博士論文

騒音性難聴におけるマクロファージ群の関与の検討

水嶋　優

博士論文

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

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教員：山岨　達也　教授

水嶋　優

目次

要旨 6

はじめに（研究の背景） 7

騒音性難聴について 7

内耳の解剖および生理機能について 7

騒音性難聴の病態について 9

自然免疫応答とマクロファージ 10

蝸牛マクロファージ 12

騒音性難聴と遺伝子誘導 13

騒音性難聴の病態における蝸牛マクロファージの機能 13

第 1 部　『クロドロン酸抱合リポソーム投与による騒音性難聴の障害軽減』 16

1.1　序文（研究の目的） 16

1.2　方法 19

1.2.1　マウス 19

1.2.2　マクロファージ除去 20

1.2.3　強大音負荷 20

1.2.4　ABR（Auditory brainstem response）計測 21

1.2.5　組織解析 22

1.2.6　定量的 RT-PCR（quantitative real-time polymerase chain reaction）23

1.2.7　統計処理 24

1.3　結果 26

1.3.1　クロドロン酸抱合リポソーム静脈内投与による聴覚障害の軽減 26

1.3.2　クロドロン酸抱合リポソーム静脈内投与による蝸牛 F4/80 陽性細胞数の変化 27

1.3.3　クロドロン酸抱合リポソーム静脈内投与による蝸牛でのサイトカイン・ケモカイン・血管内皮接着分子の mRNA 発現への影響 28

1.4　考察 29

第２部　『騒音性難聴における IL-1β の機能』 45

2.1　序文（研究の目的） 45

2.2　方法 48

2.2.1　マウス 48

2.2.2　組織解析 48

2.2.3　ウエスタンブロット法 49

2.2.4　強大音負荷および ABR 計測 50

2.2.5　統計処理 50

2.3　結果 52

2.3.1　蝸牛マクロファージの IL-1β の発現と強大音負荷による IL-1β 分子の活性化 52

2.3.2　若齢 *Il1b*$^{-/-}$マウスの定常状態での聴覚および構造 53

2.3.3　*Il1b*$^{-/-}$マウスの強大音への感受性 53

2.4　考察 55

結論 67

謝辞 68

略語一覧 69

引用文献 72

要旨

騒音性難聴の病態形成には自然免疫応答が関与し、蝸牛への炎症細胞の侵入が報告されている。しかしながら、強大音負荷後に侵入する炎症細胞やサイトカインが、聴覚障害にどの程度寄与するかは明らかではなかった。本研究では、音響障害後期相において蝸牛に侵入するマクロファージ群をクロドロン酸抱合リポソームにより除去すると聴覚が保たれ組織学的な障害が軽減されること、強大音負荷後には蝸牛マクロファージが IL-1β を強く発現し同分子の活性化が生じるが、IL-1β 欠損マウスは野生型と同等の強大音に対する障害を呈することを明らかにした。以上から、IL-1β は騒音性難聴の病態形成には必須ではないことが示唆された。

はじめに（研究の背景）

騒音性難聴について

強大音への曝露による騒音性難聴（音響障害；noise-induced hearing loss）は感音難聴の代表的な疾患の一つであり、世界的にも 6 億人以上に影響を与えていると報告されている[1]。騒音性難聴には、予期しない瞬間的な強大音による音響外傷の他、より低いレベルの騒音に職業上、繰り返し曝露されて発症する職業性難聴が含まれる。さらには、コンサートやヘッドホンなど身の回りにある、さらに低いレベルの騒音に慢性的にさらされることにより、加齢性難聴が生じるとも報告されている[2]。

騒音性難聴に対する有効な治療法が存在しないため、予期できる騒音源の遮蔽や耳栓などの防音策、健康診断による早期発見によって対応せざるを得ない。また、加齢性難聴はうつや社会的孤立に関与するとされ[3], [4]、騒音が関与する感音難聴へのより効果的な対策が求められている。

内耳の解剖および生理機能について

内耳は硬い側頭骨に包まれている。内耳には平衡器官である前庭・半規管、音受容の機能を持つ末梢感覚器である蝸牛が存在する。蝸牛はかたつむりの殻のごとく、蝸牛軸を中心としてヒトでは約 2.5 回転、マウスでは約 2 回転している。蝸牛の感覚上皮はコルチ器と呼称され、音伝導を担う主たる感覚細胞である 1 列の内有毛細胞と、周

波数弁別や音受容の感受性に関わる 3 列の外有毛細胞が並ぶように配列し、それらは支持細胞によって支えられている。内外有毛細胞は求心性および遠心性神経によって神経支配を受ける。求心性神経であるらせん神経節細胞（一次聴神経）の末梢側の神経終末と有毛細胞とはシナプス（ribbon synapse）を形成する。蝸牛内腔はリンパ液で満たされており、音の振動によりリンパ液に波動が生じて基底板が振動する。聞いた音の周波数によって基底板の最大振幅域が異なっており、高周波数の音では基底回転側を、低周波数の音では頂回転側に最大振幅が生じる。

蝸牛の外側壁は血管条（stria vascularis）やらせん靭帯（spiral ligament）によって形成される。中枢神経系には血液脳関門（blood brain barrier; BBB）と呼称される、神経実質への高分子量の障害性物質の流入を防ぎ、炎症細胞浸潤を防ぐ強固なバリアが存在する[5]。蝸牛においても血管条やらせん靭帯の毛細血管によって構成されるバリア機構（blood labyrinth barrier; BLB）が備わっている。BLB は内耳へと各種必須内因性因子を供給し、イオン組成やリンパ液量を調整し、蝸牛内電位（endocochlear potenitial）を維持することにより、有毛細胞の脱分極にはじまる適切な聴覚伝導に役立っている[6], [7]。加えて、分子量の大きい物質や炎症細胞の蝸牛内への侵入を阻止するなど、蝸牛の恒常性維持に重要な役割を果たし、聴覚神経系と免疫系の境界域を設定している。

騒音性難聴の病態について

騒音性難聴の発症や進行は、音響学的な特性と、個体ごとの感受性の差異という２つの要因によって決定される。前者に関わる事項としては強大音の音圧や周波数特性、曝露時間や頻度が挙げられる。また後者に関わる事項としては、ヒトの側頭骨病理所見や小動物を用いた基礎実験からは、蝸牛の循環動態や栄養動脈の血管吻合部位、基底板の疲弊効果などの解剖学的理由が古くより推察されてきた[8], [9]。加えて、１塩基多型解析からは、酸化ストレス関連遺伝子やカリウムイオン再吸収関連遺伝子等をはじめとして、多くの個体側の易感受性に関する遺伝的要因が存在することが明らかとなっている[10]。

強大音の音響学的特性により、一過性聴覚閾値上昇（temporary threshold shift; TTS）または恒久的聴覚閾値上昇（permanent threshold shift; PTS）という２種類の聴覚障害が生じる。前者は可逆的な聴覚閾値上昇であり、通常は強大音曝露後 24-48 時間程度で回復する。後者は不可逆な聴覚障害であり、コルチ器に存在する内外有毛細胞の脱落を伴う。強大音の主たる刺激周波数域の高低に関わらず、特に蝸牛の高周波数域を担う基底回転側が侵されやすい。また内有毛細胞は強大音に対する抵抗性が強い一方で、外有毛細胞は侵されやすい[9]。有毛細胞の脱落に続いて、らせん神経節細胞の 2 次性変性が生じる[11]。さらに、蝸牛神経核、内側膝状体、下丘から大脳皮質聴覚野に至るまでの、中枢側の聴覚伝導路に存在する神経細胞にも変性が生じるとされる[12]。

騒音性難聴の病態は主として、強大音がコルチ器および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。蝸牛の細胞間結合が離開して内外リンパが混合し、また酸化ストレス応答、グルタミン酸による興奮毒性（glutamate excitotoxicity）、アポトーシス（apoptosis）およびネクロプトーシス（necroptosis）等も生じる[13]–[16]。有毛細胞やらせん神経節細胞が細胞死により喪失すると基本的には再生されないため、それらの細胞が担っていた聴覚機能は不可逆的に障害が残存する。このような騒音性難聴の病態形成において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[17], [18]。

自然免疫応答とマクロファージ

免疫応答は、古典的には外来病原体などの非自己に対する生体防衛を表すが、これは自然免疫系および適応免疫系という２つのシステムの相互連携により形成される。炎症反応の初期応答を担う自然免疫系は、外来の病原体に特有の分子構造（pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）をパターン認識受容体（pattern recognition receptors; PRRs）によって認識して細胞内シグナル伝達を促進することにより、早期にウイルスや細菌、その感染細胞を排除する[19]。さらに、これらの受容体は自己由来の変性・代謝物質やがん細胞、環境中の微粒子などに対しても同様にパターン認識し得ることが知られている。炎症の結果生じる壊死細胞より放出された分子構造（damage-associated molecular patterns; DAMPs）は、PRRs を介して更

なる炎症反応を誘導する[20]。非病原体由来の原因物質により惹起される自己炎症は、糖尿病、動脈硬化、がん、自己免疫性疾患、アレルギー疾患や神経変性疾患の発症・進行に関与すると考えられている[21]–[23]。

単核球系貪食細胞（mononuclear phagocytes）は、単球・マクロファージ・樹状細胞（dendritic cells; DC）からなる細胞群で、自然免疫応答を正負両方向に制御する免疫担当細胞である。肝臓ではクッパー細胞、肺では肺胞マクロファージ、脳ではミクログリアなど、多くの臓器に常在マクロファージ（tissue-resident macrophage）が存在する。常在マクロファージの多くは胎生期にその局在が決定付けられ、成熟した個体においても局所の恒常性維持や炎症制御に重要な役割を果たしている。他方で、マクロファージの前駆体である単球は、骨髄内の血球系幹細胞（hematopoietic stem cells）からいくつかの前駆体を経て、循環血液中に絶えず供給されている。単球は心臓や腸管などのいくつかの臓器において定常的に組織内に侵入し、マクロファージへと成熟・分化する[24]。とりわけ様々な臓器での炎症病態では、単球は組織に侵入してマクロファージへと分化しつつ、炎症性サイトカインを放出することで更なる炎症の拡大を促す。一方で、炎症により局所に放出された細胞残渣を認識して貪食し、炎症抑制性の因子を産生することにより、炎症の収束と組織再生を促す一面も有している[25]。

蝸牛マクロファージ

蝸牛においても、血管条やらせん靭帯など、主としてコルチ器以外の構造にマクロファージが定常的に存在する。蝸牛の定常マクロファージは microglial-like cells（MLCs）とも呼称される。骨髄キメラマウスを用いた非生理的条件下ではあるが、MLC は骨髄細胞に由来し、月単位の時間経過でゆっくりとながらもターンオーバーが認められるとの報告がある[26]。近年、melanocyte-like macrophages（PVM/Ms）と呼ばれる、血管条の血管周囲に存在する細胞群の報告があり、これらもマクロファージマーカー分子である F4/80 や CD68 を発現するため、定常マクロファージの１つと考えられている。*Cd11b*^{DTR} トランスジェニックマウスを用いることで diphtheria toxin（DT）誘導性に PVM/M 細胞に特異的ではないものの、同細胞を含めて CD11b を発現する細胞を広範に除去することが可能で、血管透過性が亢進し、聴覚閾値の上昇や蝸牛内電位の低下といった表現型を示し、PVM/M 細胞は血管条ひいては内耳の恒常性維持に重要な役割を果たすことが示唆されるとの報告がある[27]。

さらに、蝸牛においても強大音への曝露などにより、血液を循環する炎症性単球の蝸牛内への侵入が生じる[28]。古くから、強大音負荷後に蝸牛で増加する炎症細胞の電子顕微鏡像の報告[29]があり、解剖学的にはらせん靭帯、鼓室階、らせん板縁（spiral limbus）や血管条といった部位への侵入が多く観察された。その後、CD45、F4/80、Iba1、CD11b、CX3CR1 など、造血系由来細胞やマクロファージ・単球に特徴的な細胞表面マーカーによる免疫染色を施すことにより、これらの細胞がマクロファージ

群であることが裏付けられている[18]。

騒音性難聴と遺伝子誘導

強大音負荷により tumor necrosis factor（TNF）、interleukin-1 beta（IL-1β）、interleukin-6（IL-6）といった炎症性サイトカインの発現が上昇することが報告されている。炎症性サイトカインもマクロファージの局在と同じく、主として蝸牛外側壁など感覚上皮以外の細胞に多く発現している。マウスおよびラットの強大音負荷後 1 日目の蝸牛における遺伝子誘導を RNA-sequence 法により解析した報告[30]では、いずれの動物も gene ontology 解析において「immune response」を筆頭に炎症や免疫プロセスに関する遺伝子変動が最も大きく、単球遊走能の強いケモカイン chemokine (C-C motif) ligand 2（*Ccl2*）や chemokine (C-C motif) ligand 7（*Ccl7*）が誘導された。ケモカイン受容体 C-C chemokine receptor type 2（CCR2）は、その欠損マウスを用いた解析からは音響障害に対して保護的な機能を持つとの報告[31]もあるが、これらのケモカインは総じて血中を循環する炎症性単球の内耳への侵入を促す可能性が示唆されている。

騒音性難聴の病態における蝸牛マクロファージの機能

強大音への急性曝露では、曝露後 3－7 日の炎症後期相に蝸牛内へと侵入する炎症細胞の数的増加のピークを認めるとの報告[28], [32], [33]がある一方、TNF や IL-1β な

どの炎症性サイトカインや CCL2 などのケモカインは強大音負荷直後（負荷後 6 時間程度）から 1 日以内の炎症早期相に発現のピークを迎えるのとの報告[34]もある。従って、炎症性サイトカインやケモカインは、炎症早期相の病態形成に寄与するが、蝸牛に侵入する炎症細胞は、炎症後期相における有毛細胞障害に関与するものと考えられていた。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いない。また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、との推察もなされている[18]。

