

平成 23 年 2 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791232
 研究課題名（和文） 内耳に存在するメラノサイトの聴力制御機構の解明
 研究課題名（英文） Hearing mechanism of melanocyte in inner ear
 研究代表者
 伊田 みちる（IDA MICHIRU）
 中部大学・生命健康科学研究所・助教
 研究者番号：80393148

研究成果の概要（和文）：難聴と毛髪・虹彩・皮膚の色素異常を呈する Waardenburg 症候群はメラノサイト（色素細胞）の異常と考えられるが、その機序は不明である。本研究は色素異常を伴う難聴の機序解明と新規治療法の開発を目的とした。メラノサイト分化関連遺伝子エンドセリン受容体 B (*Ednrb*) の遺伝子欠損マウス (*Ednrb-KO*) の内耳の形態学的解析と生理学的解析を行い、聴力低下、内耳メラノサイトの欠損、らせん神経節細胞の脱落を認めた。神経特異的に *Ednrb* を発現するマウス (*DBH-Ednrb-Tg*) と *Ednrb-KO* を掛け合わせたところ、メラノサイトは欠損していたが、聴力は回復し、らせん神経節細胞も維持されていた。

研究成果の概要（英文）：Waardenburg syndrome, an auditory-pigmentary syndrome, is caused by abnormal differentiation in melanocyte-related gene such as endothelin receptor B (*Ednrb*). In this study, the aim is an elucidation of hearing loss with pigmentation disorder and its therapeutic development. *Ednrb*-deficient mice (*Ednrb-KO*) were deafness and had a defect of melanocyte in inner ear and decrease of spiral ganglion cells. The hearing losses with neurodegeneration of spiral ganglion cells were improved by introducing an *Ednrb* transgene under control of the dopamine beta-hydroxylase promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：内耳、難聴、色素細胞、Waardenburg 症候群、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

難聴は1000-2000人に1人の割合で発症する重要な高頻度疾患である。難聴の原因遺伝

子はこれまでに約70しか解明されておらず、原因不明の疾患も多く、その治療法の開発は急務である。

内耳血管条に存在する中間細胞は内リンパ液の高カリウム濃度を維持しており、カリウム濃度勾配によって有毛細胞から信号として音が脳に伝えられる。中間細胞は他の組織に存在する色素細胞（メラノサイト）と同様に神経堤から発生することから、色素異常と難聴は密接な関係にある。

メラノサイト関連遺伝子 *c-kit* の突然変異体 *Wv/Wv* マウスは白色毛で難聴を呈する。野生型マウスに *c-kit* の機能阻害抗体を皮下投与すると、一時的にメラノサイトが死滅し体毛が白色化するが、メラノサイト幹細胞は死滅しないために新たにメラノサイトが作られ、次に生えてくる体毛は黒色化する。この抗体により毛包メラノサイトの増殖分化機構は明らかにされつつある。しかしながら現時点では内耳メラノサイトである中間細胞の性質はほとんどわかっていない。そこで、このツールを内耳に応用すれば、内耳色素細胞である中間細胞の増殖・分化の機構を明らかにできると考えられた。

また、別のメラノサイト関連遺伝子エンドセリン受容体 B (*Ednrb*) は、難聴と色素異常を発症する Waardenburg 症候群の原因遺伝子である。その遺伝子欠損マウス (*Ednrb-KO*) は難聴であるが、その機序についての詳細は明らかにされていない。

一方、受容体型チロシナーゼである RET 遺伝子の強制発現マウス (*RET-Tg*) は皮膚黒色症を呈し、メラニン合成能の亢進もしくは色素細胞の増加が考えられる (Kato M, et al, Cancer Res. 64: 801-806, 2004)。メラニンの有無は聴力に影響しないといわれているが、白色モルモットより有色モルモットの血管条色素細胞の増殖能が高いという報告もある (Hear Res. 79:115-122, 1994)。色素異常を呈する難聴モデルマウスを *RET-Tg* と掛け合わせ、メラニン/色素細胞の発現を制御することでその聴力が回復するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 内耳色素細胞の幹細胞システムの解明

内耳に *c-kit* 機能阻害抗体を作用させて内耳色素細胞を死滅させて一過性難聴モデルマウスを作製する。この際に、色素細胞のマーカーである *Dct* (ドーパクロム・トウトメラゼ) を *LacZ* で可視化できる *Dct-LacZ* マウスを用いることで、色素細胞および色素細胞幹細胞を特定することが可能となる。このマウスについて、聴力の回復に伴った内耳色素細胞および色素細胞幹細胞の局在とその増殖・分化メカニズムを明らかにする。

