

アポトーシス抑制タンパク PTD-FNK を用いた
内耳タンパク治療についての研究

耳鼻咽喉科

榎尾明憲

目次

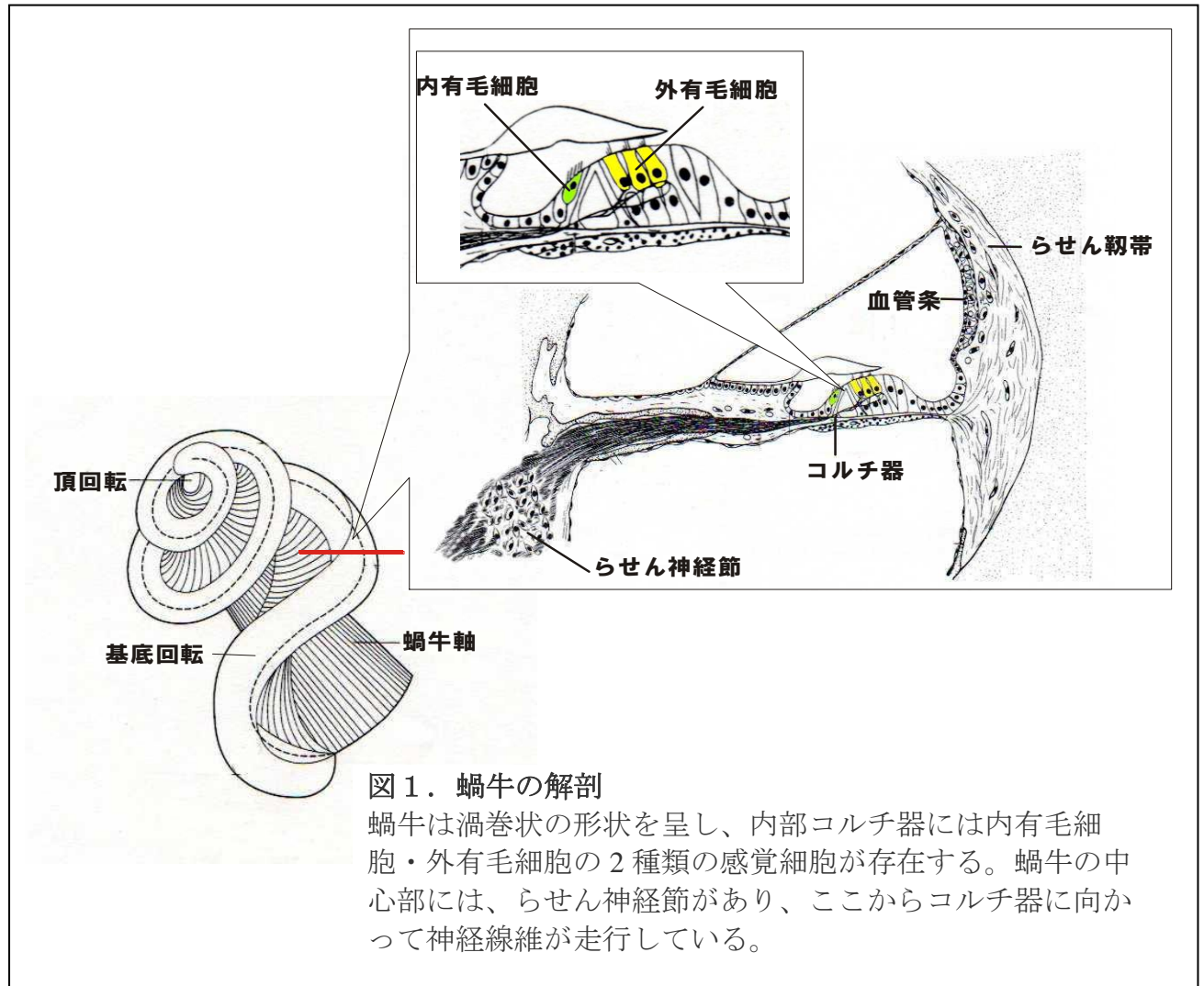
1. 要旨	3 ページ
2. 研究の背景	4 ページ
3. 研究目的	10 ページ
4. 実験 1	13 ページ
5. 実験 2	19 ページ
6. 実験 3	31 ページ
7. 考察	40 ページ
8. まとめ	52 ページ
9. 謝辞	54 ページ
10. 参考文献	55 ページ

要旨

アポトーシス抑制タンパク FNK に Protein Transduction Domain(PTD)を付加した PTD-FNK タンパクを用いて、内耳へのタンパク治療の可能性を検討した。
in vitro の系において PTD-FNK はアミノ配糖体投与に伴う内耳有毛細胞のアポトーシスを抑制し、内耳有毛細胞障害を軽減することが分かった。また、*in vivo* の系において PTD-FNK は全身投与・鼓室内投与いずれの方法でも通常高分子は到達困難といわれる内耳有毛細胞に到達することを確認し、かつアミノ配糖体による有毛細胞のアポトーシスを抑制し、難聴も予防できることが分かった。この研究結果は、PTD-FNK が臨床応用可能な新たな薬剤として期待できることを示すとともに、高分子タンパクによる内耳治療が PTD 付加技術の導入で可能となることを示しており、今後の内耳治療戦略に新たな可能性を見出すことができたという意味で非常に意義深いものと考えられた。

研究の背景

内耳の中にあり聴覚をつかさどる蝸牛は渦巻状の形状を呈し、内部コルチ器には内有毛細胞・外有毛細胞の2種類の感覚細胞が存在する（図1）。蝸牛内の

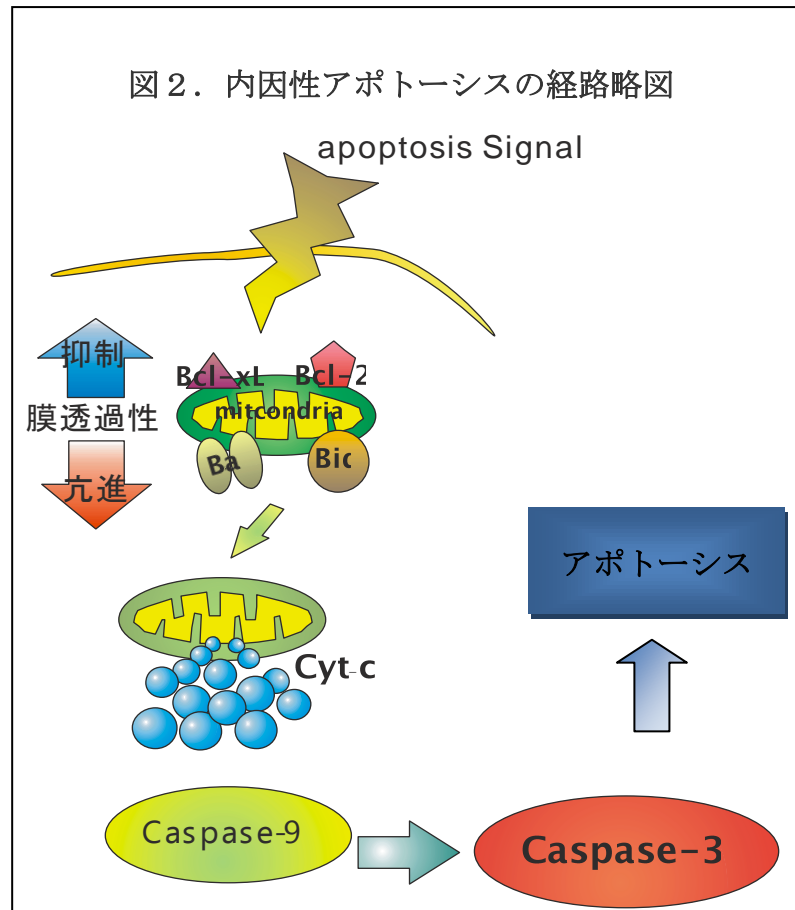


有毛細胞の配列は、基底部では高周波数の音を検知し、頂回転方向に行くに従い低音を知覚している。内有毛細胞は蝸牛神経の求心性神経の大半が分布しており聴覚入力の中樞へと伝達する役割を果たしている。一方で外有毛細胞は、遠心性の神経線維の投射も受けており、音の周波数弁別に寄与していると言われている。内有毛細胞、外有毛細胞いずれの障害でも急性感音難聴が起こり、一度障害された有毛細胞は哺乳類では再生しないとされている。

急性感音難聴は音声言語入力 of 欠如によるコミュニケーションの障害・聴覚の左右非対称に伴う環境音の方向感欠如、持続的耳鳴など様々な弊害をもたらす、QOL の低下をきたす。その代表である突発性難聴だけでも人口 100 万人に対して 250 人以上、低音障害型感音難聴なども加えると 1000 人以上とも見積もられており [1]、急性感音難聴の予防および、治療対策は重要な課題と考えられる。

急性感音難聴の発生メカニズムの研究は様々な動物実験モデルにおいて進んでいる。具体的には、アミノ配糖体やプラチナ製剤投与による薬剤障害モデル、音響外傷モデル、虚血モデル、機械的外傷モデルなどが挙げられる [2-7]。これらに共通して報告されているのは、活性酸素の発生と、それに続く蝸牛内細胞のアポトーシスである。アポトーシスのメカニズムは発癌の制御にも深い関連があるため多方面での研究が進んでおり、それに関連する酵素タンパクも多数同定されつつある。急性感音難聴に伴う有毛細胞障害ではアポトーシスの経路のうち、特にミトコンドリアを介する経路の関与が多く報告されている。この経路は細胞内に到達したアポトーシス刺激が、ミトコンドリアの膜透過性を変化させることから始まる。ミトコンドリア上に存在する Bcl2 ファミリータンパクがミトコンドリア膜の透過性をコントロールすると言われ、アポトーシスが実行に移されるかを決定する。ミトコンドリア膜の透過性が亢進すると、ミトコンドリア内からシトクロム c が放出される。シトクロム c は caspase-9 の活性化を引き起こし、さらに caspase-3 の活性化をもたらすことでアポトーシスへと細胞は進んでいく [2] (図 2)。

これら詳細なメカニ
 ズムの解明に従い、急性
 感音難聴を予防する手
 段として、既知のアポト
 ーシス関連タンパクを
 活用することでアポト
 ーシスを制御しようと
 いう戦略があがってき
 た。タンパクの活用方法
 としてタンパクをコー
 ドする遺伝子をベクタ

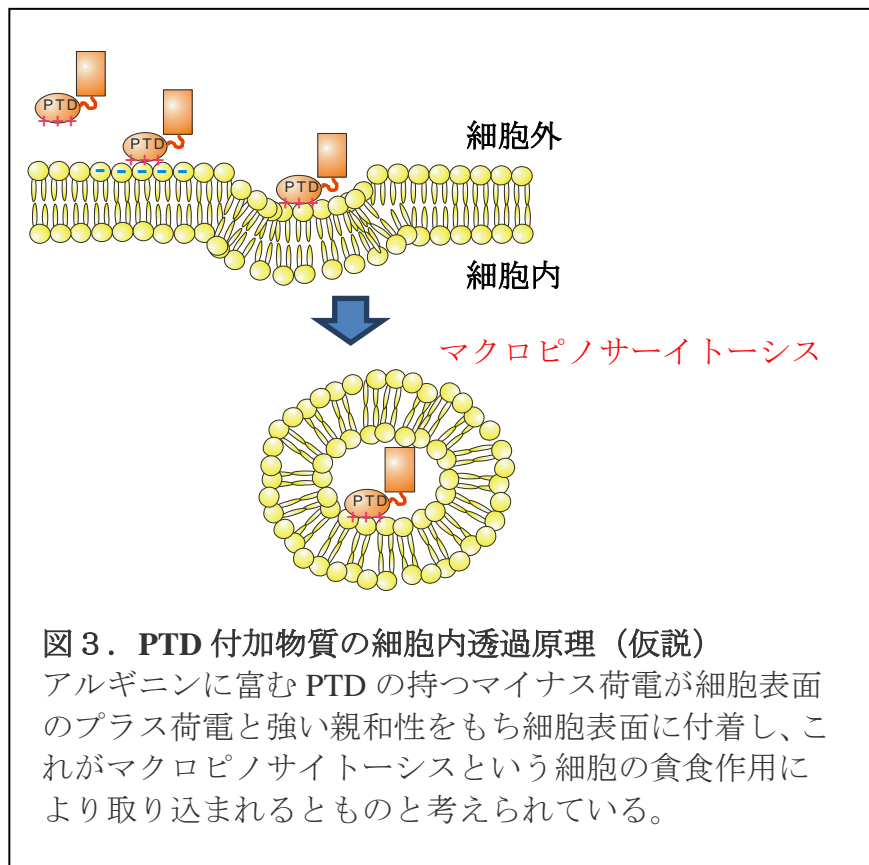


ーなど用いて細胞内に導入してやり、発現させるといういわゆる「遺伝子治療」が間接的なタンパク活用方法として検討されている。遺伝子治療の研究は内耳領域においてもなされており[8]、細胞内でのアポトーシス抑制タンパクの発現・有毛細胞障害抑制などが確認されている。しかしながら、遺伝子導入には潜在的なリスクが懸念される。また、遺伝子導入後発現までのタイムラグや発現量の調節などの問題もあり、今回のテーマである急性感音難聴をはじめとした急性疾患に対する治療方法としては不向きである。これに対して、標的タンパクを直接体内に投与・細胞内へと導入するいわゆる「タンパク治療」は必要時に必要量のタンパクを投与することが可能であり、潜在的リスクも軽減可能で、急性疾患への効果もより期待できると考える。しかしながら、内耳に対するタンパク治療は容易ではない。内耳へ薬剤を到達させる経路としては内耳へ

と繋がる血管を介する方法（全身投与）と、鼓室内に投与し、蝸牛窓からの透過を介する方法（局所投与）の 2 種類が挙げられるが、血管を介する場合には内耳血液関門が、蝸牛窓を介する場合は蝸牛窓膜がバリアーの役割を果たすため[9-10]、高分子のタンパクはこれを透過することができない。このため、タンパク製剤を内耳へ到達させることは一般に困難であり、内耳への治療手段としてタンパク治療はこれまでほとんど応用されていなかった。

1988 年 Frankel[11]らは HIV ウイルスの研究から、ウイルス内の RNA 転写にかかわる Tat タンパクを発見した。このタンパクが存在すると高分子タンパクがレセプター非依存的に細胞内へ効率的に取り込まれることが分かった。その後、Tat タンパクの中のアルギニンに富む約 10-20 塩基程度の一部の配列がこの作用に重要であることが判明し、これが Protein Transduction Domain (PTD)

と呼ばれるに至った。PTD の作用機序はまだ完全には解明されていない。一つの有力な説としては、PTD に多く含まれるアルギニンが強塩基性の残基であり PTD は強いマイナス電荷を帯



びていることになり、PTD の持つマイナス荷電が細胞表面のプラス荷電と強い親和性を持つため細胞表面に付着し、これがマクロピノサイトーシスという細胞の持つ貪食作用により効率的に取り込まれることが考えられている（図 3）。PTD としては HIV ウイルス由来の TAT タンパクの他に HSV ウイルスの VP-22 タンパクでも同様なアミノ酸配列が存在することが分かり、さらには人工的な PTD ドメインも合成されるようになっている（表 1）。これら PTD を用いてこれまで、ペプチドをはじめとして、高分子タンパク、リポソーム、DNA、RNA など様々な高分子物質を細胞内に導入できることが報告されている[11-15]。

主なPTD	Sequence
TAT48－60	GRKKRIRQRRRPPQC
TAT47－57	YGRKKKRRQRRR
TAT47－55	YGRKKRRQR
PTD3	YARKARRQARR
Polyarginine	RRRRRRRRRR

表 1 代表的な PTD 配列

PTD は様々なものが報告されているが、アルギニン（R）に富むペプチドである。

我々は、PTD-FNK というタンパクを作製した。FNK はアポトーシス関連タンパクである Bcl2 ファミリータンパクの中で、アポトーシス抑制的に作用すると言われる Bcl-x_L タンパクに由来する。FNK は Bcl-x_L タンパクのアミノ酸配列を一部変更することでその活性が強化されている。分子量は約 30kDa で、変

更した 3 つのアミノ酸配列の記号を用い **FNK** と命名した。さらにこの **FNK** に **HIV・Tat** タンパクに由来した 11 アミノ酸残基からなる **PTD** を付加した。**PTD-FNK** タンパクはこれまでの報告で、脳血液関門を通過することが示されており、脳虚血モデルにおいてアポトーシスの抑制・神経細胞障害の予防効果を示した。その他、肝虚血モデル、骨髄移植におけるアポトーシス抑制など様々な分野でそのアポトーシス抑制効果が証明されている[14-16]。

今回、この **PTD-FNK** を用いて内耳タンパク治療の可能性について検討した。**PTD** 付加技術を用いた内耳タンパク治療についての研究はこれまで行われていない。**PTD** 付加技術を応用することで内耳タンパク治療が実現できれば、今後内耳急性感音難聴の予防・治療に向けた戦略の一つとして極めて意義深いものになると考えられた。

