

令和元年6月27日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10770

研究課題名(和文) 内耳に発現するRhoA/ROCK pathwayの分子構造と生理機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of Molecular physiology and anatomy of RhoA/ROCK pathway in the rat cochlea

研究代表者

土井 勝美 (DOI, Katsumi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40243224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ROCK inhibitor(塩酸ファスジル)による突発性難聴・内耳虚血に対する新規治療法の確立を目指し、既存治療である副腎皮質ステロイド単独群、副腎皮質ステロイド+塩酸ファスジル群、そして塩酸ファスジル単独群の3群間で治療成績の比較を行った。塩酸ファスジル投与は、塩酸ファスジル60mg/日、9日間点滴静注で行った。ステロイド治療は、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム500mg・100mg/日を各3日間ずつ、合計9日間点滴静注で行った。厚労省難治性疾患克服事業(高度難聴)調査研究班の判定基準に従い治療成績の判定を行った。副腎皮質ステロイド+塩酸ファスジル群が、最も優れた治療成績を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、RhoA/ROCK pathway作動薬と副腎皮質ステロイドの併用による突発性難聴に対する新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fasudil, a potent Rho-kinase inhibitor, has been reported to reverse the endothelin-induced vasoconstriction of spiral modiolar artery in the gerbil cochlea. We demonstrated that endothelin receptors was expressed in the rat cochlea and that serum endothelin of patients with sudden sensorineural hearing loss (SSHL) significantly increased. Since SSHL is believed to arise from vasoconstriction of the spiral modiolar artery, we conducted clinical investigation of fasudil combined with steroid for SSHL treatment to prevent the inner ear ischemia induced by endothelin.

The average hearing level was 72.7 dB (n=10) before the fasudil & steroid treatment, 44.9 dB at the end of the fasudil & steroid treatment (9 days after), and 31.9 dB at the final evaluation. The result indicates that SSHL could be caused by vasoconstriction of the spiral modiolar artery in the cochlea by endothelin and that the fasudil & steroid therapy might be warranted as the novel potent treatment for SSHL.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：Rho/ROCK pathway 突発性難聴 蝸牛 内耳虚血

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

RhoA/Rho-kinase (ROCK) pathway はその強力な血管平滑筋の収縮作用から、脳血管障害・心血管障害の発症に深く関与している。また、神経細胞死・神経軸索伸長・神経再生・発芽機構への作用から、さまざまな中枢神経障害の発症にも深く関与している。近年開発された ROCK inhibitor を用いたこれらの重篤な疾患に対する新規治療法の開発は、世界的に現在最も注目を集める極めて重要な研究課題となっている。

突発性難聴・急性高度感音難聴の発症機序として、RhoA/ROCK pathway が関与する内耳微小血管の血流障害が推察されている。本研究では、1) 正常マウス内耳における RhoA/ROCK pathway の局在および生理機能を解析した上で、2) 内耳血流障害モデル動物を用いた ROCK inhibitor による内耳血流障害に対する保護作用・治療効果の確認、3) RhoA/ROCK pathway 関連分子のゲノム解析による内耳血流障害発症の危険因子・遺伝的素因の検索、4) ROCK inhibitor による突発性難聴・急性高度感音難聴に対する新規治療法の確立を目的とする。

2. 研究の目的

内耳に発現する RhoA/ROCK pathway 関連分子を同定するため、マイクロアレイによる正常マウス内耳 RNA の網羅的解析を行う。内耳に発現する RhoA/ROCK pathway 関連分子を同定した上で、内耳の血管系、すなわち固有蝸牛動脈、蝸牛軸ラセン動脈、放射状細動脈、血管条毛細血管、そして静脈系における RhoA/ROCK pathway 関連分子の発現を詳細に検討する。RhoA/ROCK pathway の内耳における生理作用を解明するため、急性・慢性の血流障害モデル動物（無酸素負荷、内耳虚血モデル動物、ROCK 遺伝子 KO マウス等）の内耳電位（EP・CAP・CM・SP）、内・外リンパ液中の K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- イオン濃度、そして ABR 測定を行った上で、RhoA/ROCK pathway 関連分子に作用する薬剤、fasudil、hydroxyl fasudil、Y-27632、H-1152 等の ROCK inhibitor の影響を解析する。同時に、内耳障害モデル動物のラセン神経節細胞、有毛細胞の細胞死、細胞生存率、神経再生についても ROCK inhibitor の陽性作用の有無を確認する。

