

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592166

研究課題名（和文） 線溶系遺伝子変異マウスを用いた聴覚における線溶系の機能解析

研究課題名（英文） Hearing functional analysis of fibrinolytic components gene mutant mice

研究代表者

石川浩太郎（ISHIKAWA KOTARO）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60347987

研究成果の概要（和文）：

組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）ノックアウトマウス、プラスミノゲン（Plg）ノックアウトマウス、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1（PAI-1）ノックアウトマウスについて、聴力と蝸牛組織標本の検討を行った。若月齢では野生型マウスと聴力に有意差が生じないことを確認したため、t-PA ノックアウトマウスについては 18 か月齢、24 か月齢、Plg ノックアウトマウス、PAI-1 ノックアウトマウスについては 8 か月齢を用意して解析を行った。しかし、これらの月齢においても聴力および蝸牛組織において、野生型マウスと有意差を確認することができなかった。今後は更なる加齢マウスの検討や、難聴に関する負荷からの回復など、新たな検討項目を加える必要があると考える。

研究成果の概要（英文）：

We studied hearing and histopathological findings of cochlea in tissue-type plasminogen activator (tPA) -deficient mice, plasminogen (Plg)-deficient mice, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)-deficient mice. We cannot detect any significant difference of hearing level and histological findings between C57BL/6J tPA<sup>-/-</sup> mice and wild type (WT) mice in 18 and 24 months age. We also analyzed the C57BL/6J Plg<sup>-/-</sup> and the C57BL/6J PAI-1<sup>-/-</sup> mice at the age of 8 months. These mice showed normal hearing level and histological findings of cochlea. In conclusion, we cannot detect any significant difference of audiological function and histopathology of cochlea between fibrinolytic components gene mutant mice and wild type mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：耳科学・感音難聴・線溶系遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

解剖学的特徴から、その病態解明が難しいとされてきた感音難聴解析への新しい手

法として、分子遺伝学手法を利用した解析が進んできた。今日までヒトの遺伝性難聴家系においてその難聴原因遺伝子および遺

伝子座が續々と発見されている。我々が解析を行い報告した日本人遺伝性難聴家系の研究成果としては、核遺伝子異常では、DFNA11 と命名された日本で最初の感音難聴の遺伝子座 (Tamagawa Y 1996) がある。ミトコンドリア遺伝子異常においては、世界で 2 家系目のミトコンドリア *7511T>C* 変異を同定し (Ishikawa K 2002)、さらにこの家系の難聴者から側頭骨病理標本を採取し、内耳病理の解析を行って、著明なラセン神経節の変性が難聴の主な原因であることを報告した (Ishikawa K 2006)。世界各地でこのような家系解析研究が行われ、現在では数多くの難聴原因遺伝子が同定され、その内耳における局材と働きの研究が進んできている。

感音難聴の病態解析には同定された遺伝子およびそれにコードされる蛋白の解析と表現型の研究の融合が欠かせないところである。しかし人間での組織学的、生化学的な解析には必ずと限界が生じる。これを補う目的で利用されているのが難聴モデルマウスである。こうした難聴遺伝子の研究は、遺伝性難聴の遺伝子診断、遺伝相談に役立つだけでなく、老人性難聴 (Nemoto 2004) や騒音性難聴 (Laer 2006) との関連も議論されるようになってきている。難聴の発症に重要な遺伝子および蛋白を解明することは、感音難聴の病態生理の解明、さらには遺伝子治療や再生医療などの将来の治療法へとつながると期待されている。

一方、線溶反応とは組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) あるいはウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーター (u-PA) により、プラスミノゲン (Plg) が活性化されて生じるプラスミンが線維素すなわちフィブリンを分解する系である。この反応はプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) と  $\alpha 2$  プラスミンインヒビター ( $\alpha 2$ PI) により巧妙に調節されている。これら線溶系の各因子は、止血栓の溶解に関わるだけでなく、免疫、アレルギー、細胞遊走、神経再生などに大きな役割を果たしていることが報告されている。(Sejima T 2005、Li J 2006) また、アポトーシスについては、t-PA ノックアウトマウスで脊髄損傷の後の神経障害や神経細胞のアポトーシスが軽度であったという報告 (Abe Y 2003)、血管内皮のミトコンドリア外膜(ミトコンドリアは内因系のアポトーシスの主たる作用点である)で t-PA の基質であるプラスミノゲンが voltage-dependent anion channel に結合し部分的にチャンネルを閉じるという報告 (Gonzalez-Gronow M 2003)、大脳の阻血実験で t-PA によりカスパーゼ 8 活性化を介する外因系のアポトーシス経路が誘導さ

