

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11316

研究課題名(和文) 前庭水管拡大を呈する難聴遺伝子SLC26A4による難聴は血管条機能障害由来である

研究課題名(英文) SLC26A4-related hearing loss is derived from stria vascularis dysfunction

研究代表者

伊藤 卓 (Ito, Taku)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40401400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Slc26a4ノックアウトマウスを用いてSLC26A4遺伝子変異に伴う内耳障害およびMondini奇形の発症機序を解明することを目的とした研究である。本研究で、血管条微細構造の観察から血管条内血管の変性およびマクロファージの増殖が内リンパ電位低下の原因と考えられること、迷路骨胞の形態解析からMondini奇形が蝸牛軸の不十分な骨化を反映したものであることが明らかになった。また、平衡障害解明のためのマウス眼球運動解析装置の開発を行い、将来の新たな研究への道筋をつけることができた。これらの結果はSLC26A4遺伝子変異に伴う内耳障害の病態解明につながり、新たな治療薬開発へと発展する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLC26A4遺伝子変異に伴う患者さんでは、難聴の変動やふらつきが高頻度に観察される。難聴の変動は現在のところ薬剤で抑えることが困難であり、補聴器の調節や人工内耳の適応を考慮する点で時に判断を困難にする。また、ふらつきやめまいなどの平衡障害は生涯にわたって続く可能性があり、聴覚障害のようにデバイスによって対応することができない点で、患者さんのQOLを著しく落とす可能性がある。本研究成果はSLC26A4遺伝子変異に伴う患者さんで見られる難聴の変動やふらつきの病態解明に迫るものであり、新たな治療薬開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to elucidate the mechanism of inner ear impairment associated with SLC26A4 mutations and the development of Mondini malformation. In this study, it was considered that the degeneration of blood vessels in the stria vascularis and the proliferation of macrophages would cause the decrease of the endolymphatic potential in slc26a4 knockout mice. Gross morphological observation of otic capsules using microCT revealed that Mondini malformation might reflect on insufficient ossification of the cochlear modiolus. In addition, we have developed a novel mouse eye movement analysis device for the purpose of elucidating vestibular impairment in mice, which could lead to unveil the novel pathogenesis of dizziness and vertigo associated with SLC26A4 mutations in the future. These results may lead to the elucidation of the pathophysiology of inner ear disorders associated with SLC26A4 mutations and may lead to the development of new therapeutic agents.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：SLC26A4 前庭水管拡大 血管条

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前庭水管拡大は多くの症例で Mondini 奇形 (Incomplete partition type II) を合併し、蝸牛回転の短縮が起こっていると考えられている。またその聴覚障害は初期において変動性難聴を、その後年齢とともに進行性難聴を示す。前庭水管拡大症における聴覚障害の原因について、過去には頭蓋内圧の変動が拡大した前庭水管・内リンパ管を介して直接内耳を障害すると考えられていたが、前庭水管のサイズと聴力レベルが相関せず、内リンパ嚢閉鎖術を行っても聴力悪化は防げないとされる。また、Mondini 奇形合併の有無と聴力レベルも相関しない。そのため、申請者は解剖学的異常よりも内耳の恒常性が聴力維持には重要であると推察していた。*SLC26A4* 変異の実験動物モデルとして、申請者は過去に Doxycycline (dox) 投与で *Slc26a4* 発現時期を誘導することができるマウス (*Slc26a4* 機能不全マウス) を作成し、1 か月齢において前庭水管拡大なしで難聴が発症することを証明した。また、ABR 閾値の上昇と負の相関をもつ内リンパ電位 (EP) の低下が観測され、難聴の原因が EP の低下であることを報告した。したがって、前庭水管拡大症の臨床徴候とされる変動性進行性聴覚障害は、前庭水管や蝸牛回転の短縮という解剖学的異常によるものではなく、血管条における微細な生理的・生化学・形態的異常に由来すると考察していた。また、本遺伝子変異はめまいやふらつきなどの平衡障害を呈することもある。しかし平衡機能検査では頭位眼振や頭位変換眼振が観察される一方で、カロリックテストや VEMP では異常を呈さないこともあり、治療を考えるうえでその病態解明は実臨床において重要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はモデルマウスを用いて *Slc26a4* 遺伝子の機能と内耳形態との関連を解析することにより、高頻度に同定される本遺伝子の変異による内耳障害の病態を解明することである。そのために、(1) *Slc26a4* ノックアウトマウスの血管条の微細な形態を免疫組織学的処理を行ったうえで観察し、ついで(2) 迷路骨胞を MicroCT で撮影して蝸牛を観察し、Mondini 奇形発生の病態、さらに(3) マウス眼球運動解析装置を組み立てて平衡機能障害のメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Slc26a4* ノックアウトマウスの血管条

