

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462570

研究課題名(和文)内耳の選択的物質輸送機構に対する性ホルモンの影響

研究課題名(英文)Effects of estrogen on the selective molecular transport in the inner ear

研究代表者

鈴木 光也 (SUZUKI, Mitsuya)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50302724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1) 卵巣摘出術群では4週後および8週後ともに、コントロール群に比較して有意なABR閾値上昇が認められた。2) 透過電顕による観察では、卵巣摘出群の血管条毛細血管基底膜の3層構造は認められなかった。血管条毛細血管基底膜のCationic polyethyleneimine (PEI) の数はコントロール群および卵巣摘出群(術後4週、8週)ともに少なく、両者に有意な差は認められなかった。一方、ラセン靭帯の毛細血管基底膜ではともにPEIの整列が確認された。3) コントロール群と卵巣摘出群の間で蝸牛におけるER alphaとER betaの発現に明らかな差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：As compared to that in the non-ovariectomized group (control) the ABR threshold in the ovariectomized group was significantly higher at 32 KHz at 1 month after surgery (3-months-old), and at 2, 4, 8, 16, and 32 kHz at 2 months after surgery (4-months-old). 2) The three-layer structure which consists of laminae rarae externa and interna and lamina densa, could be not identified clearly in the capillary basement membrane in the stria vascularis at both 3-months-old and 4-months-old in both the ovariectomized group and non-ovariectomized group. Distribution of cationic polyethyleneimine (PEI) particles was hardly observed on the capillary basement membranes in the stria vascularis in both the ovariectomized group and control group. 3) No marked difference in expression of ER alpha and ER beta was observed in the cochlea between the control group and the ovariectomized group.

研究分野：耳科学、内耳形態学、聴覚生理学

キーワード：ICRマウス estrogen ABR 血液内耳関門 Estrogen receptor alpha Estrogen receptor beta

1. 研究開始当初の背景

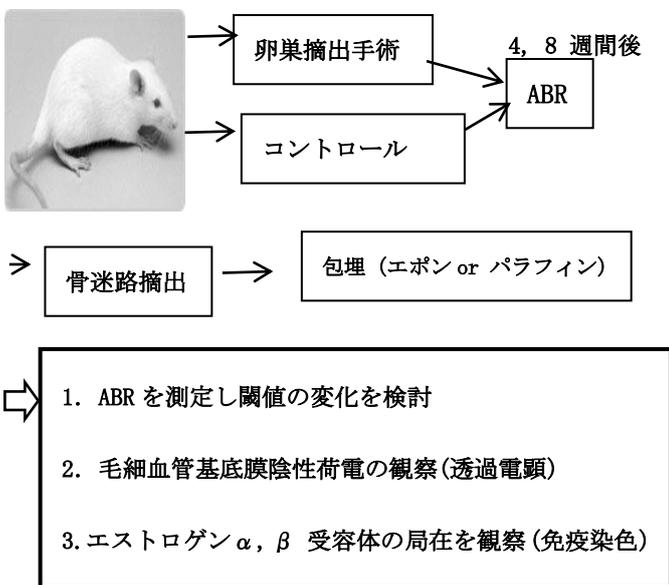
血液-内耳関門に対する加齢の影響が明らかになってきたが、加齢に伴って減少する女性ホルモンの影響については考慮されていない。本研究目的は、内耳における選択的物質輸送機構に対する女性ホルモンの影響を明らかにすることである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、聴力および血液-内耳関門に対するエストロゲンの影響と卵巣機能低下における蝸牛のエストロゲン局在を調べることである。

3. 研究の方法

4 週齢ラット



実験には生後8週 of ICR メスマウスを用いて、蝸牛に対する Estrogen の効果を調べるために、実験群 (Estrogen 減少群) に対しては両側卵巣を摘出し、卵巣を摘出しない Sham 手術を施行した群をコントロールとした。1) Sham 手術を施行した非卵巣摘出群 (コントロール) と卵巣摘出群術後に対して術前、術後4週 (3 か月齢) 術後8週 (4 か月齢) の ABR (2, 4, 8, 16, および 32 kHz : tone burst 刺激) を測定した。2) 蝸牛血液-内耳関門に対する卵巣摘出の影響を調べる目的で、コントロールと卵巣摘出術後8週間蝸牛を摘出し脱灰後エポンに包埋し超薄切片を作成した。蝸牛の外側壁の毛細血管を透過型電子顕微鏡下に 12000 倍で撮影し、4 倍に引き伸ばして現像し血管条とらせん靭帯の毛細血管基底膜の微細構造を観察した。3) 卵巣摘出術後4週間、8週間に蝸牛を摘出し、10%ホルマリン溶液で固定後、10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液にて脱灰操作を行い、パラフィン包埋を行った。その後、蝸牛の蝸牛軸に沿って 5 μm の厚さの切片を作成し、免疫染色を行って Estrogen receptor (ER)

