8H12

サリチル酸がペンドリン H723R 変異ノックインマウスの聴覚に与える影響

Effects of Salicylate on the Auditory System in a Knock-in Mouse Model for H723R Mutation in Pendrin

非 ○ 池原 康裕 (東北大院・工)	非 小山 眞 (東北大・工)	正 村越 道生 (東北大・工)
非 池田 怜吉 (東北大・医)	非 中谷 和弘 (東北大・医)	非 橋本 繁成 (信州大・医)
非 西尾 信哉 (信州大・医)	非 工 穰 (信州大・医)	非 大島 猛史 (東北大・医)
非 宇佐美 真一 (信州大・医)	非 小林 俊光 (東北大・医)	正 和田 仁 (東北大・工)

Yasuhiro IKEHARA, Tohoku University, 6-6-01 Aoba-yama, Sendai 980-8579

Shin KOYAMA, Tohoku University

Ryoukichi IKEDA, Tohoku University

Shigenari HASHIMOTO, Shinshu University

Yutaka TAKUMI, Shinshu University

Shin-ichi USAMI, Shinshu University

Hiroshi WADA, Tohoku University

Michio MURAKOSHI, Tohoku University

Kazuhiro NAKAYA, Tohoku University

Shinya NISHIO, Shinshu University

Takeshi OSHIMA, Tohoku University

Toshimitsu KOBAYASHI, Tohoku University

Key words : Pendrin, Mutation, Pendred Syndrome, Sensorineural Hearing Loss, Salicylate

1. 緒言

先天性の難聴は新生児の 1000 人に 1 人の割合で起こる。その約半数が遺伝性の疾患で、そのうちの 15% が蝸牛 (cochlea) (Fig. 1) 内で機能するタンパク質であるペンドリンの異常を原因とするペンドレッド症候群によるものである⁽¹⁾。この病気はペンドリン遺伝子に変異が起こることによって引き起こされる常染色体劣性疾患であり、感音難聴、甲状腺腫、前庭水管拡大等を呈す難治性疾患である。

ペンドリンは 780 個のアミノ酸によって構成される膜タンパク質で、主に内耳、腎臓及び甲状腺に発現している⁽²⁾。特に蝸牛内では、ペンドリンは中央階 (scala media) 付近の血管条 (stria vascularis)、ラセン隆起 (spiral prominence) 及び外ラセン溝 (outer sulcus) (Fig. 2) に存在し、Cl⁻や HCO₃⁻などの陰イオンの輸送を行うことにより内耳中の外リンパ液のイオン濃度を調節する重要な役割を果たしている⁽³⁾。

培養細胞を用いた以前の我々の研究において、ペンドレッド症候群の原因となりうる 4 種類のミスセンスペンドリン変異体、すなわち P123S, M147V, S657N, H723R の局在が 10 mM サリチル酸によって細胞質内から細胞膜上へ移行し、機能が回復することが確認された⁽⁴⁾。これらの研究に基づき、我々は埋め込み形のドラッグデリバリーシステムを用いて定期的に治療薬を蝸牛に局所投与するペンドレッド症候群の治療法を提案する (Fig. 1)。このシステムによって細胞質内にとどまっている変異ペンドリンを細胞膜上へと移行させることで、本来の機能を回復させることが期待できる。

本研究ではサリチル酸は耳毒性を有する⁽⁵⁾ため、まず異なる濃度のサリチル酸を通常マウスの蝸牛に局所投与しその聴力への影響を評価した。次にペンドリン H723R の変異を発現させたノックインマウスを作製しその聴力を調べた。そして最も適切であると判断された濃度のサリチル酸をペンドリン H723R 変異ノックインマウスの蝸牛に局所投与し、同様にその聴覚への影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 動物

実験動物には C57BL/6 マウス (オス, 10–14 週齢, 20–25 g) および同系統のマウスにペンドリン H723R の変異を発現させたノックインマウス (オス, 20 週齢, 24–29 g) を用いた。ケタミン (75 mg/kg) とペントバルビタール (33 mg/kg) の腹腔内注射によって全身麻酔の状態で行った。麻酔の深度を保つため、必要場合はケタミンとペントバルビタール

Fig. 1. Human auditory system and conception of the drug delivery system. The outer ear collects and transmits sound from the external sound source to the middle ear. The middle ear ossicles transmit the mechanical vibrations from the tympanic membrane to the cochlea. The drug delivery system is composed of ultrasonic transmitter, ultrasonic pump driven by ultrasound, tank where drug is stored and tube between the pump and the round window.

Fig. 2. Expression of pendrin in the human inner ear. Pendrin was detected mainly in stria vascularis, spiral prominence and outer sulcus.

Fig. 3. ABR test. (a) Sound signals were produced by a speaker EC1 (TDT) and evoked potentials were detected by electrodes (blue; negative, yellow; positive, red; ground). (b) Elicited waveform responses were recorded.

