

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791249

研究課題名 (和文) 内耳血管条中間細胞の辺縁細胞と毛細血管に対する相互作用

研究課題名 (英文) The relationship of intermediate cells to marginal cells and capillaries of stria vascularis

研究代表者

藤村 武之 (FUJIMURA TAKEYUKI)

産業医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：40320361

研究成果の概要：

突発性難聴は年間3万5千人以上が発症する重大な疾患である。原因として、血流障害による酸素欠乏説やウイルス感染説が唱えられているが、その他に酸化ストレスの関与も否定できず、原因解明が急務である。そこで障害部位の一つとされる内耳血管条とりわけ血管条中間細胞に着目して研究を行った結果、中間細胞は、辺縁細胞や毛細血管の正常な発達に加え、血管条の抗酸化作用にも寄与することが解明され、血管条の酸化ストレス防御機構が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳鼻咽喉科学

1. 研究開始当初の背景

内耳血管条は細胞外液でありながら細胞内に匹敵するほどの高濃度 (150mM) を呈する特殊な内リンパ液の産生と約 150mV の内リンパ電位 (Endocochlea potential: EP) の発生に寄与し、有毛細胞の音受容機構にとって極めて重要な役割を果たし、聴覚機能を維持し

ていることが知られている。

音刺激により不動毛がより背の高い不動毛へと倒れると、聴毛の先端に存在する MET チャンネルが開き、内リンパ電位と有毛細胞内負電位との間の約 150mV の電位勾配が駆動力となり、内リンパ液中の K イオンが有毛細胞内に流入し、外有毛細胞の脱分極すなわち、機械電気変換・電気機械変換を惹起し、基底

板振動を増幅する。

有毛細胞の機能に不可欠な K イオンは内リンパ・外リンパの間を循環している。

そもそも血管条は、蝸牛管の外側壁に存在し、外胚葉由来の辺縁細胞、間葉由来の中間細胞、基底細胞や毛細血管から構成されている。

特に中間細胞はメラニンを含有しており、神経堤由来のメラノサイトであることが報告されている。

これまで Steel ら、Schrott らや Fujimura らの研究により、先天的にメラノサイト由来とされる血管条中間細胞を欠損するミュータントマウスでは、正常な EP が発生せず、聴覚障害をきたし、辺縁細胞、基底細胞、毛細血管に著しい変性が生じることが報告されており、血管条の正常な発達に、必須である中間細胞の重要な役割が注目されている。

中間細胞は、胎生期～周産期にあつては、血管条の形態学的発達に深く関与し、発達後にあつては、血管条の解毒・抗酸化作用にも寄与することが、以下に述べる我々の研究から次第に明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

内耳血管条は発達段階において外杯葉由来の辺縁細胞と間葉系由来の中間細胞や基底細胞から構成されるという特殊性があり、胎生期～周産期における血管条の正常な発達には endothelin 1(ET1), や laminin, fibronectin 等の細胞外マトリックスの関与する上皮間葉相互作用が深く関与していることが推測される。そこで胎生 16 日～生後 5 日令の C57BL/6 マウス血管条を用いて中間細胞の辺縁細胞や毛細血管に対する相互作用に関する研究を行った。

さらに過去の研究により、有色人種は音響

外傷に対して白色人種より耐性があることが知られており、有色モルモットは音響外傷や耳毒性薬剤に対して、白色モルモットより耐性があることが報告されている。

特に血管条中間細胞はメラニンを含有しており、神経堤由来のメラノサイトであると考えられている。これまでの研究により、先天的にメラノサイト由来の中間細胞を欠損するミュータントマウスでは、正常な EP が発生せず、聴覚障害をきたし、辺縁細胞、基底細胞、毛細血管に著しい変性が生じることが報告されており、血管条の正常な発達に、必須である中間細胞の重要な役割が注目されている。Fujimura らは dominant white spotting mouse というミュータントマウスを用いた研究により、生後 1 週から、血管条毛細血管の基底膜の肥厚が始まり、肥厚した基底膜には IgG が沈着すること、毛細血管内皮細胞間のタイト結合の障害により、血管透過性が亢進することを解明した。