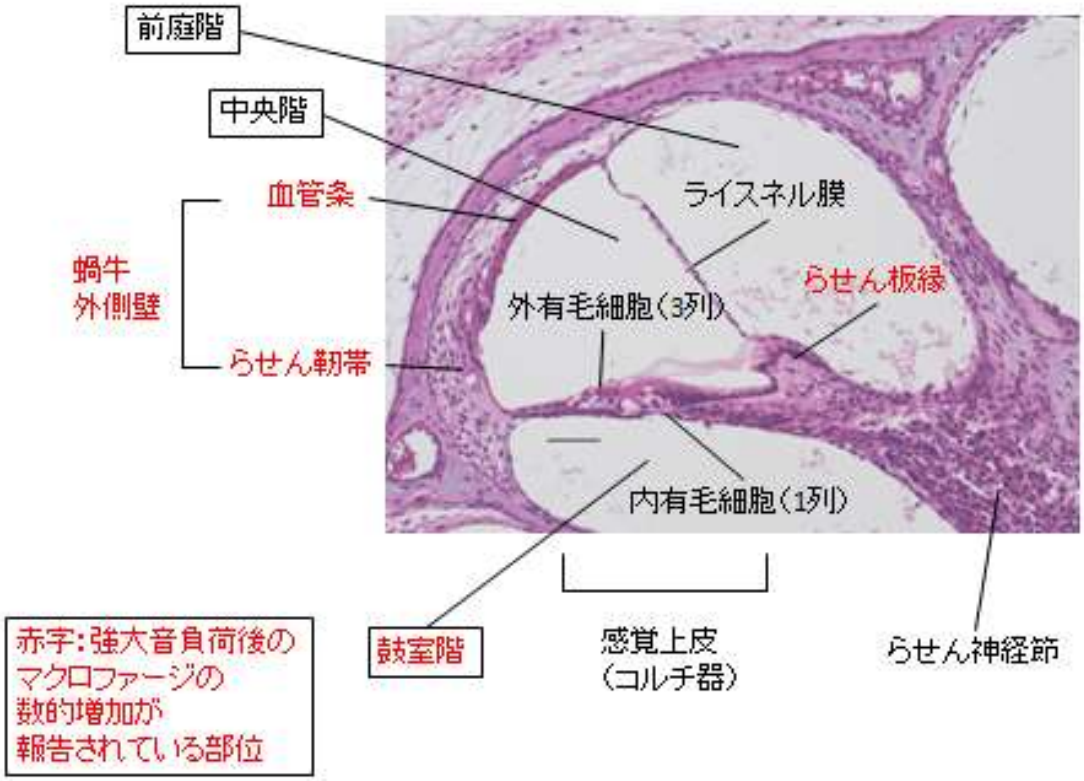
前庭階
中央階
血管条
蝸牛
外側壁
らせん靭帯
ライスネル膜
らせん板縁
外有毛細胞（3列）
内有毛細胞（1列）
鼓室階
感覚上皮
（コルチ器）
らせん神経節
赤字：強大音負荷後の
マクロファージの
数的増加が
報告されている部位

図　蝸牛の構造

第 1 部　『クロドロン酸抱合リポソーム投与による騒音性難聴の障害軽減』

1.1　序文（研究の目的）

以上のように、蝸牛に定常的に存在するマクロファージは、生体の聴覚伝導の維持に重要な役割を果たしていることが先行研究で明らかにされていたが、騒音性難聴の病態において蝸牛に侵入する細胞群、とりわけマクロファージは炎症促進的であるのか、炎症収束的な役割を果たすのかは従来の研究からは明らかではなかった。そこで私は、強大音負荷を加えたのちに、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することとした。

強大音曝露後、比較的早期に蝸牛ではマクロファージや単球の遊走に関わる幾つかのケモカインの発現誘導がみられる。しかしながら、騒音性難聴の病態ではどの遊走シグナルを阻害することでマクロファージや炎症性単球の蝸牛への侵入を阻害できるのかは、先行研究からは明らかではない。一般的には炎症局所へ遊走するマクロファージ・単球は CCR2 を発現する細胞群であるが、CCR2 欠損マウス（*Ccr2*$^{-/-}$マウス）を用いた強大音負荷実験では、強大音負荷後に蝸牛で増加する炎症細胞数は野生型マウスと同等であり、有毛細胞死は *Ccr2*$^{-/-}$マウスで有意に増加した[31]。また、fractalkine receptor の CX3C chemokine receptor 1（CX3CR1）が、内耳障害モデ

ルでのマクロファージの蝸牛への侵入の程度に影響を及ぼす、という報告がある。CX3CR1 欠損マウス（*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$）[35]に対してアミノグリコシド系抗菌薬の kanamycin を投与する薬剤性難聴モデルでは、薬剤投与後のマクロファージの蝸牛への侵入が増加し、外有毛細胞喪失率の増加を認めた[36]。その一方で、同一研究グループによる CX3CR1 欠損マウスを用いた DT 誘導性の有毛細胞死モデル（*Pou4f3*^{DTR} マウス）では、マクロファージの蝸牛への侵入が 60%程度減少し、らせん神経節細胞の生存率が低下した[32]。検討した疾患モデルによって、CX3CR1 シグナルはマクロファージの蝸牛への侵入を正負いずれにも作用する、という結果であった。

そこで、個々の遊走シグナルを阻害するのではなく、蝸牛に侵入するはずであったマクロファージ群そのものを除去する戦略を採用した。Zhang らの用いた *Cd11b*^{DTR} トランスジェニックマウス[27]は DT 誘導性にマクロファージを除去することができる。また、LysM および Csf1r という 2 つのマクロファージ・単球系マーカーを組み合わせることで特異性を高めた *Lyz2*^{Cre} *x Csf1r*$^{lsl\text{-}DTR}$ マウス[37]も DT 誘導性にマクロファージを除去することができる。これらの遺伝子改変動物を用いる戦略以外にも、薬剤投与により同様の目的が達成できる可能性があった。すなわち、クロドロン酸抱合リポソーム[38]を静脈内に in vivo 投与することで肝臓・脾臓などの臓器の他、血中を循環するマクロファージ・単球を除去することができる。さらに、抗 Colony stimulating factor 1 receptor; CSF1R 抗体ないし阻害剤[39], [40]は肝臓、腎臓、腹

腔そして中枢神経系などいくつかの臓器において常在マクロファージを除去できると報告されていることから、これらの手法により内耳に関連するマクロファージ・単球を除去し、それらの果たす機能を実証できる可能性があった。

そこで私は、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て、聴覚機能の強大音に対する感受性の変化を、そしてマウス側頭骨の薄切切片を用いた組織解析を行うことで強大音に対する組織障害の感受性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、先行研究が示すような強大音負荷後の炎症早期相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。

1.2　方法

1.2.1　マウス

マウスは 6-10 週齢の♀の野生型 C57BL/6J（日本クレア)を用いた。マウスを用いた動物実験は東京大学医学系研究科動物実験委員会より実験の倫理承認（医-P16-138）を受け、東京大学動物実験実施規則に従って行った。

マクロファージ除去し、聴覚閾値上昇の計測と組織解析を行う実験には、クロドロン酸抱合リポソームを投与したマウス（n = 7)、コントロールリポソームを投与したマウス（n = 7）の合計 14 匹を使用して解析した。クロドロン酸抱合リポソームを投与したマウスには強大音負荷後 14 日までに死亡したもの（n = 4）および瀕死の状態となったもの（実験開始時より 30%以上の体重減少したもの、n = 1）が存在するが、いずれも死因は不明であり、これらのマウスより得られたデータは解析からは除外した。なお、コントロールリポソームを投与したマウスには強大音負荷後 14 日までに死亡したもの、または瀕死の状態となったものはいなかった。

その他、強大音負荷を行わずに、クロドロン酸抱合リポソームを投与した 2 日後に側頭骨を摘出したマウス（n = 8）およびコントロールリポソーム投与した 2 日後に側頭骨を摘出したマウス（n = 8)、クロドロン酸抱合リポソームを投与した 2 日後に強大音を負荷して 3 時間後に側頭骨を摘出したマウス（n = 6)、コントロールリポソーム投与した 2 日後に強大音を負荷して 3 時間後に側頭骨を摘出したマウス（n = 6）

の合計 28 匹を、組織解析と遺伝子発現解析に用いた。

1.2.2　マクロファージ除去

0.2 mL のクロドロン酸抱合リポソーム Clophosome-N（FormuMax Scientific）を強大音負荷を与える 2 日前に尾静脈投与し、0.1 mL の同薬剤を強大音負荷後 2 日に投与した。投与量は製造者のプロトコルに依拠した。強大音負荷前の薬剤投与は定常状態の蝸牛マクロファージを枯渇する可能性も考慮して投与を決定した。負荷後 2 日の薬剤投与は、負荷後 3－7 日の炎症後期相に蝸牛内へと侵入する炎症細胞の数的増加のピークが生じることを念頭に、投与を決定した（考察の項を参照）。対照群のマウスには、PBS を含有した中空コントロールリポソーム Plain Control Liposomes for Clophosome（FormuMax Scientific）を、同用量かつ同じ投与スケジュールにて投与した。

1.2.3　強大音負荷

強大音負荷にあたり、1 匹のマウスを 1 つの鉄製のケージ（20 × 12 × 7 cm）に入れ、騒音箱内に留置した。強大音負荷の条件は、4 kHz 中心のオクターブバンドノイズを用いて強度 121 dBSPL で 4 時間曝露した。強大音をオージオメーター（AA-61B; リオン）、デュアルチャネルプログラマブルフィルタ（3624; NF）およびパワーアンプ（IP-600D; TOA）にて生成し、コンプレッションドライバー（HFD-261-8; TOA）

を用いて再生した。実験するに当たり、強大音負荷の騒音箱内での均一性や安定性を確認する目的で、校正器（NC-74; リオン）にて校正したコンデンサーマイクロフォン（UC-31; リオン）および騒音振動計測システム（UN-14; リオン）を用いて、騒音箱内の複数個所で強大音のレベルを計測した。

1.2.4 ABR（Auditory brainstem response）計測

ABR （Auditory brainstem response）を記録する際の音刺激は 4 kHz、8 kHz、16 kHz、31.25 kHz のトーンバースト音を用いて、誘発電位検査装置（Neuropack MEB-2208; 日本光電）を用いて防音室内にて計測した。ABR 計測前には耳鏡を用いて、マウスの鼓膜が中耳炎を起こしていないことを確認した。頭頂部（活性電極）、左耳後部（基準電極）および左耳後部（外側・接地電極）の皮下に合計 3 本の針電極を刺入した。刺激音は増幅器（TA-FE400R; Sony）で生成し、左耳から 13.5 cm 離れた位置に設置したスピーカー（FT200D; Fostex）から再生した。刺激音の反復周期は 17Hz とし、立ち上がり時間は 1 ミリ秒、持続時間は 3 ミリ秒、立ち下がり時間は 1 ミリ秒とした。記録用フィルタ帯域は 100-3000 Hz とし、加算回数は 500 回にて平均化した。ABR は 5dB 間隔で計測し、聴覚閾値は、再現性ある波形が得られる最小の刺激強度とした。強大音負荷前と負荷直後、1 日後、7 日後および 14 日後の ABR 閾値（4 kHz、8 kHz、16 kHz、31.25 kHz）を測定し、その変化を検討した。一過性聴覚閾値上昇および恒久的聴覚閾値上昇は以下のように定義して、算出した。

一過性聴覚閾値上昇(dB) = 強大音負荷直後の聴覚閾値 − 負荷前の聴覚閾値.

恒久的聴覚閾値上昇(dB) = 強大音負荷 14 日後の聴覚閾値 − 負荷前の聴覚閾値.

先述した騒音箱内での騒音レベルの確認と同様に、校正器（NC-74）にて校正したコンデンサーマイクロフォン（UC-31）および騒音振動計測システム（NA-42; リオン）を用いて、防音箱内の所定の位置でのスピーカーの音響レベル（純音）を事前に計測した。

1.2.5 組織解析

マウスを深麻酔の上、断頭し、蝸牛を摘出した。摘出蝸牛を 10%ホルマリンに 2 時間浸けた後、10%EDTA（ethylenediamine tetraacetic acid）で 1 週間以上脱灰の上、パラフィン包埋とした。蝸牛軸に平行となるように厚さ 4 μm でスライスし、MAS コートスライドグラス（Matsunami Glass）に進展、接着させ、ヘマトキシリン・エオジン染色（H&E 染色）および免疫染色に用いた。

免疫組織染色では、キシレン及びエタノールにより脱パラフィン、親水化の上、S1700 Target Retrieval Solution （Agilent Technologies）を用いてオートクレーブ法にて 121℃10 分間抗原賦活化を行った。3%過酸化水素水に室温で 10 分間浸透させることにより内因性ペルオキシダーゼ活性除去を施した後、phosphate buffered saline; PBS 溶液で数回洗浄した。2%ウシ血清アルブミンで室温で 30 分間ブロッキングし、1 次抗体はマクロファージマーカーF4/80 に対するウサギ抗 F4/80 抗体 （1:200

dilution; SP115; Spring Bioscience）を使用し、4℃で一晩静置した。PBS で洗浄した後、2 次抗体は、抗ウサギペルオキシダーゼ結合抗体（Histofine Simple Stain MAX-PO (R); Nichirei）を用いて室温で 50 分反応させた。PBS で洗浄した後、ペルオキシダーゼ反応は diaminobenzidine; DAB 基質（Simple Stain DAB; Nichirei）を用いて可視化した。その後蒸留水で洗浄し、エタノールおよびキシレンにて脱水、透徹し、非水溶性封入剤を用いて封入した。

1 蝸牛当たり 15 切片を H＆E 染色、5 切片を F4/80 染色した。これらの切片から、それぞれの蝸牛の代表値を算出した。蝸牛は頂回転下方、基底回転上方および基底回転下方に分けて、それぞれ内有毛細胞喪失率、外有毛細胞喪失率、血管条密度および F4/80 陽性細胞数を光学顕微鏡（BZ-X700; Keyence）下でカウントした。内外有毛細胞は、細胞核が観察できない場合に喪失と判定し、その喪失率を計算した。

血管条の密度は、40x objective のデジタル画像上で ImageJ ソフトウエア (http://imagej.nih.gov/ij) を用いて、血管条をトレースしたうえで以下の式を用いて算出した。

$$\text{血管条密度}\quad (\mathrm{a.u.}) = -100\frac{\text{血管条の Gray level}-\text{同面積の空白部位の Gray level}}{\text{トレースした血管条の面積}}.$$

F4/80 陽性細胞はデジタル画像上で蝸牛回転ごとにカウントした。

1.2.6　定量的 RT-PCR（quantitative real-time polymerase chain reaction）

蝸牛組織からのトータル RNA 抽出は Nucleo Spin RNA kit (Takara Biotechnology)

を用いて添付のプロトコルに従い行った。相補的 DNA（cDNA）の合成は PrimeScript RT Master Mix (Takara Biotechnology)を用いた。qPCR 解析には SYBR Premix Ex Taq II （Takara Biotechnology）用いて、ABI Prism 7500 Sequence Detector system (Thermo Fisher Scientific) で解析した。相対的定量のため ΔΔCt 法を用いた。各遺伝子の発現量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH 遺伝子の発現量で割ることにより、補正した。本研究において使用したプライマーの配列は表 1 のとおりである。

1.2.7　統計処理

統計解析には JMP 9 (SAS institute, Inc.)を使用した。一過性聴覚閾値上昇、恒久的聴覚閾値上昇および蝸牛の mRNA 発現は平均値＋標準誤差で、内外有毛細胞喪失率および血管条密度は平均値＋標準偏差で、F4/80 陽性細胞数は各群の中央値、四分位数範囲で表した。一過性聴覚閾値上昇および恒久的聴覚閾値上昇のグループ間比較は Two-way ANOVA, post hoc Student t-test で、内外有毛細胞喪失率および血管条密度のグループ間比較は Student t-test で、F4/80 陽性細胞数のグループ間比較は Mann-Whitney U test で、蝸牛の mRNA 発現のグループ間比較は 2-way ANOVA test を用いた。

