

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23791953

研究課題名(和文) 老人性難聴の分子病理学的解析～蝸牛外側組織に焦点を当てて～

研究課題名(英文) Molecular pathological analysis of presbycusis ~focused on cochlear lateral wall~

研究代表者

木村 百合香(Kimura, Yurika)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：40450564

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)：(1)レーザーマイクロダイゼクション(LMD)法のヒト側頭骨病理学的解析への導入：RNA熱処理を加えることで、ラセン靭帯におけるCOCH mRNA、外有毛細胞におけるSLC26A5 mRNAの部位別発現の同定に成功した(Kimura et al, Hearing research, 2013)。(2)加齢性難聴とcochlin：加齢によるラセン靭帯におけるcochlin分布の変化の可能性が示唆された。(3)mtDNA変異の蝸牛外側壁へ与える影響：MELAS症例において、血管条におけるmtDNA3243変異率は低かったが、病理組織学的には血管条の萎縮は高度であった。

研究成果の概要(英文)：1. Introduction of Laser microdissection for the analysis of human temporal bone pathology: We succeeded in the detection of mRNA expression of COCH in spiral ligaments and SLC26A5 in outer hair cells. 2. Presbycusis and cochlin: Distribution of cochlin immunostaining is changed with aging. 3. Influence of mitochondria DNA mutation in the cochlear lateral wall: in the case of mt3243 point mutation, the ratio of mtDNA 3243 mutation was low but atrophy of stria vascular was severe. Because stria vascularis requires high energy and mitochondrial rich organ, it is weak to the mutation even at low level.

研究分野：耳科学

キーワード：ヒト側頭骨病理 老人性難聴 レーザーマイクロダイゼクション

1. 研究開始当初の背景

(1) 老人性難聴と側頭骨病理

現在に至るまで、ヒトにおける老人性難聴の病理に関しては、Schuknecht らによる蝸牛において機能単位別に細胞の消失を評価した分類がスタンダードに用いられている(表1)。感覚細胞やコルチ器の消失による感覚細胞性老人性難聴 sensory presbycusis, ラセン神経節の減少を認める神経細胞性老人性難聴 neural presbycusis, 血管条の萎縮による血管条性老人性難聴 strial presbycusis は、形態異常を呈するが、こういった異常所見を持たないタイプの老人性難聴の側頭骨病理組織が少なからず存在しており、Schuknecht らはこれらのなかで直線的な高音漸傾型感音難聴を呈するものは蝸牛基底板の剛性増加に起因する cochlear conductive presbycusis という仮説的分類を行っている¹⁾。しかしながら、このような仮説的分類をもってしても、老人性難聴の病理組織所見の約25%は光顕所見では説明がつかないとされている(indeterminate presbycusis)。

(表1)

Schuknecht による老人性難聴の組織分類

1) Sensory presbycusis:
2) Neural presbycusis
3) Strial presbycusis
4) Cochlear conductive presbycusis (hypothesis)
5) Mixed presbycusis
6) Indeterminate presbycusis

(2) 老人性難聴の病態解析にはなぜヒト側頭骨病理が必要か?

実験動物レベルを用いた老人性難聴の解析は、遺伝学的背景の均一化や遺伝子工学の導入のしやすさ、経済面でのメリットが非常に大きく、様々な解析が進んでいる。しかし、有毛細胞の消失や血管条の萎縮、ラセン神経節細胞の減少といった老人性難聴に特徴的な所見を呈し、老人性難聴のモデルマウスとして頻用されている近交系マウス C57BL/6 は cadherin23 の遺伝子多型を背景に持つなど²⁾、ヒトの老人性難聴と一対一に呼応するものではなく、また、これらの実験動物モデルは、有毛細胞の消失など形態変化を指標としているものがほとんどである。前述したように、ヒト側頭骨病理組織学的には典型的な形態変化なく難聴を呈した症例が多数存在し、これらの病理の解明には実際にヒトの

