

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18798

研究課題名（和文）内耳血管条におけるメラニンの役割および各種障害に対する反応メカニズムの解明

研究課題名（英文）The role of melanin in inner ear vascular striae and the analysis of reaction mechanism to disorder

研究代表者

倉田 奈都子（KURATA, NATSUKO）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・非常勤講師

研究者番号：30516315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では SLC26A4 遺伝子の機能と血管条との関連を解析することにより、本遺伝子の変異による内耳障害の病態を解明することが目的である。内耳血管条内には色素沈着とマクロファージが観察され、血管条内色素沈着 SLC26A4 変異による難聴の増悪因子と考えられる。Slc26a4 ノックアウトマウスは先天性重度難聴とされてきたが、白色系アルビノマウスと交配し色素欠損した遺伝的背景のマウスはある程度の聴力を獲得していることが確認でき、血管条での色素沈着ならびにマクロファージの集積は認めなかった。この結果は SLC26A4 変異による聴力の変動や難聴の進行の予防法確立に貢献すると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLC26A4 変異による難聴は非常に表現型が多彩であり、本難聴遺伝子以外の環境因子による影響が示唆されている。SLC26A4 変異による難聴の研究で内耳血管条内には著明に増加・増殖した色素沈着とマクロファージが観察され、血管条内色素沈着は SLC26A4 変異による難聴の増悪因子と考えられる。このことはヒトにおける老人性難聴の側頭骨病理と共通した観察である。本研究では、内耳血管条におけるメラニンが関与する影響および各種障害に対する反応メカニズムの解明を目的とする。これらの結果は SLC26A4 変異による難聴の予防法のみならず、血管条障害に伴う老人性難聴のメカニズム解明にも大きく貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the pathogenesis of inner ear damage caused by mutations in this gene by analyzing the function of the SLC26A4 gene and its association with stria vascularis. Slc26a4 knockout mice have been considered congenitally severely deaf, but mice with a genetic background deficient in pigmentation, bred with white albino mice, have acquired some degree of hearing ability. No pigmentation or macrophage accumulation in the stria vascularis was observed. We believe that these results will contribute to the establishment of methods to prevent hearing fluctuations and progression of hearing loss caused by the SLC26A4 mutation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：血管条 難聴 マクロファージ メラニン 内耳 色素沈着 SLC26A4 耳科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SLC26A4 変異では先天性高度難聴を呈することが多いが、非先天性で軽度～中等度で発症し進行性を示すこともある。このように多彩な表現型がどのような要因によるのかは不明である。これまでにモデルマウスにおいて内耳血管条の過剰色素沈着が組織マクロファージの増殖・活性化を誘導して聴覚障害を重症化させていることを報告されている(引用文献)。本研究ではこれまで注目されてこなかった血管条内色素沈着に着目した病状進行の予防法確立を目的とする。そのためにメラニン色素を欠損したマウスを用いて、聴性脳幹反射、内リンパ電位の測定、血管条内マクロファージの形態観察、および血管条内の RNA 発現の解析を行い難聴レベルに關与する要因を特定する。

2. 研究の目的

今回我々は SLC26A4 変異による難聴のモデルマウス、*Slc26a4*^{-/-} を用いて内耳血管条における色素沈着およびマクロファージがどのような役割を持っているのか、またマクロファージ活性化の反応メカニズム、それらの役割が加齢とともにどのように変化するのか、などを解明することを目的とする。形態学的な観察のみならず、マイクロダイセクションにて採取した血管条を分子生物学的に解析することで、遺伝子レベルでどのような化学反応が起きているのかを検証する。

3. 研究の方法

1) モデルマウスの作成、選定

C57BL/6Jc1 を遺伝的背景とした *Slc26a4* ノックアウトマウスをホモ群 (*Slc26a4*^{-/-}) とヘテロ群 (*Slc26a4*^{+/-}) で交配した。

アルビノマウス CD1 (ICR) を遺伝的背景とした白色系マウスでも同様に作成した。

野生群 (*Slc26a4*^{+/+})、ヘテロ群 (*Slc26a4*^{+/-})、ホモ群 (*Slc26a4*^{-/-})

2) 聴力検査：ABR、および EP 測定

ABR は 8、12、16、22.4、32 KHz の周波数の tone burst を刺激音として用い、100 dB SPL から開始して、波形が確認できた時点で閾値と判断した。少なくとも同一周波数で 2 回以上刺激して、再現性を確認した。

