

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791891

研究課題名(和文) ストレス性内耳疾患の病態解明と臨床への応用

研究課題名(英文) Involvement of neuropeptide to the stress-related inner ear diseases

研究代表者

江藤 みちる(伊田みちる)(Ida-Eto, Michiru)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80393148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：突発性難聴などの内耳疾患はストレスが一因と言われる。生理活性ペプチド・マンセリンはストレス呼応性で神経内分泌系を中心に発現している。これまでに研究代表者はマンセリンが内耳に存在することを見出した。マンセリンのストレス性内耳疾患への臨床応用を目指し、マンセリンの局在について発達およびストレス環境下での局在について検討した。マンセリンはラット内耳の有毛細胞シナプスとらせん神経節細胞、延髄蝸牛神経核、橋外側上オリブ核と、聴覚伝達系に広く存在していた。ストレス負荷に伴い、内耳II型らせん神経節細胞の発現は減少した。よって、ストレス環境下でのマンセリンの聴覚伝達系制御への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inner ear disease such as sudden deafness and Meniere disease may be caused by stress. Manserin is distributed in the neuroendocrine system and its expression in the adrenal gland is stress dependent. Recently, I found the localization of manserin in the rat inner ear. In this study, I investigated the relationship between manserin and stress condition. Manserin localized at the neuronal terminals of the organ of Corti and spiral ganglion in the inner ear, cochlear nucleus in the medulla oblongata, and lateral superior olivary nucleus in the pons. Manserin immunoreactivity in the type II spiral ganglion cells was decreased by the stress. These results suggest that manserin may be involved in the regulation of auditory pathway under the stress condition.

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：ストレス 内耳 神経ペプチド ラット

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会においてストレス性疾患は急増している。耳鼻咽喉科領域では、メニエール病や突発性難聴などの難治性内耳疾患もまたストレスが誘因の一つであると考えられているが、その病態メカニズムは不明であり、治療法も確立されていない。

我々の所属研究室では、ラット脳から新規ペプチドの単離に成功し、マンセリンと命名した (Yajima et al., Neuroreport, 2004)。マンセリンは視床下部 / 下垂体 / 副腎系 (HPA 軸) に局在し、ストレス応答性を持つ (Kamata et al., Int J Pept Res Ther, 2010) ことから、マンセリンは生理活性ペプチドとしてストレスに呼応する神経内分泌系の制御機能が示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。生理活性ペプチドは、エンドセリン、オレキシン、グレリンなどがよく知られており、病態解明や創薬、診断マーカーとして臨床に応用されている。

研究代表者は、マンセリンが内耳に局在することを見出した。マンセリンは聴覚受容器であるコルチ器および平衡感覚の受容器である耳石器において、それぞれ有毛細胞のシナプス部位に局在していた。また、蝸牛のらせん神経節において、II 型らせん神経節細胞にも局在していた。このことから、マンセリンが聴覚および平衡感覚の神経機能調節に直接関わっていることが示唆される。これまでの研究において、マンセリンは神経内分泌系に発現し、ストレス応答性があることから、マンセリンはストレス性内耳疾患に対して内耳神経系・神経内分泌系の両方からアプローチすることが可能であると考えられる。

そこで本研究課題では、ストレス性内耳疾患の病態解明および新規治療法を探ることを最終目的として、内耳におけるマンセリンの詳細な局在解析とストレス下での機能を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 聴覚伝導路におけるマンセリンの解明

聴覚系におけるマンセリンの機能を明らかにするための基礎的研究として、ラット内耳においてマンセリンの発現および老化に伴う発現変化、および中枢神経系における聴覚路でのマンセリンの発現パターンについて明らかにする。

### (2) 聴覚伝導路におけるマンセリンとストレスの関係

ストレス負荷ラットを作製し、聴覚路の末梢神経系 (内耳) および中枢神経系 (延髄、橋) におけるマンセリンの発現変化について

明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学

雄 Wistar ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳および内耳を摘出した。内耳は EDTA で脱灰した後、OCT コンパウンドに包埋して厚さ 10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し、免疫染色を行った。脳は OTC コンパウンドに包埋して厚さ 50  $\mu\text{m}$  の脳スライスを作製し、浮遊状態での免疫組織染色を行った。

### (2) ストレス負荷ラットの作製

ラットの飼育ケージに 1.5 cm の深さで水をはり、5 日間飼育した。水は毎日交換した。給餌、給水は通常通り行った。ストレス前後での体重測定、ストレス後の胸腺・脾臓・副腎の重量測定、腹大動脈から血液を採取し、血漿中のコルチコステロンの ELISA を行い、ストレスの指標とした。

## 4. 研究成果

### (1) 発達に伴うマンセリンの局在変化

ラットの内耳は胎生 12 日に耳胞ができ、生後 2 週までに細胞増殖・分化を経て形態ができあがり、生後 3 週で機能的に完成する。生後 4 日から 25 日までの発達期において、内耳マンセリンは、生後初期には Claudius 細胞およびライスネル膜に局在し (図 1)、機能的成熟が始まる生後 12 日ごろから成獣と同様、II 型らせん神経節細胞および有毛細胞のプレシナプスに局在するようになり、Claudius 細胞およびライスネル膜の局在は消失した。したがって、蝸牛の発達、特にシナプスの成熟に伴ってマンセリンが発現するようになることから、マンセリンが聴覚機能に深く関わっていることが示唆される。1 歳以上の老齢ラット内耳についても同様にマンセリンについても検討したが、成獣と同様の局在を示した。

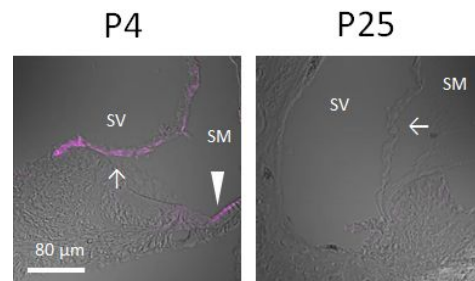


図 1 ラット内耳マンセリンの局在。SV、前庭階；SM、蝸牛管。生後 4 日のライスネル膜 (矢印)、Claudius 細胞 (矢頭) のマンセリンは生後 25 日では消失していた。

## (2) 中枢神経系における聴覚路でのマンセリンの局在

聴覚伝導路は、内耳に存在する末梢神経系のらせん神経節細胞から、延髄の蝸牛神経核へと伝わり、主に橋のオリブ複合体、下丘、内側膝状体を経て脳の一次聴覚野へと伝達される。脳スライスを用いて免疫組織化学を行い、成獣ラットの延髄～橋におけるマンセリンの局在を調べたところ、マンセリンは蝸牛神経核および上オリブ複合体に存在していた(図2)。蝸牛神経核は背側核、腹側核から成るが、マンセリンは腹側核の細胞質および背側核には斑点状に存在していた。上オリブ複合体は外側・内側上オリブ核、台形体内側・腹側核から構成される。マンセリンは外側上オリブ核の細胞質に存在することが示された(図3)。

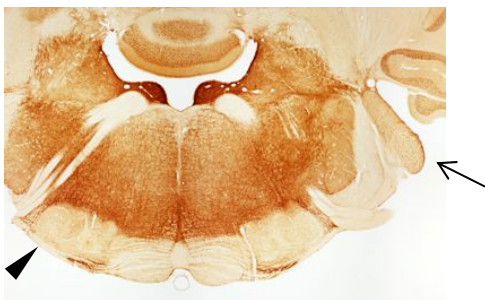


図2 ラット脳マンセリンの局在。蝸牛神経核(矢印)、オリブ複合体(矢頭)。

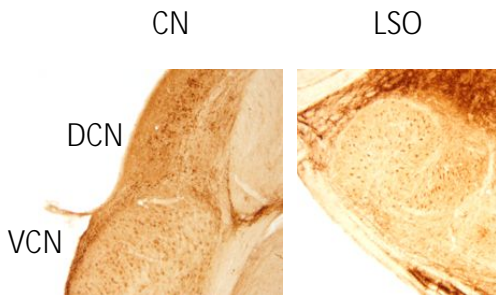


図3 蝸牛神経核(CN)およびオリブ複合体におけるマンセリンの局在。マンセリンは蝸牛神経核背側核(DCN)および腹側核(VCN)、外側上オリブ核(LSO)に局在していた。

## (3) ストレスによるマンセリンの発現変化

聴覚伝導路に発現するマンセリンがストレスにより影響を受けるのかどうかを調べるために、水浸 1.5 cm で5日間飼育して、ストレス負荷ラットを作製した。コントロールラットは5日間の間に体重が約 6 g 増加する一方、ストレスラットは、ストレス前と比較して体重が約 4 g 低下した。さらに、ストレスラットはコントロール群と比較して脾臓および胸腺の萎縮および重量低下、副腎の肥大および重量増加が見られた(図4)。血中コルチコステロンのELISAではストレス群において高値であった(図5)。以上の結果から、このストレスラットはストレス負荷を受けていることが確認できた。

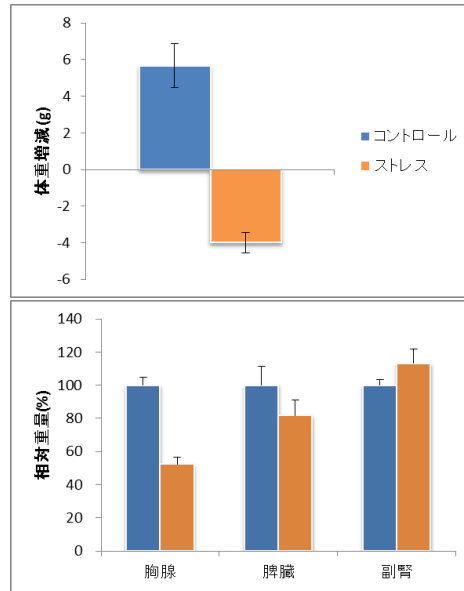


図4 ストレス前後での体重の増減(上)および臓器(胸腺、脾臓、副腎)重量の変化(下)。臓器重量はコントロールを 100%としたときの相対値で示した。

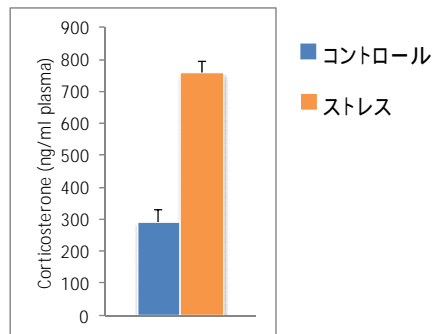


図5 血中コルチコステロン濃度

ストレスラットを灌流固定し、内耳および脳におけるマンセリンの局在をコントロール群と比較した。内耳の II 型らせん神経節細胞に発現するマンセリンの陽性反応がストレス群では減弱していた(図6)。内耳でマンセリンの局在が明らかになっているコルチ器有毛細胞のプレシナプス部位の局在に変化は見られなかった。

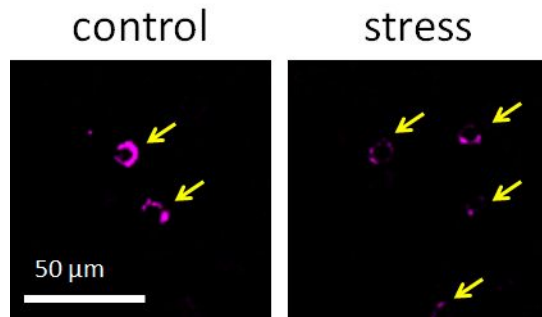


図6 内耳らせん神経節におけるマンセリンの局在。矢印は II 型らせん神経節細胞を示す。抗マンセリン抗体による陽性反応(マゼンタ)はコントロール群と比較してストレス群では減弱していた。

中枢神経系については、脳スライスを用いた免疫組織化学で検討を行った。腹側蝸牛神経核、背側蝸牛神経核、上オリブ外側核に局在するマンセリンに、ストレスによる変化は見いだせなかった(図7)。

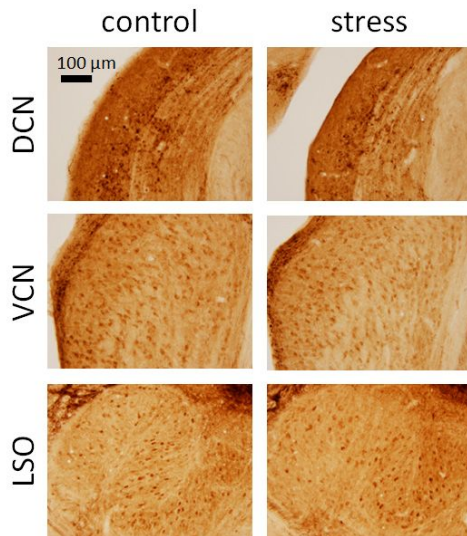


図7 延髄の蝸牛神経核(背側核:DCN、腹側核:VCN)および橋の上オリブ外側核(LSO)におけるマンセリンの局在。左、コントロール群(左);右、ストレス群。

本研究により、マンセリンは聴覚系において末梢神経の内耳から中枢神経の延髄・橋に至るまで広く局在し、またその局在は生後の発達に伴って変化することが明らかになった。さらに、ストレス負荷に伴い、内耳 II 型らせん神経節細胞におけるマンセリンの発現が減少していた。II 型らせん神経節細胞マーカーであるペリフェリンの発現に変化は見られなかったことから、らせん神経節細胞の萎縮や細胞死などに先立って、ストレスシグナルとしてのマンセリンの発現変化が起こっている可能性が考えられる。中枢の蝸牛神経核および上オリブ外側核においてはストレスによる変化は見いだせなかった。今後各マーカー抗体との二重染色やマンセリン陽性細胞数の検討を行う必要があると考える。

マンセリンは内耳において、蝸牛だけでなく卵形囊・球形囊などの前庭や半規管膨大部にも局在することが明らかになっている。平衡感覚系についても、聴覚系と同様にストレスによる変化が見いだされる可能性があり、今後の研究が必要である。

##### 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9件)

Ida-Eto M, Nomura M, Ohkawara T, Narita

N, Narita M. Localization of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the oviduct of female rats. *Acta Histochemica*, 116: 522-526, 2014. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.acthis.2013.11.009

Ohkawara T, Oyabu A, Ida-Eto M, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Subtype-specific parafollicular localization of the neuropeptide manserin in the rat thyroid gland. *Acta Histochemica*, 115(2): 190-194, 2013. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.acthis.2012.05.003

Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Existence of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the rat inner ear; relevance to modulation of auditory and vestibular system. *J. Histochem. Cytochem.*, 60: 69-75, 2012. (査読あり)

DOI: 10.1369/0022155411425688.

〔学会発表〕(計13件)

Ida-Eto M, Nomura M, Ohkawara T, Narita M. Immunohistochemical analysis of the neuropeptide manserin in the rat oviduct. 23th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS 2013)(第23回形態科学国際シンポジウム), 2013年9月10-13日, 朱鷺メッセ(新潟市)

Ida-Eto M, Oyabu A, Sakuramoto A, Katsuyama T, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita M. Developmental expression of a novel neuropeptide, manserin, in the rat cochlea. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICH2012)(第14回組織細胞化学国際会議), 2012年8月26-29日, 国立京都国際会館(京都市)

江藤みちる、大藪明子、豊田智宏、櫻本新、葛山貴士、大河原剛、太城康良、成田正明。水浸によるラット慢性ストレス負荷時のストレス呼応新規神経ペプチド・マンセリンの発現動態、第8回日本疲労学会総会・学術集会、2012年6月2-3日、国立スポーツ科学センター(東京都北区)

##### 6. 研究組織

(1)研究代表者

江藤みちる(伊田みちる)

(IDA-ETO MICHIRU)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80393148

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし