

機関番号：82674

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19791250

研究課題名（和文） 老人性難聴の分子病理学的解析～蝸牛外側組織に焦点を当てて～

研究課題名（英文） Molecular pathological study of presbycusis, focused on the lateral wall of cochlea

研究代表者

木村 百合香（KIMURA YURIKA）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40450564

研究成果の概要（和文）：老人性難聴では約 1 / 4 の症例で原因を説明しうる光学顕微鏡的病理組織所見が認められない。そこで、我々は、内耳の凍結保存の推奨や、パラフィン包埋内耳切片を用いた免疫組織学的検討、レーザーマイクロダイセクション法による蝸牛内機能単位別の遺伝子発現の同定といった分子生物学的手法の側頭骨病理学への導入を行い、老人性難聴への蝸牛外側組織における内耳特異的タンパク cochlin の関与の可能性を指摘した。

研究成果の概要（英文）：We have tried to introduce molecular biological techniques to human temporal bone pathology, such as mRNA analysis from frozen human cochlea, the immunohistological examination of paraffin embedding human inner ear and identification of local gene expression in human cochlea by laser microdissection. We pointed out the possibility of contribution of inner ear specific protein cochlin to presbycusis in the cochlear lateral wall.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	398,380	0	398,380
2008年度	901,620	270,486	1,172,106
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,200,000	840,486	4,040,486

研究分野：耳科学

科研費の分科・細目：

キーワード：(1)老人性難聴 (2)遺伝性難聴 (3)ヒト側頭骨病理学 (4)感音性難聴 (5) TaqMan PCR (6) 蝸牛 (7)mRNA (8)加齢

1. 研究開始当初の背景

(1) 老人性難聴と側頭骨病理

現在に至るまで、ヒトにおける老人性難聴の病理に関しては、Schuknecht らによる蝸牛において機能単位別に細胞の消失を評価した分類がスタンダードに用いられている（表 1）。感覚細胞やコルチ器の消失による sensory presbycusis, ラセン神経節の減少を認める neural presbycusis, 血管条の萎縮

による strial presbycusis は、形態異常を呈するが、こういった異常所見を持たないタイプの老人性難聴の側頭骨病理組織が少なからず存在しており、Schuknecht らはこれらのなかで直線的な高音漸傾型感音難聴を呈するものは蝸牛基底板の剛性増加に起因する cochlear conductive presbycusis という仮説的分類を行っている¹⁾。しかしながら、このような仮説的分類をもってしても、老人

性難聴の病理組織所見の約25%は光顕所見では説明がつかないとされている(indeterminate presbycusis)。

(表1)

Schuknechtによる老人性難聴の組織分類

1) Sensory presbycusis:
2) Neural presbycusis
3) Strial presbycusis
4) Cochlear conductive presbycusis (hypothesis)
5) Mixed presbycusis
6) Indeterminate presbycusis

(2) 老人性難聴の病態解析にはなぜヒト側頭骨病理が必要か?

実験動物レベルを用いた老人性難聴の解析は、遺伝学的背景の均一化や遺伝子工学の導入のしやすさ、経済面でのメリットが非常に大きく、様々な解析が進んでいる。しかし、有毛細胞の消失や血管条の萎縮、ラセン神経節細胞の減少といった老人性難聴に特徴的な所見を呈し、老人性難聴のモデルマウスとして頻用されている近交系マウス C57BL/6 は cadherin23 の遺伝子多型を背景に持つなど²⁾、ヒトの老人性難聴と一対一に呼応するものではなく、また、これらの実験動物モデルは、有毛細胞の消失など形態変化を指標としているものがほとんどである。前述したように、ヒト側頭骨病理組織学的には典型的な形態変化なく難聴を呈した症例が多数存在し、これらの病理の解明には実際にヒトの病理組織標本を解析することが必要である。

2. 研究の目的

ヒト内耳組織は死後開頭剖検が得られた際にしか採取できないため、組織検体数が非常に限られていること、側頭骨という硬組織の中で高度に機能分化しており形態の温存が困難であること、組織学的解析には莫大な経済的及び人的資源を要することから、分子生物学が飛躍的に進歩している現代でも、ヒト側頭骨病理学的解析は、ホルマリン固定セロイジン包埋切片における蝸牛内の機能単位別の細胞数の評価が主であり、本邦においては実働している研究機関は皆無に等しい。しかしながら、責任病巣は何か、実験動物モデルとヒトでの病態は相同か否か、ヒトでの分子細胞学的発症メカニズムは何か、といったヒトにおける老人性難聴の解明には、実際の臨床症例での解析が必須である。そこで、ヒト側頭骨病理学の観点から、老人性難聴への分子生物学的アプローチの導入の可能性