EP は正円窓経路で計測

3) 血管条の免疫組織学的検討

誕生した幼若マウスを日齢 0～5 日、8 日、15 日、60 日で安楽死させ、4%PFA にて固定後顕微鏡下に蝸牛外側壁を取り出す。

血管条を顕微鏡下に摘出し、下記の抗体にて染色

whole mount preparation によって共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8) にて観察

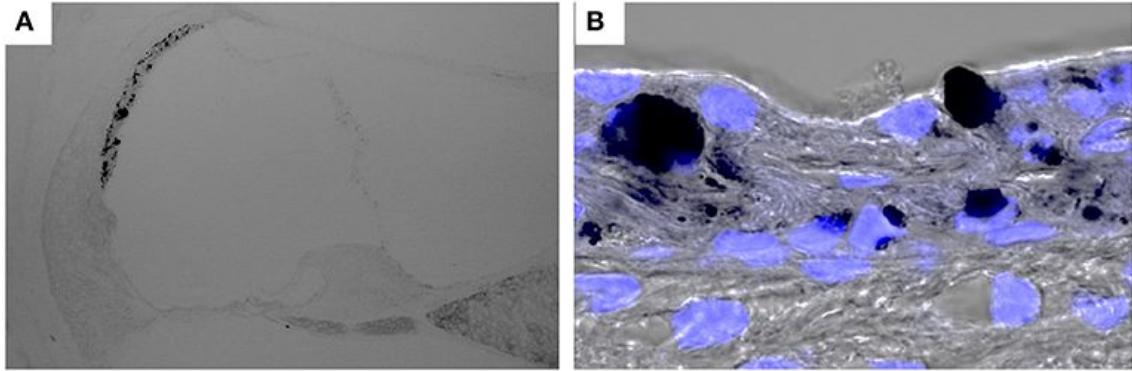
血管条内血管：CD34 抗体

マクロファージ：染色 CD68、F4/80、Iba-1 抗体

本顕微鏡では微分干渉観察にて色素沈着の有無も同時に観察することが可能なため、メラニン色素の 3 次元的な局在部位も検証する。アルビノマウス CD1 (ICR) を遺伝的背景とするマウスに対しても同様の免疫染色を行い、メラニン色素を欠損した結果として中間細胞樹状突起の形態がどのように変化するのかを検証する。

4. 研究成果

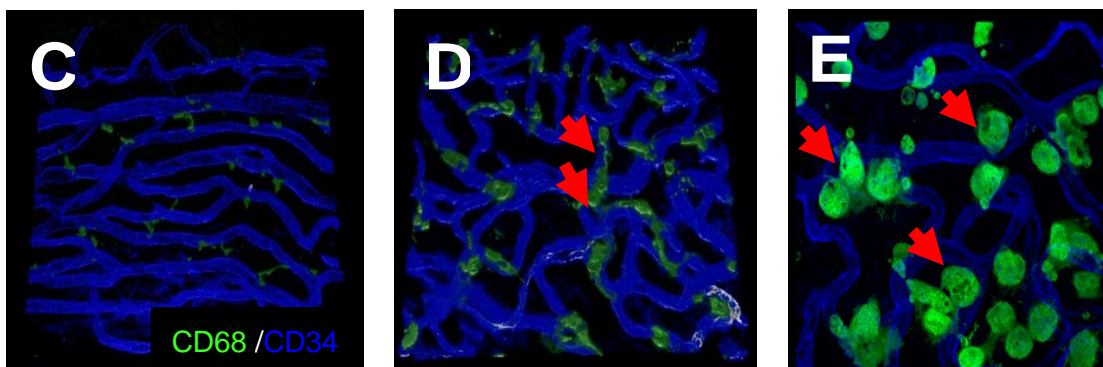
- (1) *Slc26a4*^{-/-} の血管条には大小さまざまな色素沈着が豊富にみられた (図 1 A, B) (図 1)



・コントロールマウスでは、小さな細胞体に枝分かれした突起を持つラミファイド型マクロファージ (C) が、*Slc26a4*^{-/-} では短縮した突起と肥大化した細胞体のアメボイド型マクロファージ (D,E) が血管周囲に観察された。 (図 2 C、D、E)_{ΔΔ}

