

Mannitol Protects Hair Cells Against Tumor Necrosis Factor α -Induced Loss.

Bas Infante E, Channer GA, Telischi FF, Gupta C, Dinh JT, Vu L, Eshraghi AA, Van De Water TR.
Cochlear Implant Research Program, University of Miami Ear Institute, Miami, Florida, U.S.A.

Abstract

HYPOTHESIS: Mannitol has otoprotective effects against tumor necrosis factor (TNF) α -induced auditory hair cell (HC) loss.

BACKGROUND: Mannitol has been demonstrated to possess cytoprotective effects in several organ systems. Its protective effect on post ischemic hearing loss has also been shown. Mannitol's otoprotective mechanism and site of action are at present unknown.

MATERIALS AND METHODS: Organ of Corti (OC) explants were dissected from 3 day-old rat pups. The safety (nonototoxicity) of mannitol was assessed at 4 different concentrations (1-100 mM). Three experimental arms were designed including: a control group, TNF α group, and TNF α + mannitol group. Cell viability was determined by counts of fluorescein isothiocyanate (FITC) phalloidin stained HC. Immunofluorescence assay of phospho-c-Jun and the proapoptotic mediators, cleaved caspase-3, apoptosis inducing factor (AIF), and endonuclease G (Endo G) were performed.

RESULTS: Analysis of HC density confirmed the safety of mannitol at concentration ranges of 1 to 100 mM. The ototoxic effect of TNF α was demonstrated ($p < 0.05$). The otoprotective effect of 100 mM mannitol in TNF α -challenged OC explants was also demonstrated ($p < 0.001$). Mannitol treatment reduced the high levels of phospho-c-Jun observed in the TNF α -challenged group. AIF cluster formation and EndoG translocation into the nuclei of HCs were also reduced by mannitol treatment.

CONCLUSION: Mannitol significantly reduces the ototoxic effects of TNF α against auditory HC's potentially by inhibiting c-Jun N terminal kinase (JNK) activation pathway and AIF, EndoG nuclear translocation. This local otoprotective effect may have therapeutic implications in inner ear surgery, for example, cochlear implants, protection of residual hearing, as well as implications for post ischemic inner ear insults.

マンニトールは TNF- α による有毛細胞のネクロシスを抑制する

仮説: マンニトールは TNF- α による有毛細胞への傷害を押さえる働きを持つ。

背景: マンニトールはいくつかの臓器において、細胞保護の働きを持つ。虚血後の難聴においても保護的な働きを持つことが知られている。マンニトールの有毛細胞保護のメカニズムや作動部位は分かっていない。

材料と方法: コルチ器は日齢 3 の子ラットから採取された。マンニトールの安全性は 1-100mM で 4 種類の濃度で確かめた。主実験はコントロール群・TNF- α 群・TNF- α + マンニトール群で行い、有毛細胞は FITC 標識ファロイジン染色にて計数した。また、phospho-c-Jun、アポトーシス促進因子:cleaved caspase-3、apoptosis inducing factor (AIF)、endonuclease G (Endo G)の免疫染色を行った。

結果: 1-100mM の濃度でのマンニトールの安全性が確かめられた。TNF- α の耳毒性が示された($p < 0.05$)。TNF- α 曝露下での 100mM マンニトールの耳保護作用が示された($p < 0.001$)。マンニトール追加群では、TNF- α 曝露群で認められた phospho-c-Jun の濃度上昇が減少していた。AIF クラスター生成や、EndoG の核内への移行も減少していた。

結論: マンニトールは JNK、AIF、EndoG 転移を抑制し、TNF- α の耳毒性を軽減する。この局所的な耳保護作用は、CI などの内耳手術での残存聴力の保護での治療の一助となるかもしれないし、虚血後の内耳障害においても同様である。

マンニトールは、浸透圧利尿薬として臨床的に広く使われているが、その臓器保護作用については、一部の研究があるのみである。血管作動性によるものか、細胞保護の働きによるものか詳細についてはまだわからない点が多く、内耳に対する働きについてはほとんど研究されていない。