れるという報告 (Liu D 2004) などがある。

これまで難聴と線溶系の関連についての報告としては、突発性難聴患者に t-PA を投与して改善が得られた報告 (Mora 2003) や突発性難聴患者の PAI-1 レベルを測定し、健常コントロールと比較して有意に上昇しているといった報告 (Marcucci 1994) がある。また内耳における t-PA の発現を解析した研究では、LPS 投与後に血管条血管内腔、らせん靭帯にその発現を認めたという会議録がある (高山 2007) が、線溶系遺伝子変異マウスを用いて系統的な基礎的研究として線溶系機能と聴覚との関連について考察を行った研究は未だ報告されていない。

## 2. 研究の目的

内耳組織と同様の神経系に深い関連をもち、アポトーシスにも影響を与える線溶系は、聴覚においても強い関連があるものと考えられる。実際に臨床の現場においてもその関連を示唆する現象が報告されている。こういった事柄を踏まえ、我々は現在まで行ってきた分子遺伝学的研究成果を合わせて、線溶系遺伝子の変異マウスの聴覚機能に着目するに至った。線溶系機構の視点から考えた難聴の病態解明に近づく努力をするのが今回の研究の目的である。

## 3. 研究の方法

ベルギー王国リューベン大学 P. Carmeliet 教授および近畿大学松尾理教授から供与され自治医科大学分子病態治療研究センター分子病態研究部および実験医学センターで繁殖した組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) ノックアウトマウス、プラスミノゲン (Plg) ノックアウトマウス、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) ノックアウトマウスを対象とした。当初は 5 週、10 週、15 週齢を対象として考えたが、若月齢では正常マウスと聴力に変化が生じないことが確認されたため、組織プラスミノゲンアクチベーター

(t-PA) ノックアウトマウスについては 18 カ月齢、24 カ月齢まで、プラスミノゲン (Plg) ノックアウトマウス、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1

(PAI-1) ノックアウトマウスについては 8 カ月齢まで用意して解析を行った。

これらのマウスを、イソフルレンを使用した吸入麻酔による全身麻酔法 (Unientor 社製の麻酔器を使用) を施行した上で、聴性脳幹反応 (ABR) 検査装置を用いて 8kHz、16kHz、24kHz 刺激で測定し、聴力閾値を確認した。さらに聴覚測定を終了したマウスを深麻酔後に断頭して側頭骨を摘出し、摘出した側頭骨から片側の内耳骨包を摘出

し固定と脱灰を行った上で内耳骨包のブロックを作成し、薄切切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を行って、得られた切片標本を観察し、コルチ器（内・外有毛細胞＋支持細胞）の構造や血管条、ラセン神経節の状態を確認した。

#### 4. 研究成果

##### 1) t-PA ノックアウトマウスの解析

当初、予定していた5週齢、10週例ではプライアー反射が明瞭に認められたため、15週齢マウスを用いて聴性脳幹反応検査を施行した。その結果、8kHz、16kHz、24kHz刺激ともに20dBまで反応が認められたため、正常聴力と判断し、加齢マウスにおける聴力悪化の程度を確認するため、18か月齢、24か月齢までt-PA ノックアウトマウスを飼育し、その時点での聴力解析と、内耳組織検索を行った。

