

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16841

研究課題名(和文) ストレス誘発型難聴モデルマウスの確立及び発症機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of model mice and elucidation of pathogenic mechanism in stress-induced hearing loss

研究代表者

小山 佳久 (Koyama, Yoshihisa)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40397667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：突発性難聴は原因不明の急性感音難聴である。患者数の著しい増加や低い治療効率から、発症機序の解明は急を要する。難聴モデル動物の確立は必須であるが、主流の薬剤投与や騒音暴露などのモデルでは病気の機序を完全に説明できない。我々は難聴の原因としてストレスに着目し、反復性寒冷負荷を与えたマウスがストレス誘発型難聴モデル動物となりうる可能性を明らかとした。また、形態学的解析より、蝸牛有毛細胞の脱落ではなく中枢神経の聴覚経路活性化がストレス性難聴の1つの原因になるかもしれないことが示唆された。我々のストレス誘発型難聴モデルマウスは、突発性難聴発症機序を解明するための非常に有用なツールになると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスが蔓延する社会において、突発性難聴は誰にでも起こりうる原因不明の症状である。患者数の著しい増加や低い治療効率から、発症機序の解明は急を要する。病態モデルが少ないため、難聴機序解明のためにも適したモデル動物の作製は必要である。本研究課題において、我々はストレス誘発型難聴モデルマウスの確立に成功した。この成果は、突発性難聴の発症機序解明及び治療法開発に大いに貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sudden hearing loss is cryptogenic acute sensorineural deafness. Due to the significant increase in the number of patient and low treatment efficiency, it is urgent to elucidate the pathogenic mechanism. Although it is essential to establish a model animal for hearing loss, models such as mainstream drug administration and noise exposure cannot completely explain the mechanism of the disease. We focused on "mental stress" as a cause of hearing loss and clarified the possibility that repetitive cold-treated mice could be stress-induced deafness model animals. Our findings suggested that activation of the auditory pathway in the central nervous system rather than the cochlear defect may be one cause of stress-induced hearing loss. We believe that our deafness model mice will be a useful tool for elucidating the mechanism of sudden hearing loss.

研究分野：形態解剖学

キーワード：突発性難聴 ストレス 病態モデル動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 突発性難聴は原因不明の急性感音難聴である。年間推定受療者数 3 万 5 千人(2001 年疫学調査 : 27.5 人/10 万人)で、50 ~ 60 歳代に多い。厚生労働省により実施された過去 4 回の全国疫学調査では、患者数の増加と発症年齢の高齢化が明らかとなっている¹。しかしながら、長期的大規模疫学調査を行っても、突発性難聴の病態は依然として原因不明である。有力な病因候補として、蝸牛循環障害やウイルス感染が挙げられる。しかし、難聴患者に循環障害を生じるような背景因子のない若年層(20 ~ 30 歳代)が多いこと、感染源のウイルスを特定できていないこと、突発性難聴症例の側頭骨標本の検討において、循環障害を示す血管狭窄像やウイルス感染像(白血球浸潤、血管増生など)が観察されなかったことから、これらの病因だけでは難聴発症のメカニズムは説明できない。治療には、血流改善薬(プロスタグランジン製剤)や副腎皮質ステロイド(ステロイドホルモン)がよく投与され、高気圧酸素療法や鼓室内ステロイド投与などの手法が一般的に施されている。しかし、治療率は 30%前後と低い²。病因不明、患者数の増加及び低い治療率であるため、突発性難聴のメカニズムの解明は急務であり、その機序の解明が突発性難聴の治療向上につながると考えられる。

2. 研究の目的

難聴発症機序研究の問題点の 1 つに、病態モデルが少ないことが挙げられる³。難聴機序解明のためにも適したモデル動物の作製は必要とされる。突発性難聴の危険因子として、疲労、食欲不振、感冒のかかりやすさや睡眠不足などが挙げられ、高齢者のみならず働き盛りの中年層にも患者は多い。それゆえ、突発性難聴の原因の一つに心的ストレスが関与している可能性が考えられる⁴。ストレスは視床下部-下垂体-副腎皮質系を活性化し、自律神経系、免疫系及び内分泌系を介して全身の各臓器に反応を引き起こす。過度なストレスの持続は交感神経の活性化を引き起こし、組織障害をもたらす。内耳において、アドレナリン受容体が蝸牛動脈、蝸牛外側壁や内リンパ嚢に存在し、アドレナリン作動性ニューロンが蝸牛血流の調節、内リンパの産生能及び吸収能に関与している可能性があることから、ストレスによって突発性難聴が発症する可能性は十