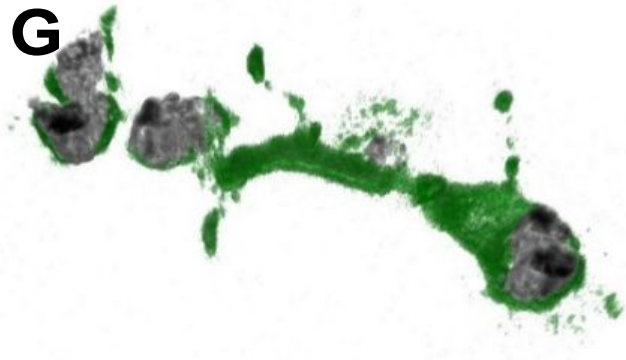
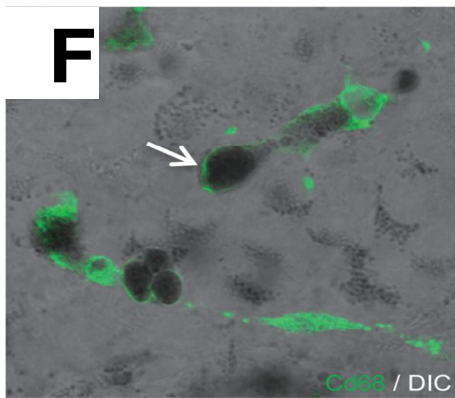
(図 2) Control

Slc26a4



・*Slc26a4*^{-/-} マウスの血管条に見られた色素沈着に一致してアメボイド型マクロファージが観察された。 (図 3 F,G)

(図 3)



(2)

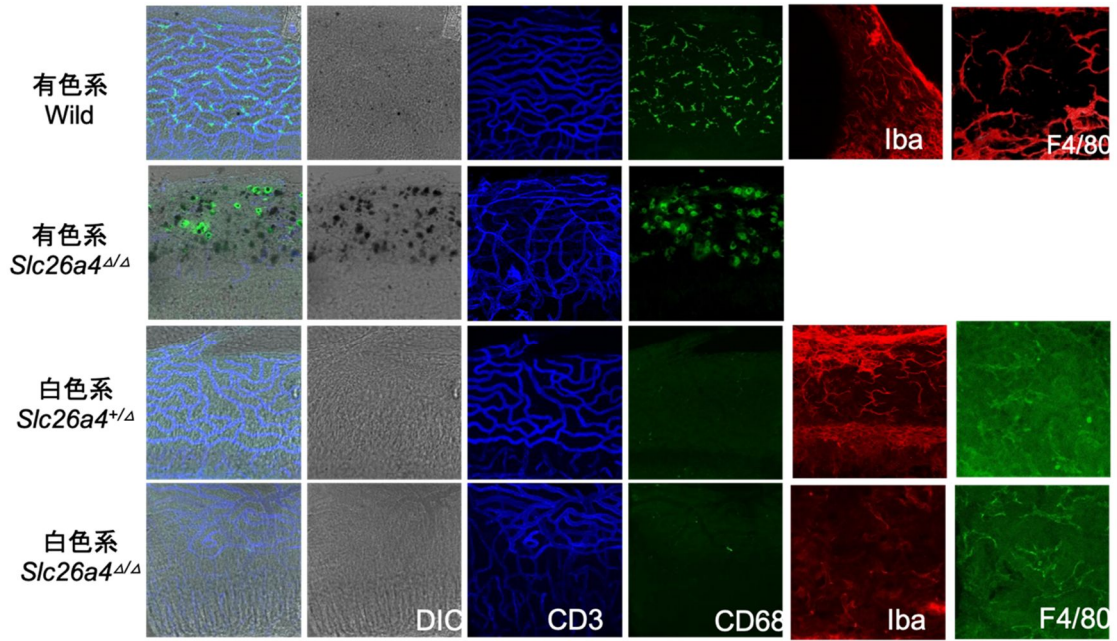
・白色系マウスでは、野生群、ヘテロ群、ホモ群にかかわらず、CD68 発現を欠いていた