につき検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト蝸牛からの mRNA 抽出の試み

ヒト蝸牛からの mRNA 抽出は、複数の施設で試みられてはきたが、通常のセロイジン包埋切片からでは、ホルマリン固定・脱灰の段階で分解・変性が進むため、抽出も困難であったという報告や、死後即時の解剖による内耳摘出の推奨といった報告のみで、実際の導入は困難とされてきた。そこで、我々は通常の開頭剖検の流れの中で中頭蓋窩から内耳の採取を行い、凍結保存を行うことで mRNA の抽出が可能かの検討を行った。一側は凍結側頭骨ブロックからもう一側はホルマリン固定を行い、膜迷路を採取し内部標準遺伝子である GAPDH mRNA と内耳内に多く発現する COCH mRNA の抽出を RT-PCR 法を用いて試みた。

(2) ヒト蝸牛形態保存の試み

ヒト蝸牛は側頭骨という硬組織に囲まれ、高度に分化した組織であることから、セロイジン包埋法がスタンダードであったが、マンパワーや時間的・経済的側面から、本邦では現在セロイジン包埋切片の作成は困難である。そこで、通常の病理学的検査に使われる、ホルマリン固定パラフィン包埋切片での形態評価は可能かという検討を行った。剖検時に中頭蓋窩より円筒鋸で内耳ブロックを採取し、20%ホルマリン溶液で固定、10%EDTA で脱灰の後、パラフィン包埋し 6 μm の厚さで検体を薄切し標本作製した。

(3) レーザーマイクロダイゼクション (LMD) 法の導入

レーザーマイクロダイゼクション法とは、観察した組織標本からレーザー光を用いて、組織・細胞レベルで特定の領域のみをカット・回収する方法であり、形態解析と分子生物学的解析の橋渡しの手法である。細胞レベルで高度に機能分化したヒト内耳病態の解明には非常に有用なツールである。そこで、本法をホルマリン固定パラフィン包埋蝸牛切片よりの mRNA 抽出に応用できないか、検討を行った。

(4) 加齢性難聴と Cochlin

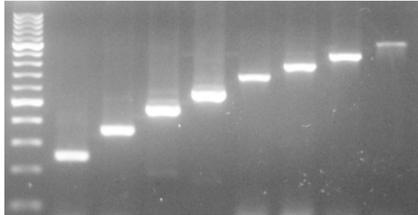
前期高齢者群 (75 歳未満) 4 耳 (平均 71.5 歳) と超高齢者群 (90 歳以上) 5 耳 (平均 92.2 歳) の凍結側頭骨標本より、前述の方法を用いて蝸牛より mRNA を抽出し、蝸牛外側壁に多く発現する難聴遺伝子 (COCH, GJB2, COL2A1) の発現量の比較を行った。

また、また、前期高齢者群 5 耳 (平均 69.4 歳) と超高齢者群 5 耳 (92.2 歳) のホルマリン固定パラフィン包埋側頭骨切片において、COCH のコードするタンパク cochlin の免疫染色を行った。

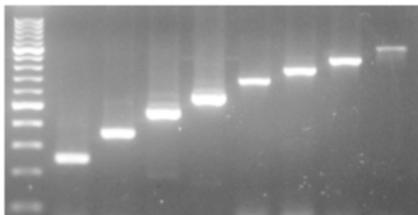
4. 研究成果

(1) ヒト蝸牛からの mRNA 抽出の試み

凍結標本では COCHmRNA が 976 bp までの増幅が可能であったのに対し(図1)、ホルマリン固定標本では 249 bp までの増幅が限界であった。また、定量的 RT-PCR 法を用いた GAPDHmRNA 発現量の比較では、ホルマリン固定検体に比し凍結保存検体が約 100



