

研究種目： 基盤研究(C)  
 研究期間： 2007 ～ 2009  
 課題番号： 19591963  
 研究課題名(和文) 遺伝子異常モデルマウスを用いた内耳血管条障害の解明と保護作用  
 研究課題名(英文) Disturbances of the stria vascularis in mice with genetic abnormalities

## 研究代表者

曾根 三千彦 (SONE MICHIIHIKO)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：30273238

研究成果の概要(和文)：メラノサイト及びメラニンの増殖・産生に関連した内耳血管条障害の解明に関して、加齢に伴う蝸牛ユーメラニン量の優位な増加を同定し、活性酸素の解毒作用を介して加齢変化に対し保護的な役割を果たす可能性を示した。ミッドカイン(MK)とプレイオトロフィン(PTN)遺伝子欠損マウスの聴力の閾値上昇、Kir4-1 の発現と透過電顕にて中間細胞領域の空胞化変性をDKOマウス確認した。MKとPTNは中間細胞の維持に重要な役割を有していることを伺わせた。

研究成果の概要(英文)： Our findings are the first quantitative evidence to show an age-related overexpression of cochlear melanin and an alteration in the proportion of eumelanin and pheomelanin with aging, suggesting a possible otoprotective function of eumelanin against age-related cochlear deterioration. We focused on the roles of midkine and pleiotrophin in the stria vascularis using mice deficient in these genes. Hearing thresholds examined by auditory brain stem response were significantly higher in midkine knockout and pleiotrophin knockout mice than in wild-type mice. Double knockout mice showed higher thresholds compared to midkine knockout and pleiotrophin knockout mice. The expression of Kir4.1 was weak in the knockout mice and severe vacuolar degeneration was observed by electron microscopy in the intermediate cells of the double knockout mice. The present study demonstrates that midkine and pleiotrophin are essential components for the morphological maintenance of intermediate cell in the stria vascularis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・ 耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛、血管条、内耳障害、難聴、メラニン

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは C57/BL6 背景の RET-トランスジェニックマウスを用いて、聴覚機能および蝸牛メラニンの量を測定した。メラニンとしてユーメラニンとフェオメラニンの subtype が存在するが高層液体クロマトグラフィーを用いた検討では聴覚閾値には差がないものの 242 系 MT/RET トランスジェニックマウスの内耳にはフェオメラニン量はコントロールと差はないものの、ユーメラニン量は有意に多く認められた。電顕にて血管条のメラニン過剰も確認している。また、加齢 RET トランスジェニックマウスでは聴力の悪化が軽減している可能性が示唆されている。内耳におけるメラニンと加齢の関係が示唆され、その保護作用の観点からも興味深い所見である。

(2) ミッドカイン (MK) は塩基性タンパク質で、組織の発育・分化やサイトカインとしての働きがある。またアポトーシスによる細胞死を防ぐ作用もあり、その保護効果は治療薬の観点からも注目されている。MK と類似したタンパク質としてプレイオトロフィン (略称 PTN、別称 HB-GAM) が知られている。MK と PTN 遺伝子欠損マウスの聴覚系への関与を解析したところ、そのダブルノックアウト (DKO) マウスで蝸牛蓋膜の  $\beta$ -tectorin の発現欠損と聴力閾値上昇が確認された。予備実験で MK、PTN ともその mRNA が血管条に発現していることから、それぞれの欠損マウスにおいて血管条障害が聴覚障害を生じている可能性が推察されている。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究ではメラノサイト及びメラニンの増殖・産生に関連した遺伝子異常モデルマウスを用いて内耳血管条障害の解明に際して、加齢による内耳メラニンの変化について検討を行った。メラニン量は加齢に伴い変化することが知られているが、加齢における蝸牛内の変化はこれまで検討されていなかった。(2) MK, PTN の発現は Wild-type (WT) マウスの血管条にも認められたことから、今回血管条に焦点をしばって遺伝子欠損マウスにおける障害を解析した。

### 3. 研究の方法

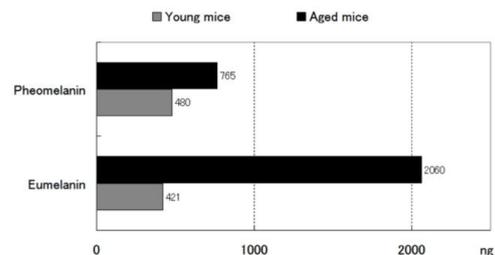
(1) 高速液体クロマトグラフィーを用いて 10 週齢と 100 週齢の C57BL/6 マウスの蝸牛内ユーメラニンとフェオメラニンの定量を行った。また、透過型電子顕微鏡を用いて同マウスの蝸牛血管条の観察を行った。

(2) 生後 8 週齢の WT, MKKO, PTNKO, DKO の各マウスを用い、ABR 測定、径 0.5mm のマウス用レーザードップラープローブにて蝸牛血流測定、内耳を光顕および透過電顕にて形態学的な変化の有無を観察した。また中間細胞に特異的な Kir4.1 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

### 4. 研究成果

(1) 蝸牛内ユーメラニンとフェオメラニン量の平均値は、100 週齢の方が 10 週齢マウスに比較し高値であり、特にユーメラニン量が顕著に高い傾向を示した (表 1)。透過型電子顕微鏡による観察では 100 週齢マウスの辺縁細胞内により多くの色素顆粒が認められた (図 1)。一般にユーメラニンは有毒な活性酸素を取り込み、その毒性を弱める作用があり、一方でフェオメラニンは、むしろ活性酸素を産生する作用があるとされる。生体内における活性酸素の主な産生源はミトコンドリアである。血管条は特にこのミトコンドリアが豊富であることで知られ、この部位においてもユーメラニンの持つ活性酸素の解毒化作用が期待される。本検討で示した加齢に伴う蝸牛ユーメラニン量の優位な増加は、ユーメラニンによる活性酸素の解毒作用を介して、蝸牛の加齢変化に対し保護的な役割を果たす可能性あると考えられた。

表 1  
Average contents of cochlear eumelanin and pheomelanin/cochlea in young and aged C57BL/6 mice.



