

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460906

研究課題名(和文) 聴力維持への鍼電気刺激の作用機序

研究課題名(英文) the investigation of electroacupuncture effect on the cochlear morphology and the release of ATP.

研究代表者

谷口 学 (manabu, taniguchi)

大阪大学・医学系研究科・技術専門職員

研究者番号：30397707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行性難聴を示すp75KOマウスを用いてこれらのマウスにおける鍼電気刺激(EA)による聴力維持の作用機序について外有毛細胞に対する遠心性抑制経路並びにATP依存的な作用に焦点をあて、その機能解析を行った。6ヶ月令のp75KOマウスのEA非処置群では蝸牛第1、第2回転の外有毛細胞における神経終末の脱落が認められる一方、EA処置群では明瞭な異常は認められなかった。以上の結果は加齢による遠心性経路の破綻がEAにより保護されていることを意味する。またEAによりp75の有無にかかわらず蝸牛内のATPの上昇が認められた。以上の結果は内耳においてもATP依存的なEAの作用機序が存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We previously reported the neurotrophin receptor p75 knockout mouse (p75 KO mice) is a useful model for progressive-onset hearing loss. We used this model for the investigation of electroacupuncture (EA) effects on the cochlear morphology. We applied EA stimulation at the acupuncture points (SI19 and TE17) which are commonly used to improve ear problems. EA stimulations were applied for 4 months from the age of 2 to 6 months. We observed that outer hair cells (OHCs) efferent innervation was degenerated in the apical or second turns of the cochlea in 6 months old p75 KO mice without EA stimulations. Wherease, these remained normal in those receiving EA. We also found that ATP, a neuromodulator with neuroprotective properties, was released during EA stimulation. These findings suggest that the EA treatment is probable to have therapeutic effects to reduce neurodegeneration of the efferent system in the OHCs and that ATP is likely to be involved in this effect.

研究分野：耳科学

キーワード：東洋医学 感覚器 脳・神経 神経機能形態学

1. 研究開始当初の背景

東洋医学においては、EA (鍼電気刺激) が間接リウマチなどの自己免疫疾患、また疼痛の治療に有効であることが報告されている (Yim YK et al. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2007;4:51-7.)。また、EA に抗アレルギー作用及び抗炎症作用のあることが動物モデルを用いた実験によって示されている (Liu XY et al. *EXP Neurol.* 2004;189:189-96.)。研究代表者らも円形脱毛症モデルマウスとして確立されている C3h/HeJ マウスを用いて EA が円形脱毛症における肥満細胞の脱顆粒を抑制する効果があることを報告している (Maeda, Taniguchi et al. *Acupunct Med.* 2013;31(1):117-9.)。現在までに研究代表者らは、EA が耳鳴りや難聴の自覚症状の改善に効果がある事実 (Wang K et al. *Complement Ther Med.* 2010; 18(6): 249-55.) に注目し、難聴治療における EA の聴力維持の作用機序 (分子メカニズム) について研究を進めてきた。すでに、研究代表者らは p75 ノックアウトマウス (p75KO マウス) が加齢とともに進行性の難聴を示すことを報告している (Sato, Taniguchi et al. *Brain Res.* 2006;1091:224-34.)。また最近になって研究代表者らは、この進行性難聴を示す p75KO マウスを用いて、EA により 1) 聴力が減退せず維持されること、2) 外有毛細胞及びラセン神経節細胞の細胞数の減少が抑制されること、3) 神経節細胞において trks 受容体が発現増強すること、の3点について報告した (Maeda, Taniguchi et al. *Acupunct Med.* 2014;32(1):90-2.)。

本課題は、p75KO マウスにおける EA による聴力維持の作用機序について、外有毛細胞に対する遠心性抑制経路の観点からその機能を明らかにすることを目的として開始したものである。