研究目的

本研究では抗アポトーシスタンパク PTD-FNK による内耳有毛細胞のアポトーシスおよび、それに続く急性感音難聴の予防について検討を行った。

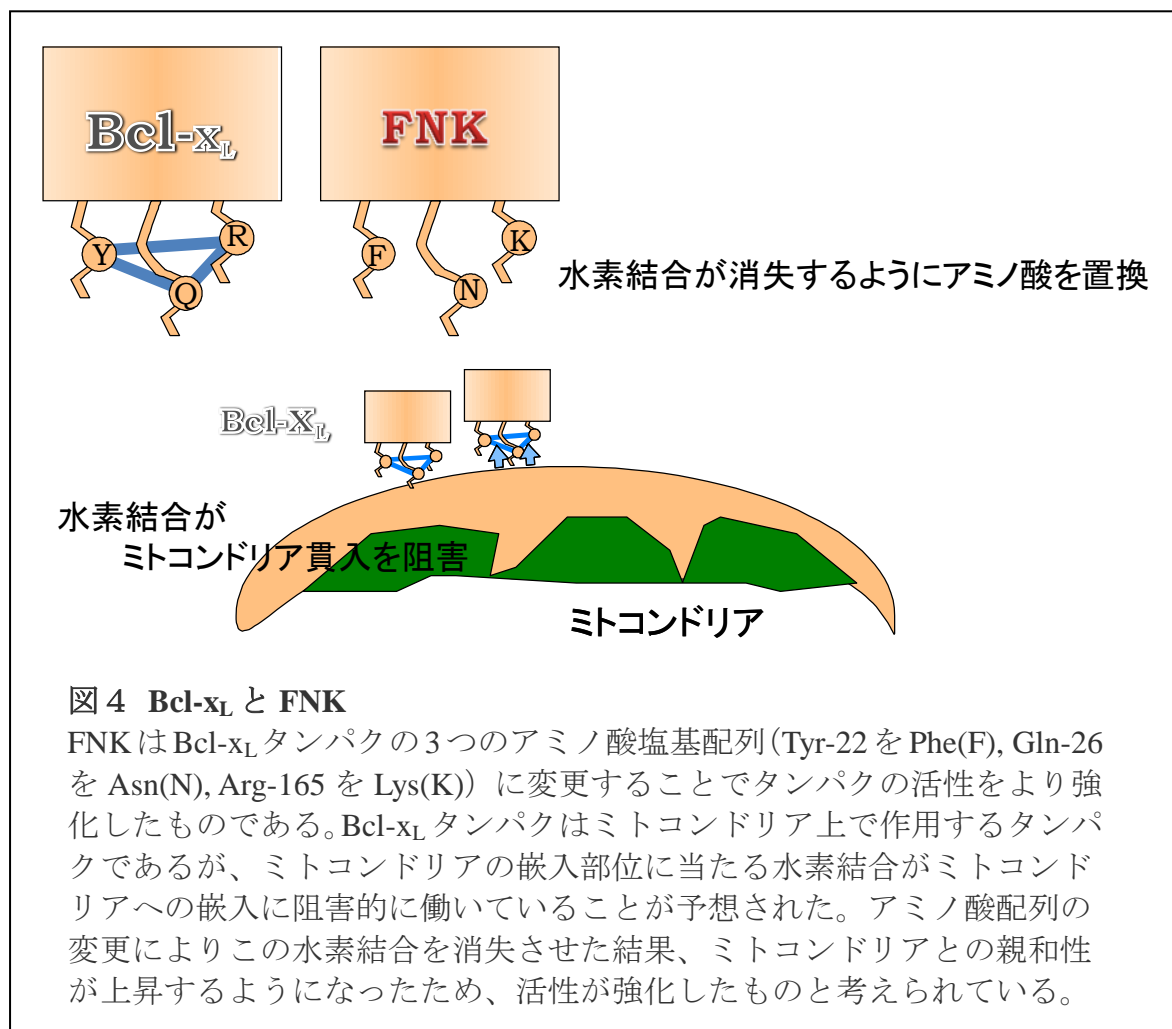
まず、実験 1 では *in vitro* の系で PTD-FNK が内耳有毛細胞の障害を抑制することを示すとともに、作用機序がミトコンドリアを介したアポトーシスの抑制であるかどうかを検討した。実験 2 では *in vivo* の系で PTD-FNK を全身投与した際、PTD-FNK が実際に内耳コルチ器へと到達して、難聴の予防・有毛細胞の障害を抑制するかを検討した。さらに、その機序としてアポトーシスの抑制が働いているかどうかについても検討を行った。実験 3 では PTD-FNK を鼓室内に局所投与した際に PTD-FNK が実際に内耳コルチ器へと到達して難聴の予防・有毛細胞の障害を抑制するかを検討した。

内耳障害・急性感音難聴因子としてはアミノ配糖体の一種である硫酸カナマイシン (KM) を用いた。アミノ配糖体における内耳有毛細胞障害は主にミトコンドリアを介したアポトーシスが関与していることが分かっている。また、*in vivo* の実験系においては、KM とエタクリン酸 (EA) を併用して急性感音難聴モデル動物を作成した。利尿剤の一種である EA と併用投与すると、一回の投与で安定した急性感音難聴モデル動物の作成が可能であることが分かっており、今回の実験に最適と考えた。

実験にあたって: PTD-FNK の合成

我々は Bcl-2 ファミリータンパクのうち、アポトーシス抑制タンパクとして知られる Bcl-x_L を元に FNK の作成を行った。この FNK は PCR による site-directed mutagenesis 法を用いて Bcl-x_L タンパクの 3 つのアミノ酸塩基配

列を (Tyr-22 を Phe(F), Gln-26 を Asn(N), Arg-165 を Lys(K))に変更することでタンパクの活性をより強化したものである。ミトコンドリア上で作用するタンパクである Bcl-x_L タンパクはその立体構造を検討したところ、ミトコンドリアの嵌入部位に当たる水素結合がミトコンドリアへの嵌入に阻害的に働いていることが予想された。この部位のアミノ酸配列の変更により水素結合を消失させた結果、ミトコンドリアとの親和性が上昇し活性が強化されたものと考えられている[14] (図 4)。



実際、FNK の遺伝子を培養細胞に導入すると酸化ストレス、タンパクキナーゼ阻害剤、増殖因子の除去など細胞死をおこす様々な因子に対して Bcl-x_L に比べ

て強力な耐性示すことが示された[17]。この FNK は我々の調べる限りで、哺乳類の抗アポトーシス製剤で初の人工的作用強化タンパクである。 続いて、PTD をコードする遺伝子部分と FNK 遺伝子を融合させて、PTD-FNK 遺伝子を作製した。ここで用いた PTD は HIV ウイルス TAT タンパク由来の 11 塩基を用いた(MGYGRKKRRQRRRG)。この PTD-FNK 遺伝子を tac プロモーターの下流に接続し、大腸菌へ導入して、タンパクの合成を誘導させ PTD-FNK タンパクを合成、25mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン/ 0.2M グリシン /0.1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）からなる溶媒にて抽出精製した。これらの過程は、協同研究者の太田成男先生・麻生定光先生・佐藤祐一郎先生らによって行われた。

実験に当たって：動物種の選定

モルモットの内耳は、解剖学的に手術的アプローチが容易で、内耳 *in vivo* の実験ではこれまで数多く用いられており、その実験手法も確立されているため今回も *in vivo* の実験系においてはモルモットを選択した。一方で、*in vitro* 培養細胞実験ではコルチ器摘出の手技的な問題から生後数日の幼若な個体を用いる必要があるが、この日齢のモルモットの管理は難しく、入手が困難であったためSDラットを用いた。

倫理面への配慮

本実験は東京大学医学系研究科動物実験委員会の倫理審査(医-P09-003)を経て行われている。

実験 1

in vitro 培養細胞系における PTD-FNK の効果と作用機序の確認

方法

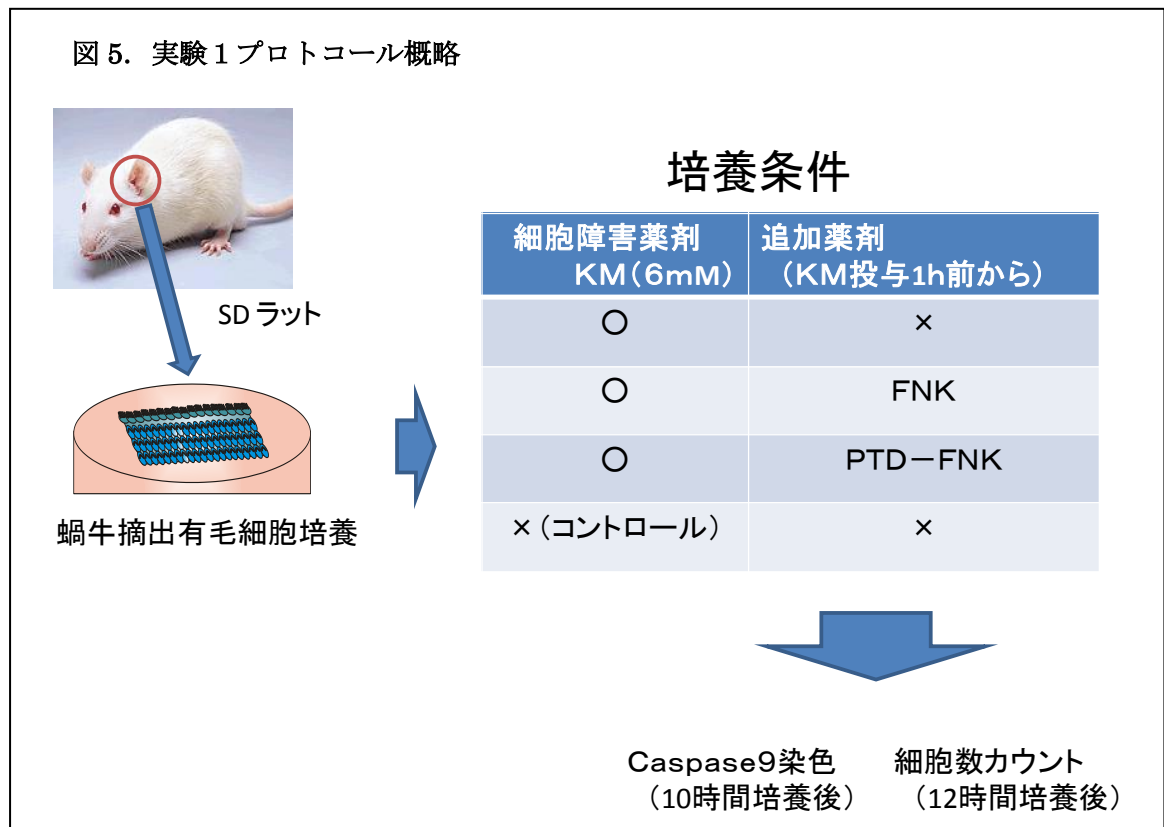
1.0 蝸牛有毛細胞培養系の作成

本実験では Sprague-Dawley (SD) ラットを対象とした。生後 5 日齢の SD ラットから蝸牛を摘出し、Sobkowicz ら[18] の方法に準じて、蝸牛外側壁・らせん神経節細胞を除去し、コルチ器のみを採取した。組織採取および、培養時の組織破損などの関係から基底部から 2mm および頂回転部分 3mm は検討から外した。採取したコルチ器は Dulbecco's modified Eagle's Medium に 10% 牛胎児血清 (FBS)、25mM Hepes および 30U/ml ペニシリンを混合した培養液において 37℃、5% 二酸化炭素、湿度 95% の条件下で培養した。24 時間培養の後、培養細胞を以下の薬剤を投与した培養液に移し替え、培養を継続した。

1. 6mM KM (Meiji, Tokyo, Japan)
2. 6mM KM および 20nM FNK (PTD を付加していない FNK を PTD-FNK 同様の方法で合成した)
3. 6mM KM および 20nM PTD-FNK
4. PTD-FNK の溶媒のみ

障害薬剤である KM の濃度は Fox ら[19]の実験を参考にした。Fox らの投与濃度は 14mMであったが先行実験で、今回の実験系では障害が強すぎたので、約半分量の 6mMに設定し実験を行った。PTD-FNK の濃度は Asoh ら[14]が培養脳神経細胞に対して投与した量を参考に設定した。それぞれの

条件につき 10 個ずつのコルチ器を培養し、そのうち 4 個は培養開始 10 時間後に培養を終了し、caspase-9 の発現を検討した。残りの 6 個は 12 時間まで培養を行い、コルチ器有毛細胞の障害率を比較した。実験のプロトコールを図 5 に示す。



1.1 Caspase-9 発現の検討

蛍光アポトーシス (caspase-9) 検出 キット fam-LEHD-fmk (Invitrogen Purchase, NY, USA) を用いて caspase-9 の発現を検討した。前述条件で 10 時間培養後、fam-LEHD-fmk を培養液に最終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるよう投与し、1 時間培養した。キット付属の洗浄液で 3 回洗浄し、キット付属の固定液にて 4°C 一晚固定した。固定後リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄後、0.3% Triton X-100 に 10 分間浸透し F-アクチン-特異的色素の 1% ロードミンファロイジン (Molecular Probes Eugene, OR, USA) に 30 分間浸し、

コルチ器有毛細胞の骨格を染色した。1つの個体につき4か所ずつランダムに0.2mmの長さを抽出し、その中にあるcaspase-9染色された有毛細胞数をカウント、平均値を算出し比較を行った。

1.2 細胞障害率の比較

12時間の培養後パラホルムアルデヒド溶液4℃で一晩固定、PBSにて洗浄後、0.3%Triton X-100に10分間浸透し1%ローダミンファロイジン(Molecular Probes Eugene, OR, USA)で30分間浸し、蝸牛有毛細胞の骨格を染色した。1つの個体につき4か所ずつランダムに0.2mmの長さを抽出し、その中にある残存有毛細胞数を外有毛細胞・内有毛細胞毎にカウント、平均値を算出し比較した。

1.3 統計解析

実験で得られた値は(平均)±(標準偏差)で表した。データーはSPSSソフトウェアを用い統計処理を行った。統計手法としては分散分析を用い、その後必要に応じて群間比較を行った。群間比較に用いた統計的方法は実験結果の部分に個別に記載した。実験2,3についても同様の統計解析手法を用いた。

結果

1.1 Caspase-9 発現の検討

培養液に溶媒のみを加えた群では1列の内有毛細胞と3列の有毛細胞の構造がはっきりと認められ、caspase-9の発現（緑）は認められなかった（図6d）。

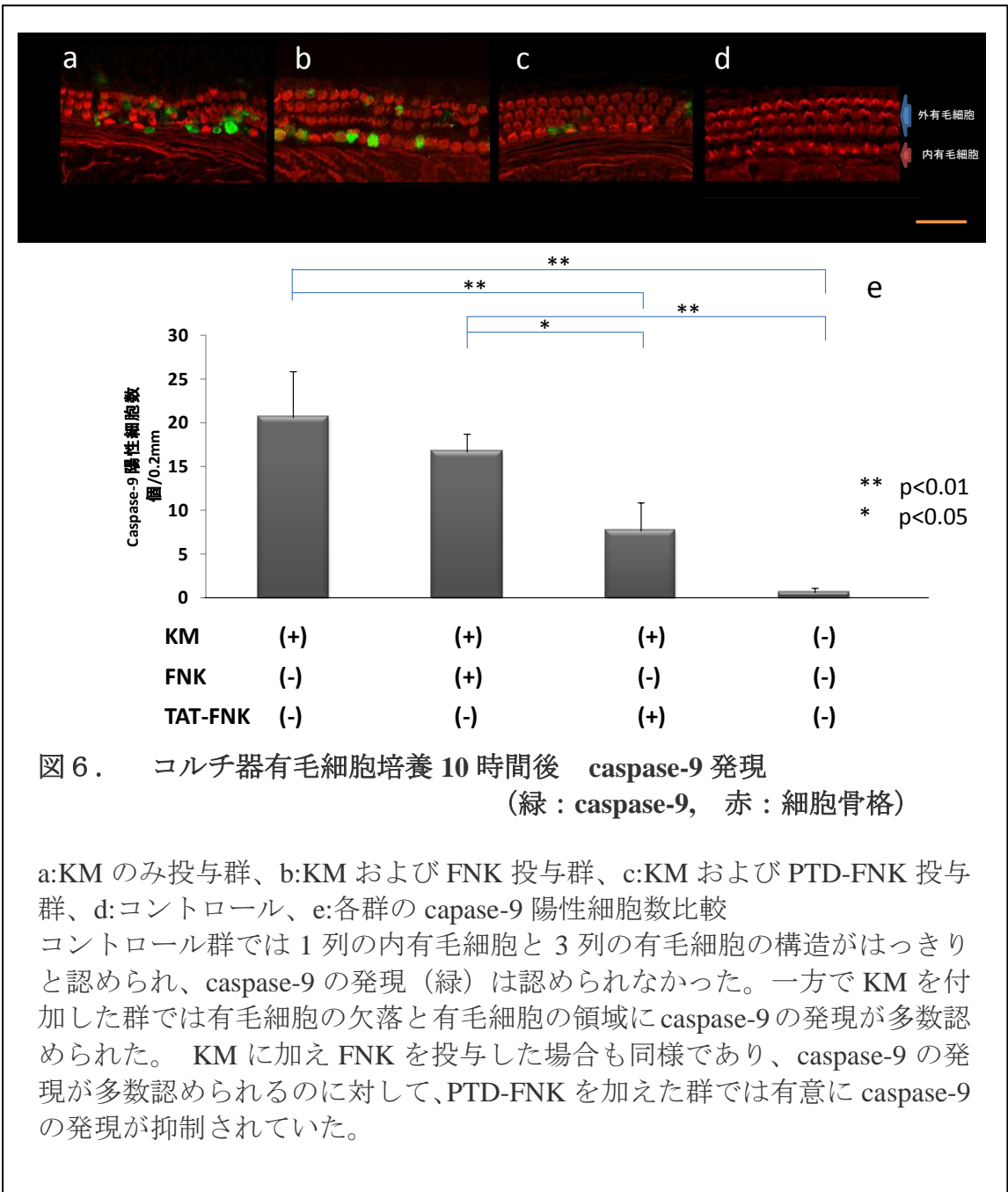


図6. コルチ器有毛細胞培養10時間後 caspase-9発現
(緑：caspase-9, 赤：細胞骨格)

a:KMのみ投与群、b:KMおよびFNK投与群、c:KMおよびPTD-FNK投与群、d:コントロール、e:各群のcaspase-9陽性細胞数比較
コントロール群では1列の内有毛細胞と3列の有毛細胞の構造がはっきりと認められ、caspase-9の発現（緑）は認められなかった。一方でKMを付加した群では有毛細胞の欠落と有毛細胞の領域にcaspase-9の発現が多数認められた。KMに加えFNKを投与した場合も同様であり、caspase-9の発現が多数認められるのに対して、PTD-FNKを加えた群では有意にcaspase-9の発現が抑制されていた。

