

機関番号：13802

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790384

研究課題名 (和文) 発育期ウイルス性難聴の発症機序に関する実験病理学的解析

研究課題名 (英文) Pathogenesis of viral infection-induced hearing loss in the developing mouse model

研究代表者

新井 義文 (ARAI YOSHIFUMI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381784

研究成果の概要 (和文) : 発育期のウイルス感染による難聴の発症機序を解析する目的で出生直後の BALB/c マウスにサイトメガロウイルス (CMV) を接種したところ、細菌壁成分である lipopolysaccharide を同時に投与した場合において内耳への CMV 感染が高率に誘導されることが明らかとなった。内耳での CMV 抗原陽性細胞は血管条やラセン靭帯といった内リンパの電解質濃度や高電位を維持する器官へも広がりを示したが、ウイルス抗原は感染 7 - 10 後をピークとして以後漸減し感染 28 日後にはほぼ消失するという一過性の感染動態を示した。血管条やラセン靭帯に発現する電解質輸送に関わるイオンチャンネルや細胞間輸送装置の発現については、血管条の K⁺チャンネルである KvLQT1 やラセン靭帯の carbonic anhydrase II は出生後から持続性の良好な発現を示す一方、Na⁺, K⁺-ATPase, Kir4.1, connexin 26 や connexin 30 は出生から約 2 週間かけて発現の増強と分布の広がりを示すことが陰性コントロール群で確認された。CMV 感染群では、感染の見られた血管条やラセン靭帯は低形成を示し、出生後に発現増強を示すこれら分子の発現がウイルス抗原の消失した後も不良であった。これらのことから、発育期の CMV の内耳感染は聴覚受容器であるコルチ器の機能不全や聴覚神経伝達路の形成不全を引き起し、進行性の難聴を来す可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : To elucidate the pathogenesis of viral infection-induced hearing loss, cytomegalovirus (CMV) was inoculated into the neonatal BALB/c mice. Additional intracranial lipopolysaccharide administration brought effective CMV propagation into the inner ear organa, such as stria vascularis and stria ligament, which played an important role for electrolyte balance homeostasis and high-voltage state of the endolymphatic duct. The number of CMV antigen-positive cells transiently peaked at 7 to 10 days after infection, followed by gradual decrease and loss within 28 days after infection. The broad expressions of KvLQT1, a potassium channel in the stria vascularis, and carbonic anhydrase II in the stria ligament were constitutively observed from the early developmental stage. Whereas, Na⁺, K⁺-ATPase, Kir4.1, connexin 26 and connexin 30 were focally and weakly expressed at first, then were up-regulated and spread, according to the hearing development, in the control group analysis. However, in the CMV-infected group, the maturation of some ion transporter molecules was inhibited even after the disappearing of the CMV antigens. Hypoplasia of the stria vascularis and stria ligament was also noted in the 28 days after CMV-infected mice. These findings suggested that CMV infection in the developing inner ear indirectly caused functional disability of the organ of Corti, mediated by the continuous electrolyte imbalance of the endolymphatic duct, and resulted in the hypoplasia of the auditory neural circuit formation, leading progressive hearing disabilities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

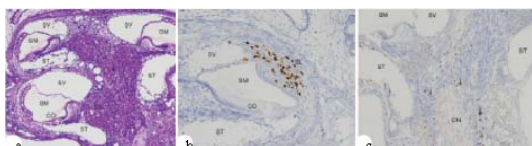
キーワード：発生病理

1. 研究開始当初の背景

(1) サイトメガロウイルス (CMV) は胎生期に感染して脳障害を起こす最も頻度の高い病原微生物である。全出産の 0.4 - 1.0% に CMV の胎内感染が報告され、そのうち 5 - 10% は出生時に小頭症、脳室壁の石灰沈着、大脳皮質の菲薄化、小脳低形成、全身の黄疸、肝脾腫などを示して死亡し、残りの約 10% は出生時には無症状で生後数年して精神発達遅滞、視力障害、難聴、てんかん等の脳機能障害が生じてくることが知られている。特に難聴は高頻度に認められ、原因不明小児難聴の 30% 近くが先天性 CMV 感染症によると推測されている。しかし、その発症機序や要因に関する研究はわずかである。

(2) 研究代表者らは、発育期のマウス CMV の感染による難聴の発症機序を解明するための独自の新生仔マウス実験モデルを確立し報告した(Lab Invest, 2008)(図 1a-c)。

<図 1: マウス感染モデルの内耳 CMV 陽性像>



この研究で、ウイルスの腹腔内感染と同時に細菌壁成分である lipopolysaccharide(LPS) を脳内に投与すると高率に内耳感染を誘導できることが明らかとなった。とくに聴覚の電気生理的環境の維持に欠くことのできない重要な働きを有する器官とされる血管条やラセン靭帯への高率な感染には LPS 刺激が必要であり、発育期 CMV 内耳感染の成立要因として細菌感染すなわち細菌性髄膜炎の重要性が示唆された。しかしながら、内耳への CMV 感染がどのような機序で難聴をもたらすのか、具体的なメカニズムの解明には至っていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、新生仔マウス動物モデルを用いて CMV 感染による難聴発症の発生病理に関わる要因を明らかにし、ヒトにおける先天性 CMV 感染での難聴発症に対する予防法のための基礎を確立することである。

(2) 聴覚受容器であるコルチ器の機能維持には、コルチ器の含まれる内リンパの電解質環境が健全に維持される必要がある。その内リンパの恒常性に関わる内耳器官として、血管条やラセン靭帯は重要な役割を持つ。血管条やラセン靭帯は、そこで発現するイオンチャンネルや細胞間輸送装置(gap junction)および細胞間隙輸送装置(tight junction)の働きによるイオン輸送を介してコルチ器の存在する内リンパ電解質の高 K⁺濃度と高電位を維持していることが知られている。これまでの研究でイオンチャンネルや電解質輸送装置の機能異常が難聴の原因となることが明らかにされており、CMV 感染が内耳電解質環境の破綻につながる直接的あるいは間接的な影響を与えるか否か検討する必要がある。先の発育期ウイルス感染動物モデル結果において、血管条やラセン靭帯にウイルス感染所見が認められたことに着目し、本研究ではウイルス感染が血管条やラセン靭帯に与える細胞形態変化や細胞機能障害の発生病機を解析する。

3. 研究の方法

(1) 新生仔マウスに対する CMV 感染および LPS 投与の方法については、基本的に先の論文(Lab Invest, 2008)に準じて行ったが、今回は CMV 感染法として腹腔内接種のみならず脳室内接種も追加して実施した。実験群は① LPS 投与 + CMV 脳室内接種群(LPS+CMV ic)、② LPS+CMV 腹腔内接種群(LPS+CMV ip)、③ CMV 脳室内接種(CMV ic)のみの群、④ LPS 投与のみの群(LPS)、⑤ 陰

性コントロール群(cont)の 5 群に分けて感染実験を行った。

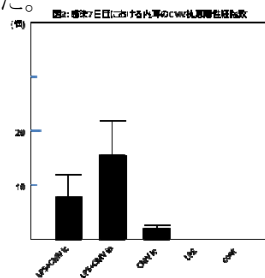
(2) CMV 感染後 7 日、14 日、21 日、28 日にそれぞれマウスを屠殺し、4%パラホルムアルデヒドにて還流固定後カミソリで頭部を矢状断。右半球側をパラフィン包埋標本用、左半球側を凍結標本用としてそれぞれ内耳を含む薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色および免疫染色に供した。免疫染色で用いた一次抗体は血管条やラセン靭帯に発現するイオンチャンネルや tight junction、gap junction に関連した分子であり、その発現の状況を形態学的に検討するとともに CMV 抗原の局在も合わせて観察した。CMV 抗原陽性細胞数についてはパラフィン包埋標本を用いた免疫染色結果より算定した。

免疫染色に使用した一次抗体は以下の通り

抗体名	クローン名	メーカー	陽性部位
KvLQT1	rabbit polyclonal	MILLIPORE	血管条
Kir4.1	rabbit polyclonal	elomone labs	血管条
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	EP2B43Y	EPITOMICS	血管条、ラセン靭帯
Aquaporin 1	1/22	abcam	ラセン靭帯
Carbonic anhydrase II	rabbit polyclonal	abcam	ラセン靭帯
Connexin 26	rabbit polyclonal	Invitrogen	ラセン靭帯
Connexin 30	rabbit polyclonal	Invitrogen	ラセン靭帯
ZO-1	rabbit polyclonal	Invitrogen	ラセン靭帯
CMV m45	CS		CMV感染細胞