表１　qPCR　プライマー配列

遺伝子	配列	
	Forward 鎖	Reverse 鎖
Gapdh	5’-TTTGTGATGGGTGTGAACCA-3’	5’-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3’
Il6	5’-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3’	5’-TTTCCACGATTTCCCAGAGA-3’
Il1b	5’-TGAAATGCCACCTTTTGACA-3’	5’-CTTCTCCACAGCCACAATGA-3’
Tnf	5’-CCCCACTCTGACCCCTTTAC-3’	5’-CACTGTCCCAGCATCTTGTG-3’
Ccl7	5’-TCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3’	5’-ATGCCCTTCTTTGTCTTGAA-3’
Ccl5	5’-CCCTCACCATCATCCTCACT-3’	5’-CCACTTCTTCTCTGGGTTGG-3’
Vcam1	5’-GAAATGCCACCCTCACCTTA-3’	5’-AGTCACAGCCAATAGCAGCA-3’

1.3　結果

1.3.1　クロドロン酸抱合リポソーム静脈内投与による聴覚障害の軽減

先行研究では C57BL/6J マウスは強大音への感受性が高いと報告される[41]。図 1.1 に示すように、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。図 1.2 に示すように、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）。図 1.3 に示すように、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（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 7、対照群 n = 7；Two-way ANOVA, $p < 0.05$ post hoc Student t-test, $*p < 0.05$）。用いた音刺激が 4 kHz 中心の octave band noise であり、その主たる刺激部位を中心に防御したという結果であった。

図 1.4 (a, b)は、強大音負荷後 14 日の時点での対照群およびクロドロン酸抱合リポソーム投与群の代表的な薄切切片（H&E 染色）である。図 1.4 (c)に示すように、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（Student-t tests, *p < 0.05）。周波数域を踏まえると、上記 ABR の結果とも整合的であった。その一方で、図 1.5 および図 1.6 に示すように、内有毛細胞の喪失率および血管条の密度を計測したところ、頂回転下方から基底回転のいずれにおいても両群で有意差は認めなかった。

1.3.2　クロドロン酸抱合リポソーム静脈内投与による蝸牛 F4/80 陽性細胞数の変化

図 1.7 (a, b)は、強大音負荷後 14 日の時点での対照群およびクロドロン酸抱合リポソーム投与群の代表的な F4/80 染色像である。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。図 1.7 (c)に示すように、強大音負荷により、この血管条の 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対照群と比較し、血管条の F4/80 細胞数は有意に少なかった（Mann-Whitney U test , **p < 0.01, ***p < 0.001）。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。図 1.8 に示すように、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（Mann-Whitney U test , **p < 0.01）。

1.3.3　クロドロン酸抱合リポソーム静脈内投与による蝸牛でのサイトカイン・ケモカイン・血管内皮接着分子の mRNA 発現への影響

図 1.9 および図 1.10 に、代表的な炎症性サイトカイン *Il1b*、*Il6* および *Tnf* 、ケモカイン *Ccl7*、 *Ccl5 (Rantes)*および血管内皮接着分子 *Vcam1* の強大音負荷前後の mRNA の発現変化を示す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 12 蝸牛、対照群 n = 12 蝸牛）。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（2-way ANOVA test, *$p < 0.05$）。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群と対照群とで有意な発現量の変化は認めなかった。

1.4　考察

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（図 1.11）。すなわち、クロドロン酸抱合リポソームの投与により、恒久的聴覚閾値上昇が抑制され、外有毛細胞喪失率が減少した。本研究の重要点の一つとして、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うることが動物実験により示された点が挙げられる。

F4/80 染色を施すことにより、内耳におけるマクロファージ群の局在と動的変化を確認したところ、主として血管条に局在するマクロファージが、強大音負荷後に増加した。この増加はクロドロン酸抱合リポソーム投与により有意に抑制され、その主たる抑制部位が、ABR での聴覚閾値上昇を軽減させた周波数域および外有毛細胞脱落を予防した部位を含んでいる。この点からも、クロドロン酸抱合リポソーム投与による音響障害の軽減が、クロドロン酸抱合リポソーム投与によるマクロファージ・単球の侵入抑制と関連することが示唆された。本研究ではクロドロン酸抱合リポソームを強大音負荷 2 日前と負荷後 2 日で投与している。この投与スケジュールは、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複数の先行研究[28], [32], [33]、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[42], [43]も考慮して決定した。とりわけ、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が示されたと考えている。ただし、クロドロン酸抱合リポソームにより一過性に除去された末梢血単球は 48 時間程度で回復するとされるため、今回の投与プロトコルでは単球の浸潤抑制の期間が限定されており、特に負荷後 4 日以降では末梢血単球は正常水準にまで回復している可能性が高い点には留意が必要と考える。

強大音負荷前ではクロドロン酸抱合リポソームを用いても、血管条での F4/80 陽性細胞数に有意な変化は見られなかった。先述したように、中枢神経系には血液脳関門（BBB）と呼称されるなバリア[5]が存在し、内耳には blood labyrinth barrier（BLB）[6], [7]が存在する。クロドロン酸抱合リポソームの静脈内投与では BBB が存在するために、中枢神経系に存在するミクログリアや貪食細胞を除去し得ないとの報告[44]がある。BLB も BBB と同様に、分子量の大きい物質や炎症細胞の蝸牛内への侵入を阻止するため、クロドロン酸抱合リポソームは BLB を通過し得なかった、と考えた。その一方で、強大音は容易に内耳に物理的障害を与え、BLB もひとたび破壊されれば血中より障害物質が内耳に流入する。そのため、クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の血管条の F4/80 陽性細胞数の減少は、破壊された BLB をクロドロン酸抱合リポソームが通過して蝸牛の定常マクロファージに取り込まれること

で、定常マクロファージを除去し得た可能性も否定はできない。

先述したように、CCR2 欠損マウス（*Ccr2*$^{-/-}$マウス）を用いた騒音性難聴に関する先行研究では、野生型マウスと比較して有毛細胞死は増加したが、蝸牛への浸潤単球数に有意差は認めなかった[31]。本研究と同じく、マクロファージや炎症性単球に焦点を当てた研究ではあるが、その結果には差異が見られた。差異を生じた原因としては、（1）騒音性難聴での蝸牛への炎症細胞浸潤には CCR2 シグナルが決定的な役割を果たさない可能性、（2）本研究では強大音負荷前より定常的に蝸牛に存在するマクロファージは除去できなかったが、*Ccr2*$^{-/-}$マウスでは定常マクロファージの CCR2 の発現も見られないことから、CCR2 陽性の定常マクロファージが騒音性難聴の病態において保護的な機能を果たすという可能性、そして（3）強大音負荷後に蝸牛へと遊走した炎症性単球の一部には、CCR2 を発現することで炎症収束に寄与する一群が含まれている可能性などが考えられるが、より精緻な遺伝子改変動物を用いた今後の検証が必要であろう。

代表的な炎症性サイトカイン *Il1b*、*Il6* および *Tnf* 、ケモカイン *Ccl7*、 *Ccl5 (Rantes)* および血管内皮接着分子 *Vcam1* は、強大音負荷前後いずれの時点においても、クロドロン酸投与群と対照群とで有意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[18]、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。これは先述した強大音負荷前ではクロ

ドロン酸抱合リポソームを用いても、血管条での F4/80 陽性細胞数に有意な変化は見られなかった、という結果に整合的である。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。

本研究からは強大音負荷後に蝸牛へ侵入するマクロファージ群の炎症誘発機能が明らかとなったが、これらの結果は内耳にかかわる単核球系貪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である。その一方で、本研究の限界としては（1）強大音により誘導される、マクロファージ群を蝸牛へと遊走させる因子の特定がなされていない点、（2）F4/80 以外の細胞表面マーカーの発現による炎症細胞群の仔細な分類はなされていない点、（3）マクロファージのサブセットごとの機能の差を考慮せずに、全体としてマクロファージが炎症促進的であると結論付けた点などが挙げられる。成熟マウスの蝸牛は硬い骨組織に包まれており、技術的には難易度が高いと考えられるものの、トランスクリプトーム解析やフローサイトメトリー解析を組み合わせて更なる検討を行うことで、少数かもしれないが、特定のマクロファージのサブセットが創傷治癒反応を担っていることが明らかとなる可能性はあると考える。

今後の研究の展望としては、これまでにも内耳に存在するマクロファージの自然免疫応答に焦点を当てた解析が多く報告されているが、獲得免疫系への橋渡しがどのようになされるのか、とりわけ T 細胞や B 細胞応答への関与の程度やその制御機構の解

明が期待される[45]。興味深い症例報告として、騒音を契機に発症したと考えられる自己免疫性感音難聴が存在する[46]。さらに、騒音性難聴をはじめとした内耳障害モデルにおいて、より詳細な分子シグナルの解明を可能とする研究手法の選択や開発がなされる必要がある。適切な遺伝子改変動物や薬剤の使用のみならず、質量分析や次世代シークエンサーを組み合わせた多層的解析による新たな分子調節機構の探索も有益と考えられる[47]。加えて、側頭骨の深部に存在する heterogeneous なマクロファージを単一細胞レベル[48]で特徴づけるために、蝸牛組織の一細胞解析を容易に可能とするような個体動物のサンプル調整法の新規開発も望まれる。

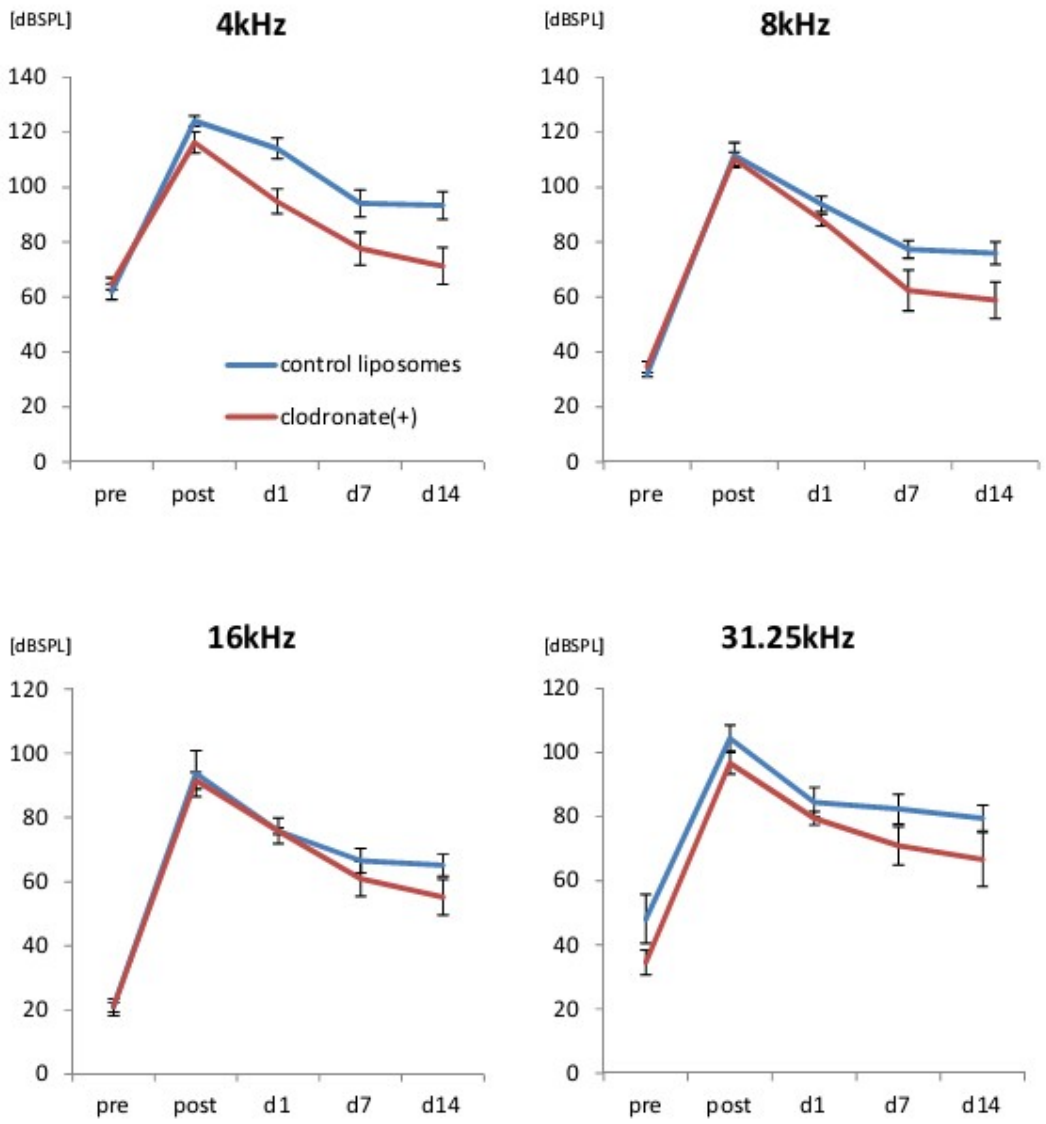

図 1.1　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の聴力閾値上昇の変化
C57B6 マウスにクロドロン酸抱合リポソームまたは、コントロールリポソームを投与し、強大音負荷を行った。強大音負荷前　(pre)、 強大音負荷直後（post)、負荷後 1 日（d1)、負荷後 7 日（d7）および負荷後 14 日（d14）の各時点において、ABR 計測を行い、4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の聴力閾値を計測した。

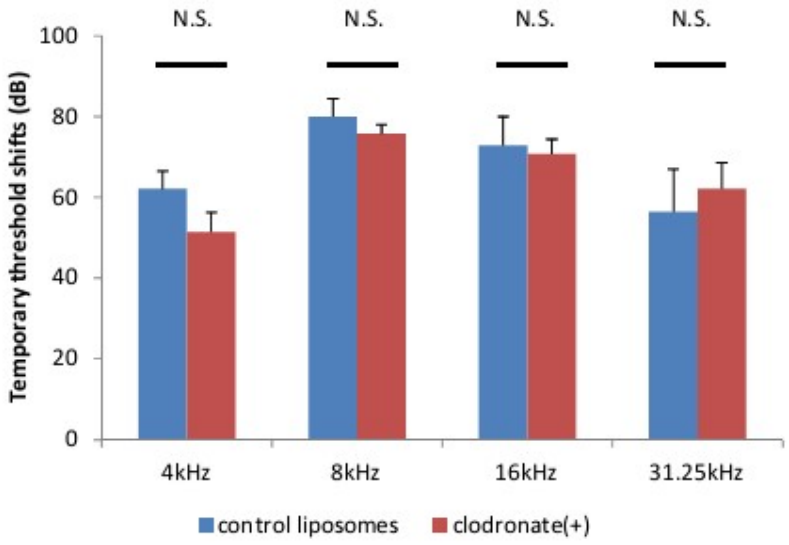

図 1.2　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の一過性聴覚閾値上昇の変化

クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の 4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の一過性聴覚閾値上昇を示す。データは平均値と標準誤差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 7、対照群 n = 7）。各周波数の一過性聴覚閾値上昇に両群で有意差は認めない（N.S. = not significant）。