今回の研究では炎症性サイトカインである TNF- α の耳毒性を用いて、マンニトールの細胞保護作用について調べた。

図1 細胞の生存について、apex/middle/basal turn での細胞数を計数。TNF- α 群で basal turn で有意に傷害を認めるが、マンニトール追加投与群では保護作用を認める。

図の説明文が矛盾、多分、別の図を挿入してしまったのだろう。本当は、どのマンニトールの濃度(1,10,50,100mM)でも有毛細胞が傷害されないことを示す図が入るはずだった。

図2 図1と同様。図1の改訂版の図だろう。

図3 phospho-c-Jun 免疫染色。TNF- α 単独投与群では支持細胞内に p-c-Jun を認めるが、マンニトール追加投与群では、それが抑えられている。有毛細胞では変化なし。

図4 Endo G の nuclear translocation。有毛細胞 stereocilia は FITC-phalloidin にて染色。ミトコンドリアは Mitotracker orange、有毛細胞の核は DAPI(青)にて染色。Endo G は anti-Endo G-Alexa 633(赤)で染色。TNF- α 投与群で有毛細胞核内に Endo G を認め、マンニトール追加投与群ではこれが減少している。

図5 AIF で図4と同じことをした。AIF についても、図4と同様の結果が得られた。

マンニトールの細胞保護作用が、循環血液量の増加による組織循環の改善による pO₂ の上昇によるものなのか、OH 基の持つフリーラジカルを中和する働きによる物かはまだはっきりしていない。しかし、今回の研究から、炎症カスケードのうち少なくとも一つのパスウェイではマンニトールが細胞保護的に働くことが分かった。

マンニトールを治療で使用する際の投与経路については、いくつかの考察が可能である。点滴での投与が最も考えられるが、鼓室内投与が行われているステロイドと同様の経路を使用できる可能性がある。分子量 182 であるマンニトールは Round Window Membrane を透過することができる可能性がいくつかの研究から示唆されており、例えば、虚血に対しマンニトールを鼓室内投与した研究では DPOAE の減少の抑制が観察されており、このことは、マンニトールが、上記のような循環作動的に耳保護作用をもたらしたのではないことを示唆している。

TNF- α は、ミトコンドリアパスウェイを通じて hair cell (HC) のアポトーシスを引き起こすと考えられる。このパスには、proapoptotic Bax molecule や JNK や Bcl-2 といった anti apoptosis gene の down regulation も含まれている。今回の研究では、TNF- α により認められる p-c-Jun が、HC ではなく supporting cell (SC) において抑制されており、いくつかの研究でも示されているとおり、HC の細胞死に SC が関わっていることが示された。また、HC の TNF- α による apoptosis は caspase-3 パスウェイにより制御されていないことがわかった。HC の apoptosis は AIF や Endo G の細胞質への移行といったミトコンドリア傷害性のルートにより制御されていると考えられ、マンニトールは、これらのミトコンドリア膜間からの細胞質への移行を抑えることで細胞死を防いでいると考えられる。

この結果の臨床応用として、ステロイド抵抗性の難聴に対して使用することも考えられるが、今回使用した材料は日齢 3 であり、成人でも同様の結果を得ることができるかは未知数である。また、SC や HC の状態が同様に体内でも保たれるかは分からない。また、上述の通り、C I 等で残存聴力を期待する場合等においても使用が考えられる。