一方で KM を付加した群では有毛細胞の欠落と有毛細胞の領域に caspase-9 の発現が多数認められた(図 6a)。KM に加え PTD が付加されていない FNK を投与した場合も同様であり(図 6b)、caspase-9 の発現が多数認められた。それに対して、PTD-FNK を加えた群では有毛細胞の形態学的な変化はなく、有意に caspase-9 の発現が抑制されていた(図 6c, e Scheffe にて比較)。

1.2 細胞の障害率の比較

各条件での 12 時間培養後の有毛細胞障害率を検討すると、溶媒のみを付加した群（コントロール）では障害された有毛細胞はほとんどなかった。一方で、KM を付加した場合はコントロール比で有毛細胞の生存率は、それぞれ内有毛細胞で $25.2 \pm 9.1\%$ 、外有毛細胞で $28.5 \pm 11.9\%$ となり著明な障害を認めた。KM に PTD-FNK を投与した群では生存率は内有毛細胞で $80.1 \pm 14.9\%$ 、外有毛細胞で $74.1 \pm 14.9\%$ となり外有毛細胞において障害率が有意に低下していた。KM に FNK を投与した群の生存率は内有毛細胞で $27.6 \pm 5.9\%$ 、外有毛細胞で $38.3 \pm 15.9\%$ と KM 付加群と比べ有意差はなく、細胞障害の予防効果はなかった。(図 7 Scheffe にて比較)。

以上から PTD-FNK は PTD を付加することではじめて有毛細胞内に作用し、ミトコンドリアを介するアポトーシス経路を抑制することで KM による有毛細胞障害を抑制することが示唆された。

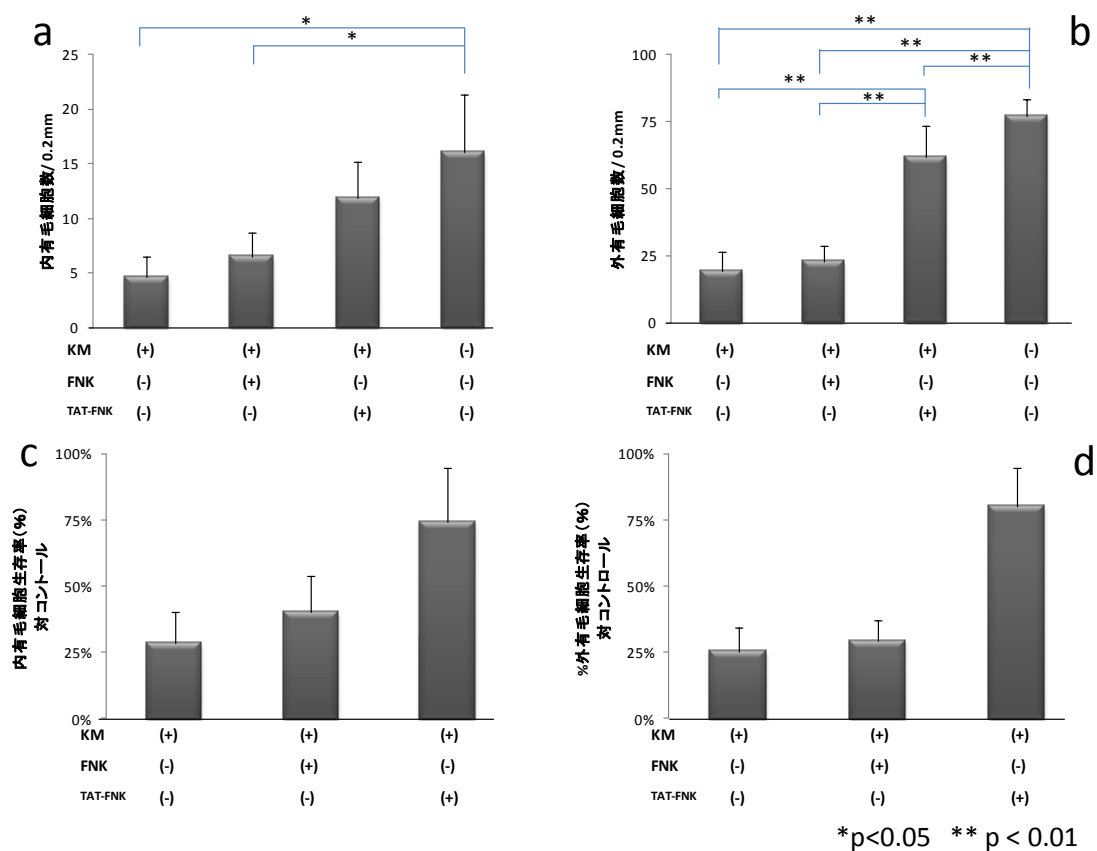


図7 コルチ器有毛細胞培養後 12 時間 残存有毛細胞数

a: 内有毛細胞細胞数の比較、b: 外有毛細胞細胞数の比較

c: 内有毛細胞生存率。(コントロールを 100%とした時の細胞残存率)、

d: 外有毛細胞生存率。(コントロールを 100%とした時の細胞残存率)

実験 2

2.1 *in vivo*、PTD-FNK 全身投与による 内耳細胞への到達確認

方法

2.1.0 実験モデルの作成

PTD-FNK の細胞内の取り込みを確認するに当たって PTD-FNK に myc Tag (GEQKLISEEDLG) を挿入した PTD-myc-FNK を PTD-FNK と同様の手法 (前述) で作成した。実験は体重が 250-300g の合計 12 匹の白色モルモットを対象とした。9 匹のモルモットに対して PTD-myc-FNK (4mg/kg) を 0.3ml の生理食塩水に溶き腹腔内投与を行った。それぞれ 3 匹ずつ PTD-myc-FNK 投与 1 時間後、3 時間後、6 時間後に深麻酔の後、安楽死させ両側の蝸牛を摘出した。また、コントロールとして 3 匹のモルモットに対しては同様の 4mg/kg の myc-FNK を 0.3ml の生理食塩水に溶き腹腔内投与し、3 時間後に深麻酔の後安楽死させ両側の蝸牛を摘出した。摘出した蝸牛は 4% パラホルムアルデヒド溶液で蝸牛内を還流し、パラホルムアルデヒド溶液内で 4℃の条件下で一晩固定した。その後 10% EDTA(pH8.0)の中で脱灰した。脱灰後の組織をパラフィンに包埋し、ブロックを作製した。ブロックは蝸牛軸に沿って 5 μ m 厚の切片に薄切し、スライドグラスにマウントした。

2.1.1 抗 myc 抗体による免疫染色

脱パラフィン・親水化した切片を Target Retrieval Solution S1700 (Dako Japan Inc. Kyoto, Japan) で加熱処理を行い、抗原賦活化した。PBS で洗浄後、0.3%過酸化水素水で室温インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。続いて、ブロッキング液でインキュベートし、非特異的結合

部位をブロッキングした。一次抗体としてウサギ・ポリクローナル・抗 myc tag 抗体（Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY）を用いた。抗 myc tag 抗体をブロッキング溶液で 5000 倍希釈し、切片を 4℃ 下一晩インキュベートした。その後 CSA II (Biotin-Free Tyramid Signal Amplification System; Dako Japan, Kyoto Japan)を用いて染色を行った。続いて、ヘマトキシリン-エオジン染色にて核の染色を行った。

光学顕微鏡を用いて抗 myc 抗体の染色を確認したが、染色の定量化を行うに当たり、Lehr ら[20]の方法にのっとり labeling index (LI)を算出した。Photoshop で、画像を 8 ビットグレースケールに変換し、Magic Wand tool を用いて免疫染色された目的器官を抽出し、ヒストグラムツールを用い輝度と画素数を算出した。その後選択範囲を逆転させ、Back Ground の輝度と画素数を同様に算出した。Immunostaining Intensity (I.I.) を染色部位と Back Ground の輝度の差から算出し、Immunostaining Ratio (I.R.)を染色範囲の画素数を全画像の画素数で割ることにより算出した。I.I.と I.R.の積算値を LI として定義した。各蝸牛から 5 枚ずつランダムに標本を抽出し、それぞれのグループ 30 切片ずつ染色を検討行った。それぞれのコントロールの LI を用いてコントロールとの LI の比を normalized LI (nLI) として算出した。

結果

2.1.1 抗 myc 抗体による免疫染色

myc-FNK を投与した群（コントロール）では染色性は認められなかった。一方で PTD-myc-FNK 投与群は、投与 1 時間からわずかながら蝸牛全体に PTD-myc-FNK の取り込みが確認され、3 時間後にははっきりと染色性が認め

られた。コントロールと比較して1時間後、3時間後では有意にLIの上昇を認めた（1時間： $p<0.05$, 3時間： $p<0.01$, Dunnettにて比較）。一方6時間後には染色性は著明に減退し、コントロールとの有意差は認められなかった。コルチ器拡大図では細胞質内で斑点状に染色が認められた（図8）。

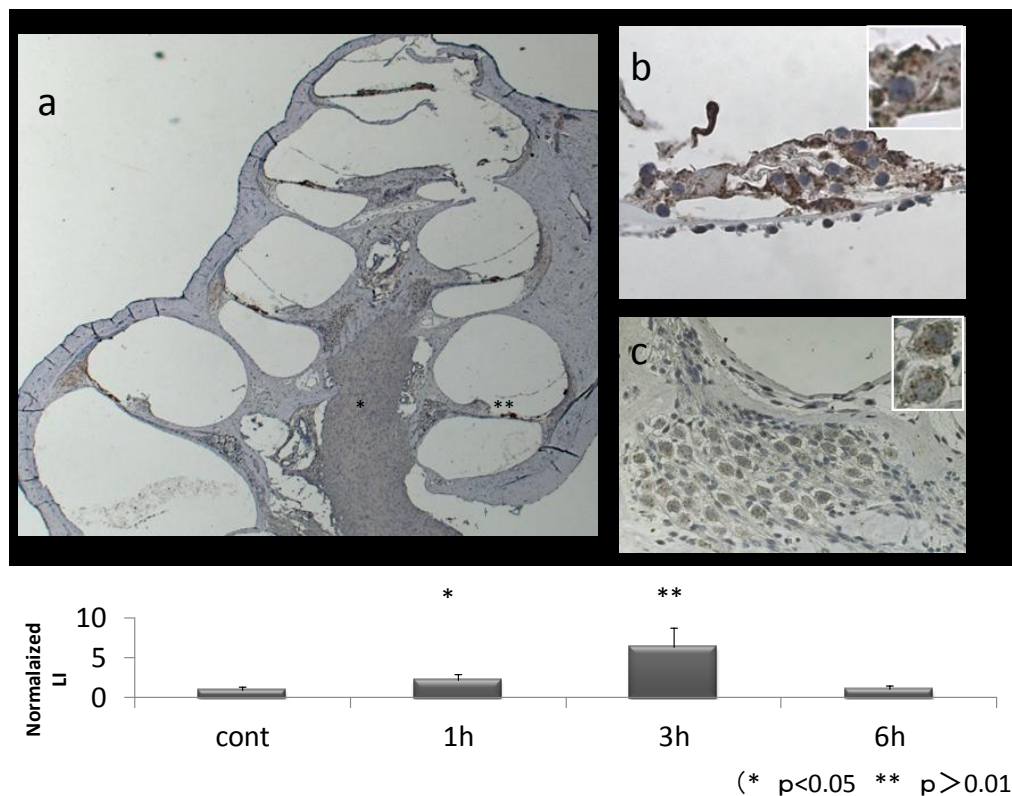


図8 PTD-myc-FNK 腹腔内投与3時間後の蝸牛 (抗 myc 染色)

a: コルチ器全体図、b: コルチ器拡大（枠内は有毛細胞の拡大）、c: らせん神経節拡大（枠内らせん神経節細胞の拡大）

コルチ器有毛細胞、らせん神経節、らせん靱帯を中心に myc に対する染色が認められた。コルチ器・らせん神経節拡大図では細胞質内で斑状に染色が認められた。

d: PTD-myc-FNK Normalized Labeling indices の時間経過

腹腔内投与1時間後より有意に染色が認められ3時間後をピークとして6時間目には消失した。

2.2 *in vivo* 全身投与による PTD-FNK のアミノ配糖体による蝸牛有毛細胞障害・聴覚障害への予防効果の検討

方法

2.2.0 実験モデルの作成

体重が 250-300g の合計 37 匹の聴力正常（実験前に確認）雄白色モルモットを対象とした。蝸牛有毛細胞障害・聴覚障害モデルを作成するに当たり、アミノ配糖体の KM（Meiji, Tokyo, Japan）皮下注射に加え 2 時間後に EA（Sigma Aldrich, MO, USA）の静脈内投与を行った。投与量は Kawamoto ら[21]及び Yamasoba ら[22]の実験条件を参考に、以下の 2 条件を行った。

1. 200mg/kg KM および 40mg/kg EA （低用量群）
2. 400mg/kg KM および 50mg/kg EA （高用量群）

これら条件下で PTD-FNK を投与する群と、溶媒のみを投与する群の 4 群を作製した。各群 8 匹ずつモルモットをランダムに割り当てた。PTD-FNK 投与群では KM 投与 1 時間前および 1 時間後、3 時間後から 5 時間後まで 1 時間ごとに $37.5 \mu\text{g/kg}$ の PTD-FNK を 0.3ml 生理食塩水に希釈して腹腔内投与し、非投与群では溶媒を 0.3ml 生理食塩水に希釈投与した。5 匹のモルモットに対しては KM, EA は投与せず PTD-FNK を上記プロトコールに従って 7 回投与した。PTD-FNK の投与濃度・回数を決定するに当たっては、先行実験で当初 Asoh らの[23]実験を参考に $300 \mu\text{g/kg}$ の 1 回投与による予防実験を試みたが、効果を認めず、むしろ難聴が増悪する傾向を認めた。高濃度では逆に内耳障害を引き起こすことが考えられたので、PTD-FNK の濃度を下げて効果を検討したが、単回投与では効果が得られなかった。そこで、投薬回数を増やす

ことを計画し、前述濃度・7回投与の実験系を計画するに至った。プロトール概要を図9に示す。

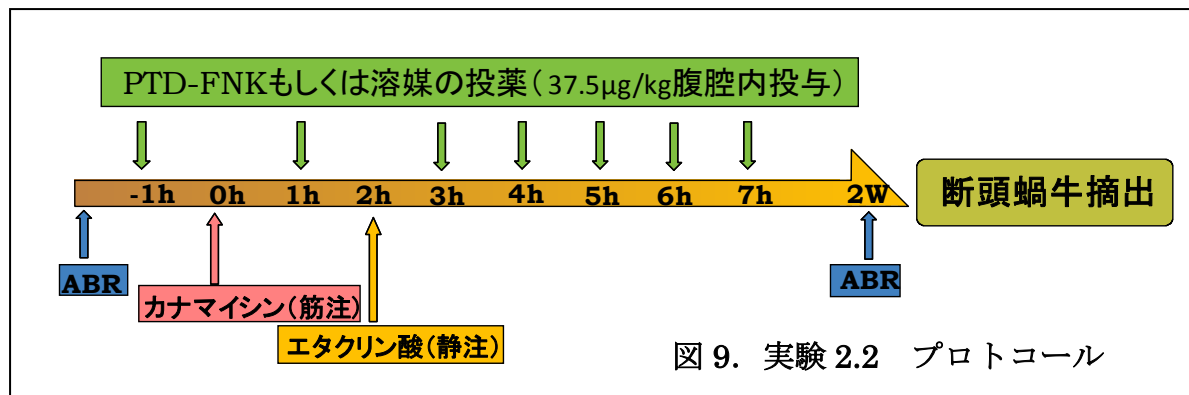


図9. 実験2.2 プロトコール

2.2.1 聴性脳幹反応 (ABR) 測定

4, 8, 20kHz の3周波数刺激における左耳 ABR を測定した。ABR の測定は KM 投与前および投与後 14 日目に行った。ABR の測定は Pourbakht・Yabasoba らの報告[24] に準じて行った。キシラジン (Bayer, Tokyo, Japan) 10mg/kg およびケタミン (Daiichi Sankyo Propharma Co., Ltd, Tokyo, Japan) 40mg/kg の混合液筋注により鎮静麻酔を行い、頭頂部皮下に記録針電極を測定側乳様突起部皮下に基準電極をそして対側乳様突起皮下に接地針電極を刺入し記録した。スピーカーは測定耳から 10cm の距離に置き、刺激時間 15msec, 定時間隔 11 回/sec, Rise/Fall time 1msec に設定し 1024 回の加算を行った。刺激音圧は 5dB おきに測定し、波形の消失する直前の値を閾値と定義した。ABR の波形が全く認められない場合最大刺激音圧に 5dB を加算した値を適応した(105dB)。実験前と薬剤投与 2 週間後の閾値差を計算し聴覚障害の指標として検討した。