ールを適量追加した。

2.2 試薬

異なる濃度のサリチル酸 (0.5, 1.0, 1.2, 2.0, および 4.0 M) が試薬として用いた。サリチル酸溶液は人工外リンパ (NaCl 120 mM, KCl 3.5 mM, CaCl_2 1.5 mM, D-glucose 5.5 mM, HEPES 20 mM) にサリチル酸ナトリウムを溶かすことで作製した。人工外リンパは対照実験にも用いた。

2.3 ABR 試験

聴力の評価はクリック音を刺激音として用いた聴性脳幹反応 (ABR) 試験によって行った (Fig. 3)。音刺激はスピーカードライバー ED1 で制御されたスピーカ EC1 (Tucker-Davis Technologies, FL, USA) によって出力した。誘発された電位差は皮下に配置した電極で検知され、増幅器 Extracellular Amplifier (Cygnus Technology, NC, USA) を介し、PowerLab 2/20 (ADInstruments, NSW, Australia) によって記録した。音刺激はスピーカーに接続したカプラで耳に直接伝えた (Fig. 3 (a))。ABR の反応が確認できなくなる音圧よりも 5 dB SPL 大きい音圧を聴力の閾値とした。

2.4 蝸牛内への試薬の投与方法

耳の後ろに切れ目を作り、鼓室腔を露出させた。手術用ドリルを用い正円窓が見えるように鼓室腔に穴を開けた。試薬を 0.5 μl 含んだ脱脂綿の小片を正円窓に置いた。その後鼓室腔の穴を肉片で覆い皮膚の切れ目を接着剤で塞いだ。これらのマウスに対して、薬剤投与手術前と 6, 24, 48, 72, 96 時間後に ABR 測定を行った。

3. 結果と考察

薬剤投与手術を行った通常マウスの聴力の変化を Fig. 4 に示す。4.0 M の濃度では恒常的に聴力が悪くなったが、2.0 M のサリチル酸溶液では聴力の回復が見られた。1.0 M および 0.5 M のサリチル酸溶液では人工外リンパ液を用いた実験と明確な違いはなく、耳毒性による聴力の低下は薬剤投与手術の影響による聴力の低下と同程度もしくはそれより小さかったのではないかと考えられる。以上の結果からサリチル酸は 2.0 M の濃度で用いるのが適切であると考えられた。

ペンドリン H723R 変異ノックインマウス 6 匹の週齢ごとの聴力変化を Fig. 5 に示す。大半の個体は 25 dB SPL 以下の音圧に閾値があり通常マウスと同様の聴力を有していた。しかし 1 匹 (KI 5) だけは閾値が 35 - 50 dB SPL であり聴こえが悪かった。またこの個体 (KI 5) の閾値は週齢を重ねるごとに上昇する傾向があった。

そこで H723R 変異ノックインマウスの聴こえが悪かった個体 (KI 5) に対して薬剤投与実験を行った (Fig. 6)。投与 6 時間後から閾値は上昇し 24 時間目で 60 dB SPL となった。その後聴力は回復傾向を示し閾値は 72 時間目では投与手術前と同じ 45 dB SPL となった。96 時間目には閾値が 55 dB SPL まで再び上昇した。サリチル酸による回復効果を調査するため、今後更に同様の実験を行う必要がある。

4. 結言

作製したペンドリン H723R 変異ノックインマウスの中には難聴を有する個体が確認された。この難聴を有する個体の蝸牛にサリチル酸を局所投与したところ、術後 24 時間を過ぎると聴力が回復する傾向が見られた。しかしサリチル酸の治療効果は今回の実験では明確にできなかった。

Fig. 4. ABR threshold shifts for click stimuli in mice with normal hearing that received surgery ($n = 3$ for each test group). Measurements were taken at before surgery (pre-) and 6, 24, 48, 72 and 96 hours after surgery. Error bars for 4.0-M salicylate indicate standard deviations. For clarity, error bars at the other data points are not shown. Test drugs used were artificial perilymph, 0.5 M, 1.0 M, 2.0 M and 4.0 M of salicylate solution.

Fig. 5. ABR threshold shifts for click stimuli in 6 knock-in mice as they aged. Measurements were taken from animals at between 13 and 22 weeks of age. KI 1 mouse died at 17 weeks of age.

Fig. 6. ABR threshold shifts for click stimuli in the knock-in mouse that was treated with 2.0 M of salicylate solution. Measurements were taken at before surgery (pre-) and 6, 24, 48, 72 and 96 hours after surgery.

参考文献

- (1) Reardon, W., Coffey, R., Phelps, P.D., Luxon, L.M., Stephens, D., Kendall-Taylor, P., Britton, K.E., Grossman, A. and Trembath, R. Pendred syndrome - 100 years of underascertainment? *QJM.*, 90, 443-447, 1997.
- (2) Everett, L.A., Glaser, B., Beck, J.C., Idol, J.R., Buchs, A., Heyman, M., Adawi, F., Hazani, E., Nassir, E., Baxevanis, A.D., Sheffield, V.C. and Green, E.D. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat. Genet.*, 17, 411-422, 1997.
- (3) Scott, D.A., Wang, R., Kreman, T.M., Sheffield, V.C. and Karniski, L.P. The Pendred syndrome gene encodes a chloride iodide transport protein. *Nat. Genet.*, 21, 440-443, 1999.
- (4) Ishihara, K., Okuyama, S., Kumano, S., Iida, K., Hamana, H., Murakoshi, M., Kobayashi, T., Usami, S., Ikeda, K., Haga, Y., Tsumoto, K., Nakamura, H., Hirasawa, N. and Wada, H. Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations. *Hear. Res.*, 270, 110-8, 2010.
- (5) Boettcher, F.A. and Salvi, R.J. Salicylate ototoxicity: review and synthesis. *Am. J. Otolaryngol.*, 12, 33-47, 1991.