

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18305

研究課題名（和文）Pendred症候群モデルマウスにおける平衡障害の評価

研究課題名（英文）Quantitative analysis and correlative evaluation of video-oculography, micro-computed tomography, and histopathology in Pendrin-null mice

研究代表者

渡邊 浩基（Hiroki, Watanabe）

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：90845356

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）：覚醒下にマウスの眼球運動を定量的に評価できる観察装置を作成して、Pendred症候群モデルマウスの前庭機能を解析した。半規管機能障害の程度は個体差が大きく、耳石器機能は明らかに障害されていた。形態学的な評価としてのmicroCTでは耳石器の耳石総体積は減少し、特に球形嚢では多くのマウスで欠損していた。一方で卵形嚢で巨大耳石がみられた。また、ホールマウント法による前庭有毛細胞の観察では、不動毛の形態および細胞数に変化は認めなかった。Pendred症候群モデルマウスの前庭障害の主因が耳石形成の異常によるものだと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pendred症候群はめまいの反復を半数以上に伴うが、有効な治療法がないことは課題である。SLC26A4変異のモデルマウスに対して、前庭の機能評価（傾斜試験、回転刺激検査、冷水刺激検査、ロータロッドテスト）と形態学的評価（共焦点顕微鏡、microCT）を行い、前庭障害の主因が神経細胞の障害ではなく耳石形成の異常によるものだとわかったことによりSLC26A4遺伝子変異に伴う前庭障害の予防法や新規治療法開発への応用が期待できる。また、モデルマウスの前庭障害を評価する実験系が確立されたことにより他の疾患モデルマウスの評価への応用も可能である。

研究成果の概要（英文）： In this study, we evaluated the equilibrium function using the inspection equipment, which can record eye movements against rotational, gravitational, and thermal stimulations. Moreover, we correlated the degree of functional impairment with the morphological alterations observed in Slc26a4 / mice. The rotational stimulus and ice water caloric tests revealed considerable impairment of the semicircular canal, while the tilted gravitational stimulus test showed a severe functional decline of the otolithic system in Slc26a4 / mice.

Giant otoconia and a significant decrease in total otolith volume in the saccule and utricle were observed in Slc26a4 / mice. The number and morphology of the utricular hair cells in Slc26a4 / mice were not significantly reduced compared to those in Slc26a4 /+ mice. Collectively, we can conclude that vestibular impairments are mainly associated with otoconia formation and morphology rather than hair cell degeneration.

研究分野：めまい平衡

キーワード：Pendred症候群 平衡障害 耳石器 半規管 傾斜試験 温度刺激検査 前庭有毛細胞 前庭動眼反射

1. 研究開始当初の背景

バランスを保つには、視覚系、体性感覚系、前庭系を含む複数の感覚系からの入力を調整する必要がある。前庭系は内耳に存在し、地球の垂直方向に対する頭部の平衡情報を調節する。インパルスは前庭器官から前庭核に伝わり、脊髄、眼球運動を制御する神経細胞群、小脳に伝達される。これらの系統的反射機構は前庭眼球反射 (VOR) と呼ばれる。内耳前庭器官は、3つの半規管と、2つの耳石器 (卵形嚢と球形嚢) からなる。三半規管は頭部の回転加速度を検知するのに対し、卵形嚢と球形嚢は頭部の直線加速度を検知する。

VOR は頭部運動中の眼球網膜の像を安定させる。近年の技術革新により、ビデオ眼球撮影システムを用いて、げっ歯類動物の3次元的な眼球運動と回転を記録・測定することができるようになった。VOR の利得は、反応と刺激の間の大きさまたは角速度の比として定義され、前庭機能の客観的かつ定量的な尺度といえる。さまざまな遺伝子改変マウスや前庭毒性薬投与動物モデルにおける前庭機能の異常は、VOR 利得レベルの低下によって評価することができる。

