

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11345

研究課題名(和文) エストロゲン濃度変化による蝸牛血管条機能の電気生理学的検討

研究課題名(英文) Physiological evaluation on the function of stria vascularis in the inner ear based on the difference of intracorporeal estrogen concentration.

研究代表者

乾 崇樹 (Inui, Takaki)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：60465614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：老年性難聴の聴力閾値に男女差があるなど、加齢に関連したエストロゲン量の変化が聴力に影響すると考えられている。内耳蝸牛内のカルシウム代謝が重要であると考えられ、イオン代謝変化の影響を局所的に評価するため、細胞内シグナル伝達機構を介したイオン輸送経路の影響を評価した。その結果、内耳蝸牛内においてはカルモジュリンを介した細胞内カルシウム代謝機構が蝸牛内直流電位の発生と維持に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果はまだ限定的であるが、これをさらに発展させていくことで、高齢女性の加齢性難聴への新たな治療および予防介入に繋がる可能性がある。これによりQOLが改善すれば、活動的な女性高齢者の社会参加に繋げることができ、結果として社会的にも大きな意義を持つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is known that the amount of estrogen in the body has effects on hearing condition such as the sex difference of hearing level of presbycusis. As the metabolism of calcium in the cochlear seems important to the hearing condition, at the present study, we evaluated effects of the intracellular ionic transportation pathways in cochlear by physiological methods. In conclusion, we found that the intracellular metabolism of calcium mediated by calmodulin plays an important role in the generation and preservation of endocochlear potentials.

研究分野：内耳聴覚、平衡覚

キーワード：加齢性難聴 女性ホルモン 卵巣摘出動物モデル 蝸牛内直流電位 蝸牛血流

### 1. 研究開始当初の背景

聴覚生理における女性ホルモンの影響について、月経周期や閉経の影響などさまざまな報告がなされている。具体例としては、月経周期に連動した聴力閾値の変動、閉経後の聴性脳幹反応 (ABR) 閾値の上昇、老年性難聴における聴力閾値の男女差、子宮摘出ラットでの聴力閾値の上昇などが挙げられる。高齢化が進む現代社会において、活動的な女性高齢者の社会参画は非常に重要である。よって高齢女性の加齢性難聴への対応は QOL の点からも社会的な問題として重要な意味を持つ。

蝸牛内耳は、物理的な振動として外耳、中耳と伝わった音刺激を、電気信号に変換して蝸牛神経に伝達する役割を担っている。蝸牛中央階は内リンパ腔と呼ばれ、内腔を満たしている内リンパ液は低  $\text{Na}^+$ 、高  $\text{K}^+$  であり、+80 mV 程度の蝸牛内直流電位 (Endocochlear potential: EP) を有している。この EP が駆動力となり、コルチ器の有毛細胞で受容器電位が発生し、音刺激が電流として蝸牛神経へと伝達される。EP の発生機構として、一般に蝸牛血管条の中間細胞におけるカリウムチャネルを介した  $\text{K}^+$  の拡散電位により EP が発生するとされている。

申請者が所属する研究グループは、これまで無呼吸負荷や高濃度のフロセミドの全身投与により EP が低下し、同時に蝸牛内リンパ腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}]_e$ ) が上昇することを報告している (Inui T et al. J Physiol Sci; 2007、Mori Y et al. J Physiol Sci; 2009)。また過去に科学研究費助成金の交付を受けての研究も行い、内リンパ腔を取り囲む細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を阻害することが急性音響負荷による内耳障害の防止に重要であることを報告した (若手研究 B、課題番号 24791814)。

これらの研究結果から聴覚障害の治療において、EP を維持するという一面が重要であることは疑いないが、前述の様に加齢性変化は女性ホルモンの影響が示唆されており、またエストロゲンが Ca 代謝に影響することも知られていることから、エストロゲン濃度と EP との関係を明らかにし、これに介入することが治療に繋がる可能性があると考えられる。具体的には、エストロゲン濃度を制御することで Ca 代謝を適切な状態に保ち、良好な内耳環境を維持できれば、加齢性難聴に対する予防介入に繋がる可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