2.2.2 有毛細胞障害の評価

薬剤投与 2 週間、ABR 測定後深麻酔下に動物を安楽死させ、左耳蝸牛を摘出した。摘出した蝸牛は 4%パラホルムアルデヒド溶液で蝸牛内を還流し、パラホルムアルデヒド溶液内で 4°Cの条件下で一晩固定した。0.3%Triton X-100 に 10 分間浸透し 1%ローダミンファロイジン (Molecular Probes Eugene, OR, USA) で 30 分間浸し、蝸牛有毛細胞の骨格を染色した。蝸牛組織は Surface Preparation Technique を用いスライドガラスの上に展開し蛍光顕微鏡下に観察した。基底回転から頂回転にかけての有毛細胞の障害率を検討した。ただし、標本の準備段階による損傷が一部であったため、頂回転の先端部から数えて 2mm のところから 17mm の部位に限定して検討を行った。Pourbakht と Yamasoba らの方法[24] に準じ 0.45mm ごとの有毛細胞障害率を算出しその平均値をプロットすることでサイトコクレオグラムを作製した。また蝸牛全体での障害率の平均値も算出し比較をおこなった。

結果

2.2.1 PTD-FNK 投与による聴性脳幹反応 (ABR) 閾値変化

聴覚障害因子である KM,EA を投与せず PTD-FNK のみを投与したコントロールの動物の聴力閾値変化はいずれの周波数においても認められなかった。PTD-FNK 投与群と非投与群 (溶媒のみ投与) での比較では高用量 KM/EA 投与群、低用量 KM/EA 投与群いずれにおいてもすべての周波数で有意に PTD-FNK 投与群で閾値上昇が抑えられることが分かった (図 10, $p < 0.01$ 周波数および薬剤の投与には交互作用は認めなかった)。

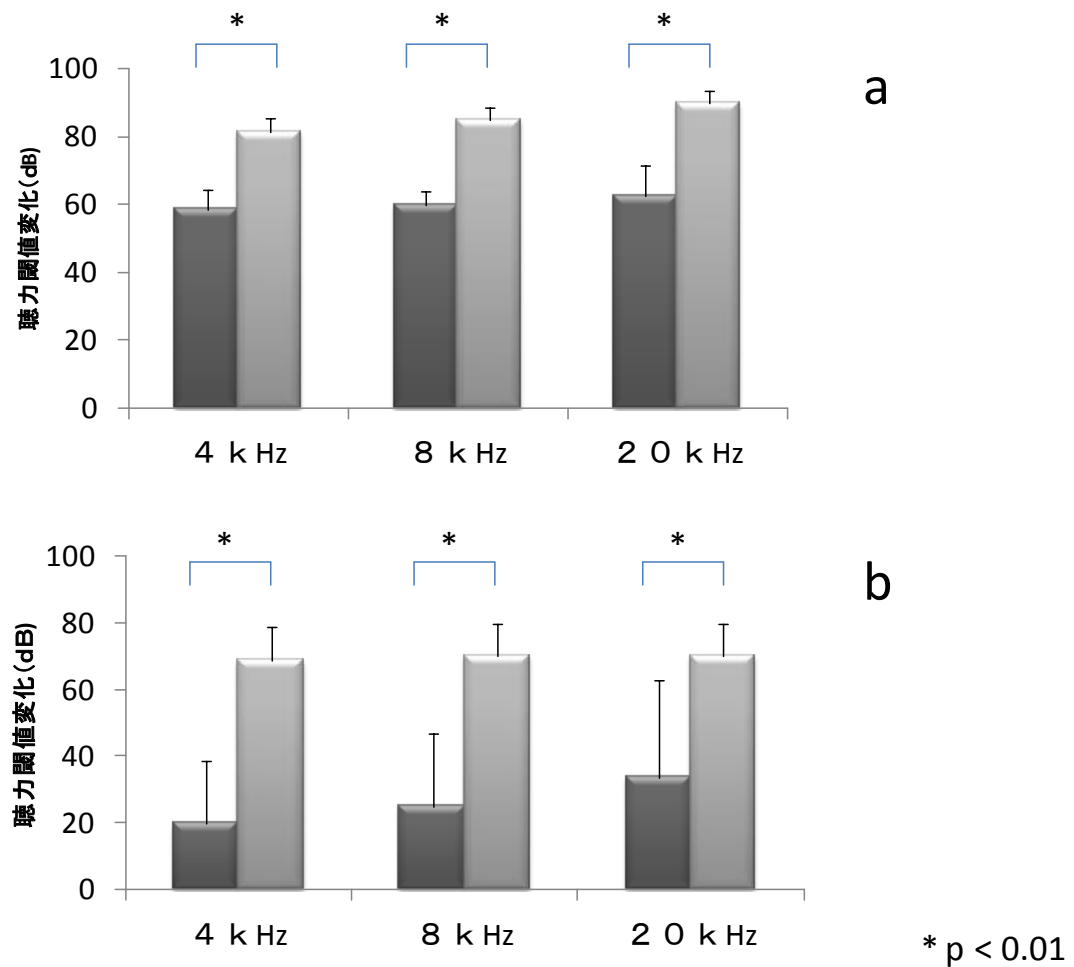


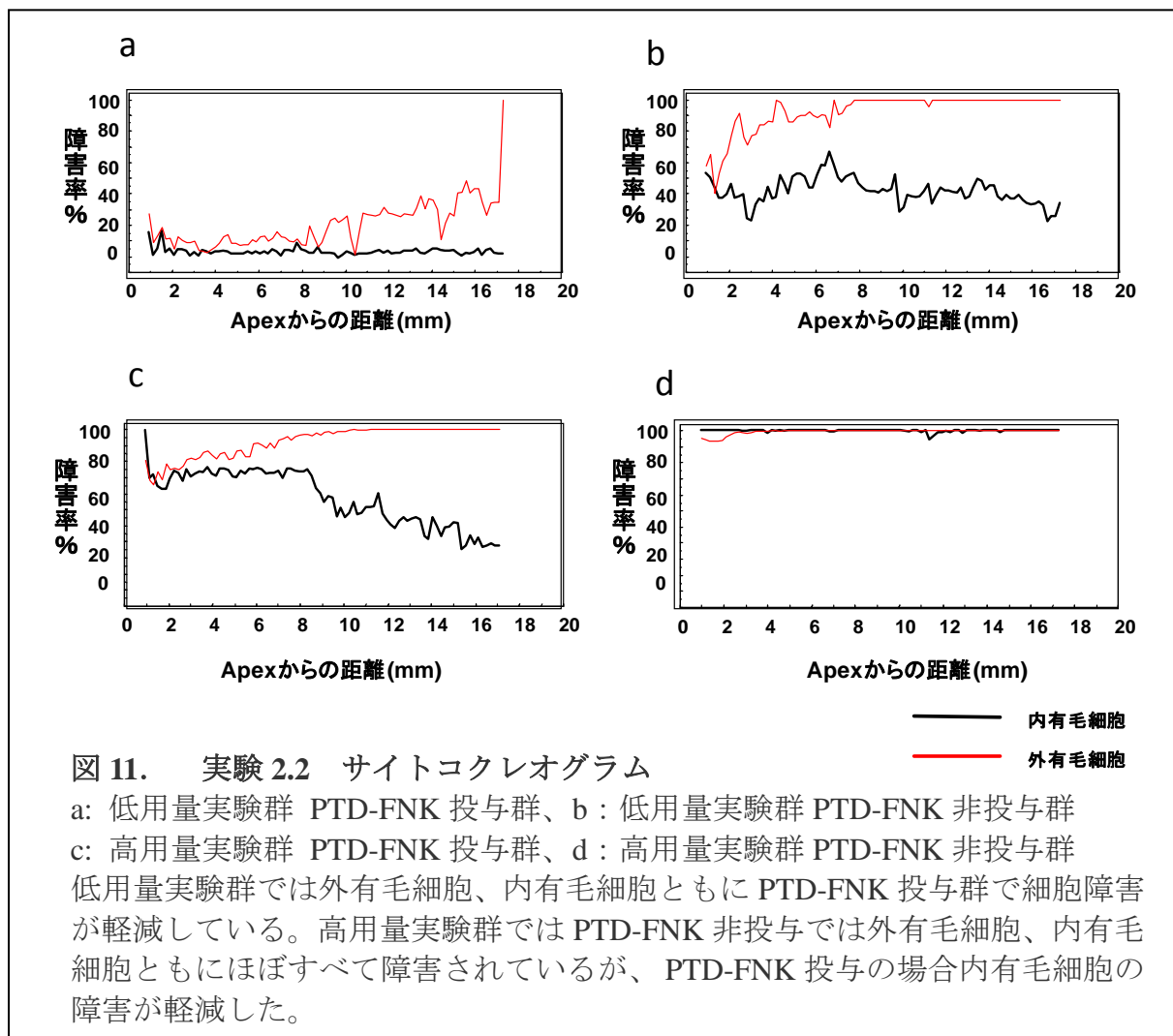
図 10. KM/EA 投与前・投与 2 週間後の ABR 閾値差

a: 低用量実験群 濃灰色：PTD-FNK 投与群、淡灰色：PTD-FNK 非投与群
 b: 高用量実験群 濃灰色：PTD-FNK 投与群、淡灰色：PTD-FNK 非投与群
 PTD-FNK 投与群と非投与群（溶媒のみ投与）での比較では高用量 KM/EA 投与群、低用量 KM/EA 投与群いずれにおいてもすべての周波数で有意に PTD-FNK 投与群で閾値上昇が抑えられることが分かった

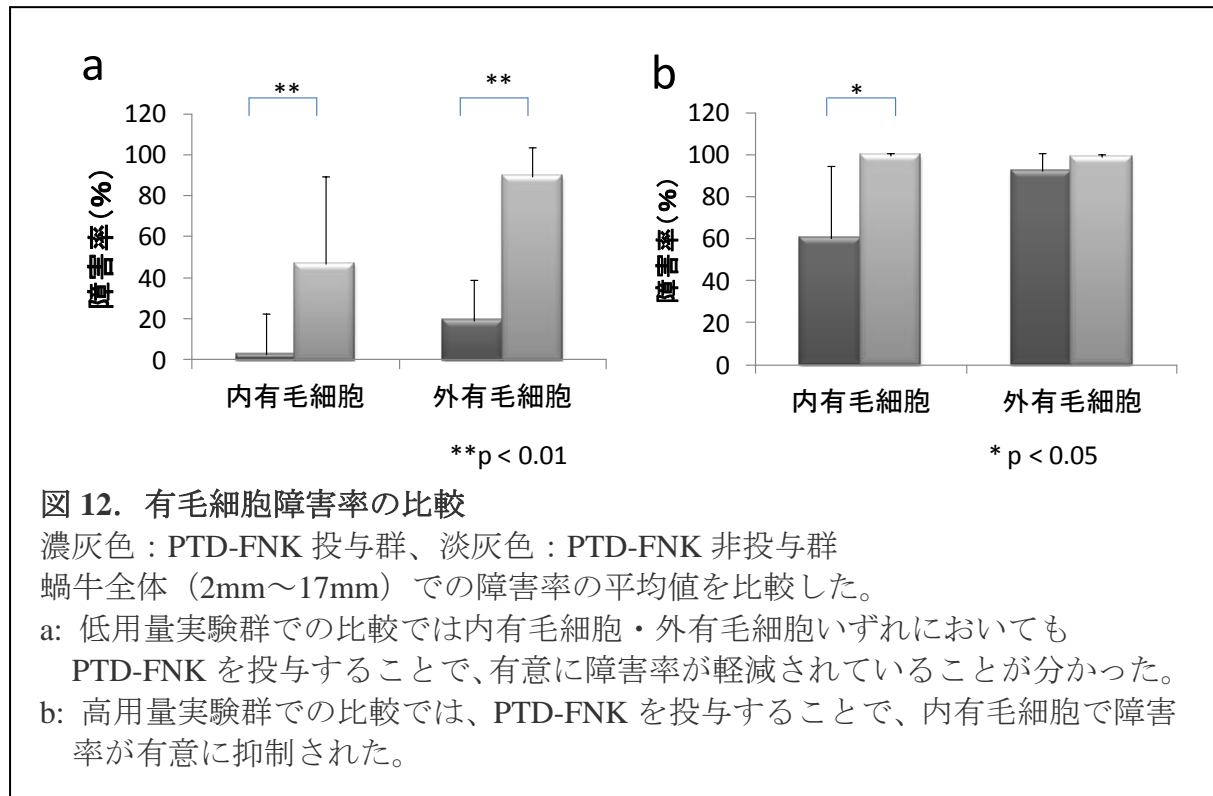
2.2.2 PTD-FNK 投与による有毛細胞障害変化

図 11 にサイトコクレオグラムの結果を示した。外有毛細胞では基底回転の方が頂回転に比べて障害の程度が大きかった。高用量 KM/EA 投与群では細胞の障害率が高いことが分かる。蝸牛全体（2mm～17mm）での障害率の平均

値を比較すると、低用量 KM/EA 投与群において、PTD-FNK 非投与群の内有毛細胞・外有毛細胞の障害率はそれぞれ $47.0 \pm 42.7\%$ ・ $89.4 \pm 14.0\%$ であったのに対して PTD-FNK 投与群ではそれぞれ、 $2.67 \pm 0.9\%$ ・ $19.2 \pm 24.3\%$ であり有意に PTD-FNK 投与群で障害率が軽減されていた（図 12a, $p < 0.01$, 薬剤投与と有毛細胞の種類には交互作用を認めなかった）。高用量 KM/EA 投与群においては、PTD-FNK を投与しない場合の障害率は内有毛細胞・外有毛細胞でそれぞれ $99.7 \pm 0.6\%$ ・ $99.4 \pm 0.6\%$ であったのに対して PTD-FNK 投与群では $60.5 \pm 34.3\%$ ・ $92.3 \pm 8.2\%$ となっており内有毛細胞において障害の軽減



を認めることができた（図 12b, $p < 0.05$ 薬剤投与と有毛細胞の種類に交互作用を認めたため単純主効果の検定を行った）。



2.3 *in vivo* における PTD-FNK 抗アポトーシス作用の検討～Cleaved

Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) 発現の検討～

方法

2.3.0 実験モデルの作成

体重が 250-300g の合計 10 匹の聴力正常（実験前に確認）雄白色モルモットを対象とした。蝸牛有毛細胞障害・聴覚障害モデルを作成するに当たり、アミノ配糖体の KM（Meiji, Tokyo, Japan）皮下注射（400mg/kg）に加え 2 時間後に EA（Sigma Aldrich, MO, USA 50mg/kg）の静脈内投与を行った。この条件下で PTD-FNK を投与する群と、溶媒のみを投与する群の 2 群に 5 匹

ずつモルモットをランダムに割り当てた。PTD-FNK 投与群では KM 投与 1 時間前および 1 時間後、3 時間から 5 時間後まで 1 時間ごとに $37.5 \mu\text{g/kg}$ の PTD-FNK を 0.3ml 生理食塩水に希釈して腹腔内投与し、非投与群では溶媒を 0.3ml 生理食塩水に希釈投与した。EA 投与 8 時間後深麻酔下に動物を安楽死させ左耳蝸牛を摘出した。摘出した蝸牛は 4%パラホルムアルデヒド溶液で蝸牛内を還流し、パラホルムアルデヒド溶液内で 4°C の条件下で一晩固定した。その後 10% EDTA(pH8.0)の中で脱灰した。脱灰後の組織をパラフィンに包埋し、ブロックを作製した。ブロックは蝸牛軸に沿って $5 \mu\text{m}$ 厚の切片に薄切し、スライドグラスにマウントした。

2.3.1 Cleaved PARP 抗体による免疫染色

PARP は DNA 修復酵素の一種である。PARP はアポトーシスの進行に伴い活性化した caspase3 により分解され cleaved PARP へと変化する。Cleaved PARP を検出することは間接的に caspase3 の活性化を証明するもので、アポトーシスの進行を示すことになる。当初モルモットパラフィン切片において活性型 caspase の検出することを試みたが、検出が困難であったため、cleaved PARP を検出することとした。

脱パラフィン・親水化した切片を Target Retrieval Solution S1700 (Dako Japan Inc. Kyoto, Japan) で加熱処理を行い、抗原賦活化した。PBS で洗浄後、0.3%過酸化水素水で室温インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。続いて、ブロッキング液でインキュベートし、非特異的結合部位をブロッキングした。一次抗体としてウサギ・ポリクローナル・抗 PARP 抗体 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA) を用いた。抗 myc PARP