Pendred 症候群は常染色体劣性遺伝の疾患で、感音性難聴、平衡障害またはエピソード性回転性めまい、前庭水道の拡張または拡大、甲状腺腫、*SLC26A4* 遺伝子の変異を特徴とする。*SLC26A4* は内耳や腎臓などの限られた組織でのみ発現するペンドリンをコードしており、Pendred 症候群の難聴や平衡障害は中枢神経系よりもむしろ内耳の障害によって引き起こされることを示唆している。*Slc26a4* KO マウスは、旋回、頭部傾斜、斜頸を含む聴覚および前庭の異常症状を示すことがある。難聴の根底にある細胞や分子のメカニズムについては多くの報告があるが、前庭症状の詳細な病因は依然として不明であり、有効な治療法もない。前庭症状の重症度は *Slc26a4* KO マウスによって大きく異なり、明らかに多くの異常症状を示すマウスもいる。病理学的研究から、*Slc26a4* KO マウスは前庭有毛細胞の重度の変性と耳石の奇形を示すことが明らかになっている。しかし、*Slc26a4* KO マウスの異常な病態や形態に関連した定量的な生理学的平衡機能評価はこれまで行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Slc26a4* KO マウスにおける VOR を観察し半規管機能と耳石器機能を定量的に評価することである。さらに、VOR の結果を形態学的観察と併せて考察した。この研究は、Pendred 症候群患者における前庭症状の治療のヒントとなる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では原則 3-4 ヶ月齢のマウス (雌雄比およそ 1:1) を対象とした。総合的な平衡機能評価として、ロータロッド試験で回転する機械の上で落下せずに耐えられる時間を測定し定量的に評価した。

そして、覚醒下におけるマウスの眼球運動を定量的に評価できる観察装置を作成して、固定テーブルを傾けたり回転させたり冷水を耳内に注入したりして回転刺激、重力刺激、温度刺激に対する VOR を観察した。各実験にて VOR 利得を旋回 *Slc26a4* KO マウス、非旋回 *Slc26a4* KO マウス、対照群マウス (*Slc26a4*^{+/+}マウス) の 3 群間で比較し、定量的に半規管機能や耳石器機能を評価した。

さらに、形態学的評価として非破壊的に骨構造を明らかにすることができるマイクロ CT を用いて耳石形態および局在の評価を行った。CT では三半規管傾斜角、前庭水管断面積なども測定した。神経細胞の形態を立体的に評価することができるホールマウント染色による共焦点顕微鏡での卵形嚢の観察も行った。

4. 研究成果

(1) ロータロッド試験にて、落下潜時は旋回 *Slc26a4* KO マウスが最も短く、対象群マウスで最も長かった。眼球運動観察による VOR 利得は回転刺激検査と温度刺激検査において、旋回 *Slc26a4* KO マウスでは有意に小さかったが、非旋回 *Slc26a4* KO マウスでは対象群マウスと変わらなかった。温度刺激検査は同じマウスでも左右どちらの耳に冷水を注入するかで結果は異なったが、マウスの回旋行動の方向と急速眼球運動速度低下の有意側との関係には一定の傾向は見られなかった。傾斜検査において垂直眼球偏位角度から測定した VOR 利得は旋回 *Slc26a4* KO マウスで最も小さく、対象群マウスで最も大きく、3 群間で有意な差を認めた。マウスによっては傾斜刺激に伴って急速に移動する異常眼球運動が観察され、非旋回 *Slc26a4* KO マウスで特に高頻度で見られた。