(2) 内耳色素細胞の分化に関わる遺伝子群と

Ret の相互作用

色素異常と難聴を発症する *Wv/Wv* など難聴モデルマウスと *RET-Tg* を掛け合わせて難聴モデルマウスの聴力を回復させることができるかどうかを調べ、*Ret* と難聴に関わる遺伝子とのクロストークを個体レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *c-kit* 抗体を用いた一過性難聴モデルマウスの作成

Dct-LacZ マウス (C57BL6/J バックグラウンド) に *c-kit* 抗体を生後 0 日~14 日まで一日おきに皮下注射で投与し、毛色の観察と聴性脳幹反応 (ABR) による聴力の解析を行った。

(2) メラノサイト機能不全による難聴マウスの解析

メラノサイト機能不全マウス (*c-kit* 突然変異体マウス *Wv/Wv*、*Ednrb* 遺伝子欠損マウス *Ednrb-KO*) の聴力について、ABR および内耳の組織学的解析 (① *Ednrb* の免疫組織染色、② HE 染色後、らせん神経節細胞の密度計測) を行った。

(3) *Wv/Wv* マウスの機能回復

c-kit 突然変異体である *Wv/Wv* マウスを、*Ret-Tg* と掛け合わせて *Wv/Wv/Ret-Tg* マウスを作製し、(2) と同様に ABR および内耳の組織学的解析を行った。

(4) *Ednrb* 遺伝子欠損マウスの機能回復

ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ (DBH) のプロモーターを用いて神経特異的に *Ednrb* を発現するトランスジェニックマウス *DBH-Ednrb-Tg* と *Ednrb-KO* を掛け合わせ、(2) と同様に ABR および内耳の組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) *c-kit* 抗体を用いた一過性難聴モデルマウスの作成

Dct-LacZ マウスに *c-kit* 抗体を投与したところ、毛色の白色化が見られた (図 1)。しかし、ABR を測定したところ聴力は正常であったことから、一過性難聴モデルマウスを作製することはできなかった。内耳には、血液内耳関門が存在しているために血流による薬剤の到達は難しく、今回は皮下注射のために内耳まで抗体が到達しなかったと考えられる。外科的手術により、正円窓から蝸牛管への直接投与で可能となる可能性がある。

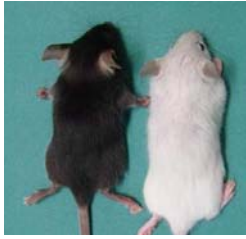


図1 c-kit 抗体投与による体毛の白色化
右、c-kit 抗体投与；左、対照。

(2)メラノサイト機能不全による難聴マウスの解析

Wv/Wv マウス、*Ednrb-KO* マウスは両方とも難聴であった。また、どちらも血管条の中間細胞が欠損していたことに加えてらせん神経節細胞の脱落も認められた(図2)。よって、メラノサイト機能不全マウスでは、メラノサイト(中間細胞)の欠損による血管条不全と、神経変性の両方により難聴をきたしていることが明らかになった。

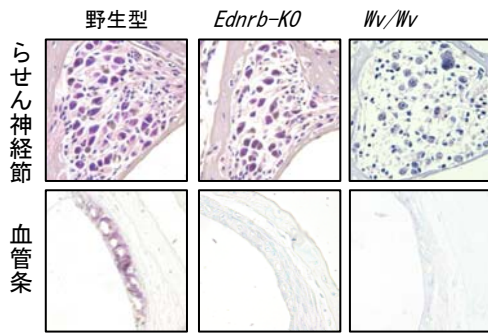


図2 野生型およびメラノサイト欠損マウスにおける内耳のらせん神経節および血管条の比較
らせん神経節は HE 染色、血管条は Kir4.1 (中間細胞マーカー) 免疫染色を行った。

(3) *Wv/Wv* マウスの聴力回復の試み

Wv/Wv マウスと *Ret-Tg* マウスを掛け合わせて *Wv/Wv/Ret-Tg* マウスを作製した。このマウスの毛色は白毛と黒毛がパッチ状を呈しており、毛包メラノサイトの部分的回復が認められた(図3)。しかしながら聴力の回復は見られず、形態学的解析においても内耳メラノサイト(中間細胞)は欠失したままであった(図4)。したがって、c-*Ret* は毛包メラノサイトの発生および機能を一部回復させることはできるが十分ではなく、また毛包と内耳ではメラノサイトの発生および発達のメカニズムが異なることが示唆された。