病理組織標本を解析することが必要である。

2. 研究の目的

ヒト内耳組織は死後開頭剖検が得られた際にしか採取できないため、組織検体数が非常に限られていること、側頭骨という硬組織の中で高度に機能分化しており形態の温存が困難であること、組織学的解析には莫大な経済的及び人的資源を要することから、分子生物学が飛躍的に進歩している現代でも、ヒト側頭骨病理学的解析は、ホルマリン固定セロイジン包埋切片における蝸牛内の機能単位別の細胞数の評価が主であり、本邦においては実働している研究機関は皆無に等しい。しかしながら、責任病巣は何か、実験動物モデルとヒトでの病態は相同か否か、ヒトでの分子細胞学的発症メカニズムは何か、といったヒトにおける老人性難聴の解明には、実際の臨床症例での解析が必須である。そこで、ヒト側頭骨病理学の観点から、老人性難聴への分子生物学的アプローチの導入の可能性につき検討を行った。

3. 研究の方法

(1) レーザーマイクロダイゼクション(LMD)法の導入

レーザーマイクロダイゼクション法とは、観察した組織標本からレーザー光を用いて、組織・細胞レベルで特定の領域のみをカット・回収する方法であり、形態解析と分子生物学的解析の橋渡しの手法である。細胞レベルで高度に機能分化したヒト内耳病態の解明には非常に有用なツールである。そこで、本法をホルマリン固定パラフィン包埋蝸牛切片よりの mRNA 抽出に応用できないか、検討を行った。

(2) 加齢性難聴と Cochlin

前期高齢者群(75歳未満)4耳(平均71.5歳)と超高齢者群(90歳以上)5耳(平均92.2歳)の凍結側頭骨標本より、前述の方法を用いて蝸牛より mRNA を抽出し、蝸牛外側壁に多く発現する難聴遺伝子(COCH, GJB2, COL2A1)の発現量の比較を行った。

また、また、前期高齢者群5耳(平均69.4歳)と超高齢者群5耳(92.2歳)のホルマリン固定パラフィン包埋側頭骨切片において、COCHのコードするタンパク cochlin の免疫染色を行った。

(3) ミトコンドリア DNA 変異の蝸牛外側壁へ与える影響

ミトコンドリア 3243 変異は MELAS の原因疾患として知られているが、神経症候を呈さず糖尿病と進行性感音難聴のみを呈する症例が存在する。これらの症例における蝸牛での障害部位の解析を行った。

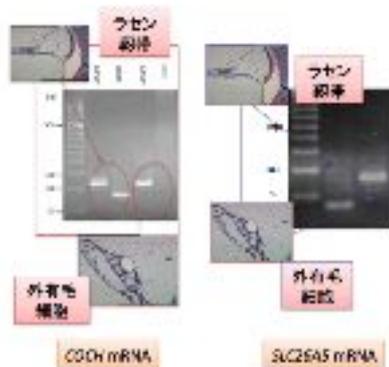
(4) 再発性多発軟骨炎症例における側頭骨病理組織学的解析

再発性多発軟骨炎では内耳障害が生じ、type II collagen 抗体が陽性となることが知られているが、加齢における関与が指摘されている cochlin の局在と type II collagen の局在は一致しており、相互作用が予測される。再発性多発軟骨炎症例における内耳病態の解析を行った。

4. 研究成果

(1) レーザーマイクロダイゼクション (LMD)法の導入

mRNA は前述の通り固定・包埋の過程で変性・分解が進むため、ホルマリン固定パラフィン包埋蝸牛切片よりの抽出は通常の RT-PCR では不可能であるが、RNA 熱処理を加えることで、ラセン靭帯における COCH mRNA、外有毛細胞における SLC26A5 mRNA の部位別発現の同定に成功した(図1)。