alpha、ER beta の局在を観察した。

4. 研究成果

非卵巣摘出群に比較して卵巣摘出群のマウスは背部の脱毛が多くみられた。

1) ABR の測定では、術後4週 (3 か月齢) の 32kHz と術後8週 (4 か月齢) の 2, 4, 8, 16, および 32 kHz で、非卵巣摘出群 (コントロール) に比較して卵巣摘出群において有意な閾値上昇が認められた (図1)。2) 透過電顕による観察では、卵巣摘出群・非卵巣摘出群ともに術後4週 (3 か月齢)・術後8週 (4 か月齢) における血管条毛細血管基底膜の3層構造は不明瞭になっていた。非卵巣摘出群 (コントロール) と卵巣摘出群の術後4週・術後8週における血管条毛細血管基底膜上の Cationic polyethyleneimine (PEI) の数はともに少なく、両群に有意な差は認められなかった (図2, 3)。一方、ラセン靭帯の毛細血管基底膜においては、コントロールと同様に術後4週および術後8週で PEI 粒子の規則正しい整列がみられ、両群間で陰性荷電の有意な変化は見られなかった (図4, 5)。

以上の結果から、ラセン靭帯に比較して血管条毛細血管基底膜ではコントロール群及び卵巣摘出群において陰性荷電は減少していることが示唆された。加齢マウスの毛細血管基底膜の陰性荷電は血管条で減少しラセン靭帯では変化しないことが報告されている

(1)。本研究では陰性荷電の減少がコントロール群と卵巣摘出群ともにみられたことから、加齢による影響が関与していると考えられた。3) 術後4, 8マウスにおいては、コントロール群、実験群ともに血管条、内・外有毛細胞、ラセン神経節において ER alpha、ER beta の発現がみられたが、両者の間に明らかな差はみられなかった。

本研究のゴールは、内耳における選択的物質輸送機構に対する女性ホルモンの影響を明らかにすることである。非卵巣摘出群 (コントロール) に比較して卵巣摘出群において ABR 閾値の有意な上昇が認められ、卵巣摘出によって難聴が進行する可能性が考えられたが、卵巣摘出によって蝸牛外側壁の毛細血管基底膜の陰性荷電 (チャージバリア) が変化することを確認できなかった。また蝸牛に存在するホルモン受容体の局在に対する女性ホルモンの影響を観察したが、明らかな変化は認められなかった。本研究結果から卵巣摘出手術によって難聴が進行することが示唆されたが、形態学的には卵巣摘出によって生じる難聴に対するエストロゲンの関与を明らかにすることができなかった。

参考文献

1. Suzuki M, Sakamoto T, Kashio A, Yamasoba T : Age-Related Morphological Changes in the Basement Membrane in the Stria Vascularis of C57BL/6 mice. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck : 273:57-62, 2016

図 1. 卵巣摘出後の ABR 閾値の変化

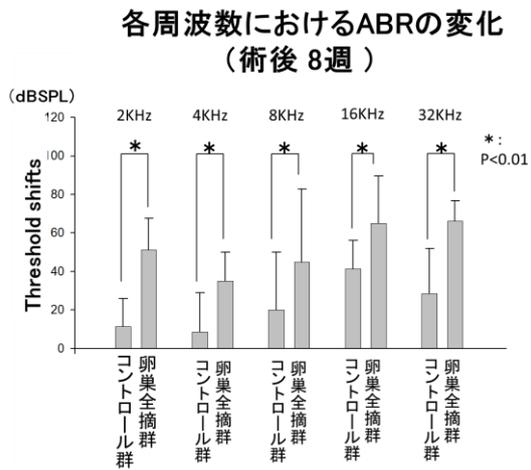
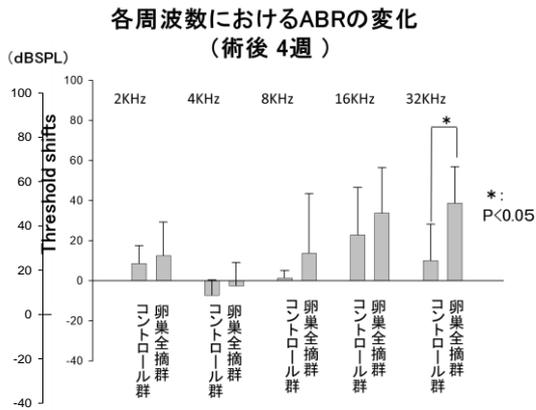