抗体をブロッキング溶液で 500 倍希釈し、切片を 4℃ 下一晩インキュベートした。その後 CSA II (Biotin-Free Tyramid Signal Amplification System; Dako Japan, Kyoto Japan) を用いて染色を行った。各蝸牛から 4 枚ずつランダムに標本を抽出し、それぞれのグループ 20 切片ずつ染色を検討行った。PARP 陽性細胞は頂回転については一部標本では評価が難しかったため、基底回転、第二回転、第三回転のみの評価を行った。

結果

2.3.1 Cleaved Poly-(ADP-Ribose) Polymerase 抗体による免疫染色

PTD-FNK を投与していない群では Cleaved PARP の発現を外有毛細胞の核内に認めることができた。一方で PTD-FNK を投与した群では Cleaved PARP の発現はわずかしかなかった。外有毛細胞では有意に PTD-FNK 投与群で Cleaved PARP の発現が少なかった ($p < 0.01$, 有毛細胞の種類, 薬剤投与の間に交互作用があり、単純主効果の検定を行った)。一方で、内有毛細胞では Cleaved PARP の発現はいずれの群においても差は認めなかった。以上より PTD-FNK は caspase-3 の活性化を外有毛細胞において、抑制・アポトーシスを抑制していることが示唆された (図 13)。

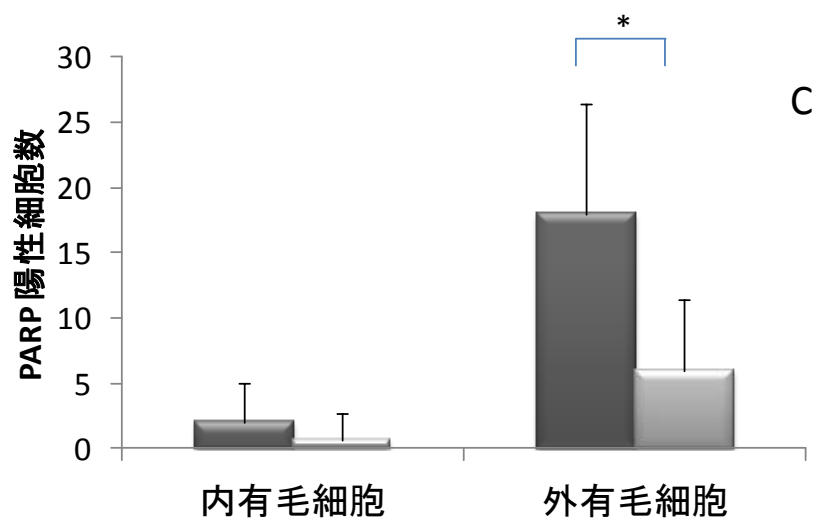
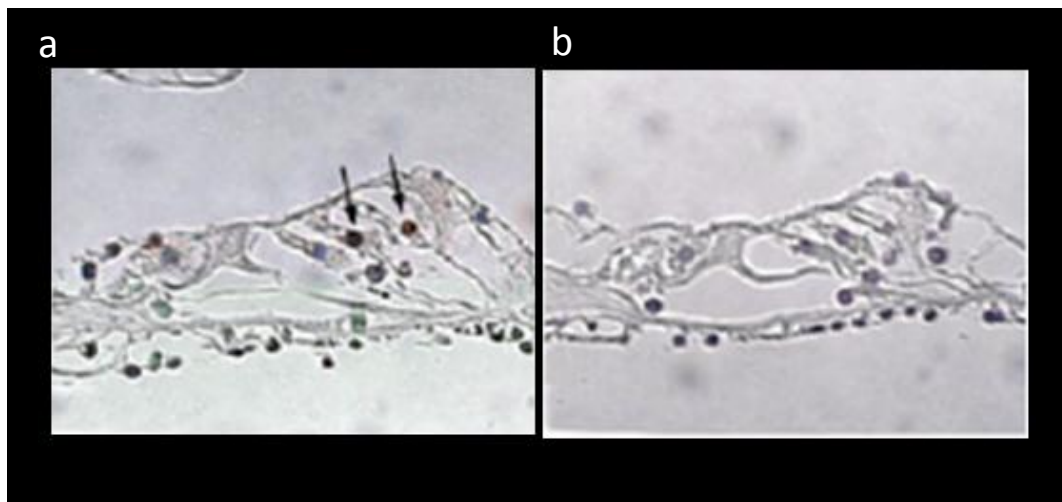


図 13. Cleaved PARP 染色

a: PTD-FNK 非投与群、b:PTD-FNK 投与群。c: PARP 陽性細胞数比較。濃灰色：PTD-FNK 非投与群、淡灰色：PTD-FNK 投与群

EA/KM 投与 8 時間後 PTD-FNK 非投与群では外有毛細胞の核に Cleaved PARP の染色が認められアポトーシスの進行が示唆された。PTD-FNK 投与群では外有毛細胞で有意に PARP 発現が抑制され、アポトーシスの進行が抑制されていることが示唆された。

実験 3

3.1 *in vivo* 局所鼓室内投与による PTD-FNK の内耳細胞への到達確認

方法

3.1.0 実験モデルの作成

PTD-FNK の細胞内の取り込みを確認するに当たって PTD-FNK に myc Tag (GEQKLISEEDLG) を挿入した PTD-myc-FNK を PTD-FNK 同様の手法(前述) で作成した。体重が 250-300g の合計 42 匹の白色モルモットを対象とした。キシラジン 10mg/kg およびケタミン 40mg/kg の混合液筋注により鎮静麻酔を行い、左耳後部切開を置き鼓膜輪後方の骨を露出させた。同部位の骨を削開し蝸牛骨胞を開放、中耳腔内にアプローチした。正円窓および正円窓膜を明視下に置き、正円窓膜上にゼラチンスポンジ (Spongel® Astellas Pharma Inc, Tokyo, Japan) を置き、ゼラチンスポンジに 3 μ l の PTD-myc-FNK (0.5mg/ml) を投与した。投与後 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間後にそれぞれ 6 匹ずつ深麻酔の後、安楽死させ両側の蝸牛を摘出した。また、コントロールとして 6 匹のモルモットに対しては同様の 0.5mg/ml の myc-FNK を 3 μ l ゼラチンスポンジに浸して正円窓膜上に投与し、6 時間後に深麻酔の後、安楽死させ両側の蝸牛を摘出した。摘出した蝸牛は 4%パラホルムアルデヒド溶液で蝸牛内を還流し、パラホルムアルデヒド溶液内で 4℃の条件下で一晩固定した。その後 10% EDTA(pH8.0)の中で脱灰した。脱灰後の組織をパラフィンに包埋し、ブロックを作製した。ブロックは蝸牛軸に沿って 5 μ m 厚の切片に薄切し、スライドグラスにマウントした。

3.1.1 抗 myc 抗体による免疫染色

脱パラフィン・親水化した切片を Target Retrieval Solution S1700 (Dako Japan Inc. Kyoto, Japan) で加熱処理を行い、抗原賦活化した。PBS で洗浄後、0.3%過酸化水素水で室温インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。続いて、ブロッキング液でインキュベートし、非特異的結合部位をブロッキングした。一次抗体としてウサギ・ポリクローナル・抗 myc tag 抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を用いた。抗 myc tag 抗体をブロッキング溶液で 5000 倍希釈し、切片を 4℃ 下一晩インキュベートした。その後 DAKO Envision + System(Dako Japan, Kyoto Japan)を用いて染色を行った。ヘマトキシリン-エオジン染色にて核の染色を行った。

光学顕微鏡を用いて抗 myc 抗体の染色を確認したが、染色の定量化を行うに当たっては前述の Labeling Index を算出した。各蝸牛から 5 枚ずつランダムに標本を抽出し、それぞれのグループ 30 切片ずつ染色し検討を行った。薬剤を投与した対側耳の LI を用いてそれぞれの LI の比を nLI として算出した。投与後 6 時間目の切片では蝸牛内コルチ器、らせん神経節、血管条、蝸牛外側壁の LI も測定し、器官ごとの比較も行った。さらに 1 時間目および 6 時間目の標本についてはコルチ器の基底回転、第二回転、第三回転の LI を算出し回転毎の LI も比較した。頂回転については標本により評価が困難なものがあったので検討は行わなかった。

結果

3.1.1 抗 myc 抗体による免疫染色

PTD-myc-FNK 投与 1 時間から蝸牛全体に PTD-myc-FNK の取り込みが確認され、24 時間後まで染色性が確認され、コントロールと比べて有意に LI の上昇を認めた ($p<0.01$, Dunnet)。48 時間目では、コントロールとの有意差は認められなかった (図 14a)。PTD-myc-FNK を投与した耳の対側耳ではいずれも染色は認められなかった (図 15d)。PTD-myc-FNK 投与後 6 時間の蝸牛を詳細に検討すると、コルチ器、らせん神経節細胞の細胞質の染色、血管条および蝸牛外側壁で染色が強く認められた (図 15a-c)。各器官の染色性を比較すると、コルチ器の染色が最も強く、らせん神経節がそれに続いた。コルチ器の LI はらせん神経節・血管条および蝸牛外側壁に比べ有意に高かった ($p<0.01$ Scheffe)。らせん神経節の LI も血管条および蝸牛外側壁に比べ有意に高値となった ($p<0.01$ Scheffe) (図 14c)。1 時間および 6 時間目コルチ器における各回転の LI を比較すると基底回転、第二回転、第三回転いずれにおいても LI の染色性には有意な差を認めなかった (図 14b)。

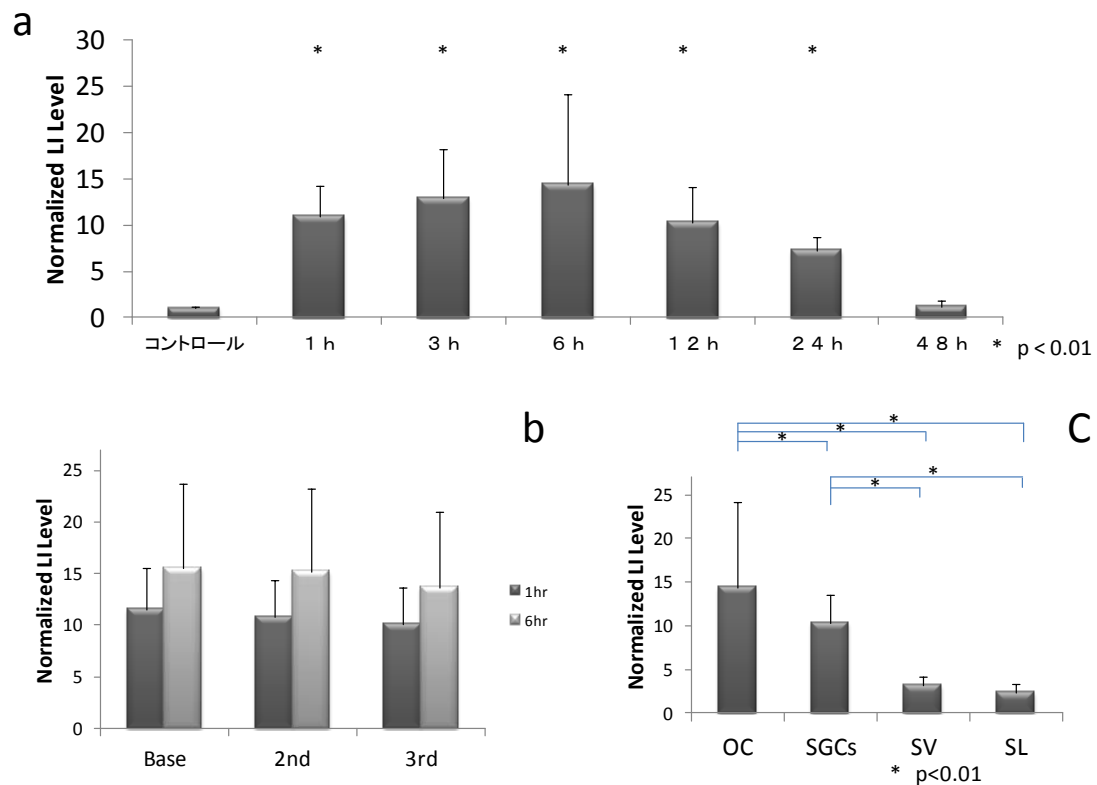


図 14 PTD-myc-FNK 鼓室内投与後 の分布比較

a: コルチ器 PTD-myc-FNK normalized LI の時間経過

PTD-myc-FNK 投与 1 時間から PTD-myc-FNK の取り込みが確認され、24 時間後まで染色性が確認され、コントロールと比べて有意に LI の上昇を認めた。

b: PTD-myc-FNK 投与 1 時間目および 6 時間目における蝸牛回転毎のコルチ器 LI 比較

各回転の LI を比較すると基底回転、第二回転、第三回転いずれにおいても LI の染色性には有意な差を認めなかった

c: PTD-myc-FNK 投与 6 時間目における蝸牛内部位ごとの LI 比較

コルチ器(OC)、らせん神経節細胞(SGCs)、血管条(SV)および蝸牛外側壁(SL)で染色が強く認められた。コルチ器の染色が最も強く、らせん神経節がそれに続いた。コルチ器の LI はらせん神経節・血管条および蝸牛外側壁に比べ有意に高かった。らせん神経節の LI も血管条および蝸牛外側壁に比べ有意に高値となった。

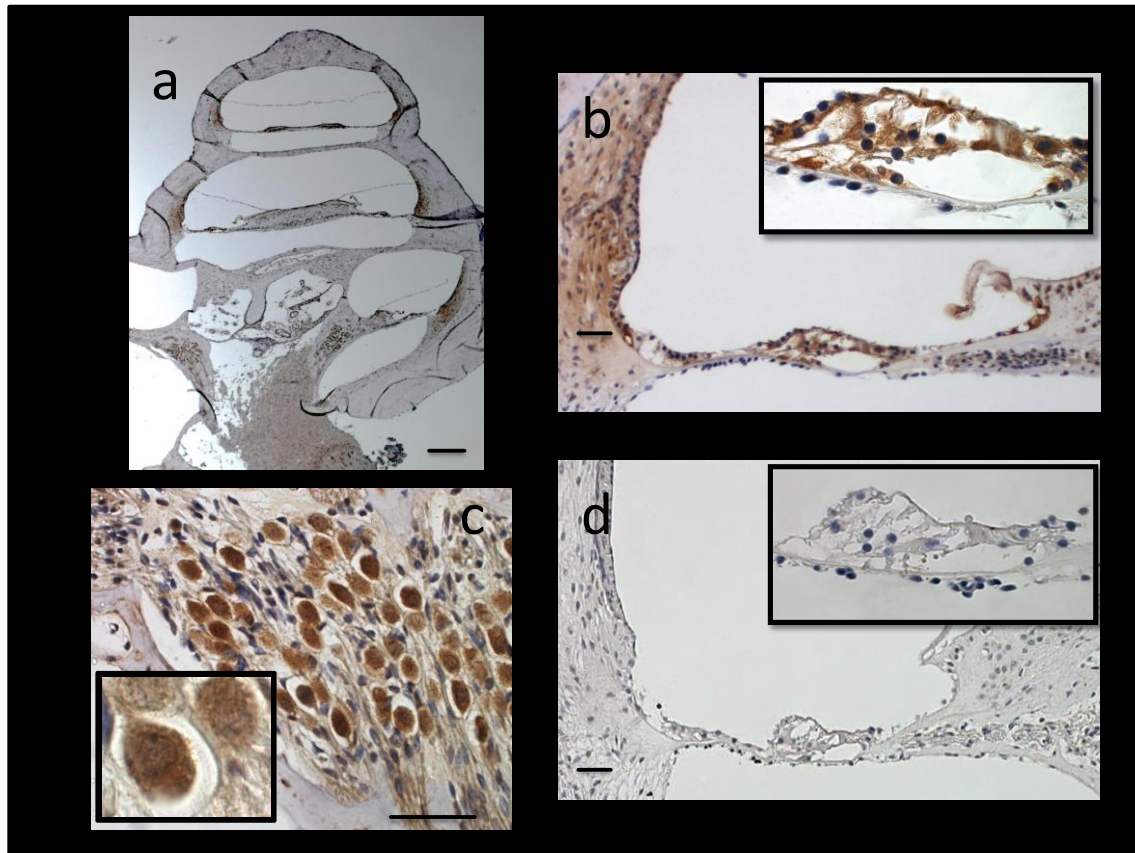


図 15 PTD-myc-FNK 鼓室内投与 6 時間後の抗 myc 染色

a: 蝸牛全体図。b: コルチ器拡大図、c: 6 時間後らせん神経節拡大図、
d: 対側耳コルチ器拡大図

コルチ器、らせん神経節細胞の細胞質の染色、血管条および蝸牛外側壁で染色が強く認められた。対側耳の染色性は認められなかった。

3.2 *in vivo* 局所鼓室内による PTD-FNK のアミノ配糖体による蝸牛有毛細胞障害・聴覚障害への予防効果の検討

方法

3.2.0 実験モデルの作成

体重が 250-300g の合計 12 匹の聴力正常（実験前に確認）雄白色モルモットを対象とした。キシラジン 10mg/kg およびケタミン 40mg/kg の混合液筋注