2. 研究の目的

本研究課題では、加齢による進行性難聴を示す p75KO マウスに対する EA の聴力改善効果が遠心性抑制経路に見いだせるかどうかについて検討する。一般に老人性難聴は雑音下での語音明瞭度の低下が極めて著しい。これは蝸牛の遠心性神経による外有毛細胞の調整機構が破綻し雑音下の音声信号の聴取改善が困難になっていることが原因といわれている。そこで、本研究では、p75KO マウスにおける EA による聴力維持の作用機序について、外有毛細胞に対する遠心性抑制経路の観点からその機能を明らかにすることを第一の目的とした。また、この聴力維持への EA の作用機序の検討をより進めるにあたり、神経難聴の治療に使用される ATP 腸溶錠にも着目した。この ATP 腸溶錠は、ATP が主成分であり内耳の血流改善と代謝の賦活により内耳の細胞機能を改善することで難聴の改善と耳鳴りの改善に効果が期待できる治療薬である。また、ATP と EA に関する報告として最近になって Nanna らは経穴 ST19 に鍼を施した組織周辺において細胞外の ATP の上昇が認められることを報告した。またその際にアデノシンの上昇が認められ、このアデノシン特異的な P1 受容体を介して、鍼電気刺激特異的な疼痛効果が認められるとしている (Nanna et al, *Nat Neurosci.* 2010 Jul;13(7):883-8.)。しかしながら、内耳において ATP に着目して EA の作用を検討した報告は認められない。そこで、我々は、p75KO マウスにおける EA による聴力維持の作用機序について ATP 依存的な系に焦点をあてその機能を明らかにすることを第2の目的とした。

3. 研究の方法 実験

P75KO マウス (EA 群・非 EA 群) に対し、難聴発症前の2ヶ月令に EA 開始。配穴 = 両側 (聴宮・翳風) 鍼幅 0.16m/m・長さ 4mm 平軸鍼を使用。刺激頻度 1Hz・0.7mA・1w/2

回・30分間、毎回耳介反射を測定した。6ヶ月後に4%PFAで還流固定後、蝸牛を回収、EDTA処理による脱灰処理後、パラフィン包埋し、パラフィン切片を作製したのち、免疫組織学的に検討を行った。

-1

有毛細胞の神経終末のマーカー(シナプトフィジン)の局在の検討・・・シナプトフィジンを認識する抗体を用いて免疫組織化学を行った。内有毛細胞、外有毛細胞における発現部位を詳細に検討した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

実験

コントロールマウス(EA群・非EA群)、P75KOマウス(EA群・非EA群)に対し、それぞれ6ヶ月令のマウスを用いてEAを開始。配穴=両側(聴宮・翳風) 鍼幅0.16mm・長さ4mm 平軸鍼を使用。刺激頻度1Hz・0.7mA・1day/1回・30分間、毎回耳介反射を測定した。7日後に、麻酔下にて蝸牛を回収し、その後の実験に供した。

-1

蝸牛におけるATPの動態変化について・・・蝸牛をすばやく氷上にてすり鉢で破碎したのち、蒸留水を加えて回収後遠心による上清画分をAMERIC社のATP抽出試薬を添加攪拌後、遠心を行った。その上清画分をATP抽出溶液とし、ルシフェラーゼ溶液を加えルミネーターで発光量を測定したのちATPレベルの算出を行った。

4. 研究成果

について

加齢による進行性難聴を示すp75KOマウスに対するEAの聴力維持効果が遠心性抑制経路に見いだせるかどうかについて組織学的に詳細な検討を行った。その結果、6ヶ月令のp75KOマウスにおいて蝸牛第1回転、第2回転の外有毛細胞における神経終末の脱

落が認められることを明らかにした。また基底回転においては外有毛細胞の変性・脱落が認められた。一方、EA処置を行った群ではこれらの外有毛細胞の神経終末に明瞭な異常は認められなかった。以上のことは加齢による遠心性経路の破綻が、EAにより回復していることを意味する。

について

研究代表者らは、さらに聴力維持へのEAの作用機序の検討を進めるにあたり内耳において耳の経穴にEAを施すことで、蝸牛内においてATPの動態変化が認められるか否かを検討を行った。その結果、難聴の程度(p75の有無)にかかわらず蝸牛内のATPの上昇が認められることを明らかにした。

以上の研究結果は、内耳においてもATP依存的なEAの作用機序が存在することを示唆している。今後、EAによる聴力維持の作用機序についてATP依存的なシグナル伝達系に焦点をあてて研究を展開していく予定である。

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1件)

谷口学 聴力維持における鍼電気刺激(EA)の作用機序の解明 第62回全日本鍼灸学会、2014年5月(松山)

〔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

谷口学(Manabu Taniguchi)

大阪大学・医学系研究科・技術専門職員
研究者番号：30397707

(2)研究分担者
該当者なし

(3)連携研究者
佐藤 真 (Makoto Sato)
大阪大学・連合小児発達学研究科・教授
研究者番号：10222019

(4)研究協力者
該当者なし