図 2. コントロール群の血管条毛細血管の PEI 粒子 (矢印)

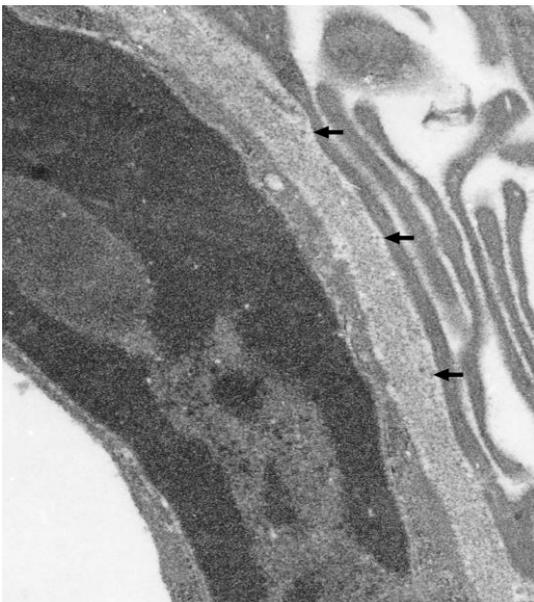


図 3. 卵巣摘出群 (術後 8 週) の血管条毛細血管の PEI 粒子 (矢印)

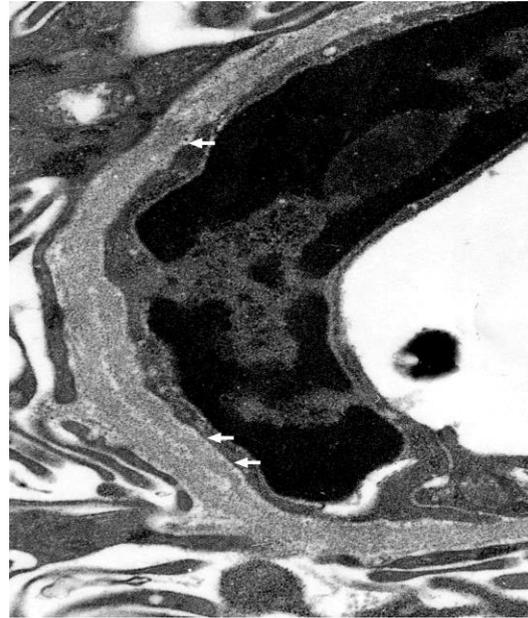
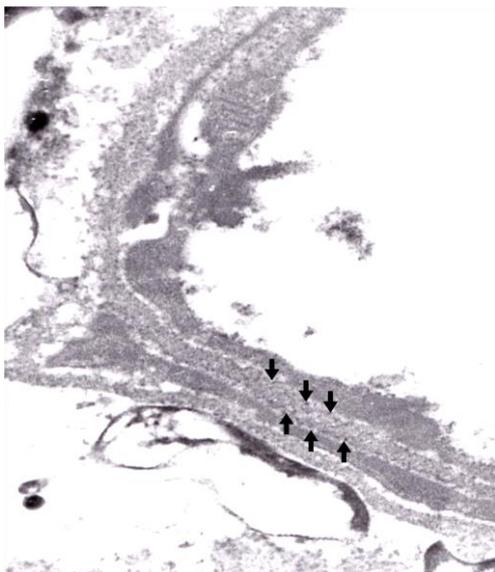


図 4. コントロール群のラセン靭帯毛細血管の PEI 粒子 (矢印)



図5. 卵巣摘出群（術後8週）のラセン靭帯毛細血管のPEI粒子（矢印）



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

1. Suzuki M, Sakamoto T, Kashio A, Yamasoba T : Age-Related Morphological Changes in the Basement Membrane in the Stria Vascularis of C57BL/6 mice. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck* : 273:57-62, 2016, 査読有
doi : 10.1007/s00405-014-3478-4. Epub 2015 Jan 3.

〔学会発表〕（計1件）

1. Suzuki M, Okamoto T, Ushio M: Effective Oval and Round Window reinforcement for Tullio phenomenon . 31st POLITZER SOCIETY MEETING , SPAIN, 2018

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 光也 (SUZUKI, Mitsuya)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：50302724

(2) 研究分担者

岩崎 真一 (IWASAKI, Shin-ichi)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10359606

上羽 瑠美 (UEHA, Rumi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10597131

坂本 幸士 (SAKAMOTO, Takashi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50323548

牛尾 宗貴 (USHIO, Munetaka)
東京大学・医学部附属病院・臨床登録医
研究者番号：70361483

(3) 連携研究者

なし