突発性難聴・急性高度感音難聴患者への ROCK inhibitor を用いた新規治療法の確立を目指した臨床研究を立ち上げる。同時に、ROCK 遺伝子および RhoA/ROCK pathway 関連分子の遺伝子解析を進め、内耳血流障害発症の危険因子・遺伝的素因の同定と将来的な発症予防法の開発を目指す。

RhoA/ROCK pathway 関連分子に関しては、心血管障害・脳血管障害に対する ROCK inhibitor の有効性の検討が、世界的に現在最も注目を集める極めて重要な研究課題となっている。聴覚系に関しては、これまで in-vitro 系での単離有毛細胞および単離ラセン動脈への ROCK inhibitor の作用が数編報告されただけである。難治性で有効な治療法の確立されていない内耳微小血管血流障害に対する新規治療法の開発を最終目標とする本研究では、基礎研究として RhoA/ROCK pathway 関連分子の内耳での局在、分子構造と生理機能の解析を進めるが、併行して、突発性難聴・急性高度感音難聴患者への ROCK inhibitor を用いた新規治療法の臨床研究も進められる。基礎研究と遺伝子解析を含めた臨床研究を融合させることで、年間 10 万人を超える新規の発症が報告されるこれらの難治性疾患の病態解明と治療法・予防法の確立を進める予定である。

研究チームは、これまでも遺伝性難聴、メニエール病、宇宙酔等の感覚器障害の克服を研究課題として選択し、基礎研究と臨床研究の融合を図りながら、遺伝子解析も含めた複合的研究を推進してきた。Preliminary study ではあるが、ROCK inhibitor を用いた基礎・臨床研究でも一定の陽性効果を確認してきた。社会的・医学的にさらに大きな impact のある成果を目指

したい。

3. 研究の方法

本研究では、1) 正常マウス内耳における RhoA/ROCK pathway 関連分子の局在、分子構造と生理機能を解析した上で、2) 突発性難聴・急性高度感音難聴の病態を RhoA/ROCK pathway 関連分子の分子機構として考察するため、内耳微小血管血流障害モデル動物における RhoA/ROCK pathway 関連分子の局在、分子構造と生理機能を解析する。3) 上記疾患に対する ROCK inhibitor による新規治療法の開発を目指して、内耳血流障害モデル動物への ROCK inhibitor 投与時の内耳機能の解析を進め、4) 臨床研究としては、患者 DNA を用いた ROCK 遺伝子および RhoA/ROCK pathway 関連分子の遺伝子解析による内耳血流障害発症の危険因子・遺伝的素因の検索を行い、5) 研究の最終ゴールである内耳血流障害に対する新規治療法の確立を目指して、ROCK inhibitor による突発性難聴・急性高度感音難聴患者に対する臨床研究を併行して進めその治療効果を慎重に解析する。

4. 研究成果

[臨床研究]

塩酸ファスジル（商品名：エリル注 S）は強力な血管拡張作用を示す Rho キナーゼ阻害剤であり、「クモ膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状の改善」に適応を有する薬剤である。中枢神経系では障害を受けた神経細胞の軸索が再生する過程に Rho キナーゼが関与することが知られており、血管への直接的な作用とは別に、Rho キナーゼ阻害剤である塩酸ファスジルは脳虚血に際しての神経細胞の再生過程でも陽性作用を示す可能性が示唆されている。

突発性難聴の病態には現在も不明な部分が残されているものの、内耳微小血管の循環障害すなわち内耳虚血がその主因であるとする考えが支持されている。治療法としてはステロイド剤の大量漸減療法が第一選択とされるが、施設によりプロスタグランジン製剤やデフィブラーゼが追加投与される場合もある。これらの併用療法によっても、突発性難聴症例の 20-30% は治療に無反応で、難聴と耳鳴の後遺症に苦しむことになる。突発性難聴における内耳障害の機序を解明すると同時に、現時点での第一選択治療薬とされるステロイド剤の治療効果をより高め、完全回復・著明回復例の割合（回復率）を上昇させ得る新規治療法の開発が望まれる。

我々はこれまで、突発性難聴新鮮例に対する塩酸ファスジル併用ステロイド治療の有効性を報告した。今回はさらに、突発性難聴非新鮮例、他の感音難聴症例についても、同治療法の有効性を検討し、突発性難聴新鮮例に対する治療成績との比較検討を行った。