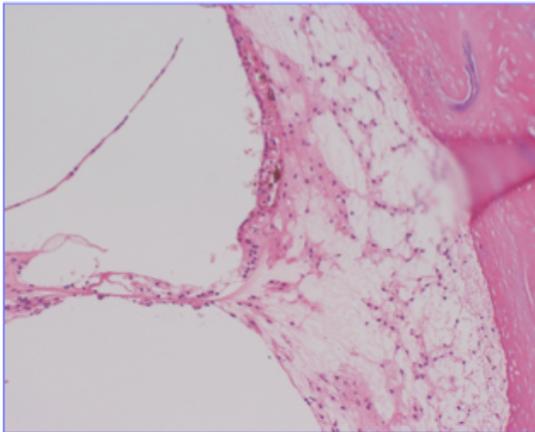
Frozen sample



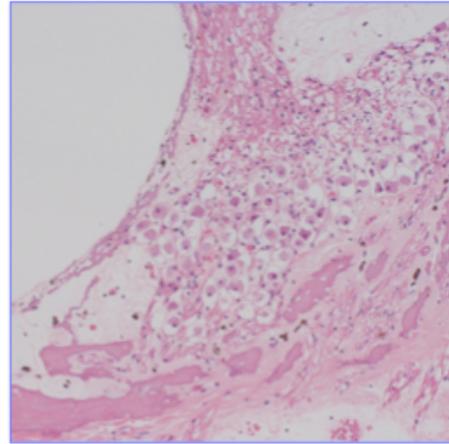
Frozen sample
(bps) 249 356 461 555 681 764 853 976

(2) ヒト蝸牛形態保存の試み

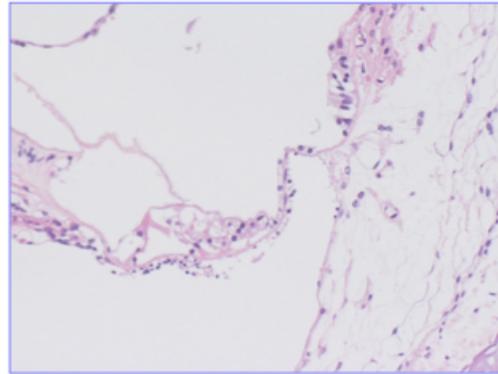
血管条・ラセン靭帯・ラセン神経節は比較的良く保たれていたが(図2, 3)、コルチ器は変形してしまう例もあった(図4)。そこで、外有毛細胞のマーカーとして prestin の免疫染色を行い、外有毛細胞の保存数の評価を行うことで、形態の問題を補うことが可能であった(図5)。



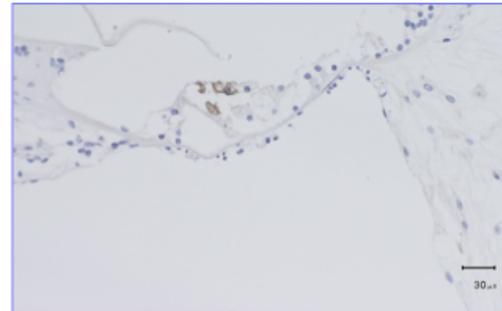
(図2) ホルマリン固定パラフィン包埋法：蝸牛基底回転外側壁(ヘマトキシリン・エオジン染色) 血管条・ラセン神経節の形態は保たれている



(図3) ホルマリン固定パラフィン包埋法：ラセン神経節(ヘマトキシリン・エオジン染色) ラセン神経節の形態も保たれている



(図4) ホルマリン固定パラフィン包埋法：コルチ器(ヘマトキシリン・エオジン染色) コルチ器の変形が認められる

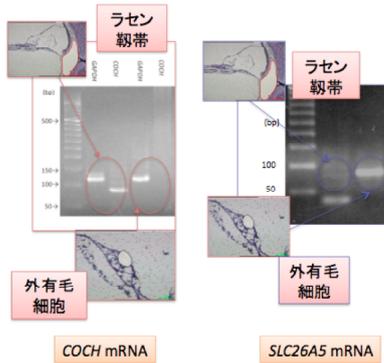


(図5) ホルマリン固定パラフィン包埋法：コルチ器(免疫染色(prestin)) prestin が3列に染色され、外有毛細胞が保存されていることがわかる

(3) レーザーマイクロダイゼクション(LMD)法の導入

mRNA は前述の通り固定・包埋の過程で変性・分解が進むため、ホルマリン固定パラフィン包埋蝸牛切片よりの抽出は通常の

RT-PCRでは不可能であるが、RNA熱処理を加えることで、ラセン靭帯における COCH mRNA、外有毛細胞における SLC26A5 mRNA の部位別発現の同定に成功した (図6)。



