

## 論文の内容の要旨

論文題目 騒音性難聴におけるマクロファージ群の関与の検討

氏名 水嶋 優

騒音性難聴 (noise-induced hearing loss) の病態は、強大音がコルチ器、らせん靭帯や血管条を含む蝸牛外側壁に直接的に機械的ダメージを与えることにより形成される。それに加えて、騒音性難聴の病態形成に自然免疫応答の関与を示す知見が近年蓄積されてきている。蝸牛には、血管条やらせん靭帯などにマクロファージが定常的に存在する。また、強大音への曝露により、血中循環する炎症性単球の蝸牛内への侵入が生じる。さらに、強大音負荷により炎症性サイトカインの発現が上昇し、主として外側壁など感覚上皮以外の細胞に多く発現する。しかしながら、強大音曝露後に蝸牛に侵入する細胞群すべてが局所での炎症反応を促進するかどうかについてはこれまで検証されておらず、とりわけマクロファージ群は炎症制御的役割あるいは組織再生の機能も有することから、蝸牛に侵入するマクロファージは炎症収束に寄与しているのではないかと推察もなされている。

そこで私は、強大音負荷後のマクロファージの蝸牛への侵入を阻害する実験デザインを検討した。C57BL6/J マウスにクロドロン酸抱合リポソームを静脈内投与することでマクロファージ除去を試みて、強大音を負荷した。このマウスの一過性聴覚閾値上昇および恒久的聴覚閾値上昇を指標とした聴覚機能の強大音に対する感受性の変化、および組織障害の変化について検討した。実際に蝸牛においてマクロファージ除去がなされているかについては、マクロファージマーカー分子 F4/80 を指標として定量的評価を試みた。加えて、強大音負荷後早期に遺伝子誘導されるとされる代表的な炎症性サイトカイン、ケモカインおよび血管内皮接着分子の遺伝子発現の変化を検討した。

クロドロン酸抱合リポソーム投与群も対照群も強大音負荷直後に、聴覚閾値上昇の極大値を認め、その後 14 日の間に聴覚閾値は低下するが、最終的には強大音負荷前と比較し、聴覚閾値上昇が残存した。両群ともに同程度の一過性聴覚閾値上昇を示した (4, 8, 16, 31.25 kHz に対して、それぞれ 50, 75, 70, 55 dB 程度)。強大音負荷後 14 日では、対照群の恒久的聴覚閾値上昇は 4, 8, 16, 31.25 kHz の周波数に対して、それぞれ 31.4, 44.3, 44.3, 31.4 dB であった。クロドロン酸抱合リポソーム投与群では、それぞれ 6.4, 24.3, 34.3, 32.1 dB であった。クロドロン酸抱合リポソーム投与群は対照群と比較し、恒久的聴覚閾値の上昇を 4 kHz と 8 kHz で有意に抑制した。薄切切片で外有毛細胞の喪失率を確認したところ、頂回転下方においては対照群では 8.43±3.34%喪失していたが、クロドロン酸抱合リポソーム投与群では 3.35±1.37%喪失しており、外有毛細胞の脱落を有意に防いでいた。続いて、薄切切片の F4/80 免疫染色を行った。らせん靭帯や基底膜にも F4/80 発現細胞を認めたが、血管条に存在する F4/80 陽性細胞に着目した。強大音負荷により、血管条の F4/80 陽性細胞数は蝸牛全体で有意に増加したが、クロドロン酸抱合リポソーム投与群では血管条の F4/80 細胞数は有意に少なかった。強大音を負荷しない場合、血管条の F4/80 細胞数に両群で有意差は認めなかった。クロドロン酸抱合リポソーム投与群の頂回転下方および基底回転上方では、血管条あたりの F4/80 陽性細胞数は有意に減少した。クロドロン酸抱合リポソーム投与の有無にかかわらず、強大音負荷前と負荷後 3 時間の時点とを比較すると、炎症性サイトカイン *Il6* とケモカイン *Ccl7* は強大音負荷後に有意な発現上昇を認めた。しかし、いずれの分子もクロドロン酸抱合リポソーム投与による有意な発現量の変化は認めなかった。

以上の結果から、クロドロン酸抱合リポソームを投与することにより、聴覚機能と組織的評価の両面において音響障害が軽減されることが示された。自然免疫応答および獲得免疫応答への橋渡しに重要な免疫担当細胞であるマクロファージ群が騒音性難聴の病態プロセスに組み込まれており、同細胞群をターゲットとすることで、聴覚障害が軽減されることが動物実験により示された。強大音負荷後 3 日から 7 日の間に炎症性単球の蝸牛への侵入がピークを迎えるという先行研究、およびクロドロン酸抱合リポソ

ームを静脈内投与すると、投与後 24 時間以内に血中を循環する単球数を減少させるという先行研究も総合して考察すると、強大音負荷後 2 日の時点で静脈内投与したクロドロン酸抱合リポソームは蝸牛に侵入するはずであったマクロファージや炎症性単球を数的に減少させ、結果として今回の聴覚障害の軽減作用を示したと考えた。代表的な炎症性サイトカイン、ケモカインおよび血管内皮接着分子は、強大音負荷前後いずれの時点においても、クロドロン酸抱合リポソーム投与による有為な発現量の変化は認めなかった。強大音負荷直後の蝸牛でのサイトカイン産生は蝸牛の定常マクロファージや fibrocyte に由来すると一般的には考えられており、今回の結果はクロドロン酸抱合リポソームがこれらの細胞群には影響を及ぼさなかったと考えられる。以上の結果から、クロドロン酸抱合リポソームは障害後早期の蝸牛の定常マクロファージによる炎症反応の形成を抑制するのではなく、障害後期相においてマクロファージ・炎症性単球の蝸牛への侵入を防いだ、と結論付けた。以上の結果は内耳にかかわる単核球系食細胞をターゲットとした聴覚保護治療の可能性を示すものと考えられる。

