

## 【別紙1】

### 論文の内容の要旨

論文題目 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  
氏 名 樫尾 明憲

急性感音難聴は音声言語入力の欠如によるコミュニケーションの障害をはじめとした様々な弊害をもたらし、QOLの低下をきたす。このため急性感音難聴の予防戦略の確立は重要な課題である。これまで、急性感音難聴発生メカニズムは様々な動物実験モデルにおいて研究が進んでいる。具体的には、アミノ配糖体投与によるモデル、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。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。内耳急性感音難聴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 Bcl2 ファミリータンパクの関与の結果 caspase-9 の活性化から caspase-3 が引き起こされアポトーシスへと進む経路が多く報告されている。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、これらアポトーシス関連蛋白の活用によるアポトーシスの制御という戦略があがってきた。タンパクを体内に導入する方法としては、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」が一般的である。実際内耳においても遺伝子治療の研究はなされており、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も報告されている。しかしながら、遺伝子導入には潜在的なリスクがあり、発現までのタイムラグや発現量の調節の問題もあるため、急性障害に対する治療方法としては不向きである。一方、タンパクを直接体内に投与することで治療につなげる戦略は「タンパク治療」と呼ばれ、インスリンや顆粒球コロニー刺激因子など臨床的に応用されているものも存在する。タンパク治療では必要時に必要量タンパクを投与することが可能であり、潜在的なリスクの軽減と急性疾患への効果が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、蝸牛窓を介する方法（局

所投与)の2種類が挙げられるが、それぞれ内耳に到達するまでに、内耳血液関門・蝸牛窓膜がバリアーの役割を果たし高分子のタンパクはこれを透過することができず、タンパク製剤の到達は困難なことが多い。

1988年 Frankel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 タンパクのアルギニンに富む約 10-20 塩基程度の一部の配列が重要であることが分かり、これが 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が、アルギニンは強塩基性の残基であり、一つの有力な説としては 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もち細胞表面に付着し、これが細胞のマクロピノサイトーシスという貪食作用により取り込まれるのではないかとされている。PTD は HIV ウイルスの他に HSV ウイルスの VP-22 タンパクでも同様なドメインが存在することが分かり、さらには人工的にも PTD ドメインが合成されるようになっている。これら PTD は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。

このような背景の中、我々の協同研究者は PTD 付加技術を用い PTD-FNK というタンパクを作製した。FNK はアポトーシス関連蛋白である 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-xL タンパクのアミノ酸配列を一部変更することでよりその活性を強化したタンパクである。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。このタンパクはミトコンドリア上で作用するタンパクであるが、アミノ酸配列の変更によりミトコンドリア膜嵌入部位の水素結合が消失し、ミトコンドリアとの親和性が上がるため活性が強化すると考えられている。PTD としては HIV 由来の Tat タンパクに由来した 11 アミノ酸残基を付加している。この 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・細胞障害の予防効果を示した他、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効果が証明されている。

本研究では、この PTD-FNK タンパクを内耳へ導入することを試み、内耳アポトーシス抑制による急性聴覚障害予防について実験的検討を行った。

まず *in vitro* において硫酸カナマイシン (KM) による蝸牛有毛細胞障害モデルを作成し PTD-FNK が有毛細胞の障害を予防できるかを検討した。P5 ラットの培養細胞を KM, KM+FNK, KM+PTD-FNK および溶媒のみを加えた培養液で培養し 10 時間後に caspase-9 の発現を検討した。さらに同様の条件で 12 時間培養し有毛細胞の障害率を比較した。KM 単独、FNK (PTD の付加していないもの) に KM を加えた場合には 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。12 時間後における細胞数の比較でも外有毛細胞で PTD-FNK 投与群は有意に障害を抑制することが分かった。以上から PTD-FNK は PTD を付加することで有毛細胞内に導入され、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

