

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659305

研究課題名（和文） 高齢者蝸牛細胞の遺伝子発現解析による老人性難聴の病態解明

研究課題名（英文） Analysis of pathophysiology of presbycusis by gene profile study of senescent cochlear cells

研究代表者

喜多村 健 (KITAMURA KEN)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90010470

研究成果の概要（和文）：

90歳以上の超高齢者と65歳以上、75歳未満の高齢者の蝸牛の基底回転ラセン靭帯における cochlin の発現を免疫組織化学的に検討し、超高齢者では、cochlin 陽性面積の占める割合が高かった。ヒト蝸牛ホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象に、レーザーキャプチャー・マイクロダイセクションの手法で目的とする細胞を採取して、解析可能な mRNA の抽出に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Immunohistochemical study of cochlin demonstrated increased rate of positive area in the spiral ligament of the basal turn of the cochlea of the subjects at the age of older than 90 years than that of the age from 65 to 75 years. We succeeded to extract mRNA of COCH and SLC26A5 from archival formalin fixed paraffin embedded human cochlear cells by laser microdissection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

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：遺伝子、医療・福祉、神経科学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

（1）高齢者の増加に伴い、老人性難聴によるコミュニケーション障害は、臨床並びに社会医学において大きな課題となっている。老人性難聴は種々の原因により生じると考えられるが、遺伝子の関与が想定されている。米国の Framingham Study の対象者 2000 名以上の純音聴力検査による聴覚測定から、老人性難聴に寄与する遺伝性要因は、血圧、コレステロールレ

ベルと同等あるいはむしろ高率であると報告されている。しかし、ヒトでは老人性難聴に直接関与すると証明された遺伝子座ならびに遺伝子は同定されていない。

（2）一方、マウスのゲノム解析により、加齢性難聴感受性 (*Ahl*: age-related hearing loss) として、現在 3 つの遺伝子座 (*Ahl*, *Ahl2*, *Ahl3*) が同定されており、*Ahl* は *Cdh23* 内の多型に由来するとされている (Nat Genet,

2003)。従って、ヒトにおいても老人性難聴の原因遺伝子の解明が必須となっている。*CDH23* は、ヒトの症候群性ならびに非症候群性遺伝性難聴の原因遺伝子でもある (Am J Hum Genet, 2001)。さらに、*CDH23* 変異を有する難聴家系において、*ATP2B2* の variant の有無が難聴の程度を修飾することが判明し、老人性難聴にも関与することが示唆されている (N Eng J Med, 2005)。

2. 研究の目的

老人性難聴は種々の原因により生じるが、遺伝要因の関与が大である。しかし、原因遺伝子は同定されていない。本研究では、老人性難聴が明らかな 90 歳以上の超高齢者を含む高齢者のホルマリン固定・パラフィン包埋のヒト側頭骨から抽出した難聴遺伝子 mRNA と、加齢により生じた内耳組織変化を比較・解析することで、老人性難聴の分子病理病態を解明し、難聴発症病態に基づいた予防法を模索する。

3. 研究の方法

(1) 剖検時に採取した15耳の高齢者、前期高齢者 (65歳以上75歳未満) 5耳 (平均年齢69.4歳) と超高齢者 (90歳以上) 5耳 (平均年齢92.2歳) 側頭骨を対象とした。

(2) 採取した側頭骨をパラフィン包埋し、6 μ mの厚さの切片を作成し、cochlinの免疫染色を施行し、基底回転外側壁における cochlin陽性部位の相対面積率を解析した。

(3) *COCH* mRNAと*SLC26A5* mRNAの相対定量解析手法を開発するために、明らかな難聴を認めない70歳、71歳、71歳の3例のホルマリン固定側頭骨のパラフィン包埋切片を作成した。

(4) Leica LMDを用い、レーザキャプチャー・マイクロダイセクションの手法でラセン靭帯、ラセン神経節細胞、血管条、外有毛細胞を採取し、各細胞からRNA抽出を行い、*COCH* mRNA と*SLC26A5* mRNAを解析した。

4. 研究成果

(1) 超高齢者の基底回転ラセン靭帯における cochlin は、びまん性に発現しており、内耳内に最も多く発現するタンパクである cochlin の陽性面積率は前期高齢者において 46.8%であったのに対し、超高齢者では 53.9%と超高齢者群において cochlin 陽性面積の占める割合が高い傾向にあった。

(2) *COCH* mRNAはラセン靭帯と血管条に、*SLC26A5* mRNAは外有毛細胞のみの発現が確認され、本手法が、ヒト側頭骨標本の個々

の細胞からのmRNA解析を可能とすることを証明し、我々の研究により、老人性難聴の病態解明において重要なツールとなる蝸牛のmRNA解析法が確立された。

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 34 件)

1. Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K, Sawabe M, Kitamura K. : RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival human temporal bone section using laser microdissection. -A technical report. Hear Res(accepted) 査読有
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03785955>
2. Sumi T, Watanabe I, Tsunoda A, Nishio A, Komatsuzaki A, Kitamura K: Longitudinal study of 29 patients with Meniere's disease with follow-up of 10 years or more (In commemoration of Professor Emeritus Isamu Watanabe). Acta Otolaryngol. 2011 Nov 6. [Epub], Acta Otolaryngol 132: 10-5, 2012 査読有 10.3109/00016489.2011.627570
3. Takahashi N, Tsunoda A, Shirakura S, Kitamura K: Anatomical feature of the middle cranial fossa in fetal periods: possible etiology of superior canal dehiscence syndrome. Acta Otolaryngol. 2011 Dec 27. [Epub], Acta Otolaryngol 132: 385-90, 2012 査読有 10.3109/00016489.2011.637234
4. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Fuku N, Ito T, Mikami E, Kitamura K and Tanaka M: Extended screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. J Hum Genet. 57:772-5, 2012

- (13 September 2012, Epub) 査読有
10.1038/jhg.2012.109
5. Kato T, Fuku N, Noguchi Y, Murakami H, Miyachi M, Kimura Y, Tanaka M and Kitamura K: Mitochondrial DNA haplogroup associated with hereditary hearing loss in a Japanese population. *Acta Otolaryngol.* 132: 1178-82, 2012 査読有 10.3109/00016489.2012.693624
 6. 西尾綾子、角卓郎、山口恵、桑波田悠子、喜多村 健: メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の4例. *耳鼻臨床* 104: 143-50, 2011 査読有 doi:10.5631/jibirin.104.143
 7. Noguchi Y, Ito T, Nishio A, Honda K, Kitamura K: Audiovestibular findings in a branchio-oto syndrome patient with a SIX1 mutation. *Acta Otolaryngol Apr*;131(4):413-8, 2011 (電子出版 2011.1) 査読有 doi:10.3109/00016489.2010.543146
 8. 山本容子, 木村百合香, 加藤智史, 杉浦むつみ, 喜多村 健: 高齢者における突発性難聴の聴力予後の検討. *Otology Japan* 21(2): 143-8, 2011. 査読有 <http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=ed7otolj>
 9. 野口佳裕, 高橋正時, 喜多村 健: 埋め込み型骨導補聴器の聴覚成績と術中、術後合併症の検討. *日耳鼻会報* 114: 607-14, 2011 査読有 doi:10.3950/jibiinkoka.114.607
 10. 福島邦博, 假谷伸, 長安吏江, 福田諭, 小林俊光, 喜多村 健, 熊川孝三, 宇佐美真一, 岩崎聡, 土井勝美, 暁清文, 東野哲也, 西崎和則: 先天性外耳道閉鎖症例における埋め込み型骨導補聴器 (Bone-Anchored Hearing Aid: BAHA) の有効性に関する検討. *日耳鼻会報* 114: 761-7, 2011 査読有 doi:10.3950/jibiinkoka.114.761
 11. Kitamura K, Nakamura Y, Noguchi Y, Takahashi M: Long term follow-up study of mastoid obliteration using bone pate in cholesteatoma. *The Journal of International Advanced Otology*, 7, (3), supplement 2, 42-3, 2011 査読有
 12. 岩崎朱見, 鈴木康弘, 神山亮介, 萩野幸治, 戸叶尚史, 喜多村 健: アレルギー性鼻炎患者における気管支喘息合併率調査と抗ロイコトリエン薬プラシルカストの有効性に関する検討. *Progress in Medicine* 9(31): 2175-8, 2011 査読無 <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ai5prmda/2011/003109/027&name=2175-2178j&UserID=202.242.187.155>
 13. Abe S, Noguchi Y, Kitamura K: What do patients with hereditary deafness think of genetic studies? *Auris Nasus Larynx* 37: 422-426, 2010 査読有 <http://www.aurisnasuslarynx.com/>
 14. Yashima T, Noguchi Y, Kawashima Y, Rai T, Ito T, Kitamura K: Novel ATP6V1B1 mutations in distal renal tubular acidosis and hearing loss. *Acta Otolaryngol*, 130: 1002-1008, 2010 査読有 <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00016481003631529>
 15. Takahashi M, Kimura Y, Sawabe M, Kitamura K: Modified paraffin-embedding method for the human cochlea that reveals a fine morphology and excellent immunostaining results. *Acta Otolaryngol* 130: 788-792, 2010

査 読 有
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00016480903426626>

16. Koda H, Kimura Y, Ishige I, Eishi Y, Takahashi K, Iino Y, Kitamura K : Quantitative cellular level analysis of mitochondrial DNA 3243A>G mutations in individual tissues from the archival temporal bones of a MELAS patient. *Acta Otolaryngol* 130 : 344-350, 2010 査読有
<http://informahealthcare.com/doi/full/10.3109/00016480903148282>
17. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Ueno H, Hosoya H, Ito T, Kimura Y, Kitamura K and Tanaka M : Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet* 55 : 147-154, 2010 (電子出版 2010.1) 査読有

[学会発表] (計 187 件)

1. Kimura Y, Kubo S, Shigemoto K, Koda H, Sawabe M, Kitamura K: Gene Expression Analysis of Inner Ear Cells from Formalin Fixed Paraffin Embedded Archival Temporal Bone Section using Laser Microdissection. The First Asian Otology Meeting & The 3rd East Asian Symposium on Otology. Nagasaki, June 2012
2. Kawashima Y, Geleoc G SG, Kurima K, Labay V, Lelli A, Asai Y, Makishima T, Wu D-K, Della Santina CC, Kitamura K, Holt JR, Griffith AJ: Mechanotransduction in Inner Ear Hair Cells Requires Transmembrane Channel-Like Genes 1 or 2. The First Asian Otology Meeting & The 3rd

East Asian Symposium on Otology. Nagasaki, June 2012

3. Kato T, Fuku N, Kimura Y, Tanaka M, Kitamura K: Mitochondrial DNA Haplogroup Analysis Associated with Presbycusis in a Japanese Population. The First Asian Otology Meeting & The 3rd East Asian Symposium on Otology. Nagasaki, June 2012
4. Tsunoda A, Kitamura K, Takahashi N, Akita K, Yamaguchi K. The certain etiology of the superior canal dehiscence syndrome: does human evolution cause vertigo? Joint Meeting of European association of Clinical Anatomy and British Association of Clinical Anatomists. Poster, Padova Italy, June 2011.
5. Takahashi N, Tsunoda A, Kitamura K: Pathology of the superior canal dehiscence (SCD) from a point of human evolution. *Collegium Oto - Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum*. Bruges Belgium, September 5-7, 2011
6. Kitamura K, Y Nakamura Y, Noguchi Y, Takahashi M: Long term follow-up study of mastoid obliteration using bone pate in cholesteatoma. 28th Politzer Society Meeting, Athens Greece, September 28-October 1, 2011
7. Noguchi Y, Sawada M, Takahashi M, Tokano H, Kitamura K: Evaluation of Baha efficacy by self-assessment questionnaires. The 8th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences, Daegu Korea, October 25-28, 2011
8. Nishio A, Noguchi Y, Kitamura K: A *DFNA5* mutation in two Japanese families

- with autosomal dominant hereditary hearing loss. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Kobe, December 2011
9. Inaba Y, Suzuki Y, Tsunoda A, Kitamura K: A case of left atypical Ramsay Hunt syndrome developing to left Wallenberg syndrome. The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Kobe, December 2011
10. 喜多村 健: めまい・難聴診断の Up-to-Date. 第109回日本耳鼻咽喉科学会福島県地方部会学術講演会 2011年4月10日 福島 特別講演
11. 加藤智史, 野口佳裕, 木村百合香, 喜多村 健: 遺伝性難聴疑い症例のミトコンドリアハプログループ解析. 第21回日本耳科学会総会・学術講演会 2011年11月24日～26日 沖縄.
12. Takahashi M, Kimura Y, Sawabe M, Kitamura K: Modified paraffin-embedding method for human cochlea that reveals a fine morphology and excellent immunostaining results. Twelfth Triennial Meeting The International Otopathology Society. Boston USA, June 6-8, 2010.
13. Noguchi Y, Ito T, Nishio A, Kitamura K: Audiovestibular findings in a Branchio-Oto syndrome patient with *SIX1* mutation. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, Budapest, Hungary, August 25, 2010
14. Noguchi Y, Ito T, Nishio A, Honda K, Kitamura K: Variable audiovestibular findings in patients with enlargement of the vestibular aqueduct caused by mutations of *SLC26A4*, *SIX1*, and *ATP6V1B1*. Sixth international symposium on Meniere's disease and inner ear disorders. Kyoto, November 14-17, 2010.
15. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Ito T, Tanaka M, Kitamura K: Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. 2nd East Asian Symposium on Otology. Taipei Taiwan, November 26-28, 2010
16. Kato T, Nishigaki Y, Fuku N, Ueno H, Noguchi Y, Kitamura K, Tanaka M: Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. Fukuoka, December 16-18, 2010
- [図書] (計 32 件)
1. 喜多村 健: 言語聴覚士のための聴覚障害学 第1版第8刷 喜多村 健 (編) 医歯薬出版, 2012.
2. 喜多村 健: 第7章: 聴覚・平衡機能系疾患の医療ニーズ 第3節特発性両側性感音難聴. 稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発. 技術情報協会, 1027-30, 2012
3. Kitamura K: Epidemiology of Otitis Media with Effusion (OME) in Japan. Current Opinion on Otitis Media with Effusion. Koonja publishing Inc.: 151-8, 2012
- [産業財産権]
○取得状況 (計 1 件)
- 名称: 自然骨と酷似した切削性を有する人工骨モデルの製造方法
発明者: 角田篤信、伊藤卓、喜多村健、大野秀則、杉山久幸
権利者: 同上

種類：特許
番号：5215350
取得年月日：平成 25 年 3 月 8 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/oto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 健 (KITAMURA KEN)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：90010470

(2) 研究分担者

野口 佳裕 (NOGUCHI YOSHIHIRO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50282752

(3) 研究分担者

木村 百合香 (KIMURA YURIKA)
東京都健康長寿医療センター・研究所・研究
院
研究者番号：40450564

(4) 研究分担者

沢辺 元司 (SAWABE MOTOJI)
東京医科歯科大学・医学部保健衛生学科・教
授
研究者番号：30196331