

菅原 一真・山下 裕司

Signaling pathway of Cell Death and Protection in the Inner Ear Hair Cells

Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita

Department of Otolaryngology, Yamaguchi University School of Medicine

---

It is well-known that the inner ear hair cells are easily damaged by ototoxic stresses (e.g. aminoglycosides, ischemia). Hair cell death often results in permanent hearing loss and vestibular dysfunction. To treat the inner ear diseases with loss of hair cells, we should understand the signaling pathway of sensory hair cell death and protection. In this article, I would like to discuss some recent findings about inner ear hair cell death and protection. There are many reports that hair cell death is induced in the form of apoptosis. The key molecules are caspases and c-Jun N2 terminal kinase (JNK) in the signaling pathway of hair cell death. The inhibition of these molecules can protect the hair cells against ototoxic chemicals.

The heat shock response is a fundamental mechanism of cells to cope with adverse environments, and is regulated mainly at the level of transcription by heat shock transcription factor (HSF1) in mammals. The activations of caspases and JNK are inhibited by heat shock proteins, and result in the survival of cells. Therefore, we performed experiments to analyze the role of the heat shock response in the inner ear. Our results showed that the heat shock response protected the inner ear against intense noise, and that the heat shock response was regulated by HSF1. The heat shock response is the one of the potential candidates for the protection of the inner ear. But more in vivo experiments will be required for the clinical treatment of inner ear diseases.

Key words: apoptosis, caspase, Jun kinase, heat shock protein

---

目 次

1. はじめに
2. 感覚細胞死のメカニズム
  - 2.1. カスパーゼの活性化
  - 2.2. Jun キナーゼの活性化

3. 生体に備わる細胞保護機構
4. 熱ショック応答による感覚細胞保護の試み

1. はじめに

内耳の有毛細胞は、骨に囲まれた深部に位置し、外部からのストレスから隔離されている。しかしながら、アミノグリコシド系抗生物質に代表

される化学物質、感染、虚血などによって、容易に障害されることが知られている。哺乳動物の有毛細胞は、ひとたび障害されると、通常の状態では再生されることはなく、機能不全（蝸牛の場合は難聴、前庭の場合は平衡失調）が一生持続することになる。前庭機能の場合、平衡失調は前庭代償によって補われるものの、より良好な予後のためには積極的な治療が有効とされる¹⁾。よって、有毛細胞死を伴うと考えられる内耳疾患の治療には、有毛細胞死を抑制することが、重要である。

最近の細胞内シグナル伝達の研究により、内耳の有毛細胞死にアポトーシスに関与することが明らかになってきた。アポトーシスとは、形態学的観察により定義された細胞死の形態であり、核の凝縮、断片化、細胞質の萎縮など極めて特徴的な変化を呈することで知られる。断片化されたアポトーシス小体と呼ばれる細胞は周りの他の細胞やマクロファージ細胞に取り込まれ、貪食除去される。アポトーシスの大きな特徴は、ネクローシスと異なり組織内で散発的に生じ、一旦開始すると速やかに進行し、さらには死に至った細胞が炎症を伴わず急速に除去される点にある。アポトーシスは生物の発生や形態維持において必須の現象と考えられており、免疫系や神経系においても重要な役割を果たしている。内耳有毛細胞に関しては、アミノグリコシドによって障害された有毛細胞が、アポトーシスと同様の形態学的特徴を有することが報告された²⁾。その後、強大音への曝露^{3,4)}、老化⁵⁾によっても、有毛細胞死がアポトーシスの形態を伴うことが明らかにされた。我々は、有毛細胞のアポトーシスを抑制することが、将来的な内耳治療に貢献できると考え、主として動物モデルを用いて有毛細胞保護を目的とする研究を行ってきた。本稿では、アポトーシスにおいて重要な役割を持つ2種類のシグナル伝達分子（カスパーゼ、Jun キナーゼ）の内耳での役割について述べる。そして、これらの分子の活性化を抑制する生体保護機構である熱ショック応答と、我々の行っている熱ショック応答を利用した有毛細胞保護を目的とした実験について報告する。