有色と白色の差違は、メラニンの量に左右されるため、血管条においてはメラノサイト由来の中間細胞に耐性機序が備わっているのではないかという仮説が立てられる。

その仮説を裏付けるために有色、白色モルモット蝸牛血管条を材料として、血管条において、glutathione-S-transferase (GST) や glutathione peroxidase (GSPx) を介した解毒・抗酸化作用が存在するか否かを詳細に検討し、中間細胞が耐性化機序の中心的役割を担っていることを解明していきたい。

3. 研究の方法

材料

胎生 16 日～生後 5 日令 C57BL/6 マウス
8 周令有色および白色モルモット

(1) 光顕観察

HE 染色標本作成

(2) 光顕免疫細胞科学

胎生 10～生後 5 日令の C57BL/6 マウス蝸牛を 4%PFA にて固定、パラフィン胞埋の後、5 μ m 厚切片を作成後、TGF- β 1, ET-1, ETA レセプター、fibronectin や laminin の抗体を 1 次抗体に用いた ABC 法を試行

(3) 透過電顕

Karnovsky 固定、通常電顕観察

(4) 免疫電顕 (postembedding method)

PLP 液固定飼料を用い、GST π を 1 次抗体、15nm 径金粒子結合ヤギ抗ウサギ IgG を 2 次抗体とした免疫電顕を施行

(5) 蛍光免疫組織化学

ウサギ抗 GST α , μ , π 抗体およびヤギ抗 GSPx 抗体を一次抗体、Alexa Fluor 488 結合ロバ抗ウサギ IgG 抗体ならびに Alexa Fluor 546 結合ロバ抗ヒツジ IgG 抗体を 2 次抗体とした

(6) 蛍光免疫組織化学 2 重染色

ウサギ抗 GST π とヤギ抗 GSPx による 2 重免疫染色法を施行

4. 研究成果

胎生 16, 18 日令の C57BL/6 マウス蝸牛における抗 ET-1 ならびに抗 laminin 抗体の免疫陽性反応は将来血管条に発達する蝸牛管の外側壁ならびに間葉系細胞に認められた。一方抗 fibronectin 抗体の免疫陽性反応は胎生 16 日では微弱であるが、胎生 18 日令では ET-1 の局在とほぼ同様であった。

C57BL/6 胎生マウス蝸牛の形態形成において ET1, laminin あるいは fibronectin が epithelial mesenchymal interaction に関わり、血管条の分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

生後 1 日令 C57BL/6 マウス内耳血管条において抗 ET 1 抗体、抗 laminin 抗体および抗 fibronectin 抗体の免疫陽性反応は epithelial-mesenchymal interface に認められた。一方生後 5 日令 C57BL/6 マウス内耳血管条の epithelial-mesenchymal interface における抗 ET 1 抗体、抗 laminin 抗体および抗 fibronectin 抗体の免疫陽性反応はいずれも消失していた。さらに両者の同免疫陽性反応は毛細血管の内皮細胞面には認められ、間葉系細胞には認められなかった。生後 5 日令 C57BL/6 マウス血管条の通常電顕による観察で血管条基底膜の消失が確認された。5 日令マウス内耳血管条の epithelial-mesenchymal interface における抗 ET 1 抗体、抗 laminin 抗体および抗 fibronectin 抗体の免疫陽性反応の消失は血管条基底膜の消失を惹起し、後に続く血管条辺縁細胞の basal infolding による毛細血管血管足の形成を促すものと考察された。胎生から生直後の周産期におけるエンドセリン (ET 1)、laminin や fibronectin の局在は血管条分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

有色モルモット血管条には GST α , μ , π および GSPx の強い免疫陽性反応が認められたが、白色血管条には同免疫陽性反応はほとんど検出されなかった。一方有色ラセン靭帯には中等度の同免疫反応があるものの、白色ラセン靭帯には強い同免疫陽性反応が検出された。GST π と GSPx による 2 重免疫染色法では、両者は有色モルモット血管条と白色モルモットラセン靭帯に局在していた。

postembedding 免疫電顕による GST π の免疫陽性金粒子は有色血管条中間細胞内のメラニン

顆粒と中間細胞の細胞質に局在した。有色および白色モルモット蝸牛外側壁におけるGSTとGSPxの局在部位は異なっていた。有色血管条中間細胞ではメラニン代謝にGST π の関与が示唆された。GSTやGSPxによる解毒・抗酸化作用が有色モルモット血管条や白色モルモットラセン靱帯に備わっていることが推測される結果であった。

