

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592500

研究課題名(和文)加齢に伴う蝸牛血液 - 内耳関門の変化と加齢性難聴の臨床

研究課題名(英文)Age-Related Changes in the Stria Vascularis in C57BL/6 mouse

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究目的：蝸牛外側壁の加齢に伴う変化を観察すること 方法：3日齢から12ヶ月齢までのC57BL/6マウスを用いて1)蝸牛基底回転で血管条の幅の比較2)蝸牛内に灌流されたPolyethyleneimine(PEI)の分布の観察3)蝸牛外側壁毛細血管のIgGの分布の観察である。結果と考察：1)血管条の幅は加齢とともに狭くなった。2)毛細血管基底膜のPEI粒子の分布は血管条では3日齢に比べて8週齢以降で有意に少なかった。3)8週齢以上の血管条毛細血管基底膜上ではIgGの沈着が認められた。これらの結果から、血管条毛細血管には加齢とともにIgG沈着し基底膜の陰性荷電が減少することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To examine age-related morphological changes in the cochlear lateral wall. Methods: C57BL/6 mice were grouped according to age as follows: 3 days, 4 weeks, 8 weeks, 6months and 12 months. Polyethyleneimine (PEI) was used to examine changes in the basement membrane anionic sites (BMAS) of the stria vascularis. Serial mid-modiolarparaffin thin sections were performed to measure the widths of the stria vascularis, and then incubate with anti-mouse IgG antibody. Results: In a width of the stria vascularis, a significant difference was observed between the 4-week- and 12-month-old mice. A statistically significant difference was observed in the distribution of PEI particles between 3-day- and 8-week-, 6- and 12-month-old mice. IgG deposition was detected in the stria capillary BM in 8-week-old, 6-month-old, and 12-month-old mice. Since IgG is a cationized antibody molecule, the decrease in the BMAS shown may be due to IgG deposition in the stria vessels.

研究分野：医歯薬学

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：C57BL/6 マウス 加齢性難聴 polyethyleneimine 陰性荷電 IgG 免疫組織学 血管条 毛細血管基底膜

1. 研究開始当初の背景

内耳における選択的物質輸送に深くかかわっている血液-内耳関門には、血液-内リンパ関門、血液-外リンパ関門、内リンパ-外リンパ関門がある。血液-内リンパ関門と血液-外リンパ関門は血管を介した内耳への物質輸送を制御し、内耳の恒常性に関与している。さらにこれら内耳のバリア機能は、内耳障害の治療の目的で全身投与された薬剤が内耳に移行する際にも大きく関わっている。一方内リンパ-外リンパ関門は、鼓室内投与された薬剤が蝸牛窓膜を介して外リンパ腔に移行し、さらに内リンパ腔へと広がっていく際に関与すると考えられる。加齢性難聴の病型に関しては、1. 蝸牛感覚細胞障害型難聴 2. 蝸牛神経障害型難聴 3. 血管条萎縮型難聴 4. 蝸牛伝音障害型難聴が基本病型とされている。Staeckerらは老化モデルである C57BL/6/J マウスを用いてスーパーオキシサイトジスムターゼ 1, 2 (SOD 1, 2) やカタラーゼなどの抗酸化酵素 mRNA を測定し、高齢マウスにおいては SOD1 の増加と一過性のカタラーゼ増加が認められたことより、加齢性難聴では活性酸素が増加し、成人難聴遺伝子(Ah1 遺伝子)が抗酸化酵素を減少させ、酸化ストレスを増強すると考察している。またミトコンドリア機能の障害による加齢性難聴の可能性も考えられている。ミトコンドリアが多く存在する血管条は加齢とともに萎縮するため、血管条の萎縮は加齢性変化を形態学的にとらえる指標とされている。血管条の萎縮によって、血液-内耳関門、特に血液-内リンパ関門の形態と機能に変化が生じる可能性も考えられるが、これまでに報告はない。cadherin 23 mutations によって早期より難聴を来す C57BL/6 マウスは、形態学的に蝸牛の加齢性変化として知られる血管条の萎縮も早期より生じるため本研究の対象とした。蝸牛の毛細血管および上皮の基底膜陰性荷電は物質の選択的透過性に関与していると考えられている。蝸牛血管条には加齢とともに IgG の沈着がみられることが報告されているが、内耳の基底膜陰性荷電に対する影響は明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