図1 冷水注入による温度刺激に対する眼球運動の解析

マウス外耳道に冷水を注入すると急速眼球運動が観察されたが、時間経過とともに徐々に眼球運動は消失していった

マウス外耳道に冷水を注入すると急速眼球運動が観察されたが、時間経過とともに徐々に眼球運動は消失していった

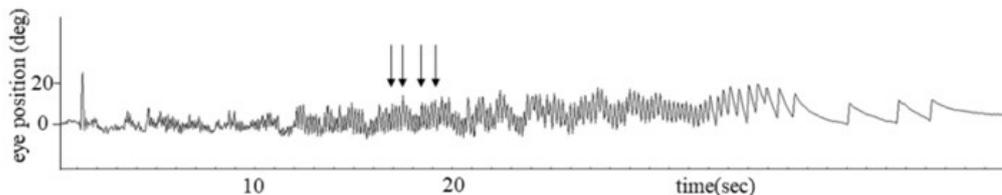
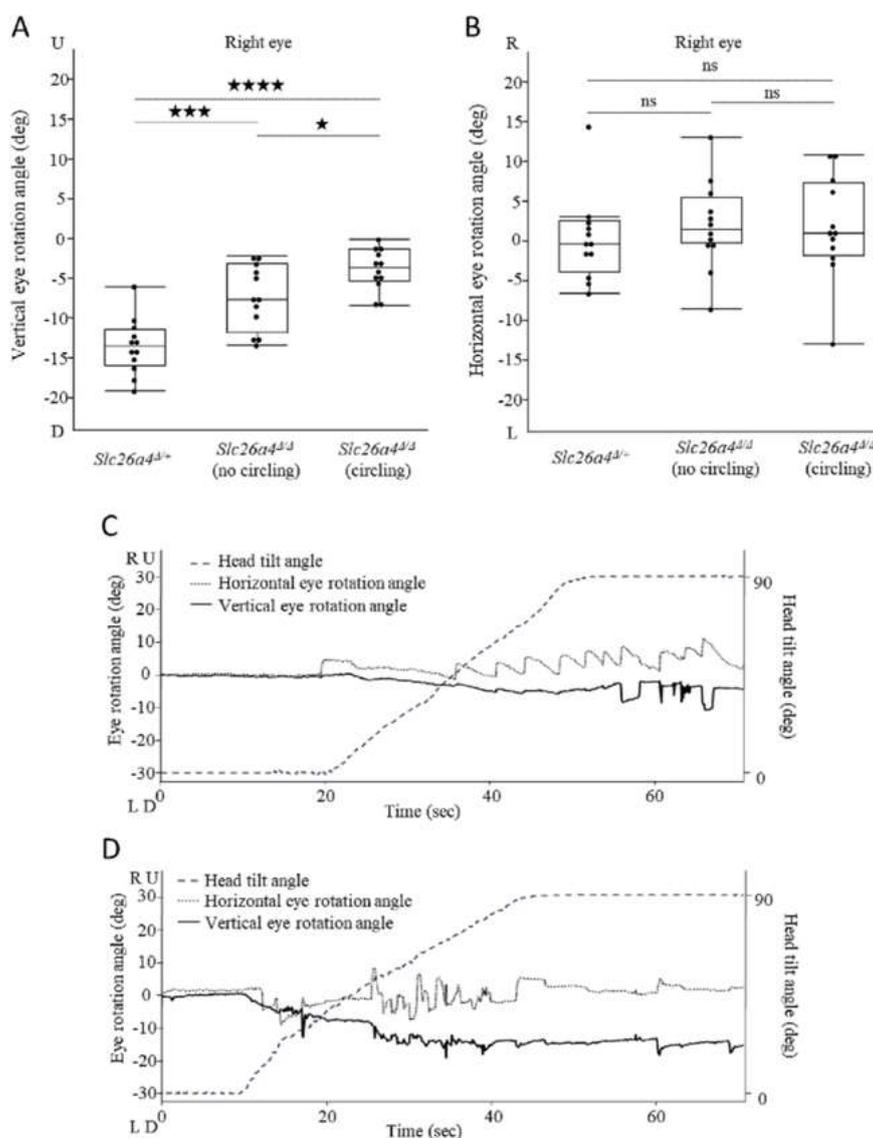