により鎮静麻酔を行い、両側耳後部切開を置き鼓膜輪後方の骨を露出させた。同部位の骨を削開し蝸牛骨胞を開放、中耳腔内にアプローチした。正円窓および蝸牛窓膜を明視下に置き、蝸牛窓膜上にゼラチンスポンジ（Spongel® Astellas Pharma Inc, Tokyo, Japan）を置き、左耳には $3\ \mu\text{l}$ の PTD-myc-FNK（6mg/ml）を投与し、右耳には溶媒を同量投与した。創部を閉創 1 時間後、KM（Meiji, Tokyo, Japan 200mg/kg）皮下注射に加え 2 時間後に EA（Sigma Aldrich, MO, USA 40mg/kg）の静脈内投与を行い蝸牛有毛細胞障害・聴覚障害モデルを作成した。4 匹のモルモットに対しては PTD-FNK を投与後 KM, EA は投与しなかった。KM、EA の投与濃度は Kawamoto ら[21]の実験に従って行った。PTD-FNK の蝸牛窓膜上に投与する実験については類似する実験がなく、抽出薬剤の最大濃度 6mg/ml, その半量、10 分の 1 量で先行実験を行ったが、良好な効果が示唆されたのが 6mg/ml であったため、この濃度を採用した。実験のプロトコール概要を図 16 に示す

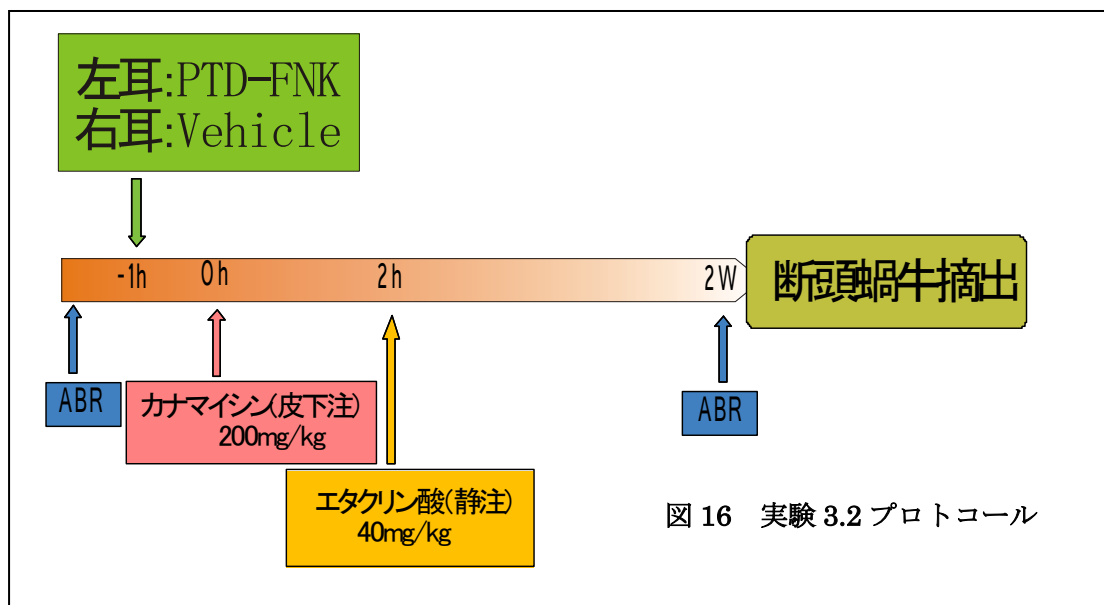


図 16 実験 3.2 プロトコール

3.2.1 聴性脳幹反応 (ABR) 測定

4, 8, 20 kHz の 3 周波数刺激における左右の ABR を測定した。ABR の測定は KM 投与前および投与後 14 日目に行った。ABR の測定方法・条件は前述のとおりである。

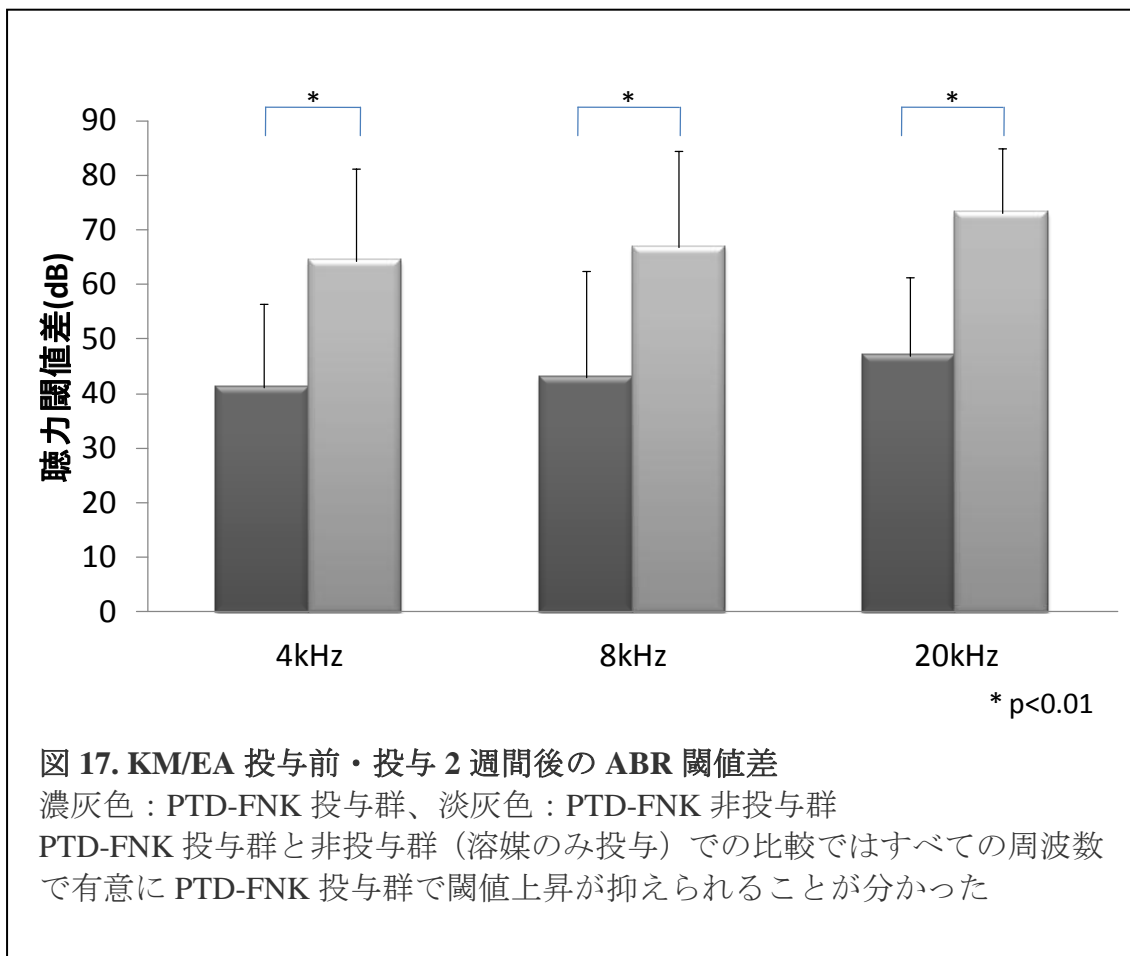
3.2.2 有毛細胞障害の評価

薬剤投与 2 週間、ABR 測定後深麻酔下に動物を安楽死させ両側蝸牛を摘出した。摘出後、蝸牛組織は前述のごとく Surface Preparation Technique を用いスライドガラスの上に展開し蛍光顕微鏡下に観察した。基底回転から頂回転にかけての有毛細胞の障害率を検討した。ただし、2 標本は損傷が著しかったため検討から除外して、6 耳ずつの検討とした。頂回転の先端部から数えて 5mm のところから 16mm の部位に限定して検討を行った。検討の方法は、Pourbakht と Yamasoba ら[22]の方法に準じ 0.45mm ごとの有毛細胞障害率を算出しその平均値をプロットすることでサイトコクレオグラムを作製した。また蝸牛全体での障害率の平均値も算出し比較をおこなった。

結果

3.2.1 PTD-FNK 投与による聴性脳幹反応 (ABR) 閾値変化

聴覚障害因子である KM,EA を投与せず PTD-FNK のみを投与したコントロールの動物の聴力閾値変化はいずれの周波数においても認められなかった。PTD-FNK 投与群では、すべての周波数で有意に PTD-FNK 非投与群に比して閾値上昇が抑えられることが分かった (図 17 $p<0.01$, 薬剤投与と聴力周波数の間には交互作用は認めなかった)。



3.2.2 PTD-FNK 投与による有毛細胞障害変化

図 18 にサイトコクレオグラムの結果を示した。外有毛細胞に関しては基底回転の方が頂回転に比べて障害の程度が大きかった。PTD-FNK を投与した場合、外有毛細胞でその障害率が軽減していた。蝸牛全体（5mm～16mm）での障害率の平均値を比較すると、PTD-FNK を投与しない場合、内有毛細胞・外有毛細胞の障害率はそれぞれ $13.8 \pm 5.9\%$ 、 $91.7 \pm 7.0\%$ であったのに対して PTD-FNK 投与群ではそれぞれ $8.3 \pm 3.5\%$ 、 $64.0 \pm 29.6\%$ であり、PTD-FNK を投与した場合では内有毛細胞・外有毛細胞いずれの障害率も有意に抑制されていた（図 18c $p < 0.05$ ，有毛細胞の種類と薬剤投与には交互作用は認めなかった）。

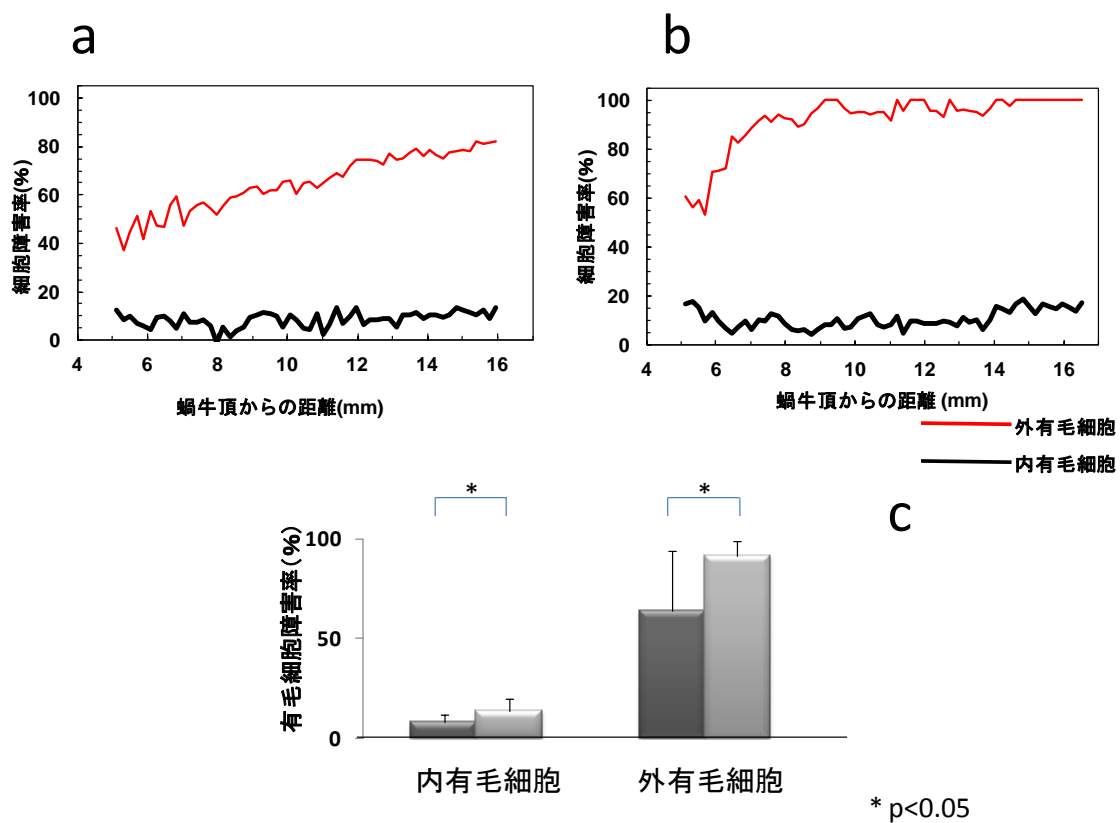


図 18. KM/EA 投与 2 週間におけるサイトコクレオグラムおよび
 蝸牛全体での有毛細胞障害率の比較

a: PTD-FNK 投与群におけるサイトコクレオグラム、b: PTD-FNK 非投与群におけるサイトコクレオグラム

c: 蝸牛全体 (5mm~16m) での障害率の平均値比較。濃灰色 : PTD-FNK 投与群、淡灰色 : PTD-FNK 非投与群

PTD-FNK 投与群では有毛細胞の障害を有意に抑制することが分かった。

考察

本研究では、アポトーシス抑制タンパク PTD-FNK を投与すると、アミノ配糖体 KM による有毛細胞障害刺激に対して細胞死を予防し、その過程において caspase-9 の発現が抑制されることを *in vitro* 蝸牛培養細胞系を用いて示した。また、*in vivo* 実験系においても KM と EA による蝸牛有毛細胞障害モデルにおいて PTD-FNK の投与が caspase-3 の活性化を抑制することを示した。以上のことからアミノ配糖体という障害因子に対して PTD-FNK は、ミトコンドリアを介した内因性アポトーシスの系を制御し、蝸牛有毛細胞で起こりうるアポトーシスを抑制していることが示唆された。次に、*in vivo* 実験系において、PTD-FNK を腹腔内全身投与することで、PTD-FNK は投与 1 時間頃から蝸牛内に到達し、6 時間後には消退することを確認した。一方で、PTD を付加しない FNK タンパクの単独投与では蝸牛内への到達は確認できなかった。さらに、*in vivo* KM/EA 投与蝸牛有毛細胞障害・難聴モデルにおいて障害薬剤投与前後に PTD-FNK を複数回腹腔内全身投与することで、蝸牛有毛細胞障害・聴力閾値上昇を有意に抑制することも示した。また、鼓室内正円窓膜上に PTD-FNK をゼラチンスポンジに浸して投与するという局所的投与方法でも PTD-FNK は蝸牛内に到達することを確認した。この場合、タンパクは 1 時間後より蝸牛内に到達して 24 時間まで PTD-FNK が蝸牛内にとどまり 48 時間後には消失することが分かった。一方で、PTD を付加しない FNK タンパク単独では蝸牛内への分布は確認できなかった。PTD-FNK 投与対側耳の検討では PTD-FNK の分布は認められず、一側の蝸牛内に PTD-FNK の分布が限局していることが示唆された。1 時間、6 時間目における蝸牛内分布の検討では PTD-FNK は各回転に

有意差はなく、基底回転近くで投与された PTD-FNK は速やかに上方の回転まで到達していることが分かった。さらに、鼓室内投与方法においても *in vivo* KM/EA 投与蝸牛有毛細胞障害・難聴モデルに対して障害薬剤投与前 1 回の投与で、蝸牛有毛細胞障害・聴力閾値上昇を有意に抑制することが確認できた。以上のことから、PTD-FNK タンパクは高分子タンパクでありながら、PTD を付加することにより全身投与並びに、鼓室内局所投与といういずれの投与方法においても、高分子タンパクの内耳細胞内への導入が可能となり、さらにアミノ配糖体による有毛細胞障害を予防する機能を果たすことが示唆された。内耳においてレセプターの存在しない高分子タンパクを細胞内でこのように機能させることができたのは、我々の知る限りでは今回が初のことであり極めて意義深い研究成果であると考えられる。

アミノ配糖体による内耳障害ではミトコンドリアを介した内因性のアポトーシスが深く関与していることが報告されている。具体例を挙げると、ゲンタマイシンは p38 MAPK リン酸化やシトクロム c の放出、caspase-3 の活性化をきたすことがラットの蝸牛培養実験で示されている[25]。Cunningam [26-27]らもネオマイシンを用いてマウス卵形嚢の有毛細胞の障害を検討し、caspase-9 および caspase-3 の発現が認められることを示しており、同時に caspase-9 の抑制を行うと有毛細胞死が抑制されることを示している。チンチラの有毛細胞を用いた実験でも、ゲンタマイシンによって障害を加えると、caspase-9 および caspase-3 が発現することが確認されている[6,28]。今回我々は、アミノ配糖体の一種である KM を用いたが、*in vivo* 培養系有毛細胞に対して、KM 投与後 10 時間で caspase-9 の広範な発現を確認した。このことから、KM においても