##### ① 聴性脳幹反応検査結果

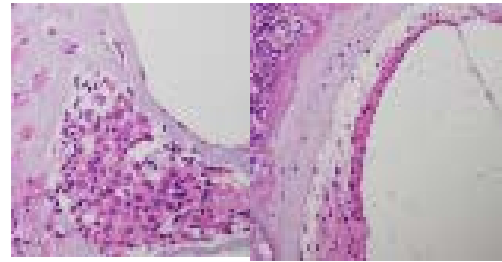
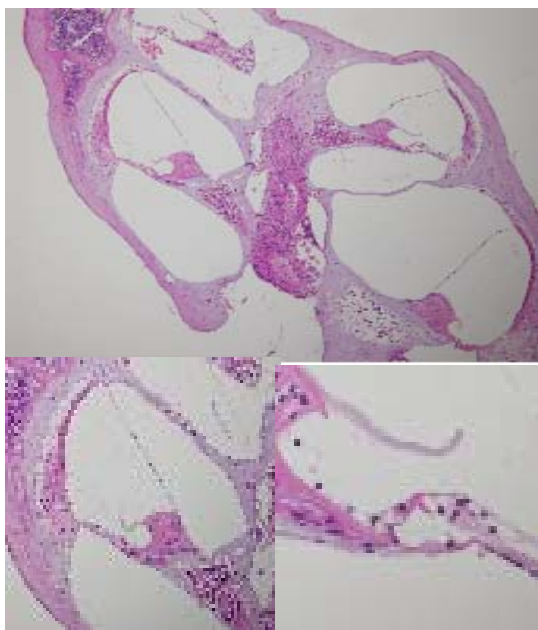
	8kHz	16kHz	24kHz
18 か月	50dB	60dB	65dB
24 か月	75dB	80dB	(-)

聴力は上記閾値となった。これは同じ実験系を用いて、別実験で我々が測定した野生型のC57BL/6Jマウスの聴力と同等の聴力であり、野生型との聴力閾値の差を見出すことはできなかった。

##### ② 内耳組織検査結果

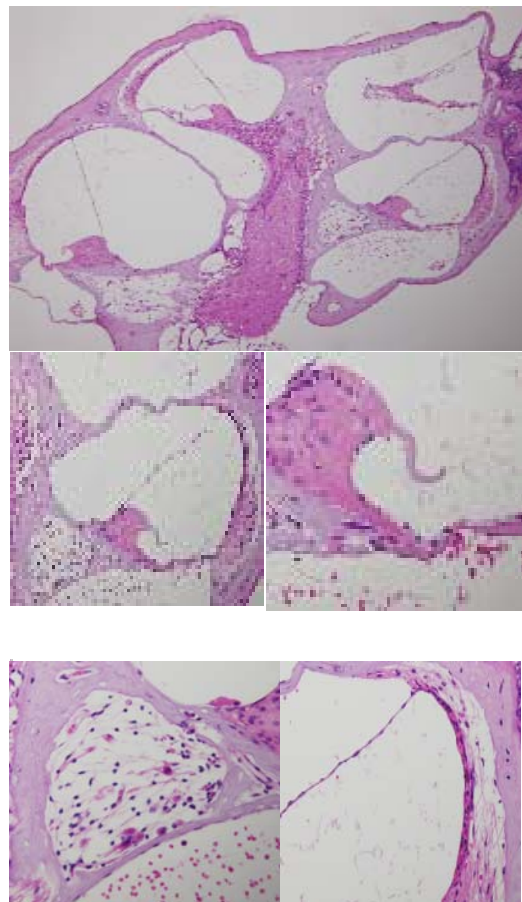
これらのマウスの内耳組織切片を作成した。

##### <18 か月齢>



基底回転ではコルチ器とラセン神経節の変性が強く認められた。中回転ではコルチ器の変性が基底回転に近い領域で認められたが、ラセン神経節や血管条はほぼ正常に存在し、それより頂回転側では正常の構造が保たれていた。

##### <24 か月齢>



基底回転から中回転までコルチ器とラセン神経節の変性が強く認められた。血管条の萎縮も認められた。中回転から頂回転ではコルチ器、ラセン神経節、血管条が保存されていることが確かめられた。

##### 2) Plg ノックアウトマウスおよび PAI-1 ノックアウトマウスの解析

t-PA ノックアウトマウスにおいて聴覚

における表現型に野生型マウスと有意な差が得られなかったため、Plg ノックアウトマウスおよび PAI-1 ノックアウトマウスの解析に移行した。t-PA ノックアウトマウスと同様に 15 週齢マウスにおいても明瞭なブライアー反射を認めたため、8 カ月齢まで 2 つのノックアウトマウスを飼育し、その時点での聴力解析と、内耳組織検索を行った。