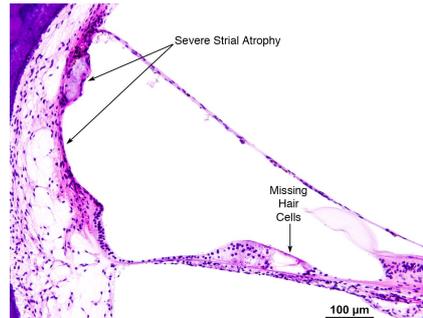
(図1) LMD法による部位別 mRNA 発現の同定
ラセン靭帯における COCH mRNA、外有毛細胞における SLC26A5 mRNA の部位別発現の同定が可能であった。

(2) 加齢性難聴と cochlin

免疫染色の結果、cochlin はラセン靭帯、基底板、ラセン板縁に cochlin の発現があり、感覚細胞、ラセン神経節には発現はなく、頂回転方向へ行くほど染色性は薄く限局されていた。超高齢者群では、基底板を中心とした間質に cochlin が広く均質に発現する傾向であった。cochlin の免疫染色陽性率は前期高齢者 VS 超高齢者=46.8%:53.9%であり、免疫染色での定量的評価は困難だが、加齢によるラセン靭帯における cochlin 分布の変化の可能性が示唆された。基底板振動障害型老人性難聴ではラセン靭帯内 II 型コラーゲンの陽性面積が増加し、また、cochlin と II 型コラーゲンの局在は一致していることから、光顕的形態変化のない老人性難聴では Cochlin の加齢による分布の変化が II 型コラーゲン配列の乱れや基底板振動の乱れを生じるなど、感音難聴を引き起こしている可能性が考えられた。

(3) ミトコンドリア DNA 変異の蝸牛外側壁へ与える影響

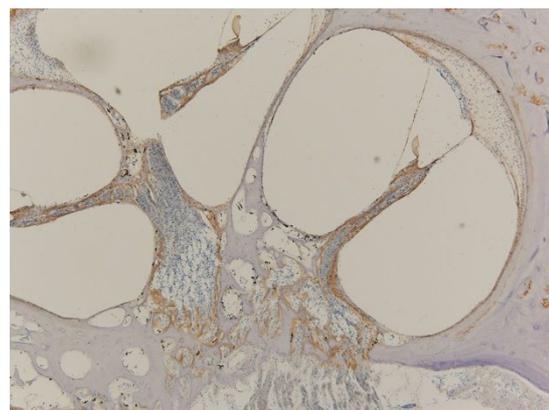
血管条におけるミトコンドリア 3243 変異率は 2.2%と低かったが、病理組織学的には血管条の萎縮は高度であり、ミトコンドリアが豊富な組織であることから、血管条はミトコンドリア障害の影響を受けやすいものと考えられた。



(図2) MELAS 症例における側頭骨病理組織所見
有毛細胞の消失と血管条の高度萎縮を認める。

(4) 再発性多発軟骨炎症例における側頭骨の病理組織学的解析

コルチ器、血管条、ラセン神経節細胞に高度な骨導閾値上昇を説明しうる所見は認めず、免疫組織学的解析により、Type II collagen の発現を、ラセン靭帯基底板、蓋膜ラセン板縁、骨ラセン板、球形嚢・卵形嚢に強く発現を認めた。抗 type II コラーゲン抗体の関与は今後の検討課題である。



(図3) ラセン靭帯基底板、蓋膜 ラセン板縁、骨ラセン板に type II collagen の強い発現を認めた。

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8件)