その他アミノ配糖体薬剤同様に、ミトコンドリアを介した内因性アポトーシスが引き起こされることが明らかとなった。これに対して PTD-FNK 投与すると、培養蝸牛有毛細胞における caspase-9 の発現は KM 投与 10 時間の時点で減少していた。また、*in vivo* 実験系で EA 投与 8 時間の時点で蝸牛外有毛細胞における caspase-3 の活性化が減少していたが、これらを総合すると、PTD-FNK は内因性アポトーシス経路を抑制し、アポトーシスを抑制していることが示唆された。FNK の起源である Bcl-x_L タンパクはミトコンドリア上に存在する Bcl-2 ファミリータンパクの一つであり、アポトーシス刺激に対するミトコンドリアの膜透過性の亢進を抑制しその結果、アポトーシス刺激に伴うミトコンドリアからのシトクロム c の放出を抑制する[2]ことが考えられているが、FNK も同様の作用を呈することで、内因性アポトーシスの抑制作用をきたしていることが予想される。ただ一方で、PTD-FNK は神経細胞のグルタミン酸による中毒死をも予防することが知られている。この過程で PTD-FNK は細胞内へのカルシウムイオン流入に影響を与えることが言われている[14]。チンチラを用いた *in vitro* の実験系でも、アミノ配糖体が細胞内カルシウムイオン濃度の増加をきたすことが報告されており[29]、PTD-FNK の作用機序について検討するに当たり、PTD-FNK が細胞内カルシウム濃度に与える影響も細胞死を抑制する一つの要因として考慮する必要があるかもしれない。PTD-FNK の作用機序の詳細については今後さらなる検討が必要である。

今回 *in vivo* 実験系において EA 投与 8 時間の時点で、内有毛細胞には caspase-3 の活性化は認められなかった。2 週間後の組織標本では内有毛細胞障害も存在したことや、*in vitro* の系での caspase-9 の発現が内有毛細胞部分にも

認められていたことを考えると、内有毛細胞で caspase-3 の活性化が認められなかったというこの結果は、*in vitro* の系では KM により内有毛細胞でアポトーシスが起こらなかったというよりは、この実験系では、内有毛細胞と外有毛細胞のアポトーシスの進行に時間差があったためと考えるべきと思われる。一般に外有毛細胞は内有毛細胞よりもアミノ配糖体感受性が高いと言われている[30-32]。さらに、アミノ配糖体の代謝は極めて遅く細胞内に蓄積されるといわれている[33-34]。以上の点を考慮すると、アミノ配糖体投与後感受性の高い外有毛細胞は比較的早期にアポトーシスが進行し 8 時間の時点で caspase-3 の活性化が起こっているが、一方で内有毛細胞はアミノ配糖体の蓄積に伴い遅れてアポトーシスをきたすため、この時点では caspase-3 の活性化が起こっていないのではないかと推測される。

今回 *in vivo* の実験系では難聴・有毛障害モデルを作成するに当たり、KM に加えて EA を投与した。KM/EA 同時投与は臨床的には用いられることはほとんどない。アミノ配糖体のみを全身投与する方が臨床により即した形として望ましいが、*in vivo* の系でアミノ配糖体の単独投与という方法で難聴・蝸牛有毛細胞障害モデルを作成するためには、数日にわたってアミノ配糖体を投与し続けなければ実現しえず、さらに難聴の程度・細胞障害の程度のばらつきが大きいと言われ[35-37]、研究目的としては単回投与により確実に蝸牛有毛細胞の障害モデルを作成できる本手法が有利であると考え KM/EA 同時投与を採用した。EA はループ利尿薬であるが、KM と同時に投与した場合 EA は蝸牛内の血管条に作用し、KM の蝸牛有毛細胞障害作用を増強するとされている[38]。すなわち、KM/EA の同時投与であっても、有毛細胞の障害については基本的には KM によ

る作用を見ているものと考えられる。実際今回の検討で、*in vivo* においても procaspase-3 の活性化が認められていることから、KM/EA 投与による有毛細胞障害も *in vitro* の KM 単独投与実験同様、有毛細胞の障害パターンはアポトーシスによるものであることが示唆される。一方で、*in vitro* の系では血管条を含めた構造は除去されており、EA の投与は KM と相互作用は示さない[19]。従って、*in vitro* の実験系では KM の単独投与を行った。

内耳・蝸牛は側頭骨内奥深くに存在し、そのアクセス方法は限られており、非侵襲的に蝸牛内への薬剤を投与するのは極めて困難である。比較的非侵襲的な薬剤投与方法として現在用いられているものは全身投与による方法と、中耳・鼓室内に薬剤を投与する方法との 2 種類に限られる。全身投与では最終的には血管を介して内耳へと薬剤は運搬されるが、内耳へ流入する血管は主に血管条や、鼓室階外側壁、蝸牛軸などに分布する[9]。これらの血管では、血管内に配列する内皮細胞がタイトジャンクションにより密に結合されており脳血液関門と同様にバリアー構造を形成している（内耳血液関門）。このため、通常タンパクを含めた高分子物質は内耳血液関門を通過して蝸牛内へ到達することはできない[39-40]。実際、脳血液関門の研究では、分子量 500 以上のものは透過性が限定されると言われている[41]。一方、中耳・鼓室内投与は臨床的にも鼓膜を介して外部から内耳へとアクセスできる数少ない手段である。中耳腔内に薬剤を投与した場合、内耳の中耳腔内に面する正円窓膜が蝸牛への主な薬剤の進入可能経路といわれている[42]。正円窓膜は蝸牛（鼓室階）の基底部に存在する膜である。この正円窓膜は、中耳腔に面する上皮層、中心の結合組織そして蝸牛に面する内皮層に分かれている[43-46]。この中で上皮層が物質の選択的な取り込み

と分泌を行っており、一種のバリアー機能をなしている[47]。正円窓膜の物質透過性については数多くの研究がなされているが、その透過性を決定する因子としては、分子量、物質の構造、接触時間、物質の濃度[47-50]などが言われている。その中でも最も重要なのは脳血管関門などと同様に物質の分子量である。一般的に正円窓膜は抗生物質やステロイドなどの低分子量物質は容易に透過するが、タンパクや脂質などの高分子量物質の透過性は限定的であることが知られている[42,50-53]。今回我々が検討を行った FNK タンパクの分子量は約 30kDa であるが、全身投与においても鼓室内投与においても FNK 単独では内耳への到達を確認できなかった。このことから内耳血液関門も正円窓膜も分子量 30kDa 程度の物質に対しては透過性が限られることが示唆された。しかしながら、PTD を付加した PTD-FNK では、これらバリア機構を透過して蝸牛有毛細胞まで FNK タンパクが到達することが確認できた。PTD を付加すると付加された物質は細胞によるマクロピノサイトーシスで積極的に取り込まれるようになると考えられている[54]。FNK タンパクも PTD を付加したことで、内耳血液関門の内皮細胞および正円窓膜上の上皮細胞において、PTD-FNK のマクロピノサイトーシス作用が加速し、その後内耳側へ PTD-FNK タンパクの分泌がなされ、蝸牛内へと分布し、最終的にはコルチ器有毛細胞内まで到達し得たものと考えられる。アポトーシスに関与すると言われるタンパク、具体的には p53、AKT および Super oxide dismutase など、また内耳再生にかかわるタンパク、具体的には Math1[55] などは、いずれも 30kDa~60kDa であり、FNK 同様それぞれ単独で内耳タンパク治療薬として応用しようとしても、実現は難しいと考えられる。この PTD 付加技術はこれらタンパクにも将来的には応用が可能と考え

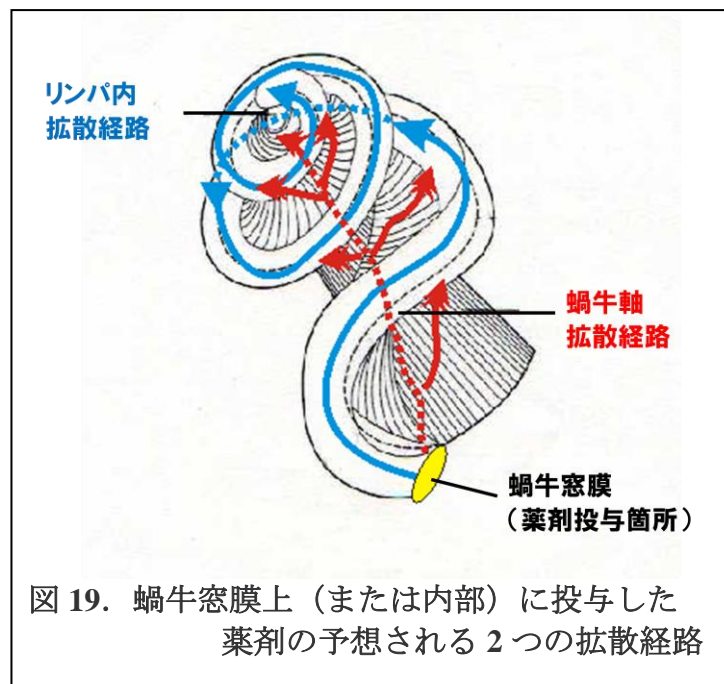
られ、内耳タンパク治療の発展が今後期待されると考える。

今回、PTD-FNK は全身投与の場合でも鼓室内投与の場合でも投与後 1 時間で蝸牛有毛細胞内に到達することが確認された。その他の実験系を見てみると、培養神経芽腫細胞へ PTD-FNK を投与した場合、1 時間以内に取り込まれ 2 時間には半減すると報告されている[14]。マウスに PTD-FNK を皮下注射し肝臓への分布を検討した場合では投与後 1 時間後には目的臓器へと到達し、3 時間後をピークとして、12 時間後には消失することが報告されている[23]。今回 PTD-FNK が投与後比較的早期に蝸牛組織内への到達を確認できた結果は、過去の報告の結果を支持するものである。また、今回染色は細胞の核外細胞質に斑点状に認められた。大脳皮質培養細胞において PTD-FNK の細胞内分布を検討した報告ではミトコンドリア内に局在することが示された[14]が今回のこの斑点状染色もそれを示唆するものと思われる。

本研究で鼓室内投与する際、中耳腔内に単純に PTD-FNK を投与するのではなくゼラチンスポンジに浸す形で投与した。中耳腔内に単純に投与した場合、薬剤の大部分が中耳粘膜に吸収されるか耳管を通じて排出されてしまうと言われており[56]、ゼラチンスポンジに浸し直接正円窓膜上に置くことで、薬剤の排出の抑制、正円窓膜との接触時間の延長などが期待できると考えたためである。ゼラチンスポンジの薬剤保持効果についてはいくつか報告があり、Husmann[57]らはゼラチンスポンジにゲンタマイシンを含ませて正円窓膜に投与した場合、単純なゲンタマイシン鼓室内投与に比べてより蝸牛の障害が強いことを示しており、ゼラチンスポンジに含ませることが薬剤をより効率的に作用させることを証明している。また、Okamoto ら[58]も犬の喉頭軟化症モデル

において Bone Morphogenetic protein-2 (BMP-2) をゼラチンスポンジに含ませることで、BMP-2 がより緩徐に長期間にわたって作用し、軟骨再生を効果的に引き起こすことを報告している。これらの結果を考慮すると、本研究においてもゼラチンスポンジに PTD-FNK を浸し、投与したことで徐放効果を発し、効率的な蝸牛内分布を生んでいると推測される。PTD-myc-FNK の組織内分布をみると、全身単回投与では 6 時間後に消失しており、その他の組織における研究でも大体 6 時間～12 時間の間に組織から消失してしまう結果[14,23]となっているが、ゼラチンスポンジを用いた鼓室内投与では単回投与で 24 時間以上という長期間で組織内での分布が確認できた。投与量を見ても、鼓室内投与において組織内分布を確認するために用いた PTD-myc-FNK の投薬量は全身投与で用いた投薬量に比べると 600 分の 1 程度で確認することができた。厳密な比較には PTD-myc-FNK の組織内蛋白量の定量比較などさらなる検討が必要となるが、ゼラチンスポンジによる鼓室内投与では、全身投与に比べて比較的少量でも蝸牛内への到達が実現されることが予想される。さらに、全身投与では複数回の投薬でしか得られなかった蝸牛有毛細胞障害予防効果が 1 回の投薬で確認ができた。ゼラチンスポンジを用いた鼓室内投与という手法は内耳タンパク治療においてはより効果的な手段であることが推測される。ただし全身投与と鼓室内投与における用量・効果の比較には今後投与量を変化させて、その効果をそれぞれで比較してゆく必要があり、今後詳細な追加検討が必要になると考える。

鼓室内投与・蝸牛窓膜経
由で薬剤を投与した場合は、
蝸牛窓膜透過後その先にあ
る蝸牛内リンパを拡散して
薬剤が基底回転から頂回転
へと浸透することが考えら
れる（図 19）。この場合、
基底部から頂回転まで薬剤
の濃度勾配ができる可能性



があり、言い換えると投与部位から遠い頂回転部分への薬剤作用が減弱することが懸念される。実際、一部の薬剤ではその分布や、効果が基底回転で強かったという報告[21,59]も存在している。低分子物質で拡散が早いと考えられるゲンタマイシンを鼓室内投与した場合でも、その後の蝸牛リンパ内濃度を検討すると基底回転で濃度が高くなったとの報告も存在する[60]。しかしながら、同じゲンタマイシンを免疫細胞化学的に蝸牛内細胞組織内の分布として検討した報告では、ゲンタマイシンは短期間に蝸牛全体の様々な組織に分布することが報告されている。Imamura and Adams[61]らはモルモットに対してゲンタマイシンを鼓室内投与した際の組織内分布を、モノクローナル抗体を用いて検討したが、6時間目まではゲンタマイシンは蝸牛全体に分布し、6時間を超えると徐々に基底回転に集まってくることを示した。さらに、全身投与によっても基底回転に集まることも示しており、このことからゲンタマイシンを鼓室内投与した場合、当初は蝸牛全体に素早く広がり最終的には基底回転の細胞の性質上基底

部での集積が増強するということが推測され、拡散の早い薬剤であれば短期間に蝸牛全体へ分布する可能性が示された。また、Zou[62]らは脂質ナノカプセルを蝸牛窓膜に投与した後の蝸牛内分布を検討したが、投薬後 30 分以内にらせん神経節や、コルチ器、血管条に到達することを示しており、加えてその分布はむしろ基底回転よりも第二回転の方が強かったことを報告している。彼らはこの早期拡散について、物質は蝸牛窓膜を通過した後リンパを拡散するのではなく、蝸牛軸へ入り神経線維に沿って分布していったものと推測している(図 19)。今回の検討でも、PTD-myc-FNK の分布は投与 1 時間後の時点で、基底回転に近い方で LI が若干高い傾向にあったものの、回転毎に LI の有意差はなく、ほぼ同等の分布を認めることができた。この結果は PTD-FNK の鼓室内投与において PTD-FNK は比較的短期間に蝸牛全体に分布していることを示唆しており、Zou[62]らの報告も支持するものであると考えられる。PTD-FNK とナノカプセルは組織への透過性の効率が極めて高い点で一致しており、その透過性ゆえ PTD-FNK もナノカプセルと同様に蝸牛軸を通じ早期に蝸牛全体へ分布できたと予想される。らせん軸に近いらせん神経節細胞でらせん軸から離れたところにある血管条や外側壁に比べ高い LI を示したことや、細胞の障害の抑制が頂回転に近いところで確認できていることも、らせん軸に沿って頂回転方向まで薬剤が浸透していくというこの説を支持するものと考えられる。ただ、一方でコルチ器がらせん神経節に比べ LI が高かったことについてはこの説に反することとなるが、細胞間による薬剤の親和性などの問題とも考えられ、詳細は今後検討すべき課題といえる。

今回の研究では全身投与・鼓室内局所投与いずれの場合もアミノ配糖体投与前

に予防的に PTD-FNK 投与開始することで障害の抑制を実現したのみで、障害の受傷後に投与する方法すなわち、後治療ではその効果を確認していない。今回用いた KM/EA の投与方法は、その内耳障害性は強力で、内耳機能は投与後数分で障害され、細胞死も薬剤投与後 2 時間程度から始まると言われ[63-64]。このことを踏まえると、今回の実験系ではその障害スピードの速さ故、予防投与の必要性があったものと考えられる。臨床でのアミノ配糖体の投薬は今回の投薬方法とは異なるものであり、障害のスピードは緩やかである可能性が高い。また別の内耳障害疾患である音響外傷では、音響外傷受傷後暫く活性酸素や活性窒素酸化物が発生し続けると言われ、有毛細胞の障害は 2 週間程度かけて進行する[65]。音響外傷受傷 3 日後に抗酸化剤の投与を行うことで活性酸素・活性窒素酸化物の減少、聴覚障害・有毛細胞障害の軽減をなし得たという報告もあり[66]、臨床的な感音難聴では中長期的にアポトーシスが進行する疾患も多いと推測される。これらに対しては障害受傷後の PTD-FNK 投与が功を奏する可能性があるといえよう。今後、障害因子を変えて PTD-FNK の後治療が有効であるかどうか検討してゆくべきと考える。

PTD-FNK については内耳治療の他に様々な分野に応用の可能性が期待されている。PTD-FNK は脳血液関門を通過し脳の細胞に到達することが確認されており[14]、スナネズミ・ラットなどを用いた脳虚血モデルにおいて PTD-FNK の事前投与が脳組織の障害を軽減することが報告されている[67-68]。肝臓においても PTD-FNK を腹腔内投与することで肝臓組織へと到達し、PTD-FNK の事前投与で肝臓虚血に伴うアポトーシスを抑制することができると報告されている[69]。Tara らは骨髄移植モデルにおいて、PTD-FNK とともに骨髄を