・白色系マウスでは、F4/80、Iba1 の発現は有色系マウスと差は無かった

・白色系 *Slc26a4*^{-/-} における Iba1 発現は、白色系 *Slc26a4*^{+/+} と差は無かった

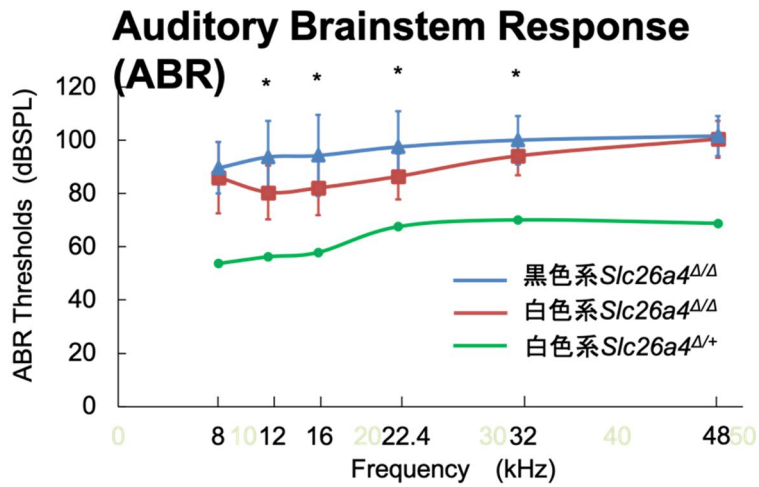
(図 4)

(図 4)

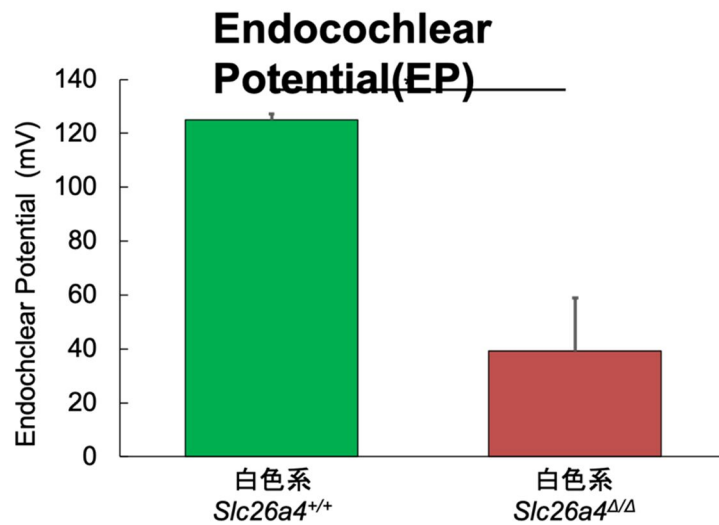


(3)

- ・白色系 *Slc26a4*^{Δ/Δ} は、有色系 *Slc26a4*^{Δ/Δ} に比べて ABR 閾値上昇が軽度 (図 5) (図 5)



- ・白色系 *Slc26a4*^{Δ/Δ} では、EP は検出可能であった。(図 6)

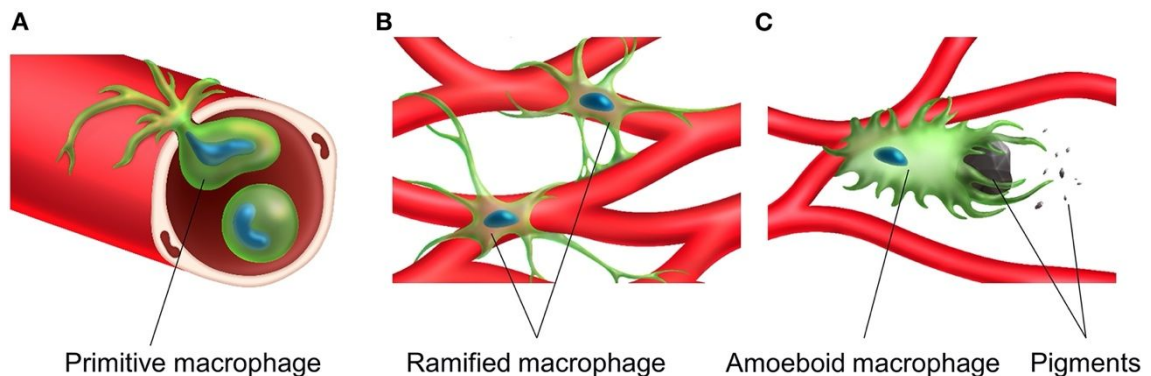


(図 6)