2. 感覚細胞死のメカニズム

2.1. カスパーゼの活性化

カスパーゼはシステインを活性中心に持ち、アスパラギン酸のC末端を切断する生理活性を持

つプロテアーゼのファミリーであることから名付けられた分子である。現在までに14のファミリー分子が同定されており、それぞれ番号を付けて呼ばれている。アポトーシスに関係するカスパーゼのシグナル伝達系路として、現在少なくとも二つの経路が知られている。一つは Death Receptor が関与するとされるカスパーゼ-8 の活性化を伴う経路で、もう一つはミトコンドリアからのチトクロム c の放出に関与するとされるカスパーゼ-9 の活性化を伴う経路である^{6)~8)}。これらの経路の活性化は、下流のカスパーゼ-3 の活性化を誘導し、結果として遺伝子の断片化と細胞の形態学的変化を引き起こし、アポトーシスに至る。

内耳においては、蝸牛の器官培養を用いた実験系で、シスプラチンによる有毛細胞死をカスパーゼ-3 阻害剤が抑制することが報告された⁹⁾¹⁰⁾。その後、前庭の感覚細胞死にもカスパーゼの活性化に関与していることが報告された^{11)~13)}。また、カスパーゼの中でも、ミトコンドリアからチトクロム-c の放出を伴って活性化されるとされるカスパーゼ-9 が、より重要であることが、マウス卵形囊の器官培養¹⁴⁾や動物モデル¹⁵⁾で報告されている。我々は、モルモット内耳に浸透圧ポンプを用いてカスパーゼ-9 阻害剤を投与することで、ゲンタマイシンによる有毛細胞死を抑制し、内耳機能を保護できることを明らかにした¹⁶⁾。

これらの実験からカスパーゼが有毛細胞死に関与していることが明らかになったが、一方でカスパーゼの活性化に伴うアポトーシスは発生段階においては内耳の形態を維持するのに必須の分子である。例えば、出生後に死亡するカスパーゼ-3 欠損マウスは、内耳の形態異常と機能不全を呈することが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾し、カスパーゼ-9 欠損マウスは神経系の奇形を伴う胎生致死である。よって、カスパーゼ阻害剤を全身投与しての内耳疾患に対する治療は困難が予想される。今後、薬剤の内耳への局所投与の手段が確立されれば、内耳疾患に対する治療の候補となる可能性はある。

2.2. Jun キナーゼの活性化

Jun キナーゼは、MAPK ファミリー分子の一つで、UV 照射された細胞において、転写因子 c-Jun のセリン残基をリン酸化するキナーゼとして同定された。MAPK ファミリー分子は細胞が

外部からの様々なストレスを受けた際に活性化され、細胞の生存、分化、死のシグナル伝達に関わる。中でも MAPK ファミリーの一つである JNK は神経細胞がアポトーシスを起こす際に必須の物質とされ、JNK の活性化が神経細胞死に密接に関わっているとする数多くの報告が見られる¹⁹⁾²⁰⁾。

内耳でも、最近、JNK の活性化を調節する MLK に対する阻害剤がゲンタマイシンによる有毛細胞死を抑制することが報告された²¹⁾²²⁾。また、JNK の上流に位置する Cdc42 に対する阻害剤²³⁾や、JNK 自体の阻害剤である D-JNKI-1²⁴⁾を用いて、*in vivo*でも、JNK の活性化が有毛細胞死に強く関わっていることが報告されている。これらの報告から JNK が有毛細胞死において重要な役割を果たしていることが明らかになってきたが、細胞死につながるシグナル伝達経路は充分明らかにされたとはいえない。神経細胞死においては、活性化された JNK が Bim と Bmf をリン酸化し、これが Bax と Bak を直接活性化もしくは Bcl-2 や Bcl-Xl と結合することで間接的に活性化して、ミトコンドリアにシグナルが伝達され、カ

