

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592476

研究課題名(和文) 蝸牛外有毛細胞動毛形成の聴覚における影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the kinocilia influence in the cochlea outer hair cells

研究代表者

戸叶 尚史 (Tokano, Hisashi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70334422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：レプチン受容体欠損マウスは難聴が早期に進行した。難聴の責任部位は外有毛細胞で、不動毛の障害というよりは細胞質の障害であった。一方、高血糖を維持したレプチン受容体正常のマウスでは聴性脳幹反応の閾値上昇も歪成分耳音響放射の減弱もなく、組織学的にも正常であった。結論として蝸牛外有毛細胞動毛におけるレプチンの役割は不動毛の形成ではなく細胞質そのものへの影響で、単純な高血糖状態のみでは難聴の進行に影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：Because C3H/HeJ mice have leptin receptor in their cochlear outer hair cell kinocilia, we analyze leptin receptor knock out *Lepr* *db/db* mice, which were known to model of diabetes mellitus. ABR thresholds were proximately same but accepted early attenuation in DPOAEs compared with control one, the responsible part of their hearing loss was regarded as outer hair cells. There were no stereocilia displacement and no hair cell bundle transformation but abnormal PAS stained follicles in cytoplasm, these meant DPOAEs attenuation were due to outer hair cell body disorder rather than stereocilia disfunction. On the other hand, in leptin receptor intact hyperglycosemia state C3H/HeJ mice, ABR thresholds and DPOAEs were proximately same compared with control one and abnormal PAS stained follicles in cytoplasm were never seen these mice. In conclusion, Absence of outer hair cell kinocilia were related to cytoplasmic abnormality and there were no affection only in a simple hyperglycosemia state.

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：レプチン受容体 外有毛細胞 高血糖 マウス ストレプトゾトシン アディポネクチン

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の内耳における有毛細胞は聴覚・平衡の機能に重要な感覚器官である。蝸牛外有毛細胞の頂部にはアクチンフィラメントを主成分とした不動毛が厳密に組織されており、これらは機械電気変換( Mechano-sensory transduction ) に重要な役割を持つ。外有毛細胞自体は音波を受容する機能は持っていないが、脱分極すると細胞自体が短くなり、過分極すると伸張する。微弱な音刺激の場合には基底板の揺れを増幅し、逆に過大に強い音の場合には基底板の振動を抑制するように働く。このようにして外有毛細胞は基底膜の振動パターンに影響を及ぼし蝸牛内で音波を増幅している。増幅した音波は蝸牛から耳小骨を経て鼓膜を振動させるため耳音響放射として他覚的に計測することができる。

外有毛細胞の不動毛の形成は出生後に行われることが明らかになっている。すなわち微絨毛に覆われたクチクラ板の端に、一つの細胞に対して一本の微小管構造を持つ動毛が認められ、その後不動毛が発生して伸張し、動毛側から高さの異なった階段状の構造を形づくる。不動毛の成長に関しては Whirlin と呼ばれる蛋白が重要な役割を担っていることが示唆されており (Kikkawa, et, al. 2005)、不動毛の異常を示すモデルマウスは難聴の他、首振り、回旋異常といった異常構造を示し、その表現型は崩壊型、融合型、短毛型の三種類に大別でき (Frolkov, et, al. 2004)、近年では Triobp らがアクチン線維を束化すること (rootlets の形成) で動毛基部とクチクラ板の接合を維持して、有毛細胞と不動毛の形態維持に役立っているということが注目されている (Kitajiri, et, al. 2010)。前庭系において動毛の形態は維持されるが、蝸牛においては不動毛が最終的に伸張して、成熟した段階で動毛は退縮し、マウスにおいて生後 9-12 日齢で消失することが知られている。不動毛での現段階においては動毛の機能については明らかではない。

以前我々は、レプチン受容体欠損マウス *lepr*

*db/db* が難聴を発症し、そのホモ接合体はヘテロ接合体、野生型に比べ早期に ABR 閾値が上昇すること、さらに DPOAE でもホモ接合体は早期から DP レベルが低下する可能性があることを報告 (有泉ら、第 16 回耳科学会総会発表; 川島ら、科学研究補助金研究課題番号: 17791163) して、その責任部位は外有毛細胞であると予想したが、そのときコントロールとして使用した C3H/HeJ の個体 (7 日齢) の動毛において、レプチン受容体の強い発現を偶然に確認した。レプチン受容体の発現は不動毛とクチクラ板にはみられなかった。レプチンは脂肪組織から産生され、視床下部に作用して強力な摂食抑制作用を示すとともにエネルギー代謝を更新させ体重増加抑制作用を示すが、その受容体の分布は多臓器にあり、レプチンの作用も多様であることが報告されている。

## 2. 研究の目的

レプチン受容体欠損マウスは C57BL/6 を背景としており、C57BL/6 は 10 ヶ月齢以降に高度な難聴を呈することが知られている (加齢性難聴系統)。一方、C3H/HeJ は加齢性難聴を示さない系統とされており、このなかで特に MSM 系統は 18 ヶ月齢まで難聴を呈さないことが明らかになっている (非加齢性難聴系統)。まず、C3H/HeJ の動毛にみられたレプチン受容体の発現を、前庭を含めた内耳全般まで確認する。次にレプチン受容体の発現を、*lepr db/db* をコントロールとして加齢性難聴系統 C57BL/6 に認められるかどうかを検証する。不動毛に形成される rootlets が不動毛に形成されるのかもあわせて確認する。また、非加齢性難聴系統のレプチン受容体欠損モデルマウスを作成して動毛の、不動毛形成や聴力に与える影響を検証する。

## 3. 研究の方法

加齢性難聴マウス系統および非加齢性難聴系統の neonate マウスの内耳を取り出して免疫染色を行い、whole body staining および凍結切

片標本を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて内耳各部位でのレプチン受容体を観察する。成熟例においては上記に加え、走査型電子鏡および超音響放射の計測、脳性脳幹反応の測定を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 糖尿病モデルマウス *Leprdb/db* における ABR の解析では、ホモ接合体と野生型、ホモ接合体の聴覚域値に有意差は認められなかったが、DPOAE の解析においてホモ個体は野生型やヘテロ個体と比べて DP レベルは低い傾向にあった。内耳の形態学的解析ではホモ個体において外有毛細胞の細胞内に比較的大型の PAS 染色陽性顆粒が認められたものの、血管条、内毛細胞に PAS 染色陽性顆粒は認められなかった。また、野生型、ヘテロ接合体の外有毛細胞には PAS 染色陽性細胞は認められなかった。また、これまで我々は非加齢性難聴マウス C3H/HeJ の個体の動毛においてレプチン受容体が強く発現することを報告した。以上より、*Leprdb/db* における難聴の機序は、不動毛の形成異常、あるいは高血糖状態における細胞障害や末梢神経障害などの可能性が示唆された。一方、*Leprdb/db* は加齢性難聴モデルマウス C57BL/6 系統がバックグラウンドにあるため、細胞障害に何らかの遺伝子による影響があることは否定できない。また可能であれば空腹時血糖値の異なる高血糖状態を作成することが理想である。そのため、我々は C3H/HeJ に対してストレプトゾトシン (STZ) を投与することによって、膵臓を障害し、高血糖における非加齢性難聴系統の内耳機能障害モデルを作成した。STZ は化学的に不安定な薬剤で、種により効果も異なるとされているが、我々の手技においては、総投与量 250mg/kg·bw で空腹時血糖 250-350mg/dL、総投与量 350mg/kg·bw で 550mg/dL 以上の高血糖状態を作成できた。

(2) *Leprdb/db* における難聴の機序が、不動毛の形成異常、あるいは高血糖状態における細胞

障害や末梢神経障害などである可能性を示唆した。そのため、難聴素因のないマウス系統である C3H/HeJ を、濃度の異なるストレプトゾトシンを投与することによって、程度の異なる 2 型糖尿病モデルマウスを作成したことを報告した。今年度、我々はこの系統において空腹時血糖が 150mg/dL 未満 (A 群)、150-550mg/dL (B 群)、550mg/dL (C 群) 以上の 3 群に分類し、6、18、24、30、36 週において、加齢性難聴モデルマウス C57BL/6 系統 (D 群) をコントロールとして電気生理学的、形態学的な検討を行った。DPOAE に関しては D 群が 24 週目から低下する傾向にあったのに対して、A 群、B 群、C 群は正常であり、各群の音響放射に有意差を認めなかった。ABR に関しては A 群、B 群、C 群、D 群ともに 5.6kHz、8kHz、12kHz、18kHz、24kHz において聴覚閾値の上昇を認めなかった。形態学的な解析においては、各週齢の A 群、B 群、C 群が基底回転を含む全周波数領域において、H-E 染色における I 型ラセン神経節細胞の減少あるいは、ファロイジンによる免疫染色における有毛細胞の脱落を認めなかったのに対して、D 群においては 24 週齢以降のラセン神経節細胞の脱落及び有毛細胞数の減少を特に高周波数域に有意差を持って認めた。また、この間に、Fujita らが加齢性難聴モデル C57BL/6J 系統を用いて、騒音負荷を行い糖尿病が騒音性難聴を来しやすいことを示唆した。これらのことから、加齢性難聴の素因を持たない個体に対しては、高血糖単独では難聴が発現しにくいことが示唆された。