① 聴性脳幹反応検査結果

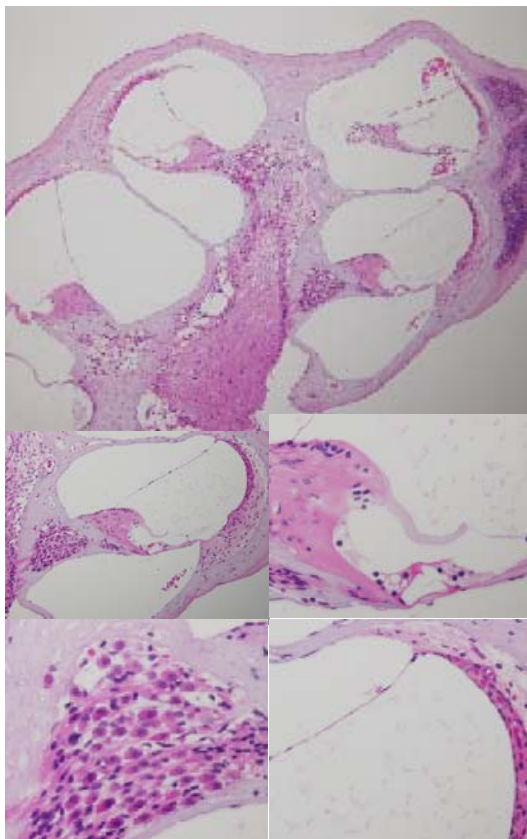
	8kHz	16kHz	24kHz
Plg KO	20dB	20dB	25dB
PAI1KO	20dB	20dB	20dB

聴力は上記のような閾値となった。これは同じ実験系を用いて、別実験で我々が測定した野生型の C57BL/6J マウスの聴力と同等の聴力であり、野生型との聴力閾値の差を見出すことはできなかった。

② 内耳組織検査結果

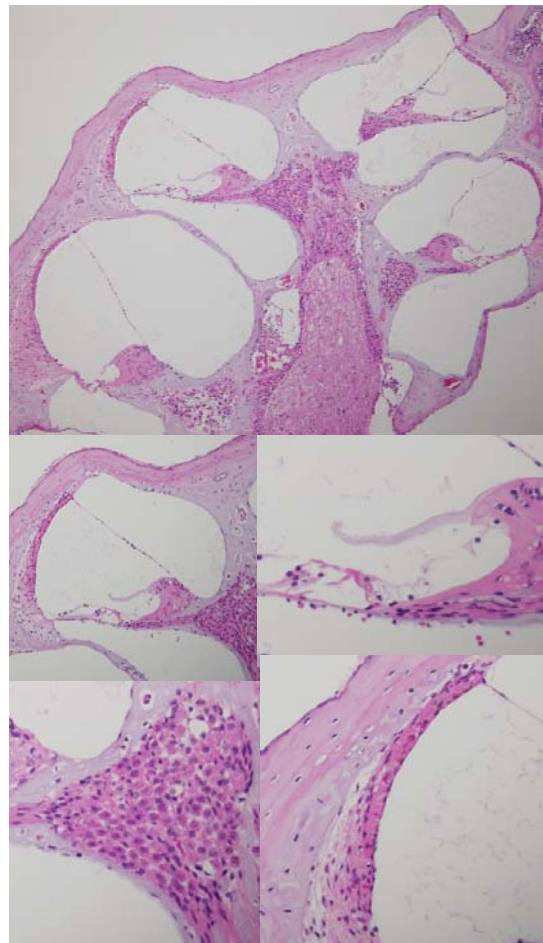
これらのマウスの内耳組織切片を作成した。

<Plg ノックアウトマウス>



基底回転から頂回転までコルチ器とラセン神経節の変性が無く、血管条の萎縮も認められなかった。正常構造と大きな差異は無かった。

<PAI-1 ノックアウトマウス>



基底回転に軽度のラセン神経節の細胞数減少を認めるものの、頂回転までコルチ器、ラセン神経節、血管条は概ね正常所見であった。

3) 総括

t-PA ノックアウトマウス、Plg ノックアウトマウス、PAI-1 ノックアウトマウス共に、我々が確認した範囲では、聴力および蝸牛組織において、野生型マウスと大きな差異を確認することができなかった。今後は更なる加齢マウスの検討や、難聴に関する負荷（騒音負荷など）からの回復など、新たな検討項目を加える必要がある。今回の研究期間では、有意な発見は得られなかったが、さらに検討を継続する予定である。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川浩太郎 (ISHIKAWA KOTARO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60347987

### (2) 研究分担者

窓岩清治 (MADOIWA SEIJI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70296119

坂田洋一 (SAKATA YOUICHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40129028

市村恵一 (ISHIMURA KEIICHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00010471