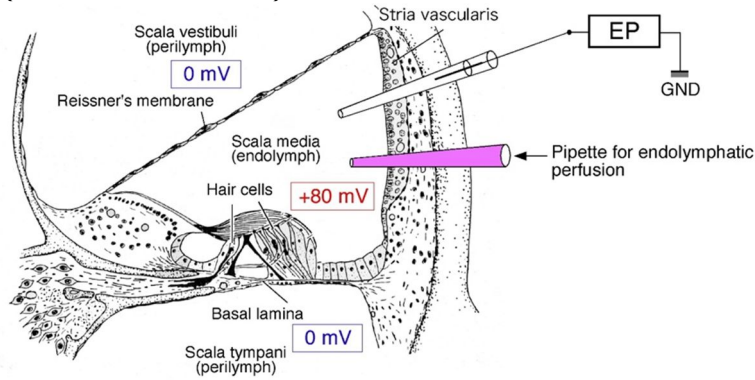
本研究では、閉経によりエストロゲンの分泌が減少すること、老年性難聴において聴力閾値に男女差があることから、女性ホルモンの聴覚生理における役割を明らかにすることを目的とした。前述の如く、申請者の所属する研究グループは EP 低下と  $[\text{Ca}]_e$  との関係についての報告を行ってきた。この知見をもとに、本研究では特に EP 低下と内リンパ腔における  $\text{Ca}^{2+}$  代謝の関係から体内のエストロゲン濃度の変化が聴覚に及ぼす影響を捉え、そこから聴覚生理の解明に迫り、長期的には老年性難聴に対する予防介入に繋げることを目的とした。具体的には申請者らがこれまで行ってきた研究を応用し、モルモットの蝸牛血管条機能に対するエストロゲン濃度変化の影響を、蝸牛血流量、ABR、蝸牛内直流電位、組織学的な変化を評価することとした。また、エストロゲンによるイオン代謝変化の影響を局所的に評価するため、細胞内シグナル伝達機構を介したイオン輸送経路活性変化の影響を、内リンパ腔への薬剤投与により EP の変化として評価することとした。

### 3. 研究の方法

実験動物として卵巣切除モルモットの確立のため、プライエル反射陽性のハートレー系白色モルモットを用いた。全身麻酔下に卵巣摘出術 (OVX) を行い、sham 群として同様の全身麻酔下に開腹のみの偽手術を行った。その上で術後 2 週間後から 1 週間ごとにエストロゲンとして estradiol benzoate (4 $\mu\text{g}/100\text{g}$  body weight) を 3 回投与、これに加えて術後から結晶化プロゲステロンを生理食塩水に溶解したものを皮下に留置したカテーテルを介して 3 週間持続投与した。これらの薬剤投与終了時 (術後 4 週間) と、estradiol benzoate 投与終了後 2 週間 (術後 6 週間) さらに 3 度の estradiol benzoate 再投与後に、つまりそれぞれ OVX 動物、これに対するエストロゲン補充、エストロゲン休止後、エストロゲン休止後再投与の条件で ABR、EP および蝸牛血流の測定を行った。

EP の測定など電気生理学的な評価は、前述の各群それぞれ定められた時期に、モルモットに全身麻酔を施した上で行った。気管切開による人工呼吸管理下に腹側からの手術操作によって蝸牛を露出し、蝸牛第 2 回転の骨を削開した後に経血管的にガラス微小ピペットを蝸牛中央階に刺入することで、内リンパ腔に各種薬剤を投与しながら EP を同時に測定した。EP 測定用電極には 0.5 M の KCl 溶液を充填し、電極ホルダーを介してエレクトロメーター (WPI, FD223) に接続し、の EP 変化を MacLab 8s (ADInstrument) にて記録した。また、内リンパ注入用ピペットから内リンパ腔に薬剤の注入を行った。薬剤として PKAi (10  $\mu\text{M}$ )、Rottlerin (10  $\mu\text{M}$ )、W7 (1 mM) を投与した (図 1)。

( 図 1: 蝸牛での操作図 )



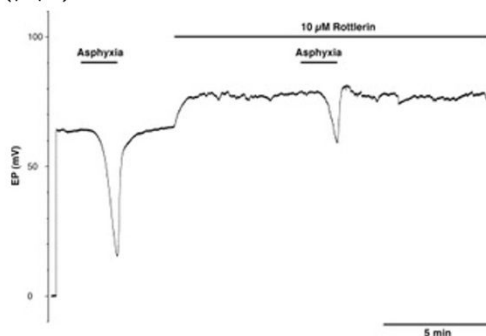
#### 4 . 研究成果

新規に確立を目指した卵巣摘出モルモットについて、当初の計画としては卵巣摘出モルモットにエストロゲンの投与を行い、これを中止、再開することで血中エストロゲン濃度を制御する方針とした。介入の方法としては 1. 卵巣摘出群、2. 卵巣摘出 + エストロゲン補充群、3. 2. のエストロゲン投与を中断する群、4. 3. にエストロゲンを再投与する群を作製し、これらに蝸牛血管条機能に対するエストロゲン濃度変化の影響を、蝸牛血流量、ABR、蝸牛内直流電位などの変化を評価することとした。