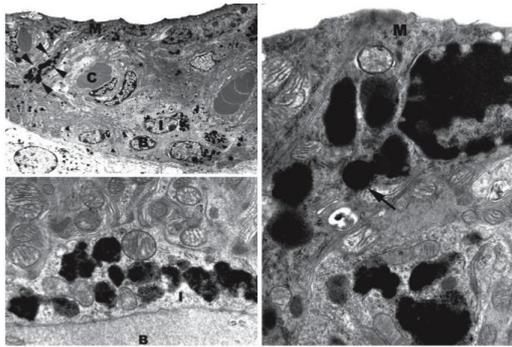


図1  
100週齢の加齢マウス血管条にはメラニン顆粒の増加が認められる

(2)MKKOおよびPTNKOマウスの聴力はWTに比べ25dBから30dBの閾値上昇を認めたが、PTNKOマウスでより閾値が高い傾向を認めた(図2)。DKOマウスではさらに高い閾値上昇を全周波数で認めた。蝸牛血流は4群において有意な差は認めなかった。光顕的観察ではMKKO、PTNKOおよびDKOマウスの血管条に明らかな変化は見られなかった。しかし中間細胞におけるKir4.1の発現がKOマウスにおいて著明に低下しており(図3)、透過電顕にて中間細胞領域の空胞化変性をDKOマウスにて認めた(図4)。

MKとPTNは相補的な役割を果たしているが、Vivoでのこれらの相補的役割はまだ解明されていない。PTNはメラノーマ細胞に強く発現し、メラノーマの転移において血管新生促進因子として関与している事が報告されている。血管条中間細胞はメラニンを含みメラノサイトと考えられており、PTNの発現が血管条に確認されたことは大変興味深い。PTNKOマウスの聴力閾値がMKKOマウスの閾値より高値である結果は、PTNが血管条においてMKより主導的な役割を果たしていることを伺わせた。

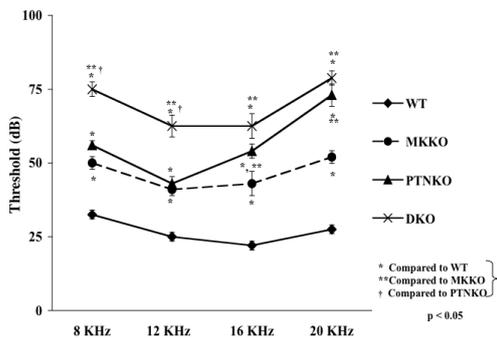
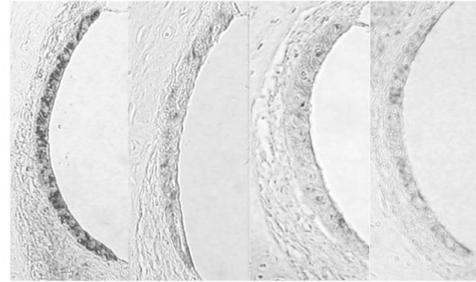


図2：聴力閾値



WT MKKO PTNKO DKO

図3：Kir4.1抗体の発現

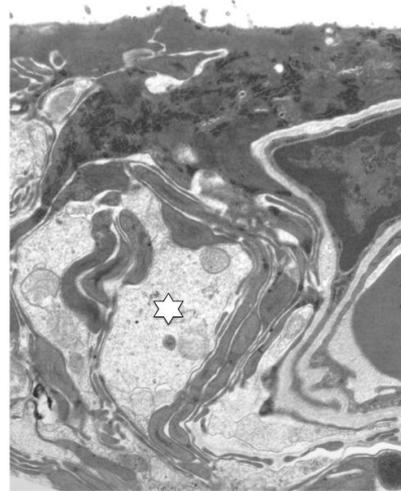


図4：DKOマウスの中間細胞の空胞変性(星印)

## 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3件)

- ① Midkine, Pleiotrophin 遺伝子欠損による血管条障害、曾根三千彦、中島務、Audiology Japan、51:291-292,2008 (査読なし)
- ② 林 秀雄、曾根 三千彦、中島 務、C57BL/6マウスにおける蝸牛メラニン量の加齢変化についての検討、Otology Japan 17:290, 2007 (査読なし)
- ③ Comparison of the quantity of cochlear melanin in young and old C57BL/6 mice. Hayashi H, Sone M, Schachern PA, Wakamatsu K, Paparella MM, Nakashima T, et al(他3名). Arch Otolaryngol Head Neck Surg 133:151-154, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- ① 曾根 三千彦、中島 務、Midkine, Pleiotrophin 遺伝子欠損による血管条障害、第53回日本聴覚医学会総会、平成20年10月2日、東京
- ② 林 秀雄、曾根 三千彦、中島 務、C57BL/6マウスにおける蝸牛メラニン量の加齢変化についての検討、第17回日本耳科学会総会、平成19年10月18日、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾根 三千彦 (SONE MICHIIHIKO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30273238

### (2) 研究分担者

中島 務 (NAKASHIMA TSUTOMU)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30180277