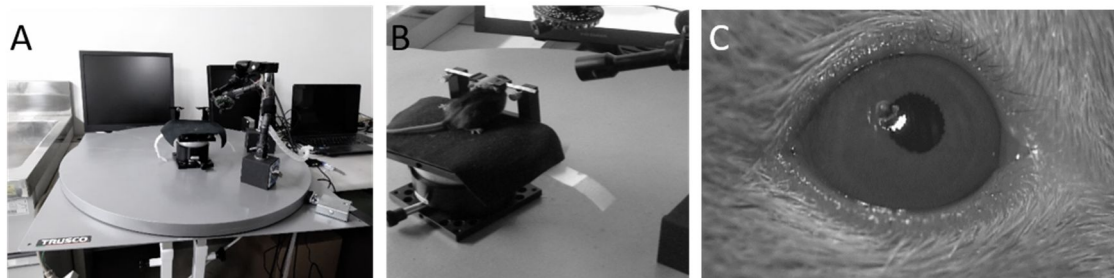
1 か月齢のコントロールマウスおよび *Slc26a4* ノックアウトマウスの内耳骨胞を摘出し、4% ホルマリンにて local perfusion を行った後に短時間の固定を行う。固定後、マイクロダイセクションにて血管条のみを摘出し、CD34 および CD68 抗体を用いて血管条内血管および血管条内マクロファージの染色を行う。ついで、whole mount preparation によって共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8) にて観察する。

#### (2) MicroCT による迷路骨胞の評価

1 か月齢のコントロールマウスおよび *Slc26a4* ノックアウトマウスの内耳骨胞を摘出し、内耳形態に影響を与えないように慎重に 4%ホルマリンにて固定を行う。その後、本学で保持している島津製作所製マイクロフォーカス X 線装置 inspeXio SMX-100CT を用いて撮影を行う。

#### (3) マウス眼球運動解析装置を組み立て

マウスの頭部傾斜に伴う眼位の変化を記録するため、図 A,B のような眼球運動記録装置を独自に開発した。本装置の特徴はマウス固定のためのナリシゲ社製マウス用頭部固定装置 SR-9M-HT、眼球運動記録のためのワテック社製近赤外線好感度カメラ WAT-910HX/RC、および傾斜回転角計測のためのスポーツセンシング社製ジャイロセンサーDSP ワイヤレス 9 軸モーションセンサをすべて同一の回転傾斜台の上に設置してあることで、頭部傾斜および回転刺激時のマウスの眼位変化を傾斜角度および回転速度と同時に記録することが可能としたことである。撮影した動画 (図 C) は画像解析ソフト、ImageJ で直接読み込むことができ、解析にはヒトにおける Listing 平面の解析に用いたプログラムを一部改変した。眼位変化の解析結果は同時に記録したジャイロセンサーのデータと比較することで、マウス眼位が傾斜および回転刺激に伴ってどのように変化したのかを解析することが出来るようにした。



#### 4. 研究成果

##### (1) *Slc26a4* ノックアウトマウスの血管条

血管条は中央階の外側に位置し、蝸牛内電位の発生源と考えられている。血管条は辺縁細胞、中間細胞、基底細胞から構成される3層構造となっており、血管条内の細胞間隙を Intrastrial space (IS) と呼び内リンパの高電位はこの部分に由来すると考えられている。Intrastrial space は、tight junction により内リンパ、ラセン靭帯、血管条内血管より電氣的に隔絶されており、特に血管とのバリア機能は血液内耳関門と呼ばれることもある。バリア機能は血液脳関門におけるグリア細胞に相当するマクロファージがその機能のすくなくとも一部を担っていると報告されている。これまでの先行研究で、*Slc26a4* ノックアウトマウスでの蝸牛内電位の低下は、IS の恒常性が破綻したことによって中間細胞の IS に面する細胞膜に発現している KCNJ10 が低下するためと考えられている。それゆえ、IS の恒常性維持に必須と考えられる血管条内血管の形態と血管条周囲を取り囲むマクロファージの形態を観察した。

その結果、*Slc26a4* ノックアウトマウスの血管条内血管はコントロールマウスに比べて細く、途中で盲端となっており途絶している部位がところどころ観察された。さらに、血管条内血管を取り囲むマクロファージはコントロールマウスに比べて *Slc26a4* ノックアウトマウスでは著明に増加あるいは増大していることが確認された。しかし、著名な増大や形態の変化がみられるにもかかわらずマクロファージは血管壁にへばりつくように存在し、バリア機能としては働いているものと考えられた。

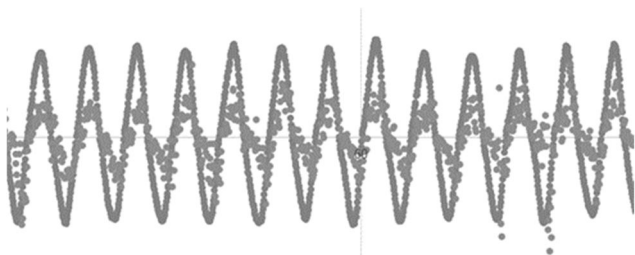
##### (2) MicroCT による迷路骨胞の評価

Mondini 奇形は側頭骨病理によってはじめて報告された内耳形態異常であり、蝸牛回転が 1.5 回転に短縮していると報告された。のちに画像診断の発達によって生前に診断されることが可能となり、現在では Incomplete partition type II (IP-II) とも呼ばれている。IP-II は多くの症例で前庭水管拡大を伴い *SLC26A4* 遺伝子変異と深い関係を類推されている。そこで、*Slc26a4* ノックアウトマウスの迷路骨胞を MicroCT で撮影してどのような形態で観察されるのか、さらに 3D 構築することで蝸牛内にどのような変化がみられるのかを検討した。