加齢に伴う蝸牛基底膜における陰性荷電の変化と IgG の沈着を観察することである。

3. 研究の方法

全身麻酔下に生後 3 日、4 週、8 週、6 カ月、12 カ月齢の C57BL/6 マウスの左蝸牛を採取し、0.5% cationic polyethyleneimine (PEI) 溶液に 15 分間浸漬後、2% リンタングステン酸、2.5% グルタルアルデヒドで 3 時間浸漬固定しエポキシに包埋した。生後 3 日、4 週、8 週、6 カ月、12 カ月齢の右蝸牛を採取し 10% ホルマリンにて固定し、脱灰後に蝸牛を蝸牛軸に沿って 2 分した後に、パラフィン包埋した。切片を作成し、年齢別に血管条の厚さを

測定した。さらに一次抗体としてヤギ抗マウス IgG 抗体を、二次抗体として peroxidase-conjugated secondary antibody を用いて、加齢に伴う血管条毛細基底膜上の IgG の分布の変化を調べた。

4. 研究成果

血管条の幅は、3 日齢よりも 4 週齢において大きくなる傾向があった。12 ヶ月齢の血管条の幅は、4 週齢に比較して有意に狭かった (Figs. 1, 2)。ラセン靭帯、ライスネル膜および半規管膨大部においては、基底膜上に PEI 粒子の規則正しい配列が認められ (Fig. 3) その分布は 3 日、4 週、8 週、6 カ月、12 カ月齢の間で差はみられなかった。血管条毛細血管基底膜の PEI 粒子の分布は、3 日齢に比較して 4 週減少傾向がみられ、8 週齢、6 カ月、12 カ月齢では有意な現象が確認された (Figs. 4-7)。3 日齢および 4 週齢のマウスでは、血管条およびラセン靭帯の毛細血管周囲に IgG 沈着は見られなかったが、8 週齢、6 ヶ月および 12 ヶ月齢では IgG の沈着が血管条毛細血管基底膜上に認められたが、ラセン靭帯の毛細血管基底膜にはみられなかった (Figs. 8, 9)。

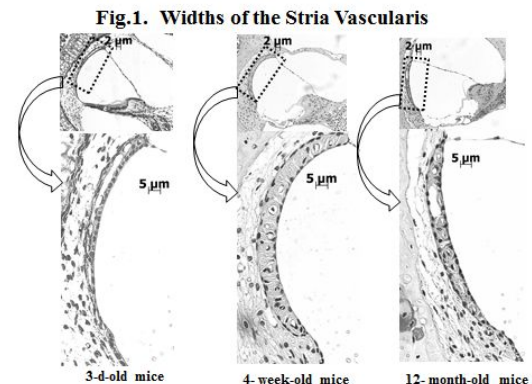
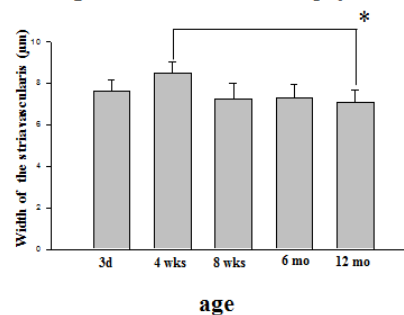


Fig.2 Age associated-strial atrophy



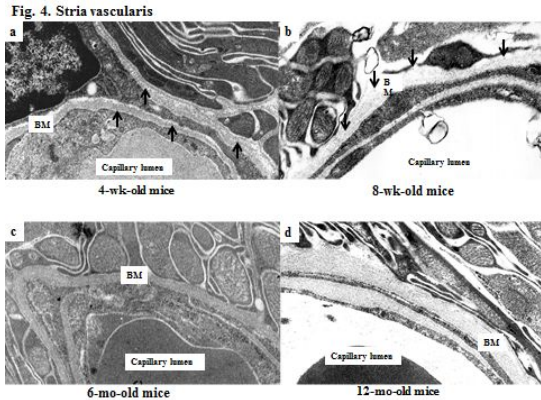
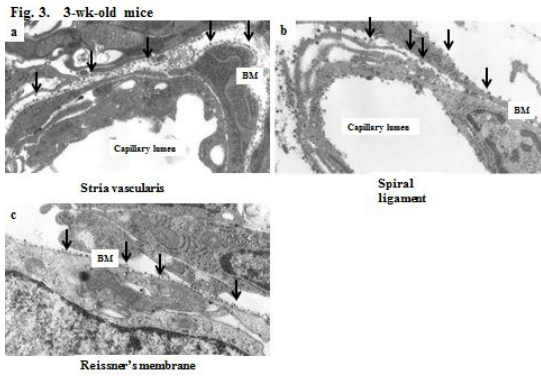