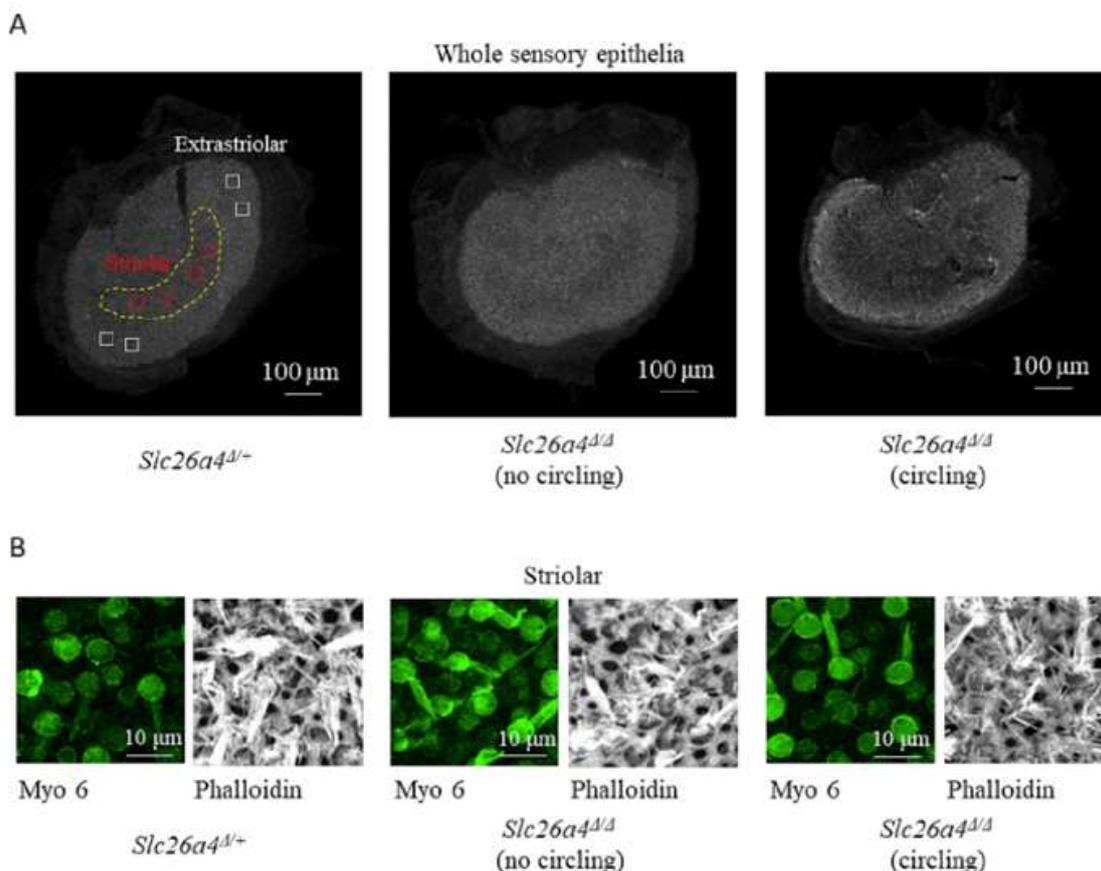
図2 傾斜刺激に対する眼球運動の解析

マウスを固定したテーブルをゆっくりと傾斜させていくと対照群では 90 度に傾けた時点で 15 度前後の垂直方向の眼位変化がみられるのに対して、*Slc26a4* KO マウスでは 5-10 度程度しか眼位変化が見られなかった (A, D)。また、マウスによっては傾斜刺激に伴って急速に移動する異常眼球運動が観察されるものもあった (C)。このような異常眼球運動は良性発作性頭位めまい症患者で観察される眼球運動の特徴と酷似していた。



(2) マイクロ CT を用いた耳石形態および局在の評価では、球形囊と卵形囊の耳石の総体積は *Slc26a4* KO マウスでは有意に減少しており、特に球形囊においては欠損しているマウスもいた。しかしその局在は *Slc26a4* KO マウスでもおおむね正常位置に存在しており、耳石器内での耳石の移動や三半規管内の異所性耳石は観察されなかった。また、ホールマウント法による前庭の感覚細胞である有毛細胞形態の観察では、不動毛の形態および細胞数に *Slc26a4* KO マウスと対象群マウスで有意な差は認めなかった。