スパーゼの活性化と細胞死が生じるとされており²⁵⁾²⁶⁾、内耳における今後の研究が待たれる。

3. 生体に備わる細胞保護機構

細胞を通常の生育条件より高い温度に曝露すると一群の熱ショック蛋白質が誘導される。この現象は熱ショック応答として知られている。哺乳動物における熱ショック応答は高熱などのストレスによって変性した蛋白質が熱ショック転写因子を活性化し、一群の熱ショック蛋白質を誘導することで生じる¹⁾。熱ショック転写因子は、現在までに哺乳類では3種類 (HSF1, HSF2, HSF4)、鳥類では3種類 (HSF1, HSF2, HSF3) の存在が知られているが、哺乳動物では HSF1 が、鳥類では HSF3 が主として熱ショック応答を調節しているとされる。熱ショック応答によって、誘導される熱ショック蛋白質は、分子量から HSP70 に代表される熱ショック蛋白質は変性した蛋白質の変性や凝集を抑制して、細胞内の蛋白質の機能を回復する²⁷⁾²⁸⁾。また、アポトーシスに至る細胞内のシグナル伝達を抑制することで、多くの細胞に対しては保護的に働くことが知られている。例え

図1 有毛細胞死に関する細胞内シグナル伝達と期待される熱ショック蛋白質による抑制部位

有毛細胞にストレスが負荷された場合、Jun キナーゼ (JNK) やカスパーゼの活性化を伴い細胞死が生じる。熱ショック蛋白質 (HSP) は、細胞死のシグナル伝達系路の多くの部位において抑制的に作用し、細胞を生存させる方向に作用すると考えられる。

ば HSP70 は、有毛細胞死に関与する Jun キナーゼの活性化を抑制したり²⁹⁾、カスパーゼの活性化を抑制することが報告されている^{30)~32)} (図 1)。加えて、熱ショック応答を調節している HSF1 自体にも、細胞を保護する働きがあることが報告されている³³⁾。

内耳においては1990年代より熱ショック応答に関する報告が散見され、通常の状態でも HSP70 は内耳に存在するが、熱ショックを与えることで熱ショック応答が生じ、内耳において熱ショック蛋白質の発現が増加することが報告されている³⁴⁾³⁵⁾。さらに、強大音への曝露³⁶⁾、一過性虚血³⁷⁾、シスプラチンの投与³⁸⁾ など内耳障害を起こしうるストレスを負荷した際、内耳に熱ショック応答が誘発されることが知られている。一方で内耳における HSF1 の存在が明らかにされたのは比較的最近である³⁹⁾。一部の生殖細胞を除いては細胞を生存させる方向に作用する HSF1 の内耳における機能は不明瞭なままであった。そこで、我々は熱ショック応答の内耳における役割と、HSF1 の役割を明らかにする目的で行った実験を以下に紹介する。

4. 熱ショック応答による感覚細胞保護の試み

Yoshida ら⁴⁰⁾ は、マウスの全身に熱を負荷してあらかじめ熱ショック応答を誘導すると、その後の強大音に曝露しても、有毛細胞死が抑制され、聴覚機能が保護されることを報告した。この報告は、生体が生来備える細胞保護機構である熱ショック応答が、内耳の保護療法として応用できる可能性を示唆した最初の報告となる。しかし、熱ショック応答の誘導のために、実験動物の全身を高温に曝露していることから、内耳疾患の治療方法としては現実的でないという問題点があった。そこで、我々は実験動物の中耳腔を、体温より高温度の生理食塩水で灌流することで、内耳に熱ショック応答を誘導できることを示した⁴¹⁾。この方法は高体温を維持するよりも実験動物の全身に与える負荷は減少したが、強い熱ショック応答が有毛細胞に誘導されており、不可逆性の音響障害を起こしうる強大音への曝露よりも強い熱ショック応答を誘導し得た (図 2)。この中耳腔を灌流する方法で熱ショック応答を誘導させた動物を、さらに強大音に曝露したところ、音響障害による有毛細胞死と内耳機能の障害を著明に抑制