Fig. 5. Capillary BM of the stria vascularis

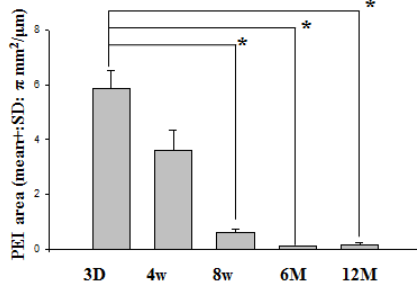


Fig. 6. Capillary BM of the spiral ligament

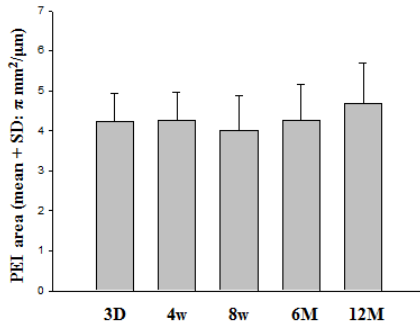
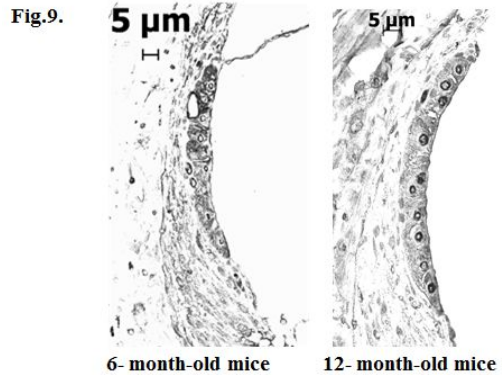
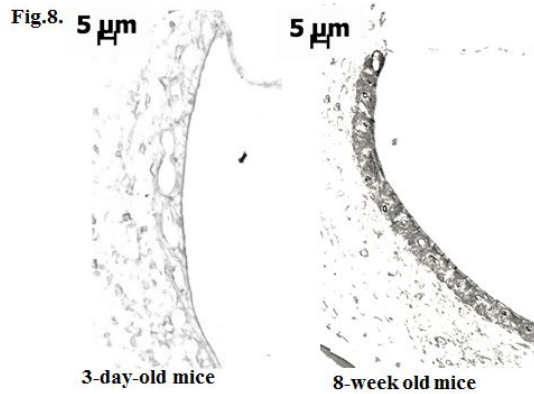
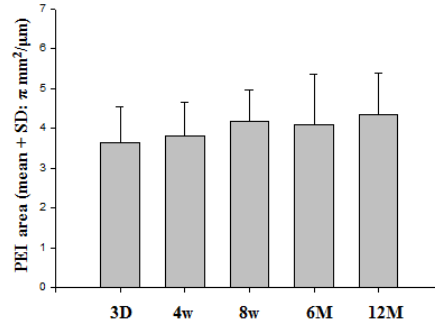


Fig. 7. Subepithelial BM of Reissner's membrane



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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Mitsuya Suzuki, Takashi Sakamoto, Yohihiro Ikemiyagi, Akinori Kashio, Tatsuya Yamasoba: Age-Related Morphological Changes in the Stria Vascularis in C57BL/6. 37th ARO Mid-Winter meeting (San Diego, USA), February 22, 2014

鈴木光也, 坂本幸士, 樫尾明憲, 池宮城慶寛, 山岨達也: 蝸牛の基底膜陰性荷電に対する加齢の影響. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会, 新潟, 2012.5.10

Mitsuya Suzuki, Takashi Sakamoto, Akinori Kashio, Yoshihiro Ikemiyagi, Tatsuya Yamasoba:

Age-Related Changes in Basement Membrane Anionic Sites in the Cochlea. 35th ARO Mid-Winter meeting (San Diego, USA), February 26, 2012

〔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
なし

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

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

榎尾 明憲 (KASHIO, Akinori)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20451809

池宮城 慶寛 (IKEMIYAGI, Yoshihiro)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：50439931

(3) 連携研究者

山嵜 達也 (YAMASOBA, Tatsuya)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60251302