結果、個々の実験ステップでの変化はみられるものの、卵巣摘出後のエストロゲン投与の開始と中止、再開の影響については安定した再現性をもった実験系の確立には至らなかった。このためエストロゲンの内耳環境への影響を評価するという目的を達成するため、エストロゲンレセプターの発現が蝸牛血管条に確認されている (Motohashi et al. Acta Otolaryngol: 2010) ことから蝸牛血管条機能の評価を電気生理学的に行うこととした。エストロゲンが cAMP 依存性プロテインキナーゼ系に作用すること、閉経に伴う血中エストロゲンの減少がカルシウム代謝に影響を及ぼすことから、蝸牛血管条機能を反映する一つの要素となる EP の産生、維持について、カルシウムイオンの代謝とタンパクリン酸化過程との関係から評価する方針とした。

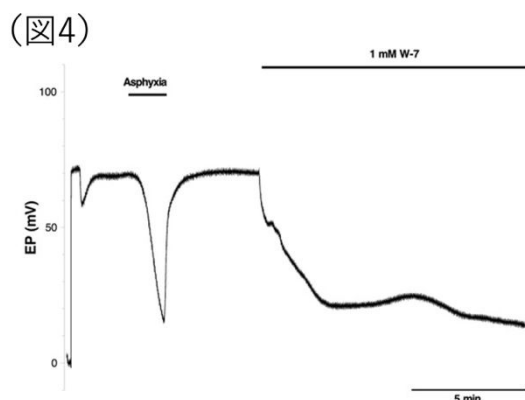
モルモットの蝸牛内直流電位は定常状態で約 +80 mV であり、この状態から経血管条的にプロテインキナーゼ A (PKA) の特異的阻害剤である PKAi を投与すると、図 2 のごとく薬剤投与による内リンパ腔内の圧負荷により EP は若干上昇するものの有意な変化は認められず、また無呼吸負荷により生じる EP 低下の程度も変化しなかった。

( 図 3 )



このことから PKA によるタンパクリン酸化過程は内耳血管条における EP の産生、維持には直接関与していないものと考えられた。次いでプロテインキナーゼ C (PKC) の選択的阻害剤である rottlerin を内リンパ腔に投与すると、EP は PKAi 投与時と同様に圧上昇により軽度上昇するものの有意な変化は生じなかったが、一方で無呼吸負荷による EP の低下が著明に抑制された ( 図 3 )。

この結果から、無呼吸負荷により生じる EP の低下は、蝸牛血管条を構成する細胞内が低酸素状態になることにより、が何らかの細胞内機構を介して PKC が活性化することにより生じる可能性が示唆された。さらに、カルモジュリン阻害剤である W7 を内リンパ腔に投与したところ、投与直後より EP は速やかに低下し、10 分以内に約+10mV 程度まで低下した (図 4)。



したがって、血管条を構成する細胞による EP の発生および維持には、カルシウム・カルモジュリン系を介した過程が重要な役割を果たしているものと考えられた。カルシウム・カルモジュリン複合体の形成による細胞内シグナル伝達経路としては、カルシニューリン、一酸化窒素合成酵素 (NOS)、カルモジュリンキナーゼなど多岐にわたるが、どの過程が EP の発生・維持にかかわるかについては今後の検討課題である。また、これまでの研究結果からカルシウムを介した細胞内シグナル伝達機構のうち PKC を介した過程は EP の発生・維持への関与の度合いは低く、低酸素状態における細胞内シグナル伝達過程に関与することで、無呼吸負荷時の EP の低下にかかわっている可能性が示唆された。