分考えられる。持続的なストレス過多が根底にあるために、交感神経活性亢進による血液循環障害、免疫機能の低下によるウイルス感染などが起こっている可能性もある。我々は、過度なストレスが突発性難聴の発症しやすさ及び治りにくさの土台を形成しているのではないかと考え、難聴発症の病因としてストレスに着目した。本研究の目的は、ストレスによって誘発される新規の突発性難聴モデルマウスの確立とストレス性難聴のメカニズム解明である。

3. 研究の方法

(1) 反復性寒冷負荷マウス(RC マウス)作製及び採材

7-9 週齢の C57BL/6J マウス (日本 SLC) に対して 24°C と 4°C の寒冷ストレスを 1 日 7 回、2 日間負荷することによって作製する。3 種混合麻酔液による深麻酔下で、4 % パラホルムアルデヒド固定液によるかん流固定を行った後、内耳と脳を取り出し、4 °C で一晚浸漬固定を行った。脳は 30% ショ糖溶液を用いた凍害処理後、ドライアイスによって凍結し、-80°C にて保存した。内耳は、10% EDTA・Na₂ 溶液を用いた脱灰処理後、リン酸緩衝液 (PBS) にて 4°C 保存した。

(2) 聴性脳幹反応(ABR: Auditory Brain-stem Response)試験

麻酔後、マウスに設置電極を背中後部、針電極を耳介後部皮膚及び額皮膚に装着した。Tucker-Davis Technologies ハードウェア (バイオリサーチセンター、名古屋) を用いて、音刺激の生成と脳波の取得を行った。聴覚閾値は、波形が再現可能な形態を失うまで刺激強度(100dB ~ 5dB)を減少させて確定した。

(3) HE 染色

エタノール上昇系列による脱水後、キシレンを介してパラフィンに内耳を包埋した。7µm 厚の内耳切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (Wako) を行った。エタノールによる脱水後、キシレンを介してエンテラン (Merck Millipore) で封入した。

(4) 蝸牛ホールマウント染色

内耳の骨をピンセットで砕いて蝸牛を取り出し、聴神経を除いて有毛細胞を同定した。Alexa Fluor 594 結合ファロイジン(Thermo Fisher Scientific)で 30 分間染色した。フルオロマウント

(Thermo Fisher Scientific)で封入後、BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス）にて画像を取得した。

(5) 蛍光免疫染色

30 μ m 厚の脳凍結切片を作製後、浮遊法による蛍光免疫染色を行った。非特異防止及び抗体浸透性向上のため、0.3%TritonX、3%bovin serum albumin 含有 PBS 溶液に 30 分間浸漬した。抗 cFos 抗体 (abcam) を用いて 1 次抗体反応 (4 $^{\circ}$ C、終夜) を行った。PBS による洗浄後、Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 2 次抗体反応 (1 時間) を行った。PBS による洗浄後、フルオロマウント (Thermo Fisher Scientific) で封入し、BX53 蛍光顕微鏡 (オリンパス) によって、解析や画像取得を行った。

4. 研究成果

(1) ストレス誘発性難聴モデルマウス確立

反復性寒冷負荷 (repeated cold: RC) マウスの聴覚を ABR 試験で計測した結果、すべての波長で閾値が、未処置のマウスと比べて低下する傾向を示した (図 1)。特にメスマウスの方がオスマウスより閾値が有意に低下傾向を示していた。メスの

RCマウスではより高頻度に難聴を発症することから、ストレス誘発性難聴モデルマウスになることが明らかとなった。

(2) ストレス誘発性難聴における内耳構造の検討

HE染色標本の顕微鏡観察にて内耳構造及び炎症の

有無を調べたが、全く観察されなかった(図 2)。さらに、

ファロイジンを用いた蝸牛のホールマウント染色で有毛細胞の状態を観察した。難聴発症の有無に関わらず、RCマウス有毛細胞では、細胞の脱落はほとんど観察されなかった(図3)。