血管条における組織に存在するマクロファージ (引用文献)⁸⁾

- ・ 幼若なマクロファージが血管を移動し血管条の血管の表面に分布している。
- ・ 定常状態の血管条では血管条血管の周囲に細い突起を持つ細胞体の小さなマクロファージが存在する。血管条内マクロファージは中枢神経における代表的な組織マクロファージであるミクログリアと同様に小さな細胞体に複数の細かく枝分かれした突起をもつラミファイド型とよばれる細胞形態で存在している。ラミファイド型のマクロファージは音響刺激などの様々な刺激が加わると突起の短縮や細胞体の肥大化といった顕著な形態学的変化を伴い、アメボイド型と呼ばれる活性化状態へと移行する (**図7、引用文献**)。血管条内マクロファージが活性化状態となって貪食機能を発揮しメラニンを取り込んだ形のは頻りに観察される。これは血管条内に沈着したメラニンを消化、分解し組織の恒常性維持に働いていると考えられる。

(図 7)



- ・ *Slc26a4* / の血管条では、酸化ストレス物質の増加に伴いメラニン色素が多数見られ、増加したメラニン色素は血管条内マクファージを活性化、とともにマクロファージがメラニン顆粒を貪食・処理している。これにより活性化マクロファージが血管条変性を加速、EP および聴力の低下を起こすと考えている。

このように、血管条内マクロファージには様々なサブタイプが存在し、血管条内のメラニン沈着は、マクロファージを活性化させて CD68 発現を誘導する。血管条内で活性化したマクロファージは神経食現象、あるいは神経炎症を引き起こし、血管条の非可逆的な変化へと誘導している可能性が考えられる。メラニン色素増殖を抑えることが、マクロファージの活性化抑制を促し、聴力障害の予防につながるのではないかと考えている。

< 引用文献 >

Ito T, Li X, Kurima K, et al.: *Slc26a4*-insufficiency causes fluctuating hearing loss and stria

vascularis dysfunction. *Neurobiology of disease* 66:53-65, 2014

Ito T, Kurata N, Fukunaga Y: Tissue-Resident Macrophages in the Stria Vascularis. *Front*

Neurol. 2022

伊藤卓, 倉田奈都子. 血管条に分布するマクロファージ様細胞の役割について *Otology Jpana* 2022; 32: 13-17.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito Taku, Kurata Natsuko, Fukunaga Yoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Tissue-Resident Macrophages in the Stria Vascularis	5. 発行年 2022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.2022.818395	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 伊藤 卓、倉田 奈都子	4. 巻 32
2. 論文標題 血管系に分布するマクロファージ様細胞の役割について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 O t o l o g y J a p a n	6. 最初と最後の頁 13~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11289/otoljpn.32.13	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 Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Fujikawa Taro, Sawada Mitsutaka, Yagihashi Ken, Takeda Takamori, Watanabe Hiroki, Ooka Tomoki, Kurata Natsuko, Nishio Ayako, Yamamoto Katsura, Honda Keiji, Takahashi Masatoki, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 125
2. 論文標題 Cochlear Implantation in the Elderly: Safety and Hearing Outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Tokeibugeka Gakkai Kaiho(Tokyo)	6. 最初と最後の頁 151~158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3950/jibi inkotokeibu.125.2_151	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 Ito Taku, Kurata Natsuko, Fukunaga Yoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Tissue-Resident Macrophages in the Stria Vascularis	5. 発行年 2022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.2022.818395	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 該当する

1. 著者名 Kurata Natsuko, Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Ooka Tomoki, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Four-Hour Delayed Gadolinium-Enhanced 3D-FLAIR MR Imaging Highlights Intralabyrinthine Micro-Schwannomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e1444 ~ e1448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.00000000000003310	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 該当する