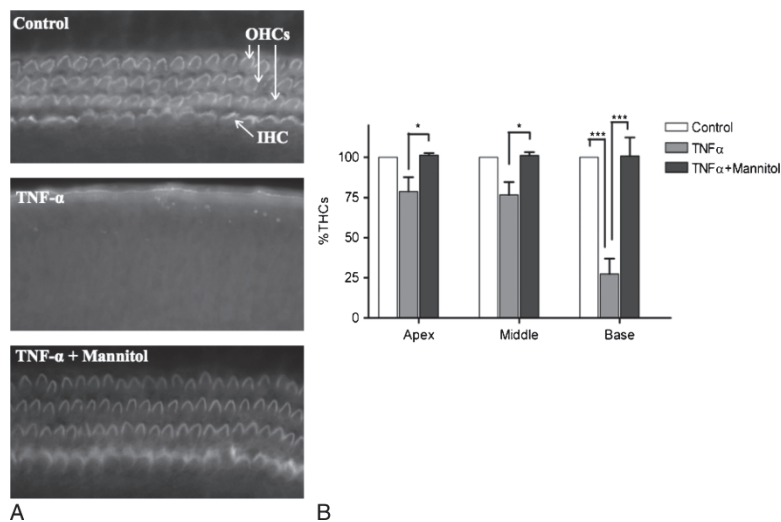


FIG. 1. Cell viability assay. Total HC counts in the apex, middle, and basal turns for the control and mannitol at 4 different concentrations. All values are mean $\pm$ SD; ns indicates not significant.

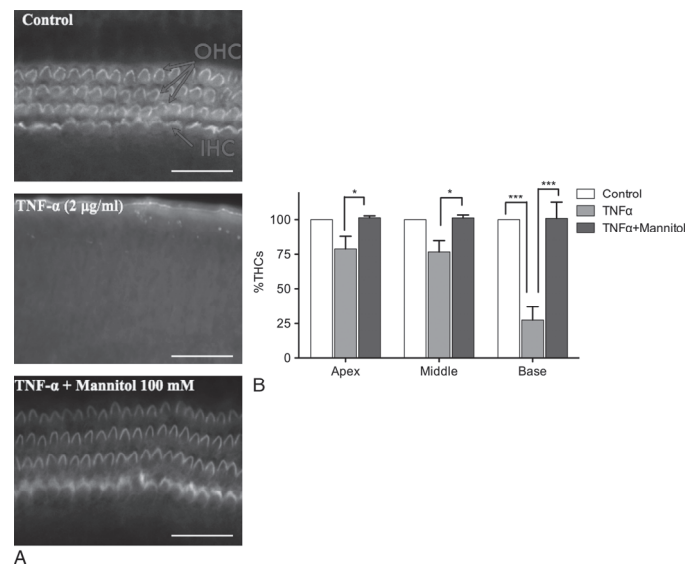


FIG. 2. Otoprotective effect of mannitol in TNF α -challenged organ of Corti explants. A, Basal turn HCs stained with FITC phalloidin, HC stereociliary bundles stain fluorescent green. Bars = 20 μ m. B, Total HC counts in the apex, middle, and basal turns of the control, TNF α , and TNF α +mannitol. All values are mean $\pm$ SD. * p < 0.05; *** p < 0.001.