以上より、RCマウスの内耳では、他の難聴モデルに観察

されるような構造異常が起こっていないことが明らかとなった。

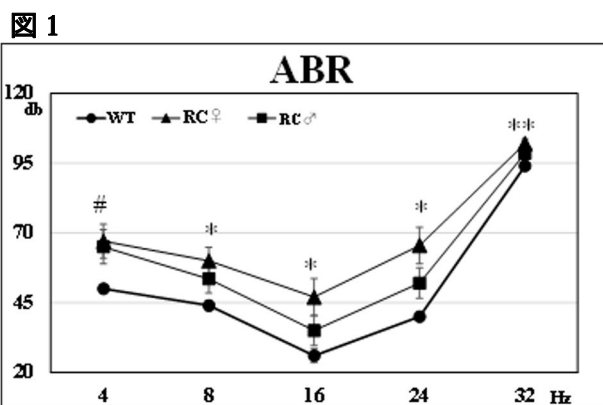


図 1

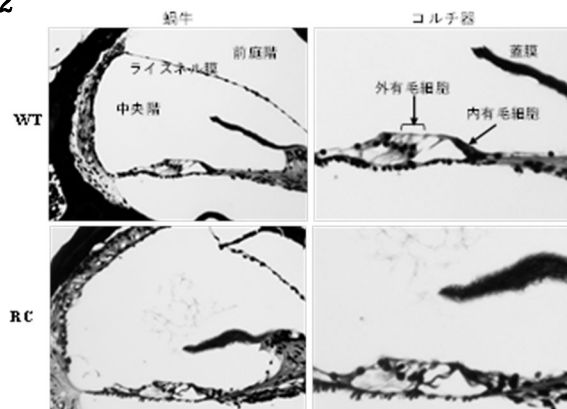


図 2

(3) 聴覚伝達路における神経活性の検討

神経活動マーカーc-Fos抗体(アブカム)を用いた免疫染色によって聴覚伝達路関連領域の神経活性を検討した。

その結果、難聴を発症した大部分のRCマウスでは、蝸牛神経核、下丘、内側膝状体や大脳皮質聴覚野などにおいて陽性シグナルが観察された。一方で、聴力低下が起こらなかったRCマウスでは、聴覚経路においてほとんど

陽性を示さなかった(図4)。以上より、難聴を発症したRCマウスでは、聴覚経路関連領域の活性化が起こっていることが明らかとなった。

図3

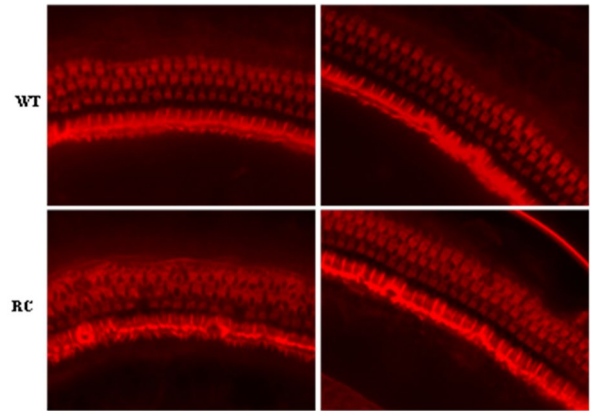
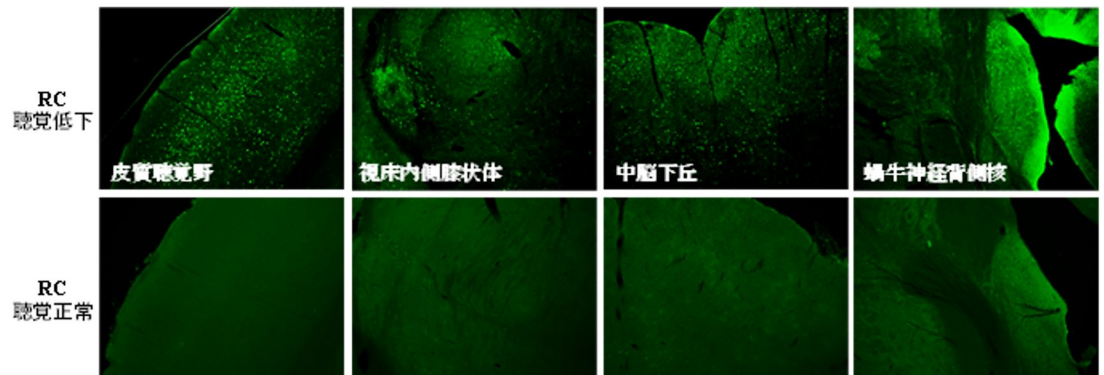


図4



本研究課題において、我々はストレス誘発性難聴モデルマウスの確立に成功した。これまでに後天性の難聴モデル動物としては、薬剤投与、騒音暴露、内耳除去などが挙げられるが、これらのモデルは内耳の損傷が大きく、治療可能な突発性難聴モデルとしては適当でない。一方、我々のストレス誘発型難聴モデルマウスは、直接的な内耳の損傷はなく生体内環境の変化によって難聴を誘発しているため、限りなく突発性難聴モデルに近いと考えられる。さらに、本研究によって、蝸牛における構造変化ではなく中枢神経系における聴覚経路の活性化がストレス性難聴の1つの原因になるかもしれないことが明らかとなった。

参考文献

1. Audiology Japan 47, 109-118, 2004
2. Audiology Japan 53, 46-53, 2010
3. 日本耳鼻咽喉科学会会報 2016
4. Audiology Japan 56, 137-152, 2013
5. Mol Pain. 52, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------