野生型 *Wv/+* *Wv/Wv/Ret* *Wv/Wv*



図3 体毛の変化

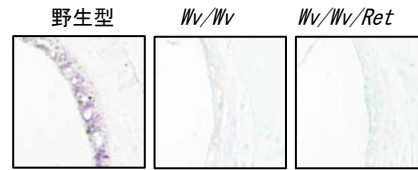


図4 内耳血管条の Kir4.1 免疫染色

(4) *Ednrb* 遺伝子欠損マウスの聴力回復

野生型マウス内耳の *Ednrb* 免疫組織染色を行ったところ、*Ednrb* は血管条メラノサイトだけでなく、らせん神経節細胞にも発現していた(図5)。図2で示したように *Ednrb-KO* マウスは血管条欠損と神経変性をきたしていることから、神経機能の回復を試みた。そこで、神経特異的に *Ednrb* を発現させる *DBH-Ednrb-Tg* と *Ednrb-KO* を掛け合わせて、*Ednrb-KO;DBH-Ednrb-Tg* マウスを作製した。このマウスはらせん神経節細胞は減少せず(図6)、聴力も維持されていた。しかし血管条は欠損したままであった(図7)。

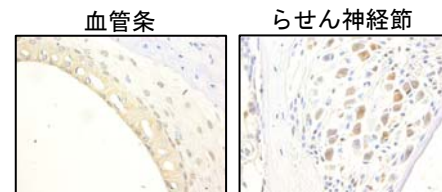


図5 野生型マウス内耳の *Ednrb* 免疫組織染色

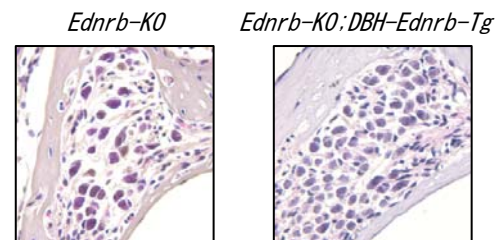


図6 らせん神経節細胞の HE 染色

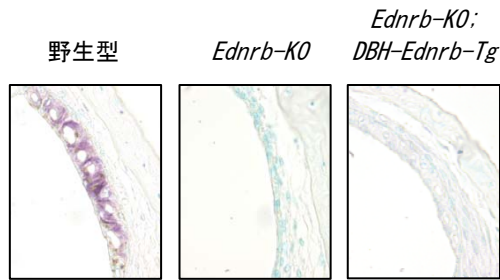


図7 血管条のKir4.1免疫染色

Ednrb-KO;DBH-Ednrb-Tg マウスは血管条メラノサイトの欠損を回復することはできなかったが、らせん神経節細胞の脱落を回復させ、聴力の部分的回復も認められた。以上の結果から、Waardenburg 症候群などメラノサイト機能不全による難聴について、メラノサイトの機能回復が困難であっても神経機能を回復させることで部分的な聴力回復が見込めることが期待される。そのためには今後、*Wv/Wv* マウスなどの他の血管条欠損マウスについても *Ednrb-KO* マウスと同様にらせん神経節細胞の脱落を回復させ、聴力が回復できるかどうかを確かめる必要がある。今回、らせん神経節細胞脱落の回復により、聴力を部分的に回復させることができたが、完全な聴力回復のためには、血管条メラノサイト欠損も回復させる必要があると考えられる。そのためには、血管条メラノサイト幹細胞システムなど血管条メラノサイトの増殖・分化のメカニズムを明らかにすることが必要だろう。

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)

Ohgami N, Ida-Eto M, Shimotake T, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M. c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jul 20;107(29):13051-6. Epub 2010 Jun 29. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

①伊田みちる、大神信孝、土本一輝、堀創二朗、山口碧、加藤昌志. 騒音暴露に対するマ

ウスの感受性の検討、第79回日本衛生学会総会、2009年3月31日、北里大学白金キャンパス(東京)

②大神信孝、伊田みちる、藤井紀子、土本一輝、堀創二朗、山口碧、加藤昌志. 騒音性・加齢性難聴を発症したマウス内耳におけるD型アミノ酸含有タンパク質の検出、第79回日本衛生学会総会、2009年3月31日、北里大学白金キャンパス(東京)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 難聴又は耳鳴りの予防・治療剤
 発明者: 加藤昌志、大神信孝、伊田みちる、田口暢彦
 権利者: 中部大学
 種類: 特許
 番号: 特願2009-185334
 出願年月日: 平成21年8月8日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊田 みちる (IDA MICHIRU)
 中部大学・生命健康科学研究所・助教
 研究者番号: 80393148

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし