

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16942

研究課題名（和文）内耳周囲骨の形成発達と、内耳機能への影響、またその結果の臨床応用

研究課題名（英文）The mechanism of bone resorption in the inner ear and the effect on inner ear function, and its clinical application

研究代表者

粕谷 健人 (kasuya, kento)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70594521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：骨吸収と耳小骨・聴覚の関連性は先行研究にて示されている。破骨細胞の活性や分布は中耳組織の骨化のタイミングと関連することから、我々はまず、健常マウスの耳小骨の形成について評価し、耳小骨の形成機序を解明した。また、人工中耳炎モデルマウスの耳小骨や内耳骨にて、破骨細胞の発現を評価し、健常マウスモデルと比較検討を行った。最後に内耳に感染が浸潤する機序について検討した。内耳への感染伝搬に関与するリポポリサッカライド（LPS）は正円窓膜において炎症を惹起させ、薬剤の内耳到達促進につながる透過性の亢進をもたらすと考えられた。これらの結果をもとに、内耳への感染波及と聴力に影響する因子を、解析しえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳外側、蝸牛軸は骨にて包まれているが、その内耳周囲骨の発達形成に関する論文は極めて少なく、内耳が外肺葉由来であることは推測されているものの、その病態生理はほとんど解明されていない。他の報告にて、内耳の外側壁とその外側の骨は連絡があり、骨自体が内耳機能に関与する可能性が示唆されている。したがって、本研究にて耳小骨、内耳骨の骨代謝や破骨細胞の活動性を解析し、内耳への感染波及と聴力に影響する因子を解析しえたことによって、例えば蝸牛硬化症などの病態解明、臨床応用に転化が可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In a previous study, we have shown that the hearing is associated with the bone resorption of auditory ossicles. Because activity and the distribution of the osteoclast correlated to a timing of the ossification of the middle ear, we firstly evaluated the formation of the auditory ossicles of the normal mouse, and we elucidated the formation mechanism of auditory ossicles. Then, with auditory ossicles and the inner ear bone of the artificial otitis media model mouse, we observed expression of osteoclast and weighed it against a normal mouse model. Finally, we examined the mechanism that infection infiltrated to inner ear. It was thought Lipopolysaccharide which participated in infection propagation to inner ear let it cause inflammation in the round window membrane and brought permeable sthenia to be connected for promotion of the drug arrival to inner ear. Based on these results, we were able to analyze some factors which influenced infection spreads and a hearing acuity to inner ear.

研究分野：耳科学

キーワード：耳科学 内耳 耳小骨 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性中耳炎による耳小骨の溶解や耳硬化症におけるアブミ骨固着のような病態は、破骨細胞の増加によって骨代謝のバランスが崩壊し骨吸収が活発化された結果生じると考えられている。近年、骨代謝学の進歩により、中耳や内耳の骨代謝に関して解明が進みつつあるが、動物実験のレベルで内耳中耳領域の骨代謝を操作し、形態変化と聴覚機能について評価した研究の報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

申請者を含むグループは、マウスの耳小骨の破骨細胞数を人為的に増減させることに成功し、破骨細胞数の制御による耳小骨形態の変化が、聴覚機能に大きな影響を与えることを示してきた。当施設では、肺炎球菌注入によるマウス中耳炎内耳炎モデルを作成しており、これらを用いて中耳内耳における骨形成発達と組織特性を解明し、中耳炎内耳炎モデルでの中耳内耳骨への影響を解明する。

これらの研究成果を活用して、内耳周囲骨の形成発達と、内耳機能への影響、またその結果の臨床応用が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)

動物実験から健常なヒトの耳小骨の形成の機構を解明することで、中耳疾患の理解・治療方法の解明に繋がると考えられる。耳小骨の骨化は軟骨細胞を破骨細胞が貪食することで生じるため、破骨細胞の活性や分布は中耳組織の骨化のタイミングと関連すると考察される。本来であればヒト中耳の破骨細胞の観察が臨床応用上で最適ではあるが、実際に活動している破骨細胞をとらえることは困難であるため、マウスモデルにて耳小骨の破骨細胞を観察した。そこで、本研究ではマウスの耳小骨に蛍光タンパク質である DsRed を発現させたトランスジェニックマウスをまず作成した。これを用いて破骨細胞の数を経時的に追っていくことにより、健常なマウスの耳小骨の形成について評価した。

(2)

中耳炎は非常に一般的な疾患であり、反復すると難聴になることは知られているが、その難聴になるメカニズムは未解明である。仮説としてはサイトカインに誘導されて破骨細胞が増加することにより、耳小骨が溶解、固着するため、もしくは感染により酸が発生し直接的に骨が溶解されるためというものがある。そこで、今回我々は破骨細胞の増加によって耳小骨の溶解、固着が起きるとする仮説を検証するため、右耳鼓膜内にリポポリサッカライド (LPS) を、左耳にはコントロールとして生理食塩水を投与した中耳炎モデルマウスを作成した。両耳の耳小骨の破骨細胞を、TRAP 染色後に実体顕微鏡にて観察比較し、評価した。

(3)

つぎに、内耳に感染が浸潤する機序について検討した。内耳における薬物動態については未だ研究が進んでいないものの、LPS は、内耳への感染伝搬に関与する事が知られている。その作用機序を薬剤鼓室内投与にて評価した。生理食塩水と LPS を左耳の鼓室内に投与したのち、IVIS イメージングシステムを用いて薬剤の到達を蛍光化した。そして、その蛍光を光子量として示すことで薬剤の内耳到達量の経時変化を調べた。その後、左右の耳の正円窓膜を電子顕微鏡で観察することで、LPS が正円窓の膜透過性を亢進させ、薬剤の到達を促進させるのかを検討した。

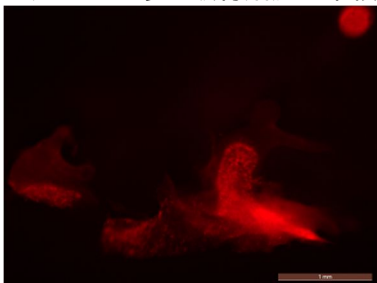
4. 研究成果

(1)

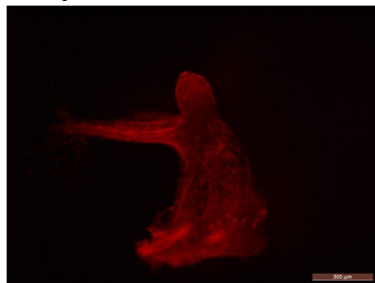
マウス耳小骨に蛍光タンパク質 DsRed を発現させたトランスジェニックマウスにおいて、生後 1 日、3 日、5 日、7 日、10 日、18 日、21 日時点での耳小骨における破骨細胞分布の経時変化を、蛍光顕微鏡下に観察した。

ツチ骨

まず、day3 よりツチ骨中央の楕円部より破骨細胞が誘導され、徐々に骨形成が骨縁部に向かって広がるように破骨細胞の集積が進む。



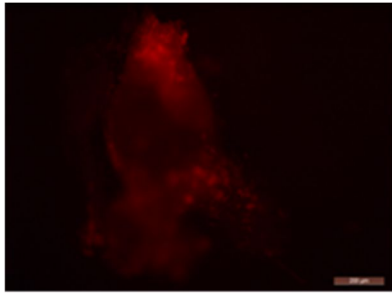
ツチ骨 day3



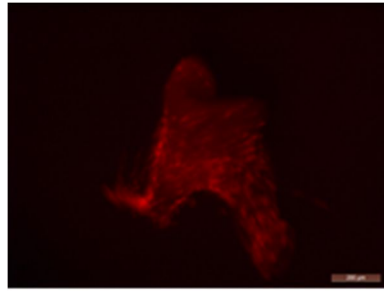
ツチ骨 day21

キヌタ骨

day3 以前にまずキヌタ骨の脚部に破骨細胞が発現し、ここから骨の中央に向かって骨化が進む。ただしこの時点での骨化は主に骨の内側部で起こり、最後に骨の内側から外側へと骨化が進むと推定できる。



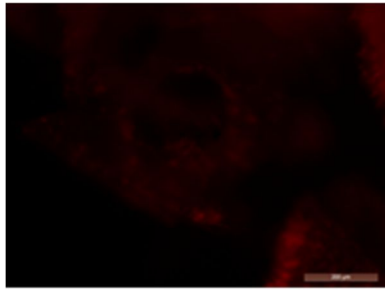
キヌタ骨 day3



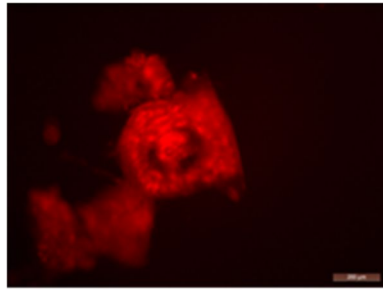
キヌタ骨 day21

アブミ骨

アブミ骨は day5 にてアブミ骨脚部内周とアブミ骨底に破骨細胞のわずかな集積が出現し、day7 にてアブミ骨全体に破骨細胞の発現が観察された。



アブミ骨 day5



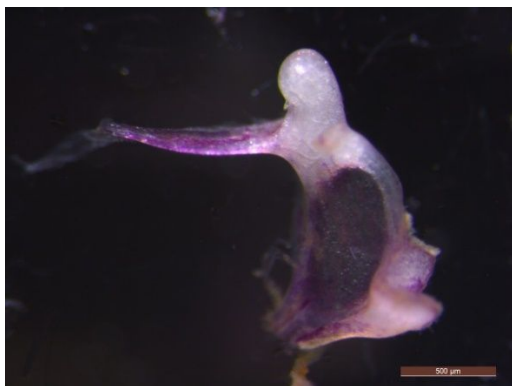
アブミ骨 day7

特にツチ骨は部位により骨化のタイミングが異なること、また、ツチ骨の一部の部位では破骨細胞が一時的に減ることがあること、アブミ骨は破骨細胞の出るタイミングが他の二つと異なること、アブミ骨とキヌタ骨は生後7日目くらいには破骨細胞は増えなくなり、ツチ骨とは骨化のタイミングが異なることが解明された。その結果、いままでほとんど報告されていなかった健常マウスでの耳小骨の形成機序が判明し、これらを疾患モデルに照らし合わせることが可能となった。(現在論文投稿準備中)

(2)

右鼓室内 LPS 投与から一週間経過後の中耳炎モデルマウスを還流固定し、左右の耳小骨を取り出して TRAP 染色した。実体蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、imageJ を用いて染色がなされていた部分の面積を計測し、コントロール群と中耳炎モデル群とで比較した。

ツチ骨



ツチ骨 左耳 (コントロール)

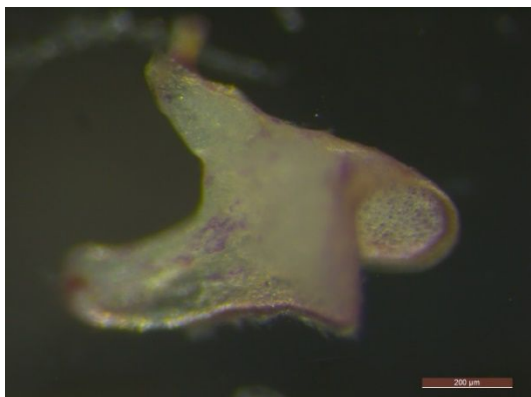


ツチ骨 右耳 (中耳炎モデル)

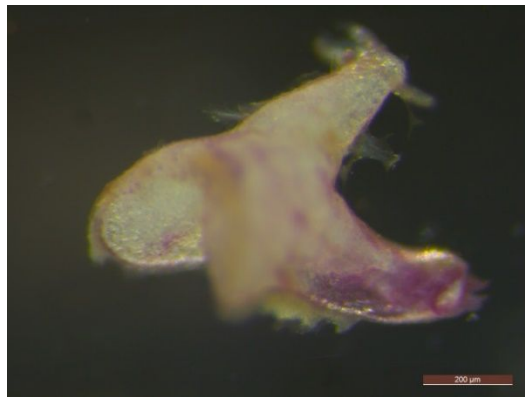
LPS を投与し、中耳炎モデル (右耳) の方が、とりわけ骨頭において濃く染色がされている。染色面積においても、骨頭を中心に全域で染色率は増加し、破骨細胞の増加が示された。

T 検定 : $t(10)=2.332$, $p<.05$ となり、平均値の差は有意であると言える。

キヌタ骨



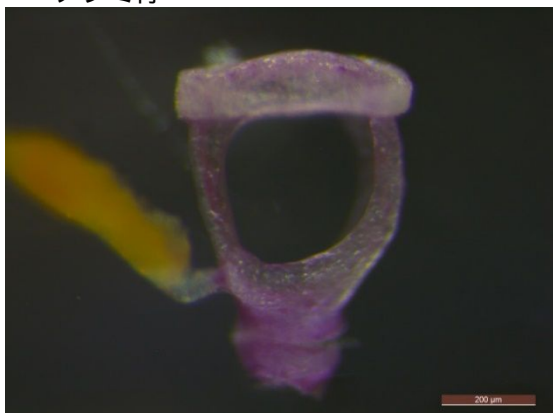
キヌタ骨、左耳(コントロール)



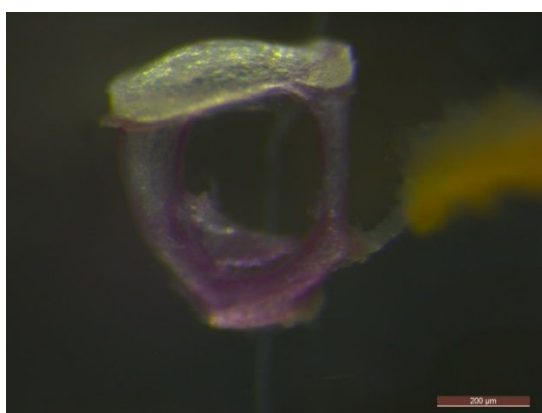
キヌタ骨、右耳(中耳炎モデル)

中耳炎モデル(右耳)の方が、とりわけ長脚において濃く染色されている
長脚での面積率も同様に増加していた。T検定： $t(8) = 5.797$, $p < .01$ となり、平均値の差は有意であると言える。

アブミ骨



アブミ骨、左耳(コントロール)



アブミ骨、右耳(中耳炎モデル)

骨頭の方で濃く染色していて、逆に骨底の方では染色が薄くなっているのが確認できる。骨底とそれ以外で面積率をみるとアブミ骨底の染色面積率は右耳にややばらつきがあったものの、概ね左耳(コントロール)の方が染色率は高く、右耳(中耳炎モデル)では染色率が低下していた。一方骨底以外の染色面積率では左耳(コントロール)に比べ、右耳(中耳炎モデル)の方がより濃く染色されていることが確認された。T検定： $t(8) = 3.523$, $p < .01$ となり、平均値の差は有意であると言える。

中耳炎モデルマウスの耳小骨や内耳骨を TRAP 染色で観察することで、現時点で中耳炎モデルの耳小骨ではツチ骨頭、キヌタ骨長脚、アブミ骨底以外において破骨細胞の増加が観察され、アブミ骨底では代償的に破骨細胞発現が低下していることを確認した。これにより、ヒト中耳炎による難聴メカニズムの解明に結び付く手がかりを得た。(現在論文投稿準備中)

(3)

IVIS システムを用いた耳の蛍光は Figure.1 のように観察され、赤で囲った範囲の蛍光を数値化した。

Figure.1 GFAP-Luc マウスにおける蛍光

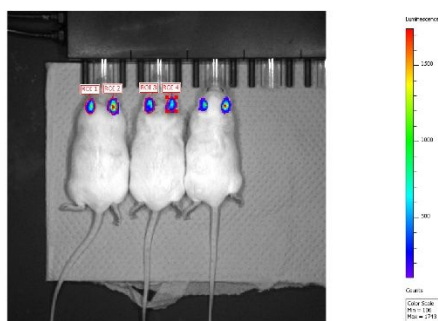
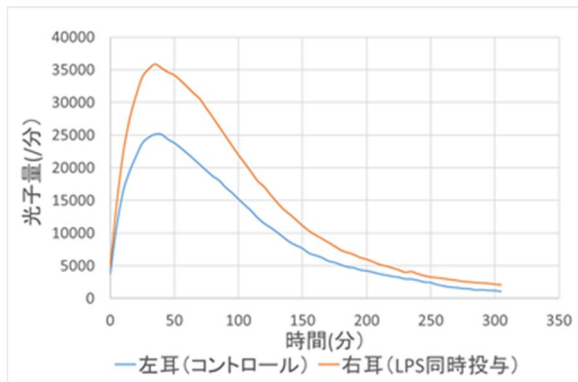


Figure.2 左耳(コントロール群)と右耳(LPS 同時投与群)の光子量の平均値

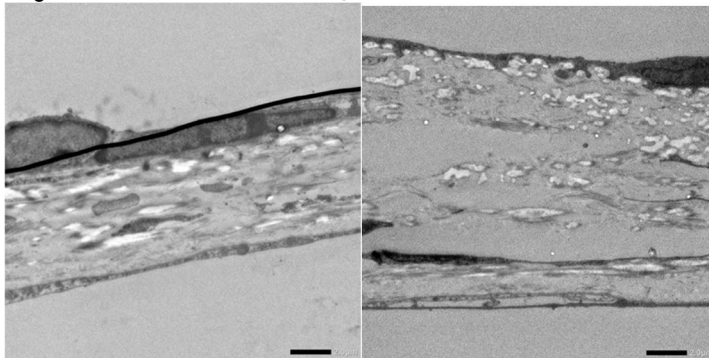


AUC とピーク値はともに右耳の平均値で光子量が高値であった。

t 検定【AUC】 $0.030545419 < 0.05$ 【ピーク値】 $0.032604609 < 0.05$ となり、有意水準 0.05 で有意差ありとなった。

電子顕微鏡での観察

Figure.6 電子顕微鏡写真(左:コントロール群、右:中耳炎モデル群)



上記写真は正円窓膜を撮影したものであり、膜の上側が内耳側、下側が中耳側となっている。コントロール群は、組織が密である事が分かる。それに対して、中耳炎モデル群では組織が疎となっている。特に、血管・リンパ管を含む結合組織である中層組織の結合が緩くなり、炎症性細胞が出現している。これは、LPS が炎症性メディエーターを惹起した結果、組織が拡張と炎症性細胞の出現がもたらされたと考えられる。

リポポリサッカライド併用投与群では薬剤の内耳移行の総量とピーク値が有意に多いことがわかった。また、電子顕微鏡での精査と合わせて LPS は正円窓膜において炎症を惹起させ、薬剤の内耳到達促進につながる透過性の亢進をもたらすと考えられた。これらの結果をもとに、内耳への感染波及と聴力に影響する因子を、解析しえた。(現在論文投稿準備中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----