図 2 内耳におけるストレス後の熱ショック応答
コントロール動物、強大音に曝露した動物、43°C の生理食塩水で蝸牛内を灌流した動物、熱ショック応答の誘導物質であるテブレノン内を内耳に直接投与した動物、それぞれの蝸牛より抽出した蛋白質を用いてウエスタンブロット解析を行った。いずれの処置においても熱ショック蛋白質 (HSP 70, HSP27) の発現が増強されている。

図 3 内耳熱ショック応答の有毛細胞に対する保護効果

モルモットの中耳腔を、43°C の生理食塩水で 1 時間灌流し、熱ショック蛋白質が高発現している 6 時間後に 130 dB SPL のバンドノイズに 1 時間曝露した。1 週間後に残存有毛細胞を評価したところ、体温とほぼ同じ温度の生理食塩水で灌流された耳や無処置の耳と比較して、有毛細胞死は有意に抑制されていた。

$p=0.05$ (文献 41 より改編して引用)

できることが明らかになった (図 3)。

この実験に加えて、熱ショック応答のシグナル伝達において上流に位置する HSF1 の欠損マウスを用いた実験を行った。HSF1 欠損マウスの内耳は、ストレスを負荷しない状態では、正常の組

図4 音響障害に対する HSF1 の影響

HSF1 欠損マウスを野生型マウスと同一ケージに入れて、強大音に曝露した。1週間後に残存有毛細胞を評価したところ、HSF1 欠損マウスでは、容易に有毛細胞が障害されていることが示された。
 $p=0.05$ (文献41より改編して引用)

織象を示し、ABR による内耳機能も野生型マウスとの差を示さなかった。しかし、HSF1 欠損マウスと野生型マウスを同一ケージに入れ、強大音に曝露すると、HSF1 欠損マウスは野生型マウスに比べて容易に有毛細胞死が誘導され (図4)、内耳機能が障害された。これらの結果から一連の熱ショック応答が生来内耳に備わった保護機構であり、有毛細胞を保護する働きを持つことが示唆された。

しかし、実際に治療に結びつけるには、熱ショック応答を誘導する時期を、少なくとも障害の直後、もしくは障害と同時に設定する必要がある。今回示した方法では、熱ショック応答が誘導されたのは、中耳腔を灌流した少なくとも6時間後であった。また、音響障害以外の内耳障害についても、内耳保護が可能かどうか検討する必要がある。現在、効率よく内耳に熱ショック応答を誘導する目的で、高温曝露以外の方法を検討中であり、今後、これらの課題について明らかにしていきたい。

文 献

1) Strupp M, Zingler VC, Arbusow V, et al: Meth-

ylprednisolone, valacyclovir, or the combination for vestibular neuritis. *N Engl J Med* 351: 354-361, 2004

- 2) Forge A: Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear Res* 19: 171-182, 1985
- 3) Hu BH, Henderson D, Nicotera TM: Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res* 166: 62-71, 2002
- 4) Nakagawa T, Yamane H, Shibata S, et al: Two modes of auditory hair cell loss following acoustic overstimulation in the avian inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 59: 303-310, 1997
- 5) Usami S, Takumi Y, Fujita S, et al: Cell death in the inner ear associated with aging is apoptosis? *Brain Res* 747: 147-150, 1997
- 6) Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290, 1999
- 7) Samejima K, Tone S, Kottke TJ, et al: Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *J Cell Biol* 143: 225-239, 1998
- 8) Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ: BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14559-14563, 1996
- 9) Liu W, Staecker H, Stupak H, et al: Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *Neuroreport* 9: 2609-2614, 1998
- 10) Cheng AG, Huang T, Stracher A, et al: Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res* 850: 234-243, 1999
- 11) Forge A, Li L: Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear Res* 139: 97-115, 2000
- 12) Matsui JI, Ogilvie JM, Warchol ME: Inhibition of caspase prevents ototoxic and ongoing hair cell death. *J Neurosci* 22: 1218-1227, 2002