Fig1a:有色モルモット GST α
 Fig1b:有色モルモット GST μ
 Fig1c:有色モルモット GST π
 Fig1d:白色モルモット GST α
 Fig1e:白色モルモット GST μ
 Fig1f:白色モルモット GST π

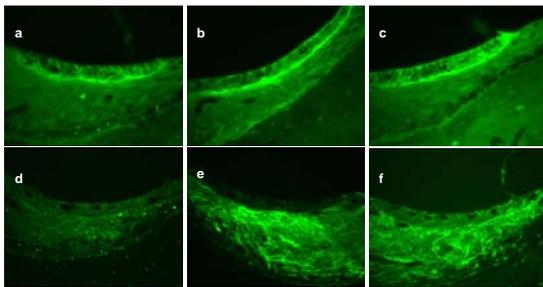


Fig2a:有色モルモット GSPx
 Fig2b:有色モルモット GST π
 Fig2c:DAPI nuclear staining
 Fig2d: GST π とGSPxによる2重免疫染色

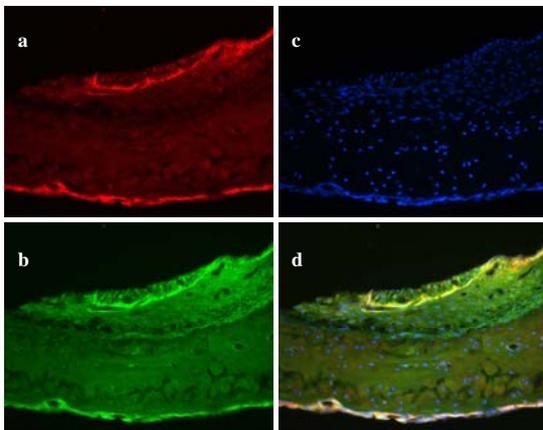


Fig3a:白色モルモット GSPx
 Fig3b:白色モルモット GST π
 Fig3c:DAPI nuclear staining
 Fig3d: GST π とGSPxによる2重免疫染色

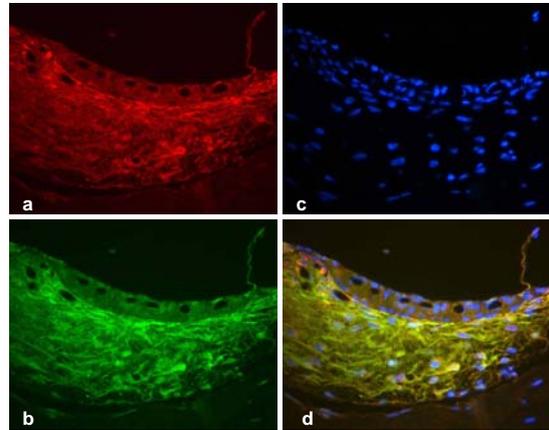
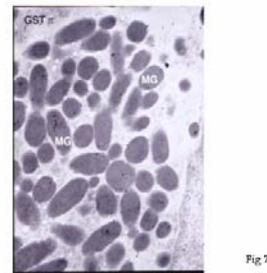


Fig4:有色モルモット GST π の免疫電顕所見



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Takeyuki Fujimura, Hideaki Suzuki, Tsuyoshi Udaka, Teruo Shiomori, Takanori Mori, Tsuyoshi Inaba, Nobuaki Hiraki, Kotaro Kayashima, Yoshiaki Doi:
 Immunoreactivities for glutathione S-transferases and glutathione peroxidase in the lateral wall of pigmented and albino

guinea pig cochlea.

Med Mol Morphol 41:139-144, 2008.

査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

① 藤村武之、鈴木秀明、宇高 毅、塩盛輝夫、森 貴稔、平木信明：

有色および白色モルモット蝸牛外側壁における Glutathione-S-transferase と Glutathione peroxidase の局在

日本耳科学会総会学術講演会

2007 年 10 月 18 日

福岡開催

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○ 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 武之 (FUJIMURA TAKEYUKI)

産業医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号: 40320361

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者