(3) C3H/HeJ にストレプトゾトシン (STZ) を投与して膵臓を傷害したマウスを血糖値 250mg/dl 以下 (A 群)、250-500mg/dl (B 群)、500mg/dl 以上 (C 群) に分類し、それぞれ実験のプロトコールに従い 6、12、18、24、30、36 週齢に対して ABR、DPOAE の解析を行った。ABR に関しては DPOAE が消失した個体にのみ行った。結果として A 群では DPOAE が消失した個体は認められなかった。B、C 群に関しては A 群に対して寿命

が短い傾向にあり DPOAE が消失した個体に対して ABR 閾値が上昇することはなく、Lepr 欠損マウスと同様であった。しかし形態学的解析において Lepr 欠損マウスにみられたような外有毛細胞不動毛の形態異常、あるいは高血糖状態による外有毛細胞内に粗大な PAS 陽性細胞は認められなかった。このため高血糖状態による細胞障害の機序は不動毛の形成異常は不動毛の形成異常や高血糖状態における直接の機能異常ではなく、遺伝子の多型性によるものと想像された。

一方、5-OHdG はいずれの個体の外有毛細胞にも発現しなかった。このことはアディポネクチン活性低下によるインスリン抵抗性の増大、その機序としての骨格筋や肝臓における AMP キナーゼの活性低下、直接的な動脈硬化の進行などアディポネクチン分泌低下の一因としての活性酸素による外有毛細胞の酸化ストレスは証明できなかった。

## 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)

Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K, Sawabe M, Kitamura K: RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival human temporal bone section using laser microdissection - A technical report. *Hear res* 302: 26-31, 2013. 査読あり

<http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2013.04.008>

岩崎朱見、戸叶尚史、鈴木康弘、喜多村健: "糖尿病モデルマウス Leprdb/db の聴覚機能及び形態学的解析" *日本耳科学会雑誌* 21. 379, 2011. 査読なし

[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/otoljpn/21/0/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/otoljpn/21/0/_contents/-char/ja/)

Fujioka M, Tokano H, Shiina-Fujioka K, Okano H and Edge AS. Generating mouse models of degenerative diseases using Cre/lox-mediated in vivo mosaic cell ablation. *J Clin Invest.* 121:2462-2469, 2011. 査読あり

doi: 10.1172/JCI45081

(学会発表) (計 13 件)

伊藤卓、喜多村 健: ペンドレッド症候群の新規マウスモデル. 平成 25 年度 第 2 回厚生労働省急性高度難聴調査研究班会議 平成 26 年 2 月 8 日 東京

吉本亮一、喜多村 健: 培養前庭神経細胞における過分極誘発カチオンチャネルの日齢変化. 平成 25 年度 第 2 回厚生労働省急性高度難聴調査研究班会議 平成 26 年 2 月 8 日 東京

吉本亮一、岩崎真一、鷹合秀輝、喜多村 健: 培養前庭神経節細胞における過分極誘発カチオンチャネルの特性. 第 23 回日本耳科学会総会学術講演会 平成 25 年 11 月 24 日、宮崎

Fujioka M, Tokano H, Mizutani K, Ogawa K, Okano H, Edge AS. Generating Mouse Models of Early Stages of Degenerative diseases Using Cre/lox-mediated in Vivo Mosaic Cell Ablation. 1st Asian Otology Meeting/ 3rd East Asian Symposium on Otology, June 1st, 2012, Nagasaki, Japan.

藤岡正人、戸叶尚史、小川 郁: Cre/lox と調節性 Caspase を用いたモザイク様細胞死モデルの樹立—病気の「なりはじめを」科学する、第 21 回日本耳科学会総会平成 23 年 11 月 24 日、那覇

岩崎朱見、戸叶尚史、鈴木康弘、喜多村健: "糖尿病モデルマウス Leprdb/db の聴覚機能及び形態学的解析" 第 21 回日本耳科学会総会学術講演会. (平成 23 年 11 月 24 日). 那覇

岩崎朱見、戸叶尚史、鈴木康弘、喜多村健: "糖尿病モデルマウスの内耳におけるPAS染色陽性細胞の局在" 第20回御茶ノ水耳鼻咽喉科頭頸部外科集談会. (平成23年7月30日). 東京  
戸叶尚史、岩崎朱見、鈴木康弘、喜多村健: "糖尿病モデルマウス解析の現状" 第20回御茶ノ水耳鼻咽喉科頭頸部外科集談会. (平成23年7月30日). 東京

[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

戸叶 尚史 (TOKANO, Hisashi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・助教

研究者番号: 70334422

### (2) 研究分担者

喜多村 健 (KITAMURA, Ken)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授

研究者番号: 90010470

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

東京都立総合医学研究所・哺乳類遺伝プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号: 20280787

### (3) 連携研究者

なし