マクロファージをはじめとする単核球系食細胞は炎症性サイトカインの主要なソースとされている。代表的な炎症性サイトカインとして、IL-6、TNF、そして IL-1 $\beta$  が挙げられる。先行研究では、抗 IL-6 中和抗体はマウスの音響障害を抑制し、抗 TNF 抗体はモルモットの音響障害を軽減させた。さらに TLR4 欠損マウスは音響障害に抵抗を示す。そこで私は、代表的な炎症性サイトカインの中で既報のなかった IL-1 $\beta$  分子に焦点を絞って検討することとした。強大音を負荷された蝸牛では活性型ミクログリア、fibrocyte そして神経細胞も IL-1 $\beta$  分子を発現する。また小規模な臨床試験では、一部の CAPS (cryopyrin-associated periodic syndromes) および副腎皮質ステロイド抵抗性の感音難聴の患者には、抗 IL-1 $\beta$  抗体が聴覚障害の軽減に有効であることが報告されていた。しかしながら、自己炎症性以外の病態による感音難聴においても IL-1 $\beta$  分子は障害促進的な役割を果たすと考えられてはいたが、必ずしも検証されてはいなかった。

そこで、蝸牛マクロファージが IL-1 $\beta$  分子を発現するかどうかを検証したうえで、強大音負荷により蝸牛の IL-1 $\beta$  分子が活性化（インフラマソームによる切断）が生じるかどうかを確認した。IL-1 $\beta$  欠損マウス (*Il1b*<sup>-/-</sup>) を用いることにより、騒音性障害の病態形成に IL-1 $\beta$  分子がどの程度寄与しているのかを検討した。副次的に、強大音を負荷しない *Il1b*<sup>-/-</sup> マウスの聴覚解析を行うことで、IL-1 $\beta$  分子が正常な聴覚発達にどれほど寄与しているかについても検討した。

強大音負荷した野生型マウスでは、IL-1 $\beta$  と F4/80 をともに発現する細胞を血管条に認めた。野生型マウスに強大音を負荷すると、強大音負荷直後より pro IL-1 $\beta$  および cleaved IL-1 $\beta$  の発現が上昇した。若齢 (6-10 週齢) の *Il1b*<sup>-/-</sup> マウスは対照群である野生型と比較し、正常な蝸牛の構造および同等の聴覚閾値を示した。*Il1b*<sup>-/-</sup> マウスの聴覚機能の強大音に対する感受性を検証した。*Il1b*<sup>-/-</sup> マウスも野生型マウスも強大音負荷直後に、聴覚閾値上昇の極大値を認め、その後 14 日間の間に聴覚閾値は低下するが、最終的には強大音負荷前と比較し、聴覚閾値上昇が残存した。両群ともに同程度の一過性聴覚閾値上昇を示した (4, 8, 16, 31.25 kHz に対して、それぞれ 45, 50, 50, 30 dB 程度)。強大音負荷後 14 日の ABR では、対照群である野生型の恒久的閾値上昇は 4, 8, 16, 31.25 kHz に対して、それぞれ 27.5, 26.7, 25.8, 19.2 dB であった。*Il1b*<sup>-/-</sup> 群では、それぞれ 14.3, 24.3, 21.4, 22.9 dB であった。強大音負荷後 14 日の ABR 測定において、*Il1b*<sup>-/-</sup> 群は野生型と比較し、恒久的聴力閾値上昇は測定したいずれの周波数においても有意差は認めなかった。

以上の結果から、強大音負荷という機械的な刺激により蝸牛局所では in vivo レベルで IL-1 $\beta$  分子のプロセシングが生じることが示された。機械的的刺激により蝸牛内での細胞障害や組織変性によって生じた DAMPs が、蝸牛を構成する細胞、特に蝸牛マクロファージのインフラマソームを活性化した可能性がある。その一方で、*Il1b*<sup>-/-</sup> マウスの聴覚機能の強大音に対する感受性は野生型と同等であった。強大音によって発現誘導され、活性化された IL-1 $\beta$  分子が騒音性難聴の病態において果たす機能は本研究からは依然として不明ではあるものの、一過性聴覚閾値上昇および恒久的聴覚閾値上昇を指標とすると、IL-1 $\beta$  分子は、少なくとも 1 回のみ負荷した強大音による、負荷後 2 週間に形成される聴覚障害には必須ではないと考えられる。本研究のような遺伝子欠損マウスを用いる loss of function の実験系ではなく、gain-of-function の実験系、つまり IL-1 シグナリングを増強することにより、IL-1 $\beta$  分子の騒音性難聴の病態における障害促進作用が確認できる、といった可能性は否定できない。今後の課題として、騒音性難聴以外

の病態において、IL-1 シグナリングが関与しているかどうかについての解析を行いたいと考えている。特に、老人性難聴の研究を検討している。*Il1b*<sup>-/-</sup>マウスを用いた老人性難聴研究が、現在では臨床的に皆無と言える老人性難聴への薬剤治療、とりわけサイトカイン分子をターゲットとした治療戦略の有効性を示す基盤となることを期待する。