1. Kimura Y, Makino N, Hitome K, Kitamura K. An Aberrant Carotid

- Artery in the Temporal Bone with Fatal Complication. Auris Nasus Larynx: in press. (査読有)
2. Kimura Y, Makino N, Sawabe M, Kitamura K. Histopathologic findings of an aberrant internal carotid artery in the temporal bone with fatal complication. Otol and Neurotol 2015 ;36:e150-2 (査読有)
 3. Ohno K, Honjyo M, Kimura Y. Nasal Manifestations of IgG4-Related Disease: a report of two cases. Auris Nasus Larynx 2015;42:483-7. (査読有)
 4. 渡邊晶, 木村百合香, 加藤智史, 喜多村健. 側頭窩・側頭下窩に進展した中耳肉芽腫の1例. Otolaryngology Japan 2014; 24: 118-122. (査読有)
 5. 木村百合香, 杉原 毅彦, 中島 麻理, 新井 富生, 村山 繁雄, 桑島 巖, 初田 裕幸, 平野 史生, 稲松 孝思. 耳介の炎症、鞍鼻、多関節炎、気管支壁肥厚を認め、ステロイド加療中に急性呼吸不全を来し死亡した1例. Geriatric Medicine 2013; 51:853-864.(査読無)
 6. 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. 2013; 302; 26-31. (査読有)
 7. Kato T, Fuku N, Noguchi Y, Murakami H, Miyachi M, Kimura Y, Tanaka M, Kitamura K. Mitochondrial DNA haplogroup associated with hereditary hearing loss in a Japanese population. Acta Otolaryngol. 2012 ;132:1178-82.(査読有)
 8. 山本容子, 木村百合香, 加藤智史, 杉浦むつみ, 喜多村健. 高齢者における突発性難聴の聴力予後の検討. Otolaryngology Japan 2011; 21: 143-148. (査読有)

[学会発表](計6件)

1. 木村百合香, 他. 再発性多発軟骨炎の側頭骨病理組織学的所見. 第24回日本耳科学会総会, 新潟市, 新潟, 2014年.
2. 木村百合香, 他. 内頸動脈鼓室内異常走行により致死的合併症を生じた一症例の側頭骨病理組織学的所見. 第23回日本耳科学会総会, 宮崎市, 宮崎, 2013年
3. Kimura Y, et al. A case of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS); temporal bone pathology and mutational analysis. 13th International

Otopathology Society, Bosuton, MA, USA, 2013. (Travel Awards)

4. Kimura Y, et al. Gene expression analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded archival temporal bone section using laser microdissection. The First Asian Otolaryngology Meeting & The 3rd East Asian Symposium on Otolaryngology. Nagasaki, Japan, 2012.
5. 木村百合香, 他. ミトコンドリア脳筋症(MELAS)の側頭骨病理組織所見. 第22回日本耳科学会総会, 名古屋市, 愛知, 2012年.
6. 木村百合香, 他. 高齢者ヒト蝸牛ラセン靭帯における Cochlin の発現と年齢に関する検討. 第21回日本耳科学会, 宜野湾市, 沖縄, 2011年

[図書](計4件)

1. 木村百合香. 高齢者の診療のコツと注意点. ENT 臨床フロンティア 子どもを診る 高齢者を診る-耳鼻咽喉科外来診療マニュアル 山岨達也編 中山書店 東京. pp242-247, 2014.
2. 木村百合香. 第2章 高齢者に多い症候 6 聴覚障害 すぐに使える高齢者総合診療ノート. 大庭健三編 日本医事新報社 pp74-78, 2014.
3. 木村百合香. 老人のめまい: 何が問題となるか. Pharma Medica 2013; 31:19-22.
4. 木村百合香. 高齢者の急性期めまいに対する診療. 高齢者の薬 よろずお助け Q&A 100. Pp107-109. 桑島巖編. 羊土社. 2012

[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
東京都健康長寿医療センター病理解剖コ
ラボレーション事業 HP
(<http://www1.tnghig.jp/pathology-d/info/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 百合香 (KIMURA YURIKA)
昭和大学・医学部・耳鼻咽喉科学講座・准
教授
研究者番号：40450564

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

喜多村 健 (KITAMURA KEN)
東京医科歯科大学大学院・耳鼻咽喉科
特任教授

池園 哲郎 (TETSURO IKEZONO)
埼玉医科大学耳鼻咽喉科・教授

重本 和宏 (SHIGEMOTO KAZUHIRO)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究
所・部長

沢辺 元司 (SAWABE MOTOJI)
東京医科歯科大学・医学部・
保健衛生学科・教授

久保 幸穂 (KUBO SACHIHO)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究
所・前研究員

小林 一女 (KOBAYASHI HITOME)
昭和大学・医学部・耳鼻咽喉科学講座・
教授