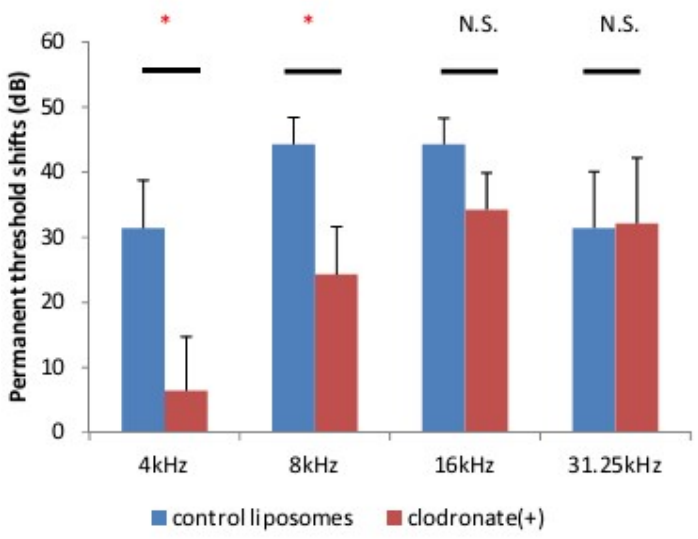

図 1.3　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の恒久的聴覚閾値上昇の変化

クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の 4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の恒久的聴覚閾値上昇を示す。データは平均値と標準誤差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 7、対照群 n = 7）。クロドロン酸抱合リポソーム投与群は対照群と比較し、聴覚閾値の上昇を 4 kHz と 8 kHz で有意に抑制した（Two-way ANOVA, $p < 0.05$ post hoc Student t-test, $*p < 0.05$, N.S. = not significant）。

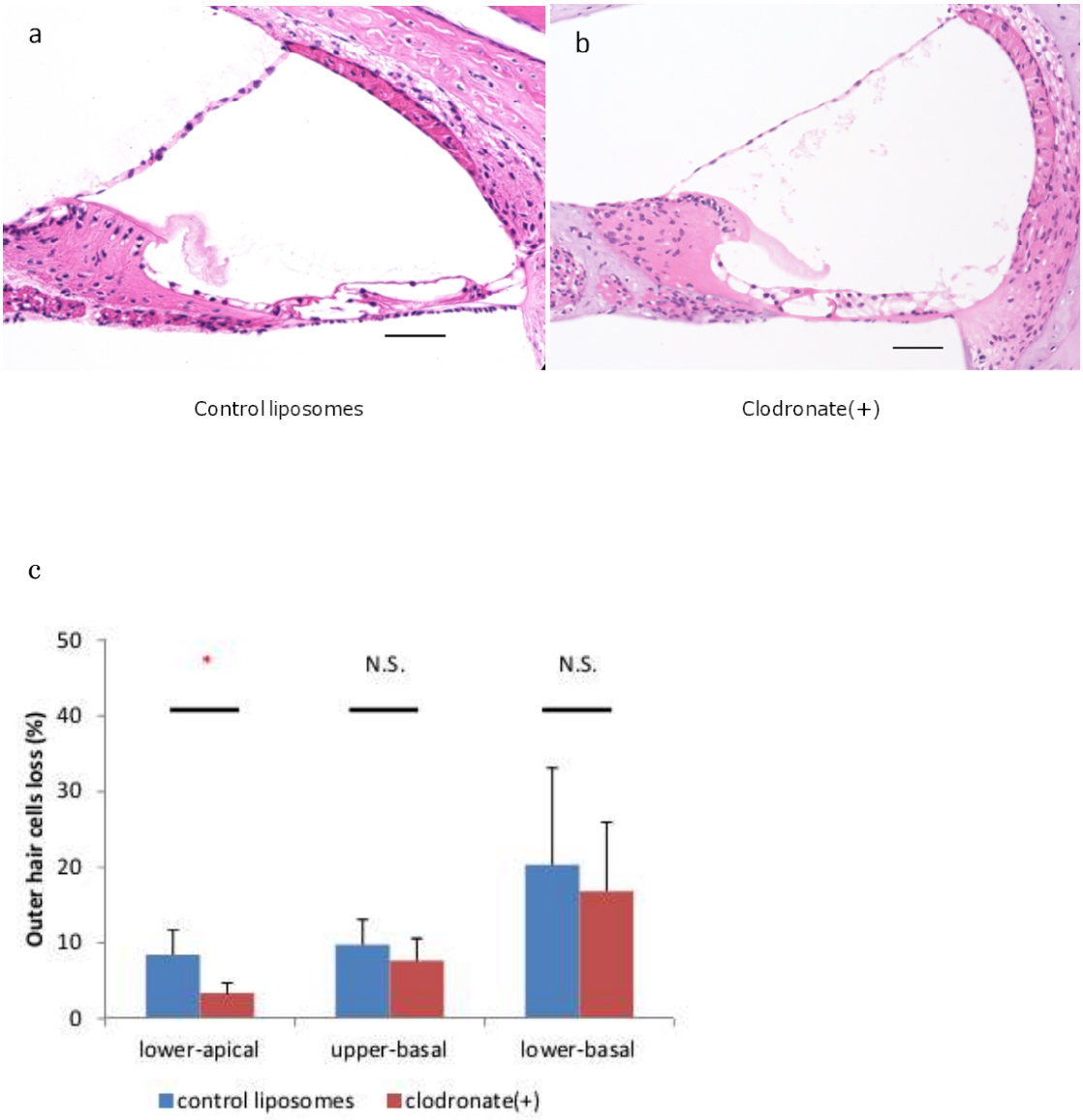

図 1.4　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の外有毛細胞喪失率の変化

(a) 対照群、および(b) クロドロン酸抱合リポソーム投与群の強大音負荷後 14 日の時点での、代表的な蝸牛の薄切切片（H&E 染色）を示す。スケール：50 μ m。

(c) クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷後 14 日の時点での、各回転（頂回転下方、基底回転上方および基底回転下方）の外有毛細胞の喪失率を示す。データは平均値と標準偏差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 5、対照群 n = 5）。クロドロン酸抱合リポソーム投与群は対照群と比較し、頂回転下方の外有毛細胞喪失率が有意に減少した（Student's t test , *$p < 0.05$, N.S.=not significant）。

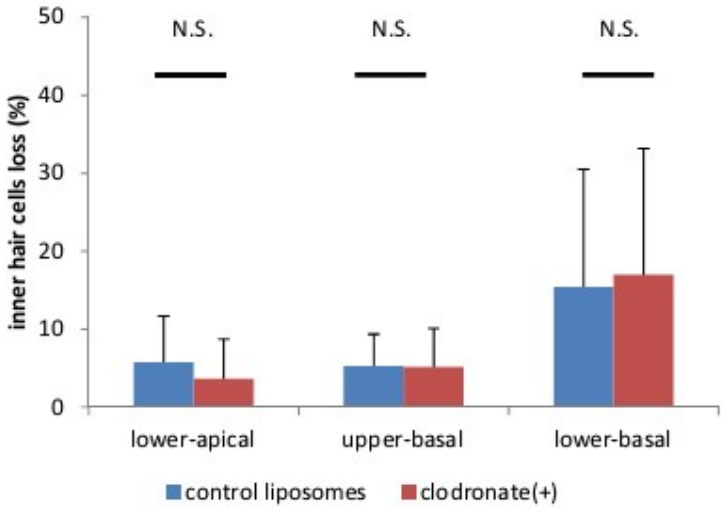

図 1.5　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の内有毛細胞喪失率の変化

クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷後 14 日の時点での、各回転（頂回転下方、基底回転上方および基底回転下方）の内有毛細胞の喪失率を示す。データは平均値と標準偏差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 5、対照群 n = 5）。各回転での内有毛細胞喪失率に両群間で有意差は認めない（N.S. = not significant）。

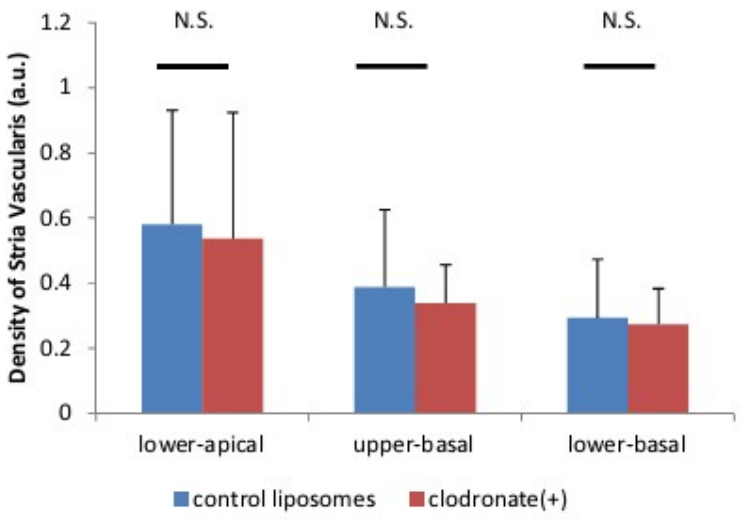

図 1.6　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の血管条密度の変化
クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷後 14 日の時点での、各回転（頂回転下方、基底回転上方および基底回転下方）の血管条密度を示す。データは平均値と標準偏差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 5、対照群 n = 5）。各回転での血管条密度に両群間で有意差は認めない（N.S. = not significant）。

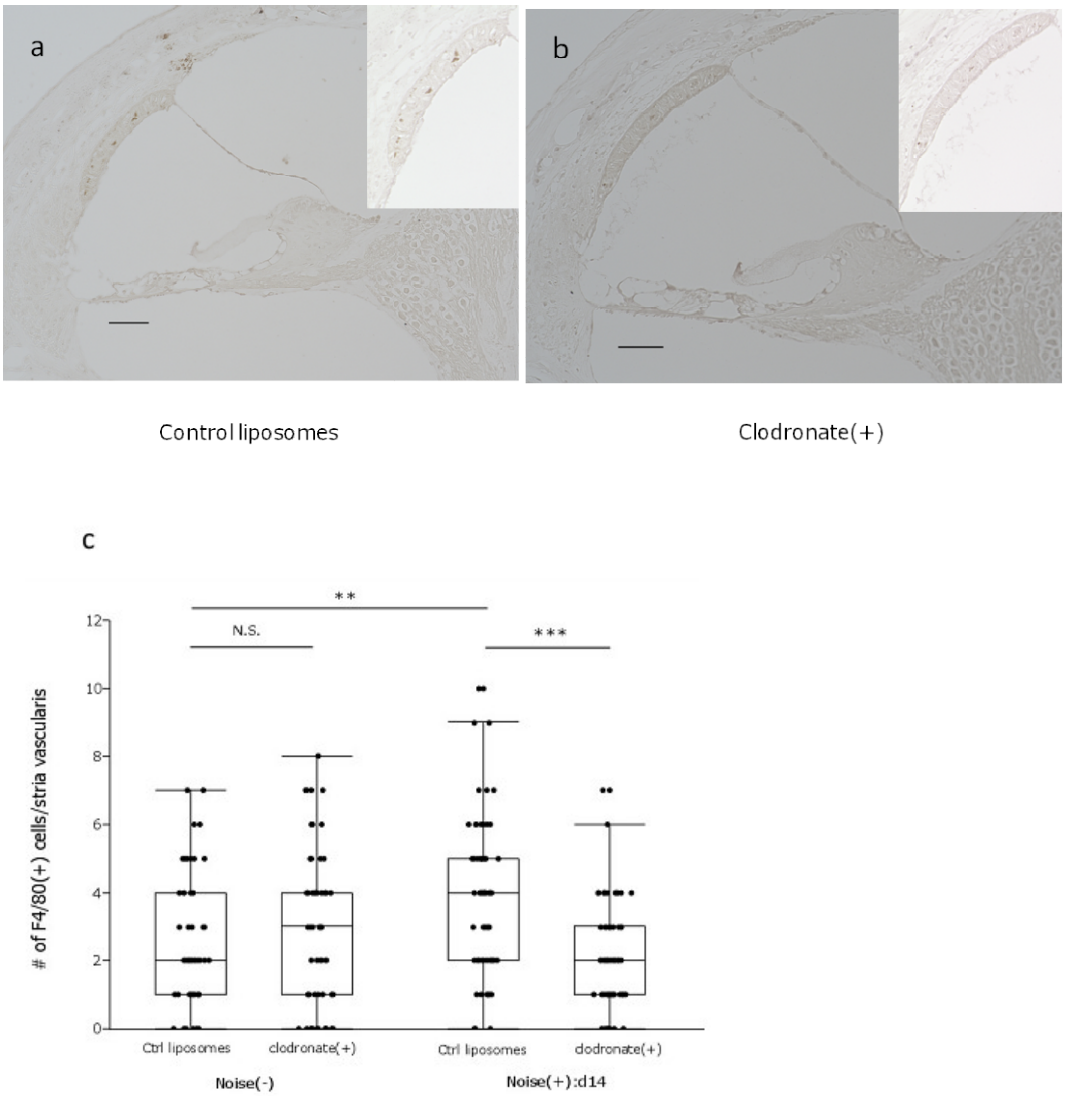

図 1.7　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷前後の血管条に存在する F4/80 陽性細胞数の変化

(a) 対照群、および(b)クロドロン酸抱合リポソーム投与群の強大音負荷後 14 日の時点での、代表的な蝸牛の免疫組織染色（F4/80 染色）を施した切片を示す。画像の右上に、血管条の強拡大を示す。スケール：50 μm。

(c) クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷後 14 日の時点での、血管条あたりの F4/80 陽性細胞数を示す。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値　最小値が示されている。(Mann-Whitney U test , **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, N.S. = not significant)

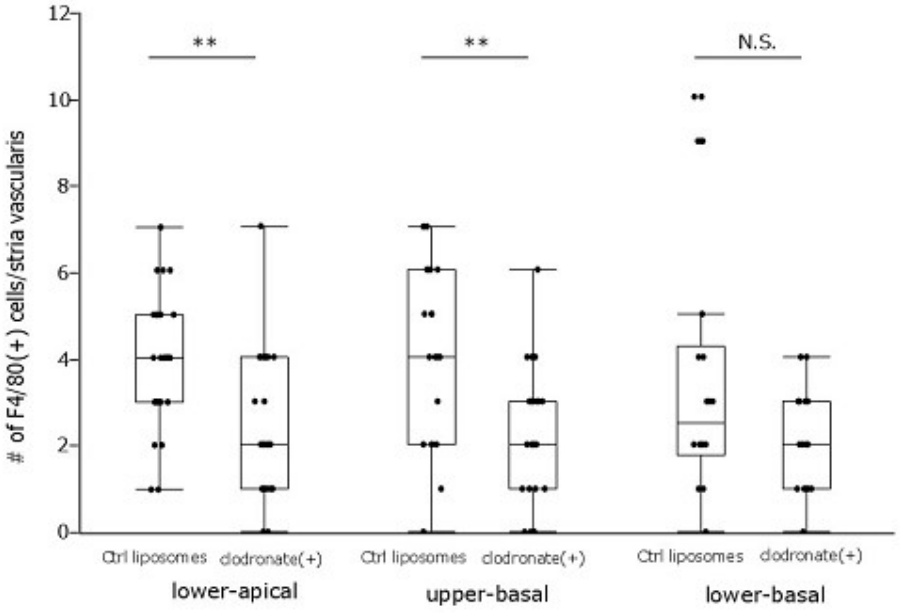

図 1.8　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の血管条に存在する F4/80 陽性細胞数の各回転（頂回転下方、基底回転上方および基底回転下方）ごとの変化

クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷後 14 日の時点での、各回転（頂回転下方、基底回転上方および基底回転下方）の F4/80 陽性細胞数を示す。データは箱ひげ図で示してあり、中央値と上下 75%値、最大値　最小値が示されている。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、血管条の F4/80 陽性細胞数は有意に減少した（Mann-Whitney U test , **$p < 0.01$, N.S. = not significant）

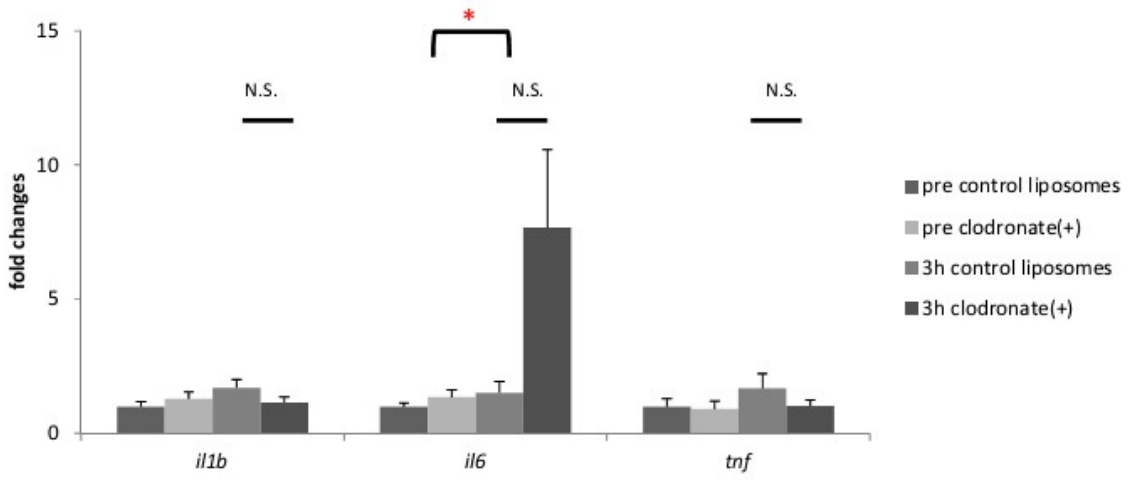

図 1.9　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の炎症性サイトカインの mRNA 変化

クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷前および負荷後 3 時間の時点での、*Il1b*、*Il6* および *Tnf* の mRNAs の発現量の変化を示す。データは平均値と標準誤差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 12 蝸牛、対照群 n = 12 蝸牛）。対照群の負荷前の発現量の平均値を 1 とした。*Il6* は強大音負荷前と比較し負荷後 3 時間で有為な発現上昇を認めたが（2-way ANOVA test, *$p < 0.05$）、いずれの炎症性サイトカインもクロドロン酸抱合リポソーム投与群と対照群とで有意な発現量の変化は認めなかった。

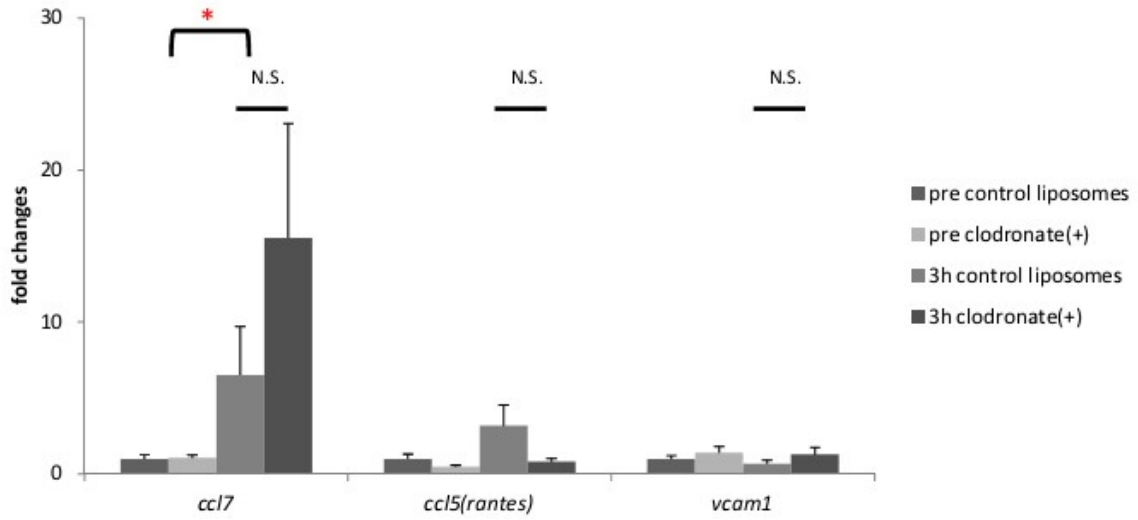

図 1.10　クロドロン酸抱合リポソーム投与による強大音負荷後の代表的なケモカインおよび血管内皮接着分子の mRNA 変化

クロドロン酸抱合リポソーム投与群および対照群の強大音負荷前および負荷後 3 時間の時点での、*Ccl7*、 *Ccl5* および *Vcam1* の mRNAs の発現量の変化を示す。データは平均値と標準誤差を表す（クロドロン酸抱合リポソーム投与群 n = 12 蝸牛、対照群 n = 12 蝸牛）。各回転での血管条密度に両群間で有意差は認めない。対照群の負荷前の発現量の平均値を 1 とした。*Ccl7* は強大音負荷前と比較し負荷後 3 時間で有為な発現上昇を認めたが（2-way ANOVA test, *$p < 0.05$）、いずれのケモカイン、血管内皮接着分子もクロドロン酸抱合リポソーム投与群と対照群とで有意な発現量の変化は認めなかった。

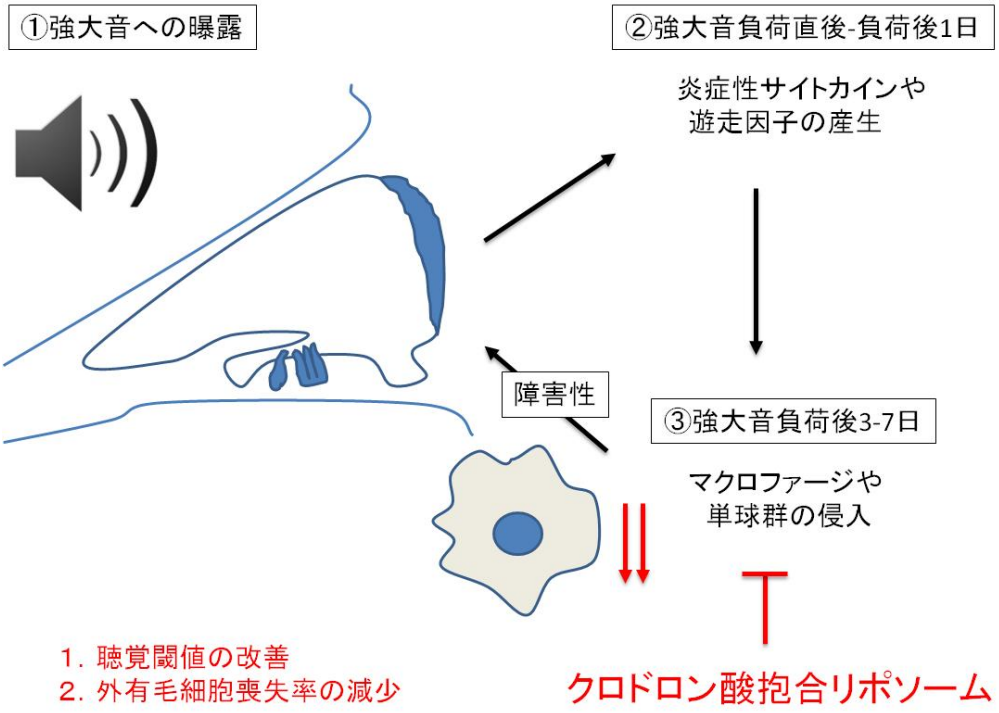

図 1.11　クロドロン酸抱合リポソーム投与による騒音性難聴の障害軽減（イラスト）

第２部　『騒音性難聴における IL-1β の機能』

2.1　序文（研究の目的）

第１部の実験結果より、騒音性難聴の障害後期相において、蝸牛に侵入するマクロファージは障害促進的に機能することが示唆された。マクロファージをはじめとする単核球系貪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[49]。代表的な炎症性サイトカインとして、IL-6、TNF、そして IL-1β が挙げられる。先行研究では、抗 IL-6 中和抗体（MR16-1）はマウスの音響障害モデルにおいて、聴力閾値上昇およびらせん神経節の細胞死を抑制した[33]。また、抗 TNF 抗体（etanercept）はモルモットを用いた音響障害モデルにおいて、聴覚障害を軽減させたとの報告[50]もある。さらに炎症性サイトカインの発現誘導に重要な PRRs の一つである、Toll-like receptor 4（TLR4）の欠損マウスは音響障害に抵抗を示す[51]。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-1β 分子に焦点を絞って、動物実験を検討することとした。

IL-1β 分子の前駆体である pro IL-1β（p31）はそのままでは分子活性を持たないが、caspase-1 や caspase-11（マウス）などのインフラマソームを構成する酵素により分子構造が切断されると、活性を持つ cleaved IL-1β（p17）となり、細胞外に放出され

て機能を発揮する[52]。ヒトの自己炎症性疾患である cryopyrin-associated periodic syndromes（CAPS）は、インフラマソームの中心的構成因子である NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3（NLRP3）の機能獲得型遺伝子変異が原因であり、インフラマソームおよび IL-1β 分子を含む、その下流分子の異常な活性化を生じさせて全身性炎症を引き起こす。CAPS は 100 万人に 1 人程度の発症頻度であり、いくつかの疾患サブタイプを有し、軽症のものから重症のものまで存在する。CAPS は発熱、関節炎、発疹、腎アミロイドーシス、髄膜炎や結膜炎など全身に多彩な症状を呈するが、聴覚障害はその臨床症状の一つである[53]。CAPS の確立した治療法として抗 IL-1β 抗体（canakinumab）[54]が用いられているが、小規模な臨床試験によれば、一部の CAPS 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-1β 抗体（anakinra）が聴覚障害の軽減に有効であることが報告されている[55], [56]。騒音性難聴の病態においても IL-1β 分子の発現上昇が報告されている。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-1β 分子を発現するという報告[57]がある。しかしながら騒音性難聴を含めて、自己炎症性以外の病態による感音難聴においても IL-1β 分子は障害促進的な役割を果たすと考えられていたが、この点については必ずしも明らかではなかった。先述のように IL-1β に対する分子標的薬はすでに上市されている。仮に、騒音性難聴の進行に IL-1β 分子が関与するのであれば、強大音への急性曝露後に聴覚保護的効果を得るために抗 IL-1β 抗体を使用する、ヒトに対する臨床研究の検討も可能と考えられる。

そこで本研究では、蝸牛における IL-1β 分子の発現細胞を同定、とりわけ蝸牛マクロファージが IL-1β 分子を発現するかどうかを検証した。また、強大音負荷により蝸牛の IL-1β 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。最後に、IL-1β 欠損マウス（*Il1b*$^{-/-}$）[58]を用いることにより、騒音性障害の病態形成、特に恒久的聴覚閾値上昇に IL-1β 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*$^{-/-}$マウスの聴覚解析を行うことで、IL-1β 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することとした。

2.2　方法

2.2.1　マウス

IL-1β ノックアウトマウス（*Il1b*$^{-/-}$）[58]は東京理科大学生命医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・岩倉洋一郎教授より供与を受け、我々の施設で繁殖させた。6-10 週齢の♀を用いた。恒久的聴覚閾値上昇の解析を行うために、野生型マウス（n = 6）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（n = 7）を使用した。これらのマウスは強大音負荷前（定常状態）の聴覚閾値測定にも用いた。その他、野生型マウス（n = 2）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（n = 2）を定常状態の聴覚閾値測定または組織解析に使用した。

図 2.1 および図 2.2 の野生型マウスを使用する実験には、6-10 週齢の♀の C57BL/6J (日本クレア)マウス、合計 7 匹を用いた。

動物実験は東京大学医学系研究科動物実験委員会より実験の倫理承認（医-P15-104）を受け、東京大学動物実験実施規則に従って行った。

2.2.2　組織解析

F4/80 と IL-1β の共染色では、 先述した F4/80 免疫染色と同様に、脱パラフィン、親水化ののち、オートクレーブ法による抗原賦活化を行った。1 次抗体はウサギ抗 F4/80 抗体 （1:200 dilution）およびマウス抗 IL-1β 抗体 （1:100 dilution; 3A6, Cell Signaling Technologies）を 4℃で一晩静置した。続いて 2 次抗体は、Alexa Fluor 568

結合ヤギ抗マウス IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific）および Alexa Fluor 488 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific）を使用し、室温 50 分反応させた。スライドを Vectashield mounting medium with 4'6-diamidino-2-phenylindole（Vector Laboratories, Burlingame）で封入し、カバーガラスをかけて、共焦点顕微鏡（A1; Nikon）で観察した。２次抗体の蛍光の漏れ込みの可能性も考慮し、連続する切片を用いて、２つの分子に対するそれぞれの単一抗体でも染色を行い、同一励起光によるそれぞれの像を観察することで、得られた共染色の像が蛍光の漏れ込みによるシグナルではないことを確認した。野生型および *Il1b*$^{-/-}$マウス由来の蝸牛サンプルを用いた、IL-1β 単色の免疫染色は、光学顕微鏡（BZ-X700）下で観察・撮像した。

2.2.3　ウエスタンブロット法

蝸牛組織からの総タンパク抽出は lysis buffer （CelLytic MT, Sigma-Aldrich）に protease inhibitor cocktail （Sigma-Aldrich）を添加して、添付のプロトコルに従い行った。タンパク濃度は Pierce bicinchoninic acid protein assay kit（Thermo Fisher Scientific）を使用して定量した。分子マーカーにはプレシジョン Plus プロテインデュアルエクストラスタンダード （#1610377, BIO-RAD）を使用した。サンプルを 15% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide ゲル（PAGEL, ATTO）を用いて電気泳動し、Immobilon-P メンブレン（Millipore, Billerica）に 定電流 165mA、35 分で転写した。メンブレンは 5% skim milk でブロッキングし、マウス抗 IL-1β 抗

体 （1: 1000 dilution; 3A6, Cell Signaling Technologies）または抗 β-actin 抗体（1:1000 dilution; MBL）を 3% skim milk に溶解した溶液とともにハイブリバックに入れて、4℃で一晩静置した。抗 IL-1β 抗体に対しては horseradish peroxidase 結合抗マウス 2 次抗体（1:1000 dilution; Abcam）を、抗 β-actin 抗体に対しては horseradish peroxidase 結合抗ウサギ 2 次抗体（1:1000 dilution; Amersham）を tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 溶液（TBST 溶液）に溶解して、メンブレンを同溶液とともにハイブリバックに入れて、室温で 1 時間反応させた。1 次抗体及び 2 次抗体反応後には、メンブレンを TBST 溶液で 1 回 5 分、合計 3 回振盪洗浄した。メンブレンの化学発光試薬には ECL prime （Amersham）を用いて、化学発光検出装置 LAS4000（GE）により検出した。発光検出を行ったメンブレンは Western BLoT Stripping Buffer（Takara Biotechnology）によりストリッピングした。ストリッピングの後は TBST 溶液で強く振盪洗浄し、ブロッキング処理を施した後、次の目的分子の 1 次抗体と反応させた。