以上の結果から、血管条を構成する細胞においてカルシウム・カルモジュリンを介した細胞内シグナル伝達機構が、EP の発生・維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかしながら、今回の研究においてはカルシウム・カルモジュリンシグナル伝達機構の詳細および女性ホルモンとの関連についての検討は不十分であったため、今後の課題としたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 乾 崇樹、栗山達朗、白井丈雄、綾仁悠介、稲中優子、荒木倫利、萩森伸一、河田 了.	4. 巻 81
2. 論文標題 前庭性片頭痛とメニエール病における平衡機能評価の比較 鑑別におけるcVEMPの有用性について.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Equilibrium Res.	6. 最初と最後の頁 184-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inui Takaki, Kuriyama Tatsuro, Haginomori Shin-ichi, Moriyama Kou, Shirai Takeo, Ayani Yusuke, Inaka Yuko, Araki Michitoshi, Kawata Ryo	4. 巻 142
2. 論文標題 Different results of vestibular examinations and blood flow in cases with transient vascular vertigo/dizziness with or without central nervous system symptoms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 685 ~ 690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2022.2134587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inui Takaki, Haginomori Shin-ichi, Kajimoto Yoshinaga, Kuriyama Tatsuro, Shirai Takeo, Kinoshita Ichita, Araki Michitoshi, Kawata Ryo	4. 巻 134
2. 論文標題 Asymmetry and tuning shift of the cervical vestibular evoked myogenic potential indicate saccular dysfunction in idiopathic normal pressure hydrocephalus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 43 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinph.2021.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inui Takaki, Hoffer Michael, Balaban Carey D.	4. 巻 1767
2. 論文標題 Mild blast wave exposure produces intensity-dependent changes in MMP2 expression patches in rat brains ? Findings from different blast severities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147541 ~ 147541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 兼竹博文, 乾 崇樹, 栗山達朗, 五島史行, 野呂恵紀, 綾仁悠介, 鈴木 学, 荒木倫利, 萩森伸一, 河田了	4. 巻 79
2. 論文標題 前庭性片頭痛と遅発性内リンパ水腫の重複が疑われた症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Equilibrium Res	6. 最初と最後の頁 549-556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木英佑, 綾仁悠介, 萩森伸一, 菊岡祐介, 尾崎昭子, 稲中優子, 乾 崇樹, 河田 了	4. 巻 30
2. 論文標題 MRI検査の騒音に貴院した急性音響性難聴の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 197-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Takaki Inui, Shin-ichi Haginomori, Hirofumi Kanetake, Tatsuro Kuriyama, Michitoshi Araki, Ryo Kawata
2. 発表標題 A case of vestibular migraine/delayed endolymphatic hydrops overlapping syndrome.
3. 学会等名 18th Japan-Korea Joint meeting of Otorhinolaryngology &#8211; Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takaki Inui, Shin-ichi Haginomori, Tatsuro Kuriyama, Takeo Shirai, Yusuke Ayanim Manabu Suzuki, Yuko Inaka, Michitoshi Araki, Ryo Kawata
2. 発表標題 Investigation of the diagnostic processes of vestibular migraine cases in Otolaryngology.
3. 学会等名 XXXI Barany Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 乾 崇樹, 栗山達朗, 白井丈雄, 綾仁悠介, 荒木倫利, 萩森伸一, 河田 了
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症における平衡機能評価
3. 学会等名 第80回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 乾 崇樹, 萩森伸一, 鈴木英佑, 菊岡祐介, 綾仁悠介, 尾崎昭子, 稲中優子, 河田 了
2. 発表標題 前庭誘発筋電位検査施行により急性音響性難聴をきたした2例
3. 学会等名 第31回日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 乾 崇樹, 栗山達朗, 木下一太, 白井丈雄, 兼竹博文, 綾仁悠介, 鈴木 学, 荒木倫利, 萩森伸一, 河田 了
2. 発表標題 前庭性片頭痛とメニエール病の神経耳科的機能評価
3. 学会等名 第79回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inui T, Haginomori S, Kuriyama T, Ayani Y, Araki M, Kawata R
2. 発表標題 Prediction of short-term prognosis of hearing impairment in patients with unilateral Meniere's disease by the results of Head-shaking test.
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乾 崇樹, 萩森伸一, 河田 了
2. 発表標題 耳鼻咽喉科めまい外来における前庭性片頭痛の診断
3. 学会等名 第47回日本頭痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乾 崇樹, 綾仁悠介, 萩森伸一
2. 発表標題 幼少児からの難聴を主訴に受診した一側狭小内耳道例
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inui T, Haginomori SI, Kuriyama T, Ayani Y, Araki M, Kawata R
2. 発表標題 Vestibular migraine; including the cases that overlap with Meniere's disease.
3. 学会等名 AAO-HNSF 2019 Annual Meeting & OTO Experience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乾 崇樹, 萩森伸一, 栗山達朗, 綾仁悠介, 荒木倫利, 河田 了
2. 発表標題 当科めまい外来における前庭性片頭痛例の検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 乾 崇樹
2. 発表標題 正常圧水頭症における歩行・平衡障害の神経耳科的評価
3. 学会等名 第20回日本正常圧水頭症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗山達朗, 乾 崇樹, 萩森伸一, 神人 彪, 綾仁悠介, 荒木倫利, 河田 了
2. 発表標題 めまい患者におけるMRAと頸部動脈エコーによる椎骨動脈の評価 - 椎骨脳底動脈循環不全疑い例における検討 -
3. 学会等名 第77回日本めまい平衡医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inui T, Balaban CD
2. 発表標題 Mild blast wave leads intensity-dependent sequential changes in MMP2 expression in rat brains.
3. 学会等名 XXX Barany Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inui T, Haginomori S, Suzuki M, Ichihara T, Araki M, Kawata R
2. 発表標題 Head shake test and hearing prognosis in Meniere ' s diseases
3. 学会等名 2017AAO-HNS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	森 禎章  (Mori Yoshiaki)  (70268192)	関西福祉科学大学・保健医療学部・名誉教授   (34431)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------