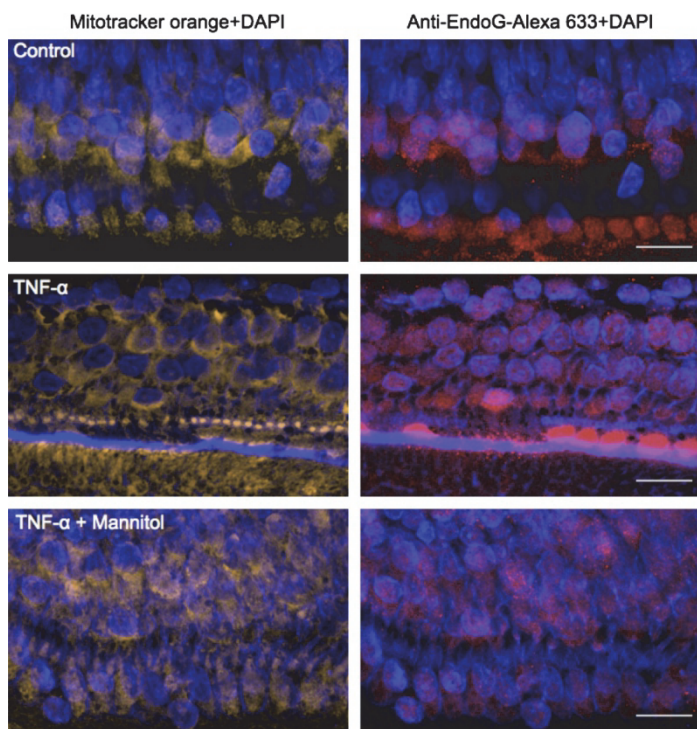


FIG. 4. Nuclear translocation of Endo G from mitochondria in the control, TNF α , TNF α +mannitol, and mannitol. HCs stereocilia were stained with FITC phalloidin (green, not shown). Mitochondria were stained with Mitotracker orange, and nuclei of HCs were stained with DAPI (blue). EndoG was stained with anti-EndoG-Alexa 633 (red). Hair cell nuclei (blue) of TNF α exposed explants show increased levels of immunostain directly over these nuclei indicating intranuclear presence of Endo G (red) and this pattern of immunolabeling is reduced in the TNF α + Mannitol specimens. Images were obtained from explant basal turns. Bars = 20 μ m.

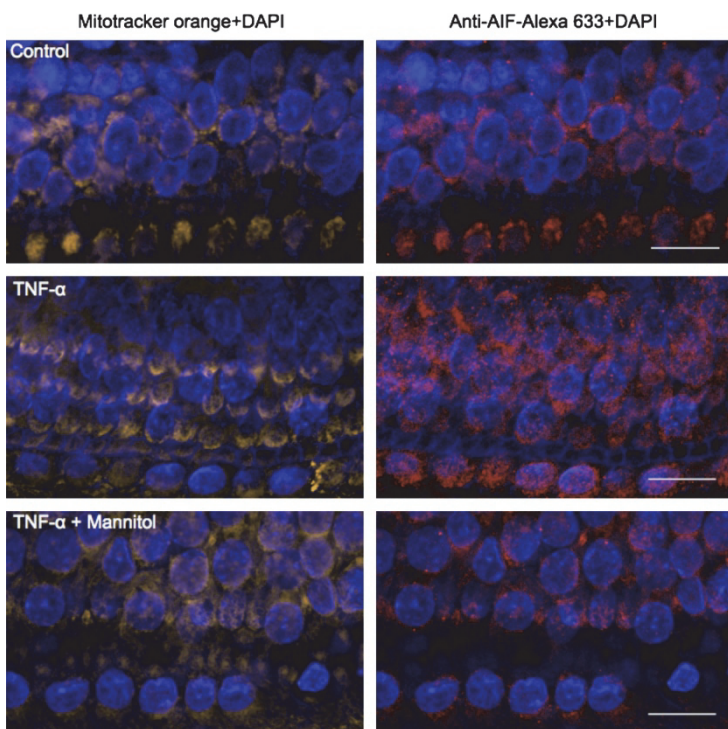
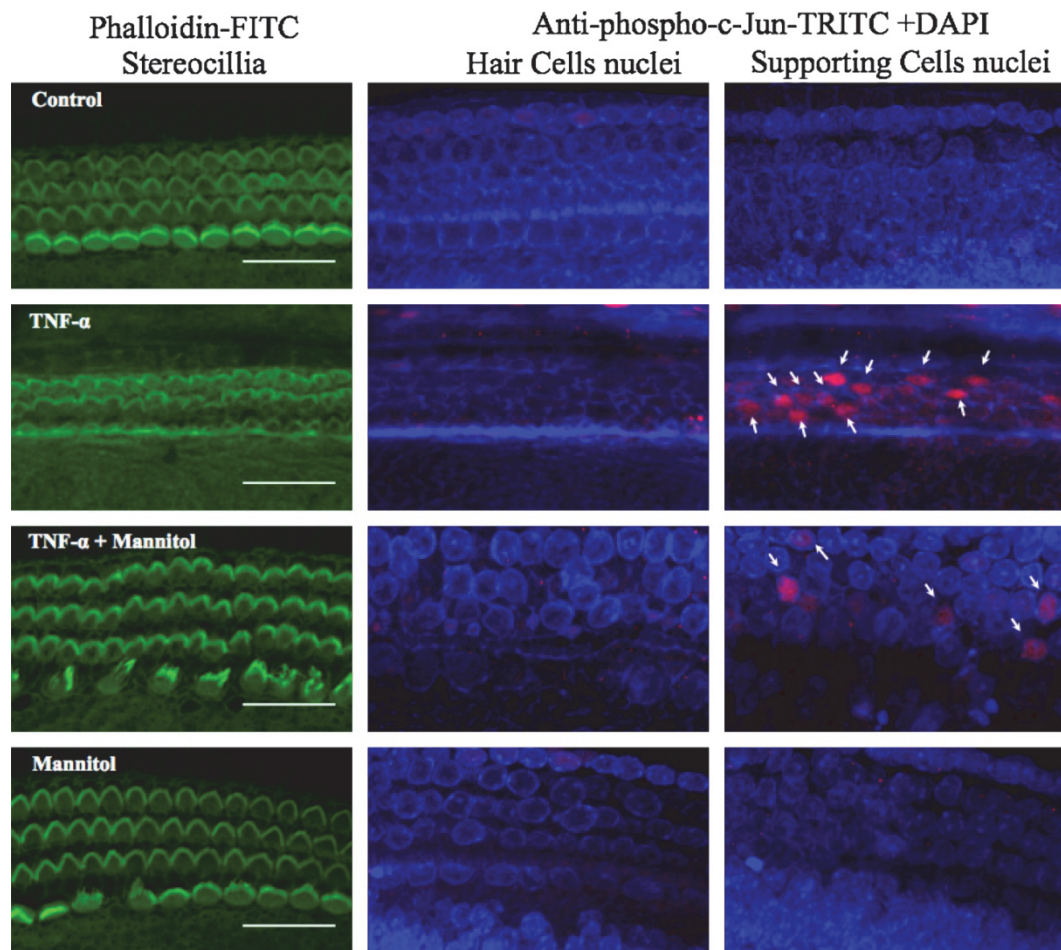
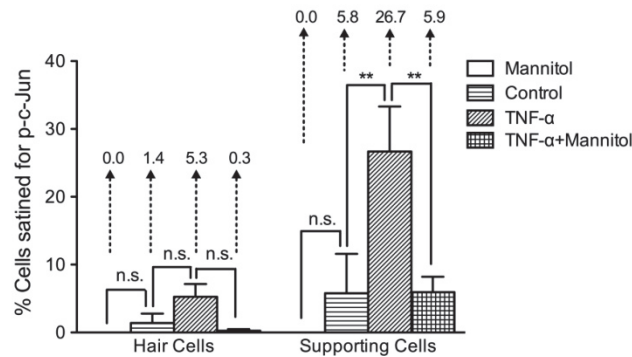