2.2.4 強大音負荷および ABR 計測

強大音負荷および ABR 計測の方法については第 1 章の項に準ずる。

2.2.5 統計処理

統計解析には JMP 9 (SAS institute, Inc.)を使用した。恒久的聴覚閾値上昇は平均値

＋標準誤差で表した。恒久的聴覚閾値上昇のグループ間比較は 2-way ANOVA, post hoc Student t-test を用いた。

2.3　結果

2.3.1　蝸牛マクロファージの IL-1β の発現と強大音負荷による IL-1β 分子の活性化

野生型マウスに強大音を負荷し、負荷後 14 日で蝸牛を摘出して薄切切片を作成した。図 2.1 に示すように、薄切切片に抗 IL-1β 抗体と抗 F4/80 抗体で二重染色を施し、共焦点顕微鏡で観察すると、IL-1β と F4/80 をともに発現する細胞を血管条に認めた。ただし、共染色を示す細胞をさらに強拡大して観察したが、本来であれば細胞質内に存在する IL-1β 分子、細胞表面分子である F4/80 分子、そして核染色である DAPI はいずれも細胞全体に染色されていた。従って、今回の結果からはこれらの分子の、細胞レベルでのより精密な局在関係は判然としなかった。

次に、強大音負荷により IL-1β 分子の活性化（切断）が生じるかどうかを検討するために、強大音負荷前 （pre）、 強大音負荷直後（post）、負荷後 5 時間（5h）、負荷後 1 日（d1）、負荷後 4 日（d4）および負荷後 7 日（d7）の各時点でマウス蝸牛を摘出して総タンパクを調製し、抗 IL-1β 抗体を用いたウエスタンブロット法により IL-1β 分子のタンパク発現および活性化（切断）を確認した。図 2.2 に示すように、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-1β（p31）および cleaved IL-1β（p17）の発現が上昇する。興味深いことに、強大音を負荷する前の定常状態でも活性型 IL-1β の発現を認め、負荷直後に発現が上昇した後に負荷後 1 日の時点で、減弱する。以上の結果は、異なる個体から調整したサンプルを用いた追試を行い、そ

の再現性を確認している。なお、図 2.2 の結果では、負荷後 4 日の時点で活性型 IL-1β の発現が再度上昇しているが、この点に関しては再現性が認められなかった。

2.3.2　若齢 *Il1b*$^{-/-}$マウスの定常状態での聴覚および構造

続いて、若齢 *Il1b*$^{-/-}$マウスの側頭骨薄切切片を用いた形態解析および ABR 計測による聴力検査を行うことで、IL-1β 分子がマウスの正常な聴覚獲得に積極的な寄与をしているかどうかについて検討した。図 2.3 に示すように、実験に用いた若齢（6-10 週齢）の *Il1b*$^{-/-}$マウスは対照群である野生型と比較し、正常な蝸牛の構造を示す。*Il1b*$^{-/-}$マウスの蝸牛では IL-1β 分子が発現していないことを確認するために、*Il1b*$^{-/-}$マウスおよび野生型のマウスに強大音負荷し、負荷後 14 日で蝸牛を摘出して IL-1β 染色を施した。図 2.4 に示すように、野生型では血管条に IL-1β の発現が確認されるが、*Il1b*$^{-/-}$マウスでは同部位に IL-1β の有意な発現は見られなかった。図 2.5 に示すように、*Il1b*$^{-/-}$マウスは野生型と同等の聴覚閾値を示した（野生型マウス n = 6、*Il1b*$^{-/-}$マウス n = 9）。

2.3.3　*Il1b*$^{-/-}$マウスの強大音への感受性

最後に、*Il1b*$^{-/-}$マウスの聴覚機能の強大音に対する感受性を検討した。図 2.6 に示すように、*Il1b*$^{-/-}$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。図 2.7 に示すように、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）。図 2.8 に示すように、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*$^{-/-}$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*$^{-/-}$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（野生型マウス n = 6、*Il1b*$^{-/-}$マウス n = 7 ； Student t-test, $p > 0.05$）[59]。

2.4　考察

第 1 部に示したように、強大音負荷後に *Il1b* 遺伝子の有意な上昇は見られなかったが、IL-1β 分子のタンパクレベルでの発現上昇が確認された。これまでの先行研究では、強大音負荷により *Il1b* 遺伝子の誘導が報告[30]されてはいたが、コルチ器に限ると同遺伝子の有意な誘導が見られないという報告[51]も存在する。強大音負荷直後から、蝸牛では IL-1β 分子のプロセシング（切断）が見られ、活性化されていることが示された。先行研究には、(1) *Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ マウス（P19）から green fluorescent protein（GFP）陽性細胞を fluorescence activated cell sorting（FACS）を用いて単離すると GFP 陽性細胞でのみ *Nlrp3* 遺伝子の発現が見られること、(2) 野生型マウス（P3-P4）より蝸牛を摘出して in vitro で NLRP3 インフラマソームを活性化する lipopolysaccharide（LPS）＋adenosine triphosphate（ATP）にて逐次刺激することで、培養上清中に IL-1β 分子のプロセシングが確認できるとの報告[55]があるが、私が得た今回の研究結果からは、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-1β 分子のプロセシングが生じることが示された。機械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[60]。今後の研究課題として、どの DAMPs やインフラマソーム構成分子が、上記応答を担っているかを分子・細胞生物学的手法により明らかにしていくことが考えられる。

その一方で、*Il1b*$^{-/-}$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-1β 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-1β 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。近年、騒音性難聴に関する研究トピックスとして、cochlear synaptopathy という現象がある。これは、今回の研究に用いた強大音（121 dBSPL）より低いレベルの騒音に慢性的に曝露されることにより、聴覚閾値の上昇は生じないが、1 次聴神経細胞の神経終末、つまり有毛細胞との間のシナプス（ribbon synapse）に変性が生じる、という現象である[61]。今後の研究課題としては、（1）今回用いた強大音よりも低いレベルの音響（たとえば 100 dBSPL）を繰り返し負荷した場合でも IL-1β 分子のタンパク誘導や活性化は生じるのか、（2）IL-1β 分子は cochlear synaptopathy の病態形成に関与するのか、という 2 点を解明するものが考えられる。

序文で述べたように、IL-1β 分子の異常な活性化が関与するヒトの自己免疫性疾患による聴覚障害には IL-1β 阻害剤が有効との報告がある。従って、少なくとも自己炎症ないし自己免疫性の病態では、IL-1β 分子は内耳の炎症促進的に機能する。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-1β 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。1つのアイデアとしては、先述したヒトの CAPS の疾患モデルマウスであり、NLRP3 インフラマソーム変異をノックインしたマウス（neonatal-onset multisystem inflammatory disease; NOMID マウス）[62]を用いて、恒常的に NLRP3 インフラマソームが活性化したマウスの強大音への感受性を確認する、というものが挙げられる。しかしながら、同マウスは正常な成長が見られず、生後 2-3 週で致死となるため、成熟した個体での聴力検査は不可能である。別のアイデアとしては、内在性の IL-1 受容体アンタゴニストである interleukin-1 receptor antagonist; IL-1ra の欠損マウス[58]を用いて、IL-1 シグナリングを増強した状態での強大音への感受性を比較検証する、といった手法が考えられる。

さらに今後の研究として、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、騒音性難聴と共通する cochlear synaptopathy が関与すると考えられている感音難聴である、老人性難聴の研究を検討している。具体的には、C57BL/6J マウス系統は cadherin23 遺伝子の *Ahl* アレルに原因を有する老人性難聴マウスモデルであるが[63]、C57BL/6J 系統の *Il1b*$^{-/-}$マウスを長期飼育し、月齢ごとの ABR 計測を行う予定である。この実験により、老人性難聴のプロセスに炎症性サイトカインが関与しているのか否かという科学的に重要な知見が得られる。先述した抗 IL-1β 抗体（canakinumab）は自己炎症性疾患のみならず、心筋梗塞後の心血管イベントを抑制する効果も有することが近年の大規模な臨床研究で示されている[64]。心血管イベントと同様に、老人性難聴の病態

形成・進行においても炎症性サイトカインが積極的に関与するとの基礎研究の結果が蓄積することで、ヒトを対象とした臨床研究も可能となるであろう。*Il1b*$^{-/-}$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[65]、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。

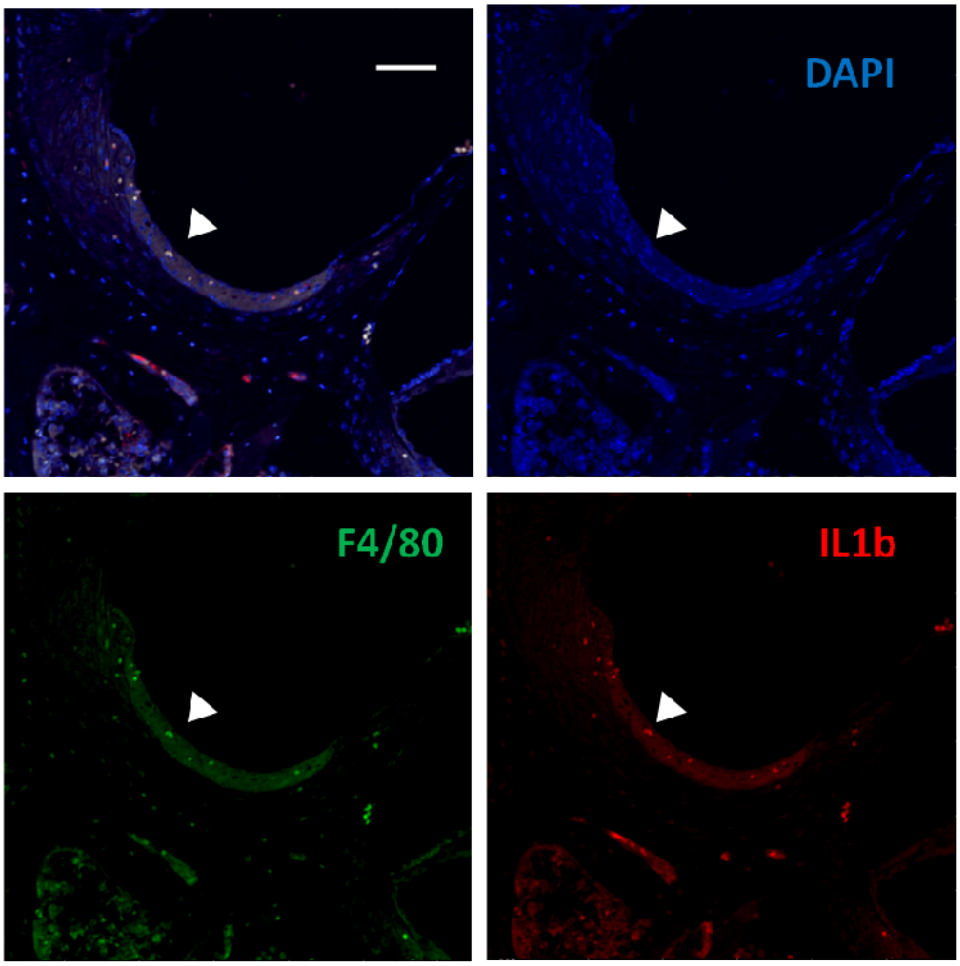

図 2.1　強大音負荷後 14 日の C57BL/6J マウス蝸牛の IL-1β および F4/80 の発現
野生型 C57BL/6J マウスに強大音負荷し、負荷後 14 日の時点で蝸牛を摘出し、薄切切片を作成した。同切片に抗 F4/80 抗体（緑）および抗 IL-1β 抗体（赤）を用いて共染色を施し、DNA を 4'6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）で染色した。スケール：50 μm。

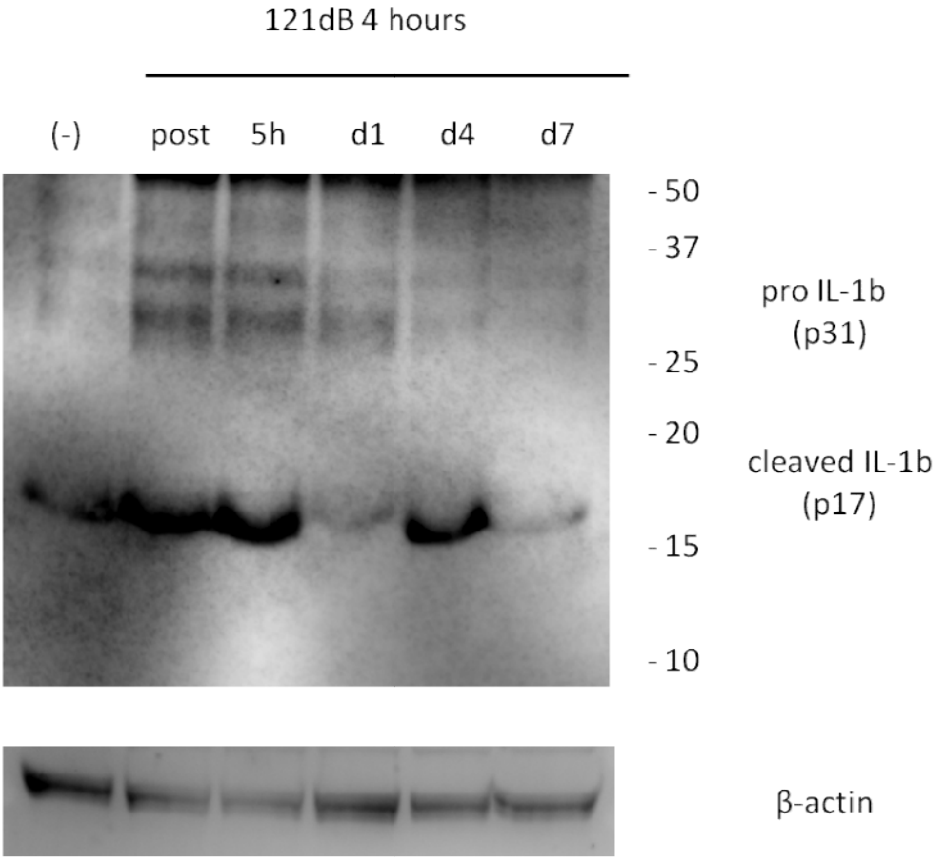

図 2.2　強大音負荷前後の C57BL/6J マウス蝸牛の前駆型 IL-1β および活性型 IL-1β の発現の変化

野生型 C57BL/6J マウスを強大音負荷し、強大音負荷前 （pre）、 強大音負荷直後（post）、負荷後 5 時間（5h）、負荷後 1 日（d1）、負荷後 4 日（d4）および負荷後 7 日（d7）の各時点で蝸牛を摘出し、それぞれのサンプルにおける IL-1β（前駆体及び活性体）の発現を抗 IL-1β 抗体を用いてウエスタンブロット法にて検出した。右列の数字は分子量を示す。ローディングコントロールとして β-actin を採用した。