厚生労働省聴覚・平衡機能系疾患調査研究班が用いている突発性難聴の診断基準に従い、grade2（5 周波数の平均聴力レベルが 40-60 dB）以上の突発性難聴新鮮例と診断された 12 症例（男性 8 例、女性 4 例、平均年齢 58.3 歳）に対して塩酸ファスジル併用ステロイド治療を行った。塩酸ファスジルの使用に関しては、大阪大学医学部附属病院および連携院内での倫理委員会の審査を経て、同薬剤使用の同意書にサインが得られた症例に投与を行った。全ての症例で、突発性難聴の発症後 7 日以内に塩酸ファスジル併用ステロイド治療が開始可能であった。塩酸ファスジル併用ステロイド治療の投与スケジュールは以下の通りとした。なお、プロスタグランジン製剤の併用は禁止した。

①塩酸ファスジル併用ステロイド治療（12 症例）

コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム（商品名：ソルコーテフ・サクシゾン）を 500mg/日、300mg/日、100mg/日、各 3 日間ずつ点滴投与する。ステロイド投与開始日より、同時に塩酸ファスジル（商品名：エリル注 S）30mg を 1 日 2 回（合計 60mg）、30mg/30min の投与速度で点滴

静注する。塩酸ファスジル投与も同じく9日間とする。

②ステロイド単独治療（52症例）

コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム（商品名：ソルコーテフ・サクシゾン）を500mg/日、300mg/日、100mg/日、各3日間ずつ点滴投与する。

突発性難聴非新鮮例3症例（女性3名、平均年齢33.7歳）、他の感音難聴3症例（外リンパ瘻2症例、メニエール病1例、女性3名、平均年齢48.3歳）に対して、上記①の内容で塩酸ファスジル併用ステロイド治療を行った。

塩酸ファスジル併用ステロイド治療の開始直前、投与終了直後、そして最終観察日（または聴力固定時）に純音聴力検査を施行した。厚生労働省聴覚・平衡機能系疾患調査研究班が用いている突発性難聴における聴力改善の判定基準に従い、各症例の聴力回復の程度を完全回復、著明回復、回復、不変の4つに分類した。また、 $(\text{初診時聴力レベル}-\text{判定時聴力レベル}) / (\text{初診時聴力レベル}-\text{健側聴力レベル}) \times 100 (\%)$ で聴力改善率を求めた。

12症例の塩酸ファスジル併用ステロイド治療開始直前の聴力レベルは、250～4000 Hzの5周波数平均で74.5 dBであった。9日間の同治療終了直後の平均聴力レベルは43.8 dB、聴力固定時の平均聴力レベルは31 dBと改善し、12症例の聴力利得の平均は43.5 dBとなった。聴力改善の判定基準に従うと、11症例（11/12=91.7%）は完全回復となり、1例は回復に留まった。以前に報告した通り、ステロイド単独治療を行った52症例では、完全回復が7症例（7/52=13.5%）、完全回復と著明回復を合わせても19症例（19/52=36.5%）と、回復率は低値に留まった。（図1）

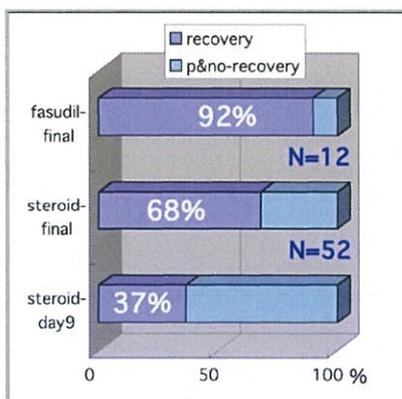


図1 塩酸ファスジル併用ステロイド治療の有効率

突発性難聴非新鮮例3症例の塩酸ファスジル併用ステロイド治療開始直前の聴力レベルは48 dBであった。9日間の同治療終了直後の平均聴力レベルは39.3 dB、聴力固定時の平均聴力レベルは33.7 dB、3症例の聴力利得の平均は14.3 dBとなった。聴力改善の判定基準に従うと、2症例が回復、1例は無反応となった。他の感音難聴3症例の同治療開始直前の聴力レベルは48 dBであった。9日間の同治療終了直後の平均聴力レベルは48 dB、聴力固定時の平均聴力レベルは46.3 dB、3症例の聴力利得の平均は1.7 dBとなった。聴力改善の判定基準に従うと、3症例とも無反応であった。