FIG. 5. Migration of AIF from mitochondria to the perinucleus in the control, TNF α , TNF α +mannitol, and mannitol. HC stereocilia were stained with FITC phalloidin (green, not shown). Mitochondria were stained with Mitotracker orange, and nuclei of HCs were stained with DAPI (blue). AIF was stained with anti-AIF-Alexa 633 (red). The pattern of immunolabel (red) distribution indicating the presence of AIF is forming perinuclear clusters around the hair cell nuclei (blue) in the TNF α specimens while the pattern of AIF labeling in the TNF α + Mannitol explants is similar to that observed in the control specimens. Images were obtained from explant basal turns. Bars = 20 μ m.



A



B

FIG. 3. phospho-c-Jun immunofluorescence study. Comparison of phospho-c-Jun expression in the experimental arms: control, TNF α , TNF α +mannitol, and mannitol. A, Microphotographs showing basal turn HCs stereocilia in green, phospho-c-Jun in red, and nuclei in blue, both in HCs and supporting cells. Arrows in the supporting cell images of TNF α and TNF α + Mannitol specimens indicate cells that immunostained (red) for the presence of phospho-c-Jun. Bars = 20 μ m. B, Percentage of total HCs and supporting cells staining for phospho-c-Jun (arrows) in the control, TNF α , TNF α +mannitol, and mannitol. All values are mean $\pm$ SD. * p < 0.05; *** p < 0.001.