- 13) Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW: Hair cell death in the avian basilar papilla: characterization of the in vitro model and caspase activation. *J Assoc Res Otolaryngol* 4: 91–105, 2003
- 14) Cunningham LL, Cheng AG, Rubel EW: Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J Neurosci* 22: 8532–8540, 2002
- 15) Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, et al: Signaling pathway for apoptosis of vestibular hair cells of mice due to aminoglycosides. *Acta Otolaryngol Suppl* 551: 69–74, 2004
- 16) Okuda T, Sugahara K, Takemoto T, et al: Inhibition of caspases alleviates gentamicin-induced cochlear damage in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx* 32: 33–37, 2005
- 17) Takahashi K, Kamiya K, Urase K, et al: Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss. *Brain Res* 894: 359–367, 2001
- 18) Morishita H, Makishima T, Kaneko C, et al: Deafness due to degeneration of cochlear neurons in caspase-3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 142–149, 2001
- 19) Davis RJ: Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239–252, 2000
- 20) Harper SJ, LoGrasso P: Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* 13: 299–310, 2001
- 21) Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, et al: Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci* 20: 43–50, 2000
- 22) Ylikoski J, Xing-Qun L, Virkkala J, et al: Blockade of c-Jun N-terminal kinase pathway attenuates gentamicin-induced cochlear and vestibular hair cell death. *Hear Res* 163: 71–81, 2002
- 23) Bodmer D, Brors D, Pak K, et al: Rescue of auditory hair cells from aminoglycoside toxicity by *Clostridium difficile* toxin B, an inhibitor of the small GTPases Rho/Rac/Cdc42. *Hear Res* 172: 81–86, 2002
- 24) Wang J, Van De Water TR, Bonny C, et al: A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J Neurosci* 23: 8596–8607, 2003
- 25) Lei K, Davis RJ: JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2432–2437, 2003
- 26) Becker EB, Howell J, Kodama Y, et al: Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24: 8762–8770, 2004
- 27) Hartl FU: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–579, 1996
- 28) Agashe VR, Hartl FU: Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11: 15–25, 2000
- 29) Mosser DD, Caron AW, Bourget L, et al: Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317–5327, 1997
- 30) Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, et al: Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 17: 6124–6134, 1998
- 31) Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al: Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469–475, 2000
- 32) Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, et al: Overexpression of rat heat shock protein 70 is associated with reduction of early mitochondrial cytochrome C release and subsequent DNA fragmentation after permanent focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 718–727, 2003
- 33) Inouye S, Katsuki K, Izu H, et al: Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol Cell Biol* 23: 5882–

- 5895, 2003
- 34) Neely JG, Thompson AM, Gower DJ: Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. *Hear Res* 52: 403-406, 1991
- 35) Akizuki H, Yoshie H, Morita Y, et al: Nuclear transition of heat shock protein in guinea pig cochlea after hyperthermia. *Hear Res* 92: 126-130, 1995
- 36) Lim HH, Jenkins OH, Myers MW, et al: Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea. *Hear Res* 69: 146-150, 1993
- 37) Myers MW, Quirk WS, Rizk SS, et al: Expression of the major mammalian stress protein in the rat cochlea following transient ischemia. *Laryngoscope* 102: 981-987, 1992
- 38) Oh SH, Yu WS, Song BH, et al: Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplatin-induced acute ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 120: 146-150, 2000
- 39) Fairfield DA, Kanicki AC, Lomax MI, et al: Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. *Hear Res* 173: 109-118, 2002
- 40) Yoshida N, Kristiansen A, Liberman MC: Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *J Neurosci* 19: 10116-10124, 1999
- 41) Sugahara K, Inouye S, Izu H, et al: Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear Res* 182: 88-96, 2003
-

原稿到着：平成16年11月1日

別刷請求先：菅原一真

〒755-0585 山口県宇部市南小串1-1-1

山口大学医学部耳鼻咽喉科

E-mail: kazuma@yamaguchi-u.ac.jp