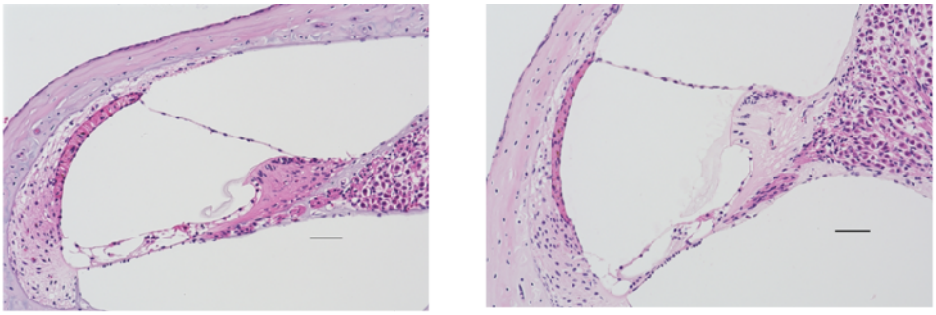

図 2.3　*Il1b*$^{-/-}$マウスと野生型マウスの蝸牛構造の比較
野生型マウス（WT）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（KO）の代表的な蝸牛の薄切切片（H&E 染色）を示す。*Il1b*$^{-/-}$マウスは野生型と同様の蝸牛構造を示した。スケール：50 μ m。

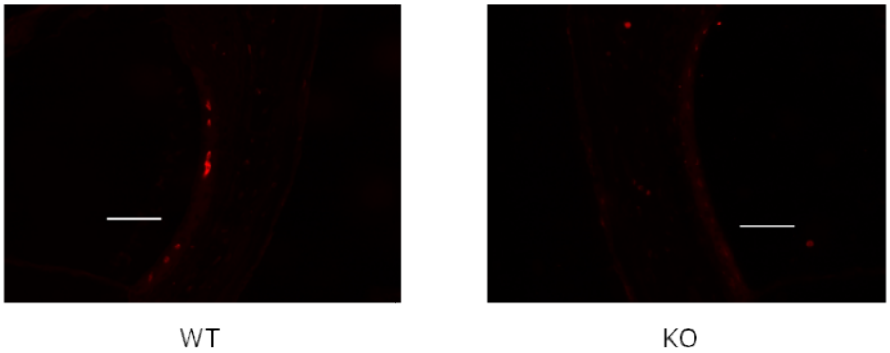

図 2.4　*Il1b*$^{-/-}$マウスと野生型マウス蝸牛の IL-1β の発現の比較
野生型マウス（WT）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（KO）に強大音負荷し、負荷後 14 日の時点で蝸牛を摘出し、薄切切片を作成した。同切片に抗 IL-1β 抗体（赤）を用いて免疫染色を施し、血管条での IL-1β の発現を光学顕微鏡下に観察した。上記画像は同一の露光時間（0.05 秒）で撮像した。スケール：50 μ m。

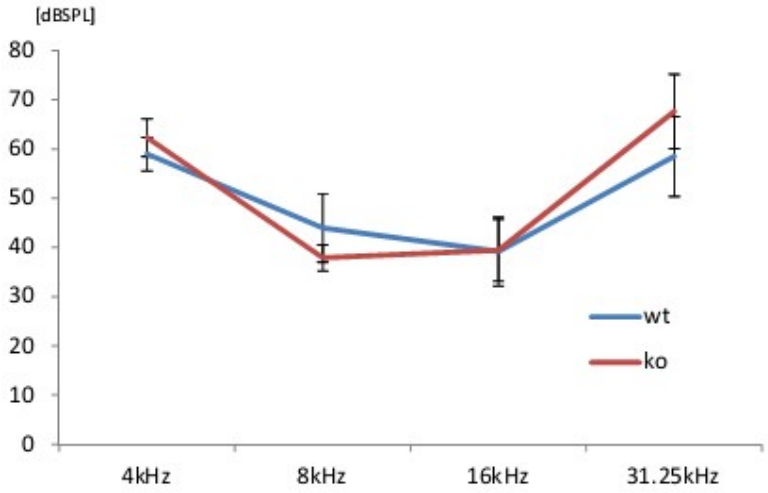

図 2.5　*Il1b*$^{-/-}$マウスの定常状態の聴力閾値
若齢の野生型マウス（wt）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（ko）を用いて、4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の聴力閾値を ABR により計測した。各周波数の聴力閾値に両群で有意差は認めない（野生型 n = 6、*Il1b*$^{-/-}$マウス n = 9）。

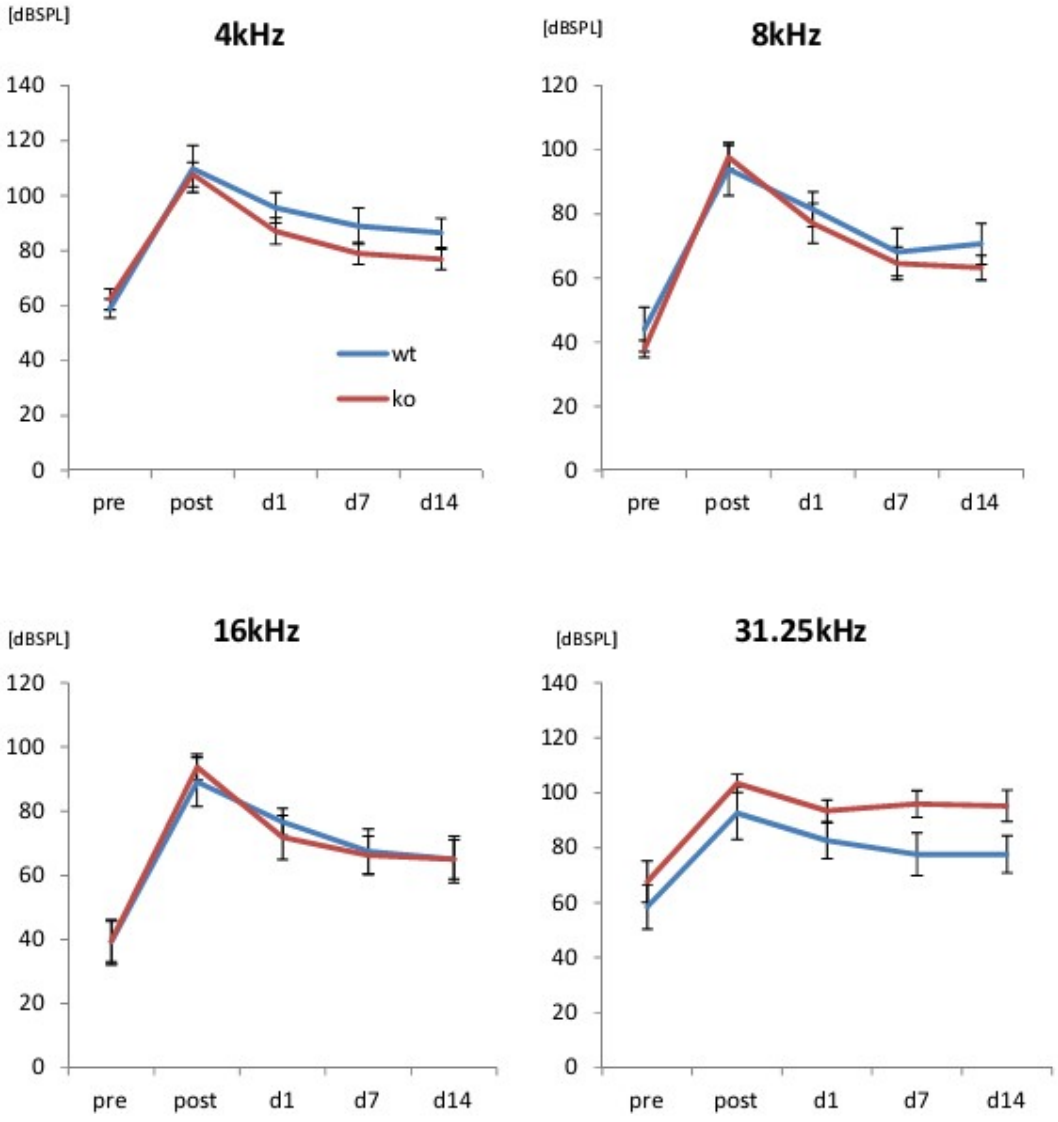

図 2.6　*Il1b*$^{-/-}$マウスの強大音負荷前後の聴力閾値の推移
野生型マウス（wt）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（ko）に、強大音負荷を行った。強大音負荷前　(pre)、 強大音負荷直後（post)、負荷後 1 日（d1)、負荷後 7 日（d7）および負荷後 14 日（d14）の各時点において、ABR 計測を行い、4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の聴力閾値を計測した。

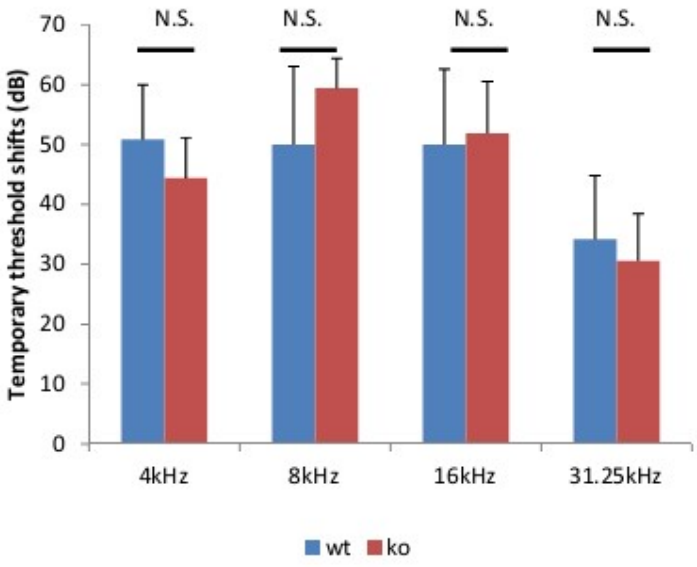

図 2.7　*Il1b*$^{-/-}$マウスの強大音負荷後の一過性聴覚閾値上昇の変化
野生型マウス（wt）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（ko）の 4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の一過性聴覚閾値上昇を示す。データは平均値と標準誤差を表す（野生型 n = 6、*Il1b*$^{-/-}$マウス n = 7）。各周波数の一過性聴覚閾値上昇に両群で有意差は認めない（N.S. = not significant）。

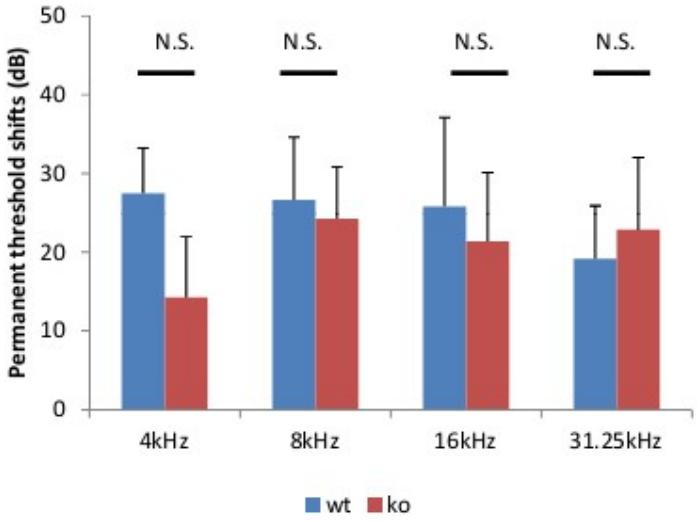

図 2.8　*Il1b*$^{-/-}$マウスの強大音負荷後の恒久的聴覚閾値上昇の変化
野生型マウス（wt）および *Il1b*$^{-/-}$マウス（ko）の 4 kHz、8 kHz、16 kHz および 31.25 kHz の各周波数の恒久的聴覚閾値上昇を示す。データは平均値と標準誤差を表す（野生型 n = 6、*Il1b*$^{-/-}$マウス n = 7）。各周波数の恒久的聴覚閾値上昇に両群で有意差は認めない（N.S. = not significant）。

結論

クロドロン酸抱合リポソームを投与することにより、恒久的聴覚閾値の上昇を 4 kHz と 8 kHz で有意に抑制し、頂回転下方での外有毛細胞の脱落を有意に防いだ。強大音負荷により、血管条の F4/80 陽性細胞数は有意に増加したが、クロドロン酸抱合リポソーム投与群では血管条の F4/80 陽性細胞数は有意に少なかった。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意な遺伝子発現量の変化は認めなかった。以上の結果からは、クロドロン酸抱合リポソームは障害後早期の蝸牛に存在する定常マクロファージによる炎症反応の形成を抑制するよりは、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考えられた。

さらに、強大音負荷により蝸牛マクロファージは IL-1β 分子を強く発現し、蝸牛局所では in vivo レベルで IL-1β 分子のプロセシングが生じることが示された。その一方で、IL-1β 欠損マウスは野生型と同等の強大音に対する障害を呈することから、IL-1β は騒音性難聴の病態形成には必須ではないことが示唆された。

謝辞

本研究の機会を与え、ご指導賜りました東京大学大学院医学系研究科・外科学専攻・耳鼻咽喉科学の山岨達也教授に謹んで御礼申し上げます。IL-1β ノックアウトマウスを提供くださった東京理科大学生命医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター長の岩倉洋一郎教授に心より感謝申し上げます。具体的な研究の立案、手法、結果の解釈および論文作成につきまして丁寧にご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科・外科学専攻・耳鼻咽喉科学の近藤健二准教授、論文作成につき丁寧にご指導いただいた樫尾明憲助教、研究の方向性につき的確なアドバイスをくださった藤本千里助教、そして強大音負荷装置および ABR 計測機器の構築を行ってくださった同研究室の鴨頭輝先生に心より感謝申し上げます。動物飼育および蝸牛切片の作成につきまして技術補佐いただきました同研究室の宮澤晃一様、露崎敦子様、田中治子様、臼倉絵美様そして小原千聖様に心より感謝申し上げます

略語一覧

ABR	auditory brainstem response
AHL	age-related hearing loss
ATP	adenosine triphosphate
BBB	blood brain barrier
BLB	blood labyrinth barrier
CAPS	cryopyrin-associated periodic syndrome
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
DAB	diaminobenzidine
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DAPI	4’6-diamidino-2-phenylindole
DC	dendritic cells
DT	diphtheria toxin
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid

FACS	fluorescence activated cell sorting
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
IHC	inner hair cell
IL-1ß	interleukin-1ß
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-6	interleukin-6
LPS	lipopolysaccharide
MLC	microglial-like cell
NIHL	noise-induced hearing loss
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NOMID	neonatal-onset multisystem inflammatory disease
OHC	outer hair cell
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PRRs	pattern recognition receptors
PTS	permanent threshold shift
PVM/M	melanocyte-like macrophage
SV	stria vascularis

TBST	tris-buffered saline with 0.1% Tween 20
TNF	tumor necrosis factor
TLR4	Toll-like receptor 4
TTS	temporary threshold shift
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

引用文献

[1] T. N. Le, L. V. Straatman, J. Lea, and B. Westerberg, “Current insights in noise-induced hearing loss: a literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options,” *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, vol. 46, no. 1. 2017.