(図6) LMD法による部位別 mRNA 発現の同定
ラセン靭帯における COCH mRNA、外有毛細胞における SLC26A5 mRNA の部位別発現の同定が可能であった。

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8件)

1. 木村百合香. 【老人性難聴 その病態解明に向けて】 老人性難聴におけるヒト側頭骨を用いた分子生物学的アプローチ. *Otology Japan* 20: 197-202, 2010.
2. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Ueno H, Hosoya H, Ito T, Kimura Y, Kitamura K, Tanaka M. Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet.* 2010;55:147-54.
3. Takahashi M, Kimura Y, Sawabe M, Kitamura K. Modified paraffin-embedding method for the human cochlea that reveals a fine morphology and excellent immunostaining results. *Acta Otolaryngol.* 2010;130:788-92.
4. Koda H, Kimura Y, Ishige I, Eishi Y, Iino Y, Kitamura K. Quantitative cellular level analysis of mitochondrial DNA 3243A > G mutations in individual tissues from the archival temporal bones of a MELAS patient. *Acta Otolaryngol.* 2010;130:344-50.
5. 木村百合香, 飯野ゆき子. 【耳の奇形】 発生・分類・遺伝子 外耳・中耳奇形の分類 *JOHNS* 2009;25:11-152.
6. 木村百合香. 【高齢者診療マニュアル】 高齢者主要疾患の診療の進め方 耳鼻咽喉科疾患 耳鼻咽喉科疾患の特徴 *日本医*

師会雑誌 2009;138 巻特別 2 :S260-S261.

7. Koda H, Kimura Y, Iino Y, Eishi Y, Murakami Y, Kitamura K. Bilateral sudden deafness caused by diffuse metastatic leptomeningeal carcinomatosis. *Otol Neurotol.* 2008;29:727-9.
8. Kimura Y, Kubo S, Koda H, Noguchi Y, Sawabe M, Maruyama N, Kitamura K. Quantitative analysis of mRNA in human temporal bones. *Acta Otolaryngol.* 2007 ;127:1024-30.

[学会発表] (計4件)

1. 木村百合香, 久保幸穂, 古宇田寛子, 重本和宏, 沢辺元司, 喜多村健. パラフィン包埋ヒト保存側頭骨切片におけるレーザーマイクロダイセクション法を用いた mRNA 定量解析. 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会, 仙台, 5月20-22日, 2010.
2. 木村百合香, 久保幸穂, 古宇田寛子, 加藤智史, 高橋正時, 重本和宏, 沢辺元司, 喜多村健. レーザーマイクロダイセクション法による保存側頭骨切片からの mRNA 解析. 第110回日本耳鼻咽喉科学会総会. 東京, 2009
3. 木村百合香. シンポジウム 老人性難聴 その病態解明に向けて ヒト側頭骨を用いた分子生物学的アプローチ 第19回日本耳科学会総会. 東京, 2009
4. 木村百合香, 古宇田寛子, 高橋正時, 加藤智史, 喜多村健. ホルマリン固定パラフィン包埋側頭骨病理組織標本より LMD 法を用いた細胞レベルでの mRNA 抽出の試み. 第18回日本耳科学会. 神戸, 2008

[図書] (計1件)

1. 木村百合香, 高橋正時, 喜多村健. めまい. *老年医学の基礎と臨床 I*. P175-179

2. [産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京都健康長寿医療センター病理解剖コラ
ボレーション事業 HP
(<http://www1.tmg Hig.jp/pathology-d/info/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 百合香 (KIMURA YURIKA)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究
所・研究員
研究者番号：40450564

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

喜多村 健 (KITAMURA KEN)
東京医科歯科大学大学院耳鼻咽喉科・教授

池園 哲郎 (TETSURO IKEZONO)
埼玉医科大学耳鼻咽喉科・教授

重本 和宏 (SHIGEMOTO KAZUHIRO)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究
所・部長

沢辺 元司 (SAWABE MOTOJI)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究
所・部長

久保 幸穂 (KUBO SACHIHO)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究
所・研究員
研究者番号