図3 ホールマウント法を用いた卵形嚢有毛細胞の形態評価
 対照群、および *Slc26a4* KO マウスにおいて前庭の神経細胞である有毛細胞の数と形態に大きな差は認めなかった。すなわち、*Slc26a4* KO マウスにおいて前庭の有毛細胞は障害されていないことが判明した。



(3) 我々は、眼球運動追跡装置を作成し、静的および動的な耳石器および半規管機能を解析した。さらに、半規管機能の程度を左右別々に評価した。この装置により、異常行動と個々の前庭機能障害や病態との相関を考察することが可能となった。

ロータロッド試験の結果から *Slc26a4* KO マウスで前庭機能障害を認めるが、その重症度はマウスにより異なり、旋回行動などの異常行動の有無に反映されることがわかる。半規管機能を反映する回転刺激検査や温度刺激検査の結果と、耳石器機能を反映する傾斜検査の結果を総括すると、*Slc26a4* KO マウスの半規管機能は少し障害されており、耳石器機能は著しく障害されているといえる。また、旋回行動の有無は半規管機能障害の深刻さに依存しているとわかる。傾斜刺激による異常眼球運動の出現はヒトで最も一般的なめまいの原因疾患である良性発作性頭位めまい症で見られる所見と酷似しており興味深い。また、形態学的な評価として、CTで耳石形成の異常が認められる一方で、ホールマウント染色の観察にて既報告と異なり耳石器の有毛細胞に変成を認めなかったことは驚きだ。この相違は遺伝的背景の差だと推測される。これらの結果を全て考慮すると *Slc26a4* KO マウスでみられる前庭障害の病態が神経細胞の障害ではなく主に耳石形成の異常によるものであることが強く示唆された。

(4) マウスの眼球運動を計測する装置を開発して、回転刺激、重力刺激、温度刺激に対する VOR を観察することにより前庭機能を定量的に評価することに成功した。これらの生理学的検査に加えて、マイクロ CT を用いた非破壊的な形態評価とホールマウント染色による観察によって、*SLC26A4* の機能不全によって引き起こされる平衡機能障害の原因が、主に耳石形成の異常によることをつきとめた。*SLC26A4* 遺伝子変異に伴う前庭障害の予防法や新規治療法開発への応用が期待できる。また、半規管機能の程度を左右別々に評価できる温度刺激検査を含め、モデルマウスの前庭障害を評価する実験系が確立されたことにより他の疾患モデルマウスの評価への応用も可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Hiroki, Ito Taku, Aoki Natsuki, Bai Jing, Honda Keiji, Kawashima Yoshiyuki, Fujikawa Taro, Ikeda Takuo, Tsutsumi Takeshi	4. 巻 183
2. 論文標題 Quantitative analysis and correlative evaluation of video-oculography, micro-computed tomography, and histopathology in Pendrin-null mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 106194 ~ 106194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2023.106194	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊浩基, 伊藤卓, 本田圭司, 川島慶之, 藤川太郎, 池田卓生, 堤剛
2. 発表標題 Slc26a4-nullマウスの良性発作性頭位めまい症モデルマウスとしての活用
3. 学会等名 第81回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊浩基, 伊藤卓, 本田圭司, 川島慶之, 藤川太郎, 大岡知樹, 池田卓生, 堤剛
2. 発表標題 温度刺激検査を用いた Pendred 症候群モデルマウスの前庭機能評価 病的回旋運動や内耳形態との関連について
3. 学会等名 第80回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊浩基, 伊藤卓, 本田圭司, 白静, 大岡知樹, 川島慶之, 藤川太郎, 池田卓生, 堤剛
2. 発表標題 Pendred症候群モデルマウスの前庭動眼反射の定量的評価
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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