*Slc26a4* ノックアウトマウスの蝸牛軸は骨化に乏しいことを反映して描出が難しく、とくに頂回転では欠損しているように見えた。これは、側頭骨病理所見でみられる interscalar septum の欠損、いわゆる 'scala communis' に相当するものだと思われた。しかし、3D 構築したコントロールと *Slc26a4* ノックアウトマウスの迷路骨胞を比較すると骨迷路の回転数はほとんど変わらないように見えた。すなわち、IP-II において蝸牛回転の短縮とされていたものは、蝸牛軸の未熟な骨化に伴う見かけ上のものであると考えられた。

##### (3) マウス眼球運動解析装置を組み立て

動物における眼球運動解析の歴史は古く、これまでに多くの先行研究がある。しかし、小型のマウスでは観察や解析が困難な場合があり、国内外の報告でもまだそれほど多くない。我々は小型の赤外線ビデオシステムとジャイロセンサーを用いてコントロールマウスにおいて前庭動眼反射を記録することに成功した(下図)。今後はこの装置を用いて、*Slc26a4* ノックアウトマウスの平衡障害の病態解明を目指す予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okada Ryuhei, Ito Taku, Nomura Fuminori, Kirimura Susumu, Cho Yuichiro, Sekine Masaki, Tateishi Yumiko, Ariizumi Yosuke, Asakage Takahiro	4. 巻 139
2. 論文標題 The quantitative analysis of the human papillomavirus DNA load in submandibular gland lesions with droplet digital polymerase chain reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 105 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2018.1562215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Taku, Ikeda Satoshi, Asamori Tomoaki, Honda Keiji, Kawashima Yoshiyuki, Kitamura Ken, Suzuki Keiko, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Increased expression of pendrin in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brazilian Journal of Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjorl.2018.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Takamori, Kawashima Yoshiyuki, Hirai Chiaki, Makabe Ayane, Ito Taku, Fujikawa Taro, Yamamoto Katsura, Maruyama Ayako, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Vestibular Dysfunction in Patients With Superficial Siderosis of the Central Nervous System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e468 ~ e474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000001844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Taku, Kawashima Yoshiyuki, Fujikawa Taro, Honda Keiji, Makabe Ayane, Kitamura Ken, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Rapid screening of copy number variations in STRC by droplet digital PCR in patients with mild-to-moderate hearing loss	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0075-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Ayako, Kawashima Yoshiyuki, Fujikawa Taro, Makabe Ayane, Ito Taku, Takeda Takamori, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Potential Confounding Factors May Influence the Association Between Configurations of the Vertebrobasilar System and the Incidence of Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss and Canal Paresis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e548 ~ e555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤 卓, 川島 慶之, 藤川 太郎, 竹田 貴策, 堤 剛	4. 巻 29
2. 論文標題 耳小骨奇形に対する高精細4K内視鏡システムを用いた経外耳道的内視鏡下アブミ骨手術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 297-301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 2020106594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Hiroshi, Prakash Pragya, Ito Taku, Kim H. Jeffrey, Brewer Carmen C., Harrow Danielle, Roux Isabelle, Hosokawa Seiji, Griffith Andrew J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic Hearing Loss Associated With Autoinflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2020.00141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makabe Ayane, Kawashima Yoshiyuki, Sakamaki Yuri, Maruyama Ayako, Fujikawa Taro, Ito Taku, Kurima Kiyoto, Griffith Andrew J., Tsutsumi Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Systemic Fluorescent Gentamicin Enters Neonatal Mouse Hair Cells Predominantly Through Sensory Mechanoelectrical Transduction Channels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Association for Research in Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10162-020-00746-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤卓
2. 発表標題 マイクロCTを用いたSlc26a4ノックアウトマウス内耳形態の三次元解析
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 浩基, 伊藤 卓, 川島 慶之, 藤川 太郎, 本田 圭司, 竹田 貴策, 船曳 和雄, 池田 卓生, 堤 剛
2. 発表標題 頭部傾斜によるマウスの静的な前庭動眼反射の評価
3. 学会等名 第78回めまい平衡医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 剛, 池田 卓生, 渡邊 浩基, 竹田 貴策, 本田 圭司, 伊藤 卓
2. 発表標題 回旋性サッケードのmain sequenceのサンプリング頻度による差について
3. 学会等名 第78回めまい平衡医学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川島 慶之	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授	
	(kawashima Yoshiyuki)		
	(10376759)	(12602)	