4. 研究成果

(1) CMV 感染法による内耳へのウイルス波及については、脳室内接種法よりも腹腔内接種法においてウイルス抗原陽性細胞数が多い傾向が認められた(図 2)。このことから CMV の内耳感染は髄液を介した脳内の直接伝播よりも血行性のウイルス伝播によるものの可能性が高いと推測された。先の論文結果と一致して、LPS 投与がない場合は内耳における CMV 抗原陽性細胞数が少なく、感染効率が低いと考えられた。ウイルス抗原陽性部位はラセン神経節や蝸牛神経を含む内耳間質部分と血管条・ラセン靭帯で、とくに後者は腹腔摂取群で陽性細胞が多く認められた。また、コルチ器自体にはウイルス抗原は検出されなかった。CMV ウイルス抗原陽性細胞数は感染後 7 日から 10 日をピークとし、以後漸減して感染 28 日にはほとんど消失した。

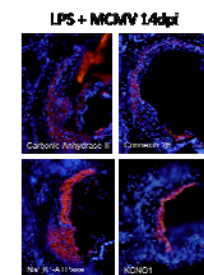
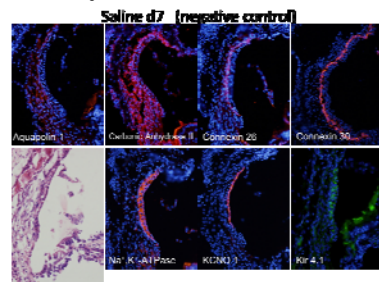


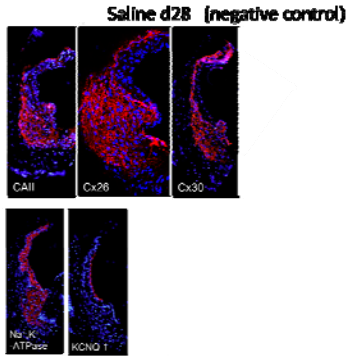
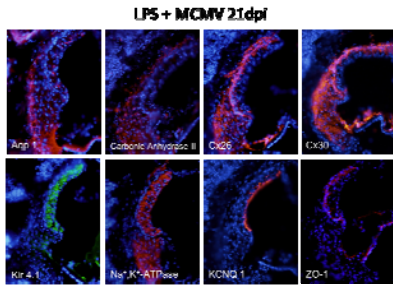
(2) 過去の報告から、主に血管条で発現の見られる分子として KvLQT1 (KCNQ1)、Na⁺, K⁺-ATPase、Kir4.1 を、ラセン靭帯に発現する分子として carbonic anhydrase II (CAII)、connexin (Cx) 26 および Cx 30 をそれぞれ凍結標本による蛍光免疫染色にて経時的に観察し、CMV 感染による影響を調べた。

陰性コントロール群では、KvLQT1 と CAII は出生 7 日目において既にびまん性の強い陽性像が得られ、成長しても持続的に良好な発現を示した。一方、Na⁺, K⁺-ATPase、Kir4.1、Cx26、Cx30 は生後 14 日頃までは発現が低くかつ限局的で、その後発現が増強し分布が拡大した。これはマウスの聴覚機能が出生後 2~3 週で完成するとされているこれまでの報告と合致する所見と考えられた。ところが、LPS+CMV ip 群では感染後 14 日を超えても CAII や Cx26 について発現増強や分布の拡大傾向は乏しく、コルチ器の存在する内リンパの電解質環境に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

このことから、CMV 感染が血管条やラセン靭帯に含まれる細胞に直接傷害を与えるのみならず、いったん CMV が感染することで血管条やラセン靭帯における細胞の成熟や機能発現に間接的に影響を及ぼすことが予想された。

本来ならば出生後持続的な音響刺激を経て完成される聴覚機能が、CMV 感染によって内耳イオン輸送関連分子の機能不全を介して音響刺激に不応な状態が形成される可能性が示唆された。生後間もない時期から聴覚刺激が適切に伝達されない場合、聴覚受容器から連絡を受ける神経組織が二次的に退縮を来すことが予想され、胎生後期あるいは出生直後の一過性ウイルス感染であっても、その後の進行性難聴へ進展する危険性が推測された。





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)

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0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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 義文 (ARAI YOSHIFUMI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381784

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：