移植した場合に移植細胞の生存が有意に上昇することを報告している[70]。

Nakashima-Kamimura らはエトポシドによる脱毛モデルマウスに対して PTD-FNK を皮下に事前・または同時投与することで脱毛が予防できることを報告している[71]。リポサッカライドによる急性肺障害モデルにおいて PTD-FNK の効果が報告されており、PTD-FNK の腹腔内投与により肺胞細胞のアポトーシスが抑制されることを証明している[72]。また、ラットを用いた心筋虚血モデル動物に対して、心筋への PTD-FNK の注射が心筋における caspase3 の活性化・アポトーシスを抑制し、有意に梗塞範囲を縮小させたという報告もなされている[73]。これら PTD-FNK を用いた研究では本研究を含め、特に有害事象は認められなかった。しかしながら、抗アポトーシスタンパクの全身投与の研究を含めこれまで行われている研究で癌化の報告もないが、FNK が起源とするタンパク Bcl-x_L 過剰発現モデルでは癌化の報告も存在している[74-45]。このような事実を踏まえると、全身的作用を最小限にする方法が臨床応用上重要と考えられる。今回、局所投与における対側の蝸牛への分布を確認したが、分布は認められておらず、蝸牛窓膜上への投与では全身へ回る量は比較的少なく全身性の副作用の確率も軽減されることが推測され、この意味でも鼓室内投与局所投与は、内耳治療としてより理想的な投与方法と考えられた。

PTD 付加技術は PTD-FNK 以外にも存在する。例えば、Protein kinase C 阻害剤に PTD を付加し、急性心筋梗塞患者に対して投与するという研究は、Phase II トライアルが進行中であり[76]、臨床試験の段階に至っている。さらに、より効率的に取り込みを行う PTD ドメインの開発も研究も進行中である。今後近い未来にタンパク治療の臨床応用範囲が拡大することがおおいに期待される。

まとめ

1. *in vitro* 蝸牛培養細胞で KM による有毛細胞障害がアポトーシス抑制タンパク PTD-FNK を投与することで抑制することを示した。また、caspase-9 の発現を比較すると有意に PTD-FNK 投与群で低下していた。また、*in vivo* においても KM と EA による蝸牛有毛細胞障害モデルにおいて PTD-FNK の投与が procaspase-3 の発現を抑制することも示された。以上のことから PTD-FNK はアミノ配糖体によるミトコンドリアを介した内因性アポトーシスの系を制御することで蝸牛有毛細胞の死を抑制していることが示唆された。

2. PTD-FNK を腹腔内全身投与することで、投与 1 時間頃から蝸牛内に到達し、6 時間後に消退することを確認した。一方で PTD を付加しない FNK は蝸牛への到達は確認できなかった。以上のことから PTD を付加することで PTD-FNK は高分子タンパクでありながら、内耳血液関門を透過して蝸牛内へ到達することが分かった。さらに、PTD-FNK を鼓室内正円窓上にゼラチンスポンジに浸して投与するという局所投与でも蝸牛内に到達することが分かった。この場合、タンパクは 1 時間後より蝸牛内に到達して 24 時間まで PTD-FNK が蝸牛内にとどまり 48 時間後には消失した。対側耳の検討では分布は認められず、一側の蝸牛内に PTD-FNK の分布が限局していることが示唆された。PTD-FNK 投与 1 時間時点ですでに蝸牛内では基底回転から上方の第二・第三回転まではほぼ同等の分布を示すことが分かり、局所投与でも PTD-FNK は蝸牛全体に短期間に分布することが分かった。一方で PTD を付加しない FNK は蝸牛への到達は確認できなかった。以上のことから、PTD-FNK は鼓室内投与により、内耳正円窓膜バリアーを透過し蝸牛全体に到達することも可能であり、かつ投与側内耳局

所的な作用が期待できることが考えられた。

3. KM/EA 投与蝸牛有毛細胞障害・難聴モデルにおいて障害薬剤投与前後に PTD-FNK を複数回全身投与することで、蝸牛有毛細胞障害・聴力閾値上昇を 2 種類の KM/EA 投与量において、いずれにおいても有意に障害を抑制することを示した。また、鼓室内投与では KM/EA 投与蝸牛有毛細胞障害・難聴モデルに対して障害薬剤投与前 1 回の投与でも蝸牛有毛細胞障害・聴力閾値上昇を有意に抑制することも示された。全身投与および、鼓室内局所投与といういずれの投与方法においても、高分子タンパクを細胞内へ導入させたうえ、機能させることが可能であることも確認できた。

謝辞

本研究を終えるに臨み、ご校閲、ご指導を賜りました指導教官である山唄達也先生(東京大学耳鼻咽喉科学教室教授)に謹んで深謝いたします。また、PTD-FNK をご提供くださった共同研究者の太田成男先生（日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野）・麻生定光先生・佐藤佑一郎先生に深謝いたします。さらに、本研究において実験の手順などご指導いただきました坂本幸士先生、近藤健二先生をはじめとした当研究室の先生方、標本の準備、動物の管理などお手伝いいただきました倉澤由香里さん、宮澤晃一さん、露崎敦子さんにも心から感謝申し上げます。

参考文献

1. 小川郁 急性高度難聴に関する調査研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009.
2. Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 72: 931-935, 2007.
3. Oishi N, Schacht J. Review. Emerging treatments for noise-induced hearing loss .*Expert Opin Emerg Drugs.* 16: 235-245, 2011. .
4. Omotehara Y, Hakuba N, Hato N, Okada M, Gyo K. Protection against ischemic cochlear damage by intratympanic administration of AM-111. *Otol Neurotol.* 32: 1422-1427, 2007.
5. Eshraghi AA, Van de Water TR. Cochlear implantation trauma and noise-induced hearing loss: Apoptosis and therapeutic strategies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 288: 473-481, 2006.
6. Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid. *Hear Res.* 259: 16-23, 2010.
7. Hu BH, Zheng GL. Membrane disruption: an early event of hair cell apoptosis induced by exposure to intense noise. *Brain Res.* 1239: 107-118, 2008.
8. Liu YH, Ke XM, Qin Y, Gu ZP, Xiao SF. Adeno-associated virus-mediated Bcl-xL prevents aminoglycoside-induced hearing loss in mice. *Chin Med J* 120 : 1236-1240, 2007.
9. Swan EE, Mescher MJ, Sewell WF, Tao SL, Borenstein JT. Inner ear drug delivery for auditory applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 60: 1583-1599,

- 2008.
10. Tanaka K, Motomura S. Permeability of the labyrinthine windows in guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol* 233: 67-73, 1981.
 11. Frankel AD, Pabo CO. Cell. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. 55: 1189-1193, 1988.
 12. Snyder EL, Dowdy SF. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin Drug Deliv.* 2: 43-51, 2005.
 13. Matsushita M, Matsui H. Protein transduction technology. *J Mol Med (Berl)*. 83: 324-328, 2005.
 14. Asoh S, Ohsawa I, Mori T, Katsura K, Hiraide T, Katayama Y et al. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 17107-17112, 2002.
 15. Nagai S, Asoh S, Kobayashi Y, Shidara Y, Mori T, Suzuki M et al. Protection of hepatic cells from apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury by protein therapeutics. *Hepatol Res* 37: 133-142, 2007.
 16. Tara S, Miyamoto M, Asoh S, Ishii N, Yasutake M, Takagi G, Takano T, Ohta S. Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells. *J Mol Cell Cardiol.* 42: 489-497, 2007.
 17. Asoh S, Mori T, Ohta S. Practicable recovery of plasmids carrying cDNAs encoding anti-apoptotic factors that had been introduced by particle bombardment into 5-week old rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 272 :

- 62-66, 1999.
18. Sobkowitz HM, Loftus JM, Slapnick SM. Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl* 502: 3-36, 1993.
 19. Fox KE, Brummett RE. The relationship between the cytotoxicity of kanamycin and ethacrynic acid for mammalian cells in vitro and their ototoxicity in vivo. *Acta Otolaryngol.* 87: 72-78, 1979.
 20. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusano G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 45: 1559-1565, 1997.
 21. Kawamoto, K, Yagi, M, Stover, T, Kanzaki, S, and Raphael, Y. Hearing and hair cells are protected by adenoviral gene therapy with TGF-beta1 and GDNF. *Mol Ther* 7: 484-492, 2003.
 22. Yamasoba T, Kondo K. Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell Tissue Res.* 325:23-31, 2006.
 23. Asoh S, Mori T, Nagai S, Yamagata K, Nishimaki K, Miyato Y, Shidara Y, Ohta S. Zonal necrosis prevented by transduction of the artificial anti-death FNK protein. *Cell Death Differ.* 12: 384-394, 2005.
 24. Pourbakht A, Yamasoba T. Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hear Res* 181: 100-108, 2003.
 25. Wei X, Zhao L, Liu J, Dodel RC, Farlow MR, Du Y. Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Neuroscience.* 131: 513-521, 2005.

26. Cunningham LL, Matsui JI, Warchol ME, Rubel EW. Overexpression of Bcl-2 prevents neomycin-induced hair cell death and caspase-9 activation in the adult mouse utricle in vitro. *J Neurobiol.* 60: 89-100, 2004.
27. Cunningham LL, Cheng AG, Rubel EW. Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J Neurosci.* 22: 8532-8540, 2002.
28. Chen Y, Huang WG, Zha DJ, Qiu JH, Wang JL, Sha SH, Schacht J. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: from the laboratory to the clinic. *Hear Res.* 226: 178-182, 2007.
29. Hirose K, Westrum LE, Stone JS, Zirpel L, Rubel EW. Dynamic studies of ototoxicity in mature avian auditory epithelium. *Ann N Y Acad Sci* 884: 389-409, 1999.
30. Dallos P, Harris D. Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol.* 41: 365-383, 1978.
31. Schmiedt RA, Zwislocki JJ, Hamernik RP. Effects of hair cell lesions on responses of cochlear nerve fibers. I. Lesions, tuning curves, two-tone inhibition, and responses to trapezoidal-wave patterns. *J Neurophysiol.* 43: 1367-1389, 1980.
32. Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurotol.* 5 : 3-22, 2000.
33. Hashino E, Shero M, Salvi RJ. Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res.* 777 : 75-85, 1997.
34. Ding D, Jin X, Zhao J. Accumulation sites of kanamycin in cochlear basal

- membrane cells. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 30 : 323-325, 1995.
35. Aran JM. Evaluation of the ototoxicity of aminoglycosides. Comparative study of dibekacin, gentamicin and tobramycin. *Nouv Presse Med.* 11 : 3426–3431, 1982.
 36. Hangfu M, Zhao J, Ding D. The prophylactic effect of thyroxin on kanamycin ototoxicity in guinea pigs. *Hear Res.* 61: 132–136, 1992.
 37. Zhu Q, Liu G, Ding D, Jin X. Accumulation of gentamycin in perilymph of guinea pigs. *Acad J Second Mil Med Univ.* 14: 568–571, 1993.
 38. Liu H, Ding DL, Jiang HY, Wu XW, Salvi R, Sun H. Ototoxic destruction by co-administration of kanamycin and ethacrynic acid in rats. *J Zhejiang Univ Sci B.* 12 : 853-861, 2011.
 39. K. Jahnke. The fine structure of freeze-fractured intercellular junctions in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol. Suppl.,* 336 : 1–40, 1975
 40. R. Kimura, C. Ota Ultrastructure of the cochlear blood vessels *Acta Otolaryngol.,* 77 : 31–250, 1974.
 41. Levi VA. Relationships of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* 23: 682-684, 1980.
 42. Tanaka K, Motomura S. Permeability of the labyrinthine windows in guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol* 233: 67-73, 1981.
 43. Tsuji J, Liberman MC. Intracellular labeling of auditory nerve fibers in guinea pig: central and peripheral projections. *J Comp Neurol.* 381: 188-202, 1997.

44. Bellucci RJ, Fisher EG, Rhodin J. Ultrastructure of the round window membrane. *Laryngoscope* 82: 1021-1026, 1972.
45. Carpenter AM, Muchow D, Goycoolea MV. Ultrastructural studies of the human round window membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 115: 585-590, 1989.
46. Miriszalai E, Benedeczky I, Horváth K, Köllner P. Ultrastructural organization of the round window membrane in the infant human middle ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 45: 29-38, 1983.
47. Goycoolea MV, Lundman L. Round window membrane. Structure function and permeability: a review. *Microsc Res Tech.* 36: 201-211, 1997.
48. Lundman LA, Holmquist L, Bagger-Sjoberg D. Round window membrane permeability. An in vitro model. *Acta Otolaryngol* 104: 472-480, 1987.
49. Juhn SK, Hamaguchi Y, Goycoolea, M. Review of round window membrane permeability. *Acta Otolaryngol Suppl* 457: 43-48, 1989.
50. Brady DR, Pearce JP, Juhn SK. Permeability of round window membrane to ^{22}Na or RISA. *Arch Otorhinolaryngol* 214: 183-184, 1976.
51. Nomura Y. Otological significance of the round window. *Adv Otorhinolaryngol* 33: 1-162, 1984.
52. Morizono T, Hamaguchi Y, Juhn SK. Permeability of human serum albumin from chinchilla middle ear to inner ear. In XXIII workshop on inner ear biology 1986; Berlin, GDR.
53. Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B, Carpenter AM. Permeability of the round window membrane in otitis media. *Arch Otolaryngol* 106:

- 430-433, 1980.
54. Wadia JS, Dowdy SF. Protein transduction technology *Curr Opin Biotechnol.* 13: 52-56, 2002.
55. Akazawa C, Ishibashi M, Shimizu C, Nakanishi S, Kageyama R. A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 270: 8730-8738, 1995.
56. Ruel-Gariepy E, Chenite A, Chaput C, Guirguis S, Leroux J. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *Int J Pharm* 203: 89-98, 2000.
57. Husmann KR, Morgan AS, Girod DA, Durham D. Round window administration of gentamicin: a new method for the study of ototoxicity of cochlear hair cells. *Hear Res* 125: 109-119, 1998.
58. Okamoto T, Yamamoto Y, Gotoh M, Huang CL, Nakamura T, Shimizu Y et al.. Slow release of bone morphogenetic protein 2 from a gelatin sponge to promote regeneration of tracheal cartilage in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127: 329-334, 2004.
59. Lee KY, Nakagawa T, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, Lee SH, Ito J. Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 28: 976-981, 2007.
60. Salt AN. Simulation of methods for drug delivery to the cochlear fluids. *Adv Otorhinolaryngol.* 59: 140-148, 2002.

61. Imamura S, Adams JC. Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. *J Assoc Res Otolaryngol.* 4: 176-195, 2007.
62. Zou J, Saulnier P, Perrier T, Zhang Y, Manninen T, Toppila E et al. Distribution of lipid nanocapsules in different cochlear cell populations after round window membrane permeation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 87: 10-18, 2008.
63. Nourski KV, Miller CA, Hu N, Abbas PJ. Co-administration of kanamycin and ethacrynic acid as a deafening method for acute animal experiments. *Hear Res.* 187: 131-133, 2004.
64. Russell NJ, Fox KE, Brummett RE. Ototoxic effects of the interaction between kanamycin and ethacrynic acid. Cochlear ultrastructure correlated with cochlear potentials and kanamycin levels. *Acta Otolaryngol.* 88: 369-381, 1979.
65. Yamashita D, Jiang HY, Schacht J, Miller JM. Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 1019: 201-209, 2004.
66. Yamashita D, Jiang HY, Le Prell CG, Schacht J, Miller JM. Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience.* 134: 633-642, 2005.
67. Katsura K, Takahashi K, Asoh S, Watanabe M, Sakurazawa M, Ohsawa I, Mori T, Igarashi H, Ohkubo S, Katayama Y, Ohta S. Combination therapy with transductive anti-death FNK protein and FK506 ameliorates brain damage with focal transient ischemia in rat. *J Neurochem.* 106: 258-270,

2008.

68. Sakurazawa M, Katsura K, Saito M, Asoh S, Ohta S, Katayama Y. Mild hypothermia enhanced the protective effect of protein therapy with transductive anti-death FNK protein using a rat focal transient cerebral ischemia model. *Brain Res.* 1430: 86-92, 2012.
69. Nagai S, Asoh S, Kobayashi Y, Shidara Y, Mori T, Suzuki M, Moriyama Y, Ohta S. Protection of hepatic cells from apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury by protein therapeutics. *Hepatol Res.* 37: 133-142, 2007.
70. Tara S, Miyamoto M, Asoh S, Ishii N, Yasutake M, Takagi G, Takano T, Ohta S. Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells, *J Mol Cell Cardiol.* 42 : 489-497, 2007.
71. Nakashima-Kamimura N, Nishimaki K, Mori T, Asoh S, Ohta S. Prevention of chemotherapy-induced alopecia by the anti-death FNK protein. *Life Sci.* 82: 218-225, 2008.
72. Chen H, Zhang L, Jin Z, Jin E, Fujiwara M, Ghazizadeh M, Asoh S, Ohta S, Kawanami O. Anti-apoptotic PTD-FNK protein suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 83: 377-384, 2007.
73. Arakawa M, Yasutake M, Miyamoto M, Takano T, Asoh S, Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. *Life Sci.* 80:

2076-2084, 2007.

74. Minn AJ, Boise LH, Thompson CB. Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev.* 10: 2621-2631, 1996.
75. Valera ET, Brassesco MS, Scrideli CA, Tone LG. Tetraploidization in Wilms tumor in an infant. *Genet Mol Res.* 9: 1577-1581, 2010.
76. Chen L, Harrison SD. Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem Soc Trans.* 35: 821-825, 2007.