害を抑制したことが示唆された。

*in vitro* に続き、*in vivo* 全身投与 における PTD-FNK の効果を検討した。まずは、PTD-FNK が実際に蝸牛内の細胞に取り込まれるかどうかを検討した。組織内に取り込まれた PTD-FNK を検出するに当たり、PTD-FNK に myc Tag を挿入した PTD-myc-FNK を作製した。これを白色モルモットに腹腔内投与し、myc に対する抗体を用いて免疫染色を行い、その取り込みを検討した。3 時間後における蝸牛ではコルチ器・らせん神経節細胞をはじめとして取り込みが確認された。器官の染色性を背景との比較を用い Labeling Index(LI) を算定し定量化比較した。時間的な経過を検討すると投与 1 時間後から染色性が認められ 3 時間後をピークとして 6 時間後にはほぼ消失していた。以上より PTD-FNK は全身投与により内耳血液関門を通過し蝸牛内へ到達することができることが示唆された。

次に、PTD-FNK 全身腹腔内投与による急性感音難聴に対する効果を検討した。急性感音難聴モデル動物としては白色モルモットに対して KM200mg/kg とエタクリン酸 (EA) 40mg/kg を投与して作成する急性感音難聴実験モデルを用いた。PTD-FNK を KM 投与 1 時間前から 7 時間後にわたって複数回投与し、2 週間後における ABR 閾値変化、蝸牛有毛細胞の障害率を検討した。その結果 PTD-FNK 投与群と非投与群で ABR 閾値変化を比較すると PTD-FNK 投与群で有意に聴力閾値上昇が抑制されていることが分かった。細胞の障害率も PTD-FNK 投与群で有意に抑制されていることが分かり、全身投与により PTD-FNK は KM, EA による有毛細胞障害・聴覚障害を抑制することが示唆された。

さらに、同様の条件でアポトーシス進行の指標である Cleaved PARP の発現についても検討したが、PTD-FNK 投与群は非投与群に比べて外有毛細胞において有意に Cleaved PARP の発現が減少しており *in vivo* の実験系からも PTD-FNK はアポトーシス抑制効果があることが示唆された。

続いて、より限局的な投与手法としての鼓室内投与による治療の可能性を検討した。全身投与と同様に、まずは鼓室内投与により蝸牛内へ取り込まれるかどうかを検討した。白色モルモットを用い、PTD-myc-FNK をゼラチンスポンジに浸して蝸牛正円窓膜上に留置、蝸牛内の分布を免疫組織学的に検討した。PTD-myc-FNK はコルチ器をはじめとして、らせん神経節細胞、血管条、らせん靭帯、蝸牛外側壁に取り込まれていることが分かった。LI を用いて時間的な経過を比較すると、1 時間後から取り込みは認められ 24 時間後まで有意に染色を認めることができた。薬剤を投与した正円窓近傍である基底回転部分と比較的距離のある第二回転、第三回転での投与後 1 時間および 6 時間における LI の比較を行ったが有意差はなかった。一方で、PTD を付加しない myc-FNK では染色性は認めず、蝸牛内へ到達ができないことが分かった。また、PTD-myc-FNK を投与した反対側の耳についても検討を行ったが、染色性は認めず、蝸牛正円窓膜上に投与した PTD-myc-FNK は一側の耳に限局することが示唆された。以上より PTD-FNK タンパクは PTD を付加することで通常高分子タンパクが通過困難といわれる正円窓膜を透過することが可能であることが示唆された。さらに、鼓室内・正円窓経由の投与方法でも PTD-FNK は比較的早期に蝸牛全体に広がることを示唆され、かつ全身投与に比べてより長時間蝸牛内に分布することが予想

された。また、対側蝸牛への分布がないことから局所投与の場合全身的な影響はさらに少なくなると考えられた。

続いて、PTD-FNK 鼓室投与による急性難聴予防効果を検討した。KM 投与 1 時間前に正円窓膜上に一側にゼラチンスポンジに浸透させた PTD-FNK を対側には溶媒のみを浸したゼラチンスポンジを手術的に置き、14 日後に ABR 聴力変化と蝸牛有毛細胞の障害率を確認した。PTD-FNK を投与していない耳では高度の難聴をきたすのに対して、PTD-FNK を投与した耳では閾値上昇が抑えられており、有毛細胞の障害率についても PTD-FNK を投与した場合障害率は有意に軽減した。以上のことから PTD-FNK は鼓室内投与という局所的な投与方においても KM, EA による有毛細胞障害・聴覚障害の抑制が可能であることが示唆された。