[2] S. G. Kujawa and M. C. Liberman, “Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth.,” *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 7, pp. 2115–23, 2006.

[3] C.-Q. Huang, B.-R. Dong, Z.-C. Lu, J.-R. Yue, and Q.-X. Liu, “Chronic diseases and risk for depression in old age: a meta-analysis of published literature.,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 131–141, 2010.

[4] P. Mick, I. Kawachi, and F. R. Lin, “The Association between Hearing Loss and Social Isolation in Older Adults,” *Otolaryngol. neck Surg.*, vol. 150, no. 3, pp. 378–384, 2014.

[5] P. Ballabh, A. Braun, and M. Nedergaard, “The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications,” *Neurobiology of Disease*, vol. 16, no. 1. pp. 1–13, 2004.

[6] M. Suzuki, T. Yamasoba, T. Ishibashi, J. M. Miller, and K. Kaga, “Effect of

noise exposure on blood-labyrinth barrier in guinea pigs," *Hear. Res.*, vol. 164, no. 1–2, pp. 12–18, 2002.

[7] X. Shi, "Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (review)," *Hearing Research*, 2015.

[8] A. J. Duvall, W. D. Ward, and K. E. Lauhala, "Stria ultrastructure and vessel transport in acoustic trauma," *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 83, no. 4 I, pp. 498–514, 1974.

[9] T. J. I. McGill and H. F. Schuknecht, "HUMAN COCHLEAR CHANGES IN NOISE INDUCED HEARING LOSS," *Laryngoscope*, vol. 86, no. 9, pp. 1293–1302, 1976.

[10] M. Sliwinska-Kowalska and M. Pawelczyk, "Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: A human studies review," *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 752, no. 1, pp. 61–65, 2013.

[11] Y. Wang, K. Hirose, and M. C. Liberman, "Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea," *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 3, no. 3, pp. 248–268, 2002.

[12] D. Basta, B. Tzschentke, and A. Ernst, "Noise-induced cell death in the mouse medial geniculate body and primary auditory cortex," *Neurosci. Lett.*, vol. 381, no. 1–2, pp. 199–204, 2005.

[13] T. Kamogashira, C. Fujimoto, and T. Yamasoba, "Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss," *BioMed Research International*, vol. 2015. 2015.

[14] J. L. Puel, J. Ruel, C. Gervais d'Aldin, and R. Pujol, "Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss.," *Neuroreport*, vol. 9, no. 9, pp. 2109–2114, 1998.

[15] T. M. Nicotera, B. H. Hu, and D. Henderson, "The Caspase Pathway in Noise-Induced Apoptosis of the Chinchilla Cochlea," *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 4, no. 4, pp. 466–477, 2003.

[16] H.-W. Zheng, J. Chen, and S.-H. Sha, "Receptor-interacting protein kinases modulate noise-induced sensory hair cell death.," *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 5, p. e1262, 2014.

[17] M. Fujioka, H. Okano, and K. Ogawa, "Inflammatory and immune responses in the cochlea: Potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss," *Front. Pharmacol.*, vol. 5, no. DEC, pp. 1–5, 2014.

[18] M. B. Wood and J. Zuo, "The Contribution of Immune Infiltrates to Ototoxicity and Cochlear Hair Cell Loss," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, no. April, pp. 1–7, 2017.

[19] O. Takeuchi and S. Akira, "Pattern Recognition Receptors and

Inflammation," *Cell*, vol. 140, no. 6. pp. 805–820, 2010.

[20] D. Bertheloot and E. Latz, "HMGB1, IL-1α, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 14, no. 1, pp. 43–64, 2017.

[21] T. Strowig, J. Henao-Mejia, E. Elinav, and R. Flavell, "Inflammasomes in health and disease," *Nature*, vol. 481, no. 7381, pp. 278–286, 2012.

[22] D. V. Krysko, A. D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele, "Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 12, pp. 860–875, 2012.

[23] M. Colonna and O. Butovsky, "Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 35, no. 1, pp. 441–468, 2017.

[24] F. Ginhoux and M. Guilliams, "Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis," *Immunity*, vol. 44, no. 3. pp. 439–449, 2016.

[25] T. A. Wynn and K. M. Vannella, "Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis," *Immunity*, vol. 44, no. 3. pp. 450–462, 2016.

[26] T. Okano, T. Nakagawa, T. Kita, S. Kada, M. Yoshimoto, T. Nakahata, and J. Ito, "Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea," *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, no. 8, pp. 1758–1767, 2008.

[27] W. Zhang, M. Dai, A. Fridberger, A. Hassan, J. Degagne, L. Neng, F. Zhang, W. He, T. Ren, D. Trune, M. Auer, and X. Shi, "Perivascular-resident macrophage-like melanocytes in the inner ear are essential for the integrity of the intrastrial fluid-blood barrier.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 26, pp. 10388–93, 2012.

[28] K. Hirose, C. M. Discolo, J. R. Keasler, and R. Ransohoff, "Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma," *J. Comp. Neurol.*, vol. 489, no. 2, pp. 180–194, 2005.

[29] L. Fredelius and H. Rask-Andersen, "The role of macrophages in the disposal of degeneration products within the organ of corti after acoustic overstimulation.," *Acta Otolaryngol.*, vol. 109, no. 1–2, pp. 76–82, 1990.

[30] S. Yang, Q. Cai, R. R. Vethanayagam, J. Wang, W. Yang, and B. H. Hu, "Immune defense is the primary function associated with the differentially expressed genes in the cochlea following acoustic trauma," *Hear. Res.*, vol. 333, pp. 283–294, 2015.

[31] N. B. Sautter, E. H. Shick, R. M. Ransohoff, I. F. Charo, and K. Hirose, "CC chemokine receptor 2 is protective against noise-induced hair cell death: Studies in CX3CR1+/GFP mice," *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 7, no. 4, pp. 361–372, 2006.

[32] T. Kaur, D. Zamani, L. Tong, E. W. Rubel, K. K. Ohlemiller, K. Hirose, and M. E. Warchol, "Fractalkine Signaling Regulates Macrophage Recruitment into the Cochlea and Promotes the Survival of Spiral Ganglion Neurons after Selective Hair Cell Lesion," *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 45, pp. 15050–15061, 2015.

[33] K. Wakabayashi, M. Fujioka, S. Kanzaki, H. J. Okano, S. Shibata, D. Yamashita, M. Masuda, M. Mihara, Y. Ohsugi, K. Ogawa, and H. Okano, "Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea," *Neurosci. Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 345–352, 2010.

[34] W. J. T. Tan, P. R. Thorne, and S. M. Vlajkovic, "Characterisation of cochlear inflammation in mice following acute and chronic noise exposure," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 146, no. 2, pp. 219–230, 2016.

[35] S. Jung, J. Aliberti, P. Graemmel, M. J. Sunshine, G. W. Kreutzberg, A. Sher, and D. R. Littman, "Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 11, pp. 4106–4114, 2000.

[36] E. Sato, H. E. Shick, R. M. Ransohoff, and K. Hirose, "Expression of fractalkine receptor CX3CR1 on cochlear macrophages influences survival

of hair cells following ototoxic injury," *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 11, no. 2, pp. 223–234, 2010.

[37] H. a Schreiber, J. Loschko, R. a Karssemeijer, A. Escolano, M. M. Meredith, D. Mucida, P. Guermonprez, and M. C. Nussenzweig, "Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to Citrobacter rodentium.," *J. Exp. Med.*, vol. 210, no. 10, pp. 2025–2039, 2013.

[38] N. Van Rooijen and A. Sanders, "Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications," *J. Immunol. Methods*, vol. 174, no. 1–2, pp. 83–93, 1994.

[39] K. P. A. MacDonald, J. S. Palmer, S. Cronau, E. Seppanen, S. Olver, N. C. Raffelt, R. Kuns, A. R. Pettit, A. Clouston, B. Wainwright, D. Branstetter, J. Smith, R. J. Paxton, D. P. Cerretti, L. Bonham, G. R. Hill, and D. A. Hume, "An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation," *Blood*, vol. 116, no. 19, pp. 3955–3963, 2010.

[40] M. R. P. Elmore, A. R. Najafi, M. A. Koike, N. N. Dagher, E. E. Spangenberg, R. A. Rice, M. Kitazawa, B. Matusow, H. Nguyen, B. L. West, and K. N. Green, "Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for

microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain," *Neuron*, vol. 82, no. 2, pp. 380–397, 2014.

[41] M. A. Gratton, A. Eleftheriadou, J. Garcia, E. Verduzco, G. K. Martin, B. L. Lonsbury-Martin, and A. E. Vázquez, "Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage," *Hear. Res.*, vol. 277, no. 1–2, pp. 211–226, 2011.

[42] D. a Ferenbach, T. a Sheldrake, K. Dhaliwal, T. M. J. Kipari, L. P. Marson, D. C. Kluth, and J. Hughes, "Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice," *Kidney Int.*, vol. 82, no. 8, pp. 928–933, 2012.

[43] C. Sunderkötter, T. Nikolic, M. J. Dillon, N. van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets, and P. J. M. Leenen, "Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response," *J. Immunol.*, vol. 172, pp. 4410–4417, 2004.

[44] M. M. J. Polfliet, P. H. Goede, E. M. L. Van Kesteren-Hendrikx, N. Van Rooijen, C. D. Dijkstra, and T. K. Van den Berg, "A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system," *J. Neuroimmunol.*, vol. 116, no. 2, pp. 188–195, 2001.

[45] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Control of adaptive immunity by the innate

immune system," *Nat Immunol*, vol. 16, pp. 343–353, 2015.

[46] R. Gupta and R. T. Sataloff, "Noise-induced autoimmune sensorineural hearing loss," *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 112, no. 7, pp. 569–573, 2003.

[47] K. Yugi, H. Kubota, A. Hatano, and S. Kuroda, "Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers," *Trends in Biotechnology*, vol. 34, no. 4. pp. 276–290, 2016.

[48] J. R. Heath, A. Ribas, and P. S. Mischel, "Single-cell analysis tools for drug discovery and development.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 3, pp. 204–16, 2016.

[49] G. A. Duque and A. Descoteaux, "Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. OCT. 2014.

[50] W. Arpornchayanon, M. Canis, F. Ihler, C. Settevendemie, and S. Strieth, "TNF-α inhibition using etanercept prevents noise-induced hearing loss by improvement of cochlear blood flow in vivo," *Int. J. Audiol.*, vol. 52, no. 8, pp. 545–552, 2013.

[51] R. R. Vethanayagam, W. Yang, Y. Dong, and B. H. Hu, "Toll-like receptor 4 modulates the cochlear immune response to acoustic injury.," *Cell Death*

Dis., vol. 7, no. 6, p. e2245, 2016.

[52] P. Broz and V. M. Dixit, "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 7, pp. 407–420, 2016.

[53] N. Ahmadi, C. C. Brewer, C. Zalewski, K. A. King, J. A. Butman, N. Plass, C. Henderson, R. Goldbach-Mansky, and H. J. Kim, "Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes," *Otolaryngol. Neck Surg.*, vol. 145, no. 2, pp. 295–302, 2011.

[54] H. J. Lachmann, I. Kone-Paut, J. B. Kuemmerle-Deschner, K. S. Leslie, E. Hachulla, P. Quartier, X. Gitton, A. Widmer, N. Patel, and P. N. Hawkins, "Use of Canakinumab in the Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 23, pp. 2416–2425, 2009.

[55] H. Nakanishi, Y. Kawashima, K. Kurima, J. J. Chae, A. M. Ross, G. Pinto-Patarroyo, S. K. Patel, J. A. Muskett, J. S. Ratay, P. Chattaraj, Y. H. Park, S. Grevich, C. C. Brewer, M. Hoa, H. J. Kim, J. A. Butman, L. Broderick, H. M. Hoffman, I. Aksentijevich, D. L. Kastner, R. Goldbach-Mansky, and A. J. Griffith, "*NLRP3* mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, p. 201702946, 2017.

[56] A. Vambutas, M. Lesser, V. Mullooly, S. Pathak, G. Zahtz, L. Rosen, and E. Goldofsky, "Early efficacy trial of anakinra in corticosteroid-resistant autoimmune inner ear disease," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 9, pp. 4115–4122, 2014.

[57] V. Fuentes-Santamaría, J. C. Alvarado, P. Melgar-Rojas, M. C. Gabaldón-Ull, J. M. Miller, and J. M. Juiz, "The Role of Glia in the Peripheral and Central Auditory System Following Noise Overexposure: Contribution of TNF-α and IL-1β to the Pathogenesis of Hearing Loss," *Front. Neuroanat.*, vol. 11, no. February, pp. 1–26, 2017.

[58] R. Horai, M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M. Takahashi, and Y. Iwakura, "Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion.," *J. Exp. Med.*, vol. 187, no. 9, pp. 1463–75, 1998.

[59] Y. Mizushima, C. Fujimoto, A. Kashio, K. Kondo, and T. Yamasoba, "Macrophage recruitment, but not interleukin 1 beta activation, enhances noise-induced hearing damage," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 6, pp. 1–7, 2017.

[60] G. M. Kalinec, G. Lomberk, R. A. Urrutia, and F. Kalinec, "Resolution of Cochlear Inflammation: Novel Target for Preventing or Ameliorating Drug-, Noise- and Age-related Hearing Loss," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, no. July, p. 192, 2017.

[61] M. C. Liberman and S. G. Kujawa, "Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms," *Hearing Research*, vol. 349. pp. 138–147, 2017.

[62] S. L. Bonar, S. D. Brydges, J. L. Mueller, M. D. McGeough, C. Pena, D. Chen, S. K. Grimston, C. L. Hickman-Brecks, S. Ravindran, A. McAlinden, D. V. Novack, D. L. Kastner, R. Civitelli, H. M. Hoffman, and G. Mbalaviele, "Constitutively activated NLRP3 inflammasome causes inflammation and abnormal skeletal development in mice," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, 2012.

[63] K. L. Kane, C. M. Longo-Guess, L. H. Gagnon, D. Ding, R. J. Salvi, and K. R. Johnson, "Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice," *Hear. Res.*, vol. 283, no. 1–2, pp. 80–88, 2012.

[64] P. M. Ridker, B. M. Everett, T. Thuren, J. G. MacFadyen, W. H. Chang, C. Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S. D. Anker, J. J. P. Kastelein, J. H. Cornel, P. Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kobalava, L. Vida-Simiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M.

Dellborg, P. R. F. Rossi, R. P. T. Troquay, P. Libby, and R. J. Glynn, "Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease," *N. Engl. J. Med.*, p. NEJMoa1707914, 2017.

[65] K. Oshima, S. Suchert, N. H. Blevins, and S. Heller, "Curing hearing loss: Patient expectations, health care practitioners, and basic science," *J. Commun. Disord.*, vol. 43, no. 4, pp. 311–318, 2010.