塩酸ファスジルは、1) 血管拡張・血流改善作用、2) 神経・シナプス再生作用の2つの薬理作用を有しており、突発性難聴の主たる病態の1つとされる内耳微小血管の循環障害すなわち内耳虚血を改善させると同時に、ラセン神経節細胞-有毛細胞間のシナプス結合の修復を促すことで、突発性難聴に対してより優れた治療効果示すことが期待される薬剤である。今回の検討結果より、塩酸ファスジル併用ステロイド治療が、従来からのステロイド単独治療の聴力改善率をより高め、突発性難聴の治療成績を著明に向上させ得る新規治療法となる可能性を示唆す

ものの、その治療効果は突発性難聴新鮮例において最大限に発揮されるものと考察された。

[基礎研究]

分子生物学的研究により、ラット蝸牛内の蝸牛軸ラセン動脈において、RhoA/ROCK pathway に作用する endothelin-1 (ET1) の受容体である ETa 受容体および ETb 受容体の発現を確認した。ET1 の蝸牛内外リンパ投与により内リンパ直流電位 (EP: Endocochlear Potential) は濃度依存性に低下し、ET1 投与中止により正常 EP まで可逆性に回復した。(図 2) ET1 による EP 低下時に、外リンパへの fasudil 同時投与に明らからかな効果は確認できなかった。

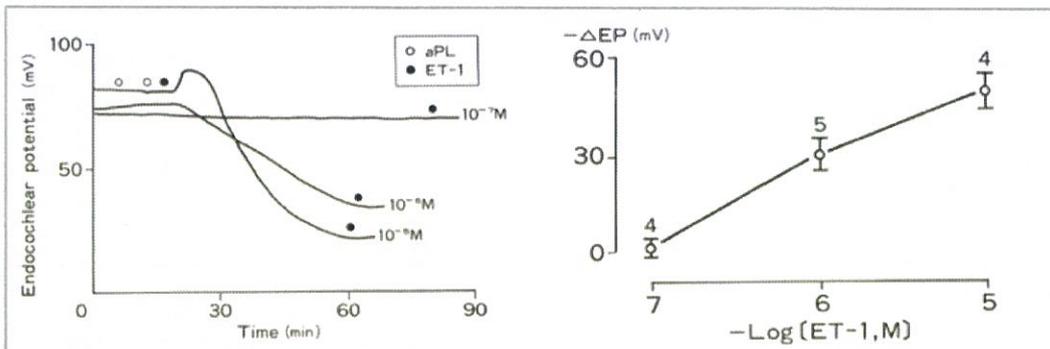


図 2 ET1 の蝸牛内外リンパ投与による内耳直流電位 (EP) への効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Fujita T, Saito K, Kashiwagi N, Sato M, Seo T, Doi K. The prevalence of vestibular schwannoma among patients treated as sudden sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 46: 78-82, 2018 「査読あり」
- 2) Seo T, Shiraishi K, Kobayashi T, Fujita-T, Saito K, Doi K. Recent and frequent vertigo attacks produce negative findings on furosemide-loading vestibular evoked myogenic potential testing in Meniere's disease. *Frontiers in Neurology* (in press, 2018) 「査読あり」
- 3) Fujita T, Kobayashi T, Saito-K, Ikezono T, Doi K. Vestibule-middle ear dehiscence tested with perilymph-specific protein cochlin-tomoprotein (CTP) detection test. *Frontiers in Neurology* (in press, 2018) 「査読あり」
- 4) Noda K, Kitahara T, Doi K. Sound change integration error: an explanatory model of tinnitus. *Frontiers in Neuroscience* (in press, 2018) 「査読あり」

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Doi K. VSB surgery for conductive & mixed hearing loss. The 31st Politzer Society Meeting (2018)
- 2) Doi K. Preservation of vestibular function after cochlear implantation with round window approach (RWA). The 30th Barony Society Meeting (2018)
- 3) Doi K. 3D-CT analysis of the FMT angle to RW/OW after VSB surgery - its correlation to the hearing sensitivity -. the 55th Inner Ear Biology Meeting (2018)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：日比野 浩

ローマ字氏名：HIBINO Hiroshi

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系分子生理学

職名：教授

研究者番号（8 桁）：70314317

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。