1. 著者名 伊藤 卓, 倉田 奈都子	4. 巻 32
2. 論文標題 血管系に分布するマクロファージ様細胞の役割について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 川島 慶之, 伊藤 卓, 藤川 太郎, 澤田 光毅, 柳橋 賢, 竹田 貴策, 渡邊 浩基, 大岡 知樹, 倉田 奈都子, 西尾 綾子, 山本 桂, 本田 圭司, 高橋 正時, 堤 剛	4. 巻 125
2. 論文標題 高齢者への人工内耳 手術の安全性と聴取成績	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会会報	6. 最初と最後の頁 151-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 市原 寛子, 藤川 太郎, 伊藤 卓, 川島 慶之, 山本 桂, 倉田 奈都子, 本田 圭司, 渡邊 浩基, 大岡 知樹, 堤 剛	4. 巻 124
2. 論文標題 炎症性腸疾患患者に合併した耳症状の社会的・心理的影響の質問紙調査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 890-896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kurata Natsuko, Kawashima Yoshiyuki, Ito Taku, Fujikawa Taro, Nishio Ayako, Honda Keiji, Kanai Yasuhisa, Terasaki Mariko, Endo Ikuyo, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Advanced Magnetic Resonance Imaging Sheds Light on the Distinct Pathophysiology of Various Types of Acute Sensorineural Hearing Loss	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 656 ~ 663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000003930	査読の有無 無
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 Bai Jing, Ito Taku, Fujikawa Taro, Honda Keiji, Kawashima Yoshiyuki, Watanabe Hiroki, Kurata Natsuko, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 <sc>Three dimensionally</sc> visualized ossification and mineralization process of the otic capsule in a postnatal developmental mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.1090	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉田 奈都子, 川島 慶之, 伊藤 卓, 藤川 太郎, 西尾 綾子, 本田 圭司, 大岡 知樹, 渡邊 浩基, 山本 桂, 堤 剛
2. 発表標題 急性感音難聴の診断と病態把握における内耳造影MRIの有用性
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉田 奈都子, 川島 慶之, 伊藤 卓, 藤川 太郎, 山本 桂, 西尾 綾子, 大岡 知樹, 渡邊 愛, 堤 剛
2. 発表標題 迷路内神経鞘腫12症例の臨床像と遅延造影3D-FLAIRの有用性について.
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉田 奈都子, 伊藤 卓, 剛
2. 発表標題 内耳血管条におけるメラニン沈着へのマクロファージの関与と活性化メカニズム
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白 静, 伊藤 卓, 川島 慶之, 藤川 太郎, 本田 圭司, 渡邊 浩基, 倉田 奈都子, 堤 剛.
2. 発表標題 C57BL/6Jマウスを用いた、出生後の耳石発生に関するEx VivoでのマイクロCT分析(Ex Vivo Micro-CT Analysis of Postnatal Otoconia Development in C57BL/6J Mice)
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西尾 綾子, 川島 慶之, 竹田 貴策, 伊藤 卓, 藤川 太郎, 山本 桂, 倉田 奈都子, 大岡 知樹, 渡邊 愛, 堤 剛
2. 発表標題 脳表ヘモジデリン沈着症28例の聴平衡覚所見
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島 慶之, 伊藤 卓, 藤川 太郎, 竹田 貴策, 渡邊 浩基, 大岡 知樹, 倉田 奈都子, 本田 圭司, 柳橋 賢, 高橋 正時, 堤 剛
2. 発表標題 高齢者への人工内耳植込術 年齢により層別した手術成績
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉田 奈都子, 川島 慶之, 大岡 知樹, 本田 圭司, 渡邊 裕基, 山本 桂, 藤川 太郎, 伊藤 卓, 堤 剛
2. 発表標題 聴神経腫瘍症例における内耳造影MRI所見と臨床像の検討
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白 静, 伊藤 卓, 川島 慶之, 藤川 太郎, 本田 圭司, 渡邊 浩基, 倉田 奈都子, 堤 剛
2. 発表標題 マウスの生後における耳囊石灰化過程のマイクロCTによる可視化(Calcification Process of the Otic Capsule in Postnatal Stage of Mice Visualized with Micro-CT)
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉田 奈都子, 川島 慶之, 伊藤 卓, 大岡 知樹, 藤川 太郎, 山本 桂, 本田 圭司, 渡邊 浩基, 堤 剛
2. 発表標題 微小な迷路内神経鞘腫の診断における内耳遅延造影MRIの有用性
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉田 奈都子, 川島 慶之, 竹田 貴策, 本田 圭司, 渡邊 浩基, 山本 桂, 藤川 太郎, 伊藤 卓, 堤 剛
2. 発表標題 各種の急性感音難聴症例における内耳遅延造影MRI所見の比較検討
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島 慶之, 伊藤 卓, 藤川 太郎, 倉田 奈都子, 竹田 貴策, 大岡 知樹, 山本 桂, 堤 剛
2. 発表標題 突発性難聴に対する高気圧酸素治療および鼓室内ステロイド注入療法の治療効果の傾向スコアマッチング解析
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉田 奈都子, 伊藤 卓, 川島 慶之, 藤川 太郎, 山本 桂, 西尾 綾子, 渡邊 愛, 堤 剛
2. 発表標題 NLRP3遺伝子変異を認めた2症例の遅延造影MRI所見および人工内耳手術の治療経験
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会
4. 発表年 2023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
研究協力者	伊藤 卓 (TAKU ITO) (40401400)		

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
---------	---------