

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791818

研究課題名(和文) 蝸牛外側壁線維細胞の再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of cochlear lateral wall fibrocytes regeneration

研究代表者

水足 邦雄 (Mizutari, Kunio)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・聴覚・平衡覚研究部・研究員

研究者番号：40338140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳エネルギー不全モデルを作成した。その結果マウスにおいて3-NP投与後の聴性脳幹誘発反応(ABR)閾値上昇が認められその原因が蝸牛外側壁線維細胞に特異的に生じるアポトーシスによるものであることを確認した。この3-NPモデルマウスを3-NP投与後2ヶ月まで経過観察すると、低音域から中音域までのABR閾値に有意な改善が認められた。さらに、3-NP投与によって低下した蝸牛内電位が改善していることが明らかとなった。以上より自発的な蝸牛外側壁線維細胞の再生は蝸牛内電位の回復により聴力の改善を来していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Our research aimed to reveal the mechanism of cochlear lateral wall regeneration after severe damage caused by acute mitochondrial dysfunction. First, we successfully made a mouse model of acute mitochondrial dysfunction used by 3-nitropropionic acid (3-NP). This mouse model had severe hearing loss measured by auditory brainstem response (ABR), which was caused by apoptosis on the cochlear lateral wall fibrocytes. Two months after 3-NP administration, spontaneous ABR threshold recovery was observed. Moreover, endocochlear potential was also recovered at the same timing. Therefore, regeneration of cochlear lateral wall fibrocytes leads to recovery of endocochlear potential, following recovery of hearing.

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：急性感音難聴 内耳障害 ミトコンドリア 線維細胞 蝸牛外側壁 再生 蝸牛内電位

1. 研究開始当初の背景

蝸牛外側壁に存在する線維細胞は、ATP を利用した能動的なカリウムイオンのリサイクリングによって、感覚受容細胞である有毛細胞の脱分極に不可欠な蝸牛内リンパ液の高カリウム濃度を作り出し、蝸牛内電位を維持している(Delprat et al., Mol. Cell. Biol. 25, 847-853. Minowa et al., Science 285, 1408-1411)。そのため虚血や低酸素血症などの ATP 産生が減少するような病態では、この能動的イオン輸送に障害が生じる事が推測される。これまで、我々の研究グループではミトコンドリアの電子伝達系の不可逆的阻害剤である 3-nitropropionic acid(3-NP)を内耳に局所投与することによって、内耳に局限するエネルギー不全を生じるモデルラットを作製し、その病態の解明と治療法の検討を行ってきた。その結果、内耳局所的なミトコンドリア機能阻害により高度の聴性脳幹誘発反応(ABR)閾値上昇が認められ(Hoya et al. Neuroreport, 2004)、その原因が蝸牛外側壁線維細胞に特異的に生じるアポトーシスによるものであることを報告した(Okamoto et al. Audiol Neurotol, 2005)。また、感覚受容に最も重要な器官であるコルチ器にはアポトーシスが生じておらず、アポトーシスの主要伝達経路であるカスパーゼを阻害することによって外側壁のアポトーシスを阻害し難聴の予防が可能であることを報告した (Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007)。一方で、この 3-NP モデルラットを 3-NP 投与後 2 ヶ月まで経過観察すると、低音域から中音域までの ABR 閾値に有意な改善が認められた。組織学的には外側壁線維細胞、特に I 型、IV 型において細胞分裂を伴う自発的な再生が認められ(付図参照)。再生した線維細胞は能動的イオンリサイクリングの主体を担う $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase } \beta-1$ を発現していることが明らかとなった (Mizutari et al. Brain Res,

2011)。一方で、外側壁再生の程度と蝸牛内電位との関係、および再生した外側壁線維細胞の由来細胞は依然として不明である。そこで本研究では、この自発的外側壁再生のメカニズムを解析し、さらに外側壁線維細胞再生が蝸牛内電位に与える影響を明らかにすることを目的とする。このような 1 ヶ月を越す遅発性の聴力改善は、突発性難聴における臨床でも約 10%に見られる(Yeo et al. Otolaryngol. Head Neck Surg, 2007)。すなわち、本モデルは臨床において突発性難聴と診断される病態の一部を再現しうるモデルであると考えられる。そのため、本研究は未だ病態が不明である突発性難聴の病態解明を目的としており、病態に基づいた新規治療法を確立するにあたり重要な知見になるものと考え研究を立案した。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの電子伝達系の不可逆的阻害剤である 3-nitropropionic acid(3-NP)を内耳に局所投与し作成した急性内耳エネルギー不全モデルを用いて、蝸牛外側壁線維細胞の自発的外側壁再生のメカニズムを解析し、さらに外側壁線維細胞再生が蝸牛内電位に与える影響を明らかにすることを目的とする。本研究によって、外側壁線維細胞の再生と蝸牛内電位との関係が明らかとなる。本研究は、原因不明である急性感音難聴の病態理解、特に外側壁線維細胞の障害後の動態について新たな知見をもたらす、突発性難聴等の新規治療法の開発に大きく寄与すると思われる。

3. 研究の方法

まず、従来我々の施設で S-D ラットを使用して作成していた 3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳エネルギー不全モデルを CBA/CaJ マウスを用いて作成する。方法はこれまでの報告と同様(Mizutari

et al. J Neurosci Res, 2007, Hoya et al. Neuroreport, 2004)、全身麻酔下に耳後部切開をおき、中耳骨胞を露出。中耳骨胞にマイクロドリルで小開窓を行い手術顕微鏡下に正円窓窩を明視下に置く。500mM の3-NP を正円窓窩にマイクロポンプと微小チューブを用いて局所投与する。3-NP 投与後、正円窓窩からの薬液脱落を防ぐため、正円窓窩にコラーゲンスポンジを留置し、閉創する。この500mM という3-NP の濃度は、投与後翌日には全周波数においてスケールアウトレベルの ABR 域値上昇が見られるが、投与後2ヶ月で低音域・中音域において中程度の ABR 閾値改善が見られる濃度である (Mizutari et al. Brain Res, 2011)。3-NP の投与量はラットにおいては3 μ lであったが、本研究ではマウスの正円窓窩の体積とほぼ同様の1 μ lとする。その後経時的に聴性脳幹誘発反応(ABR)を全身麻酔下に行い、これまでのラットを用いたモデルと同様の ABR 閾値変化を生じるか確認する。3-NP の反応に動物種差が認められる可能性もあるため、マウスにおいて正円窓窩に投与した3-NP の効果が認められなければ、既に報告したラットを用いたモデルを使用して以後の実験を行う。マウスにおいて3-NP 投与後 ABR 閾値上昇が認められれば、まず光学顕微鏡下に外側壁線維細胞、血管条、およびコルチ器とらせん神経節の観察を行う。より詳細な組織所見を得るため、グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒドの混合液による全身灌流固定を行い、内耳を摘出・脱灰後、オスミウムにて後固定を行いEpon812を用いたプラスチック包埋薄切切片を作成し、トルイジンブルーによる染色で評価を行う。また、同時に超薄切切片を作成し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛による二重染色により透過型電子顕微鏡を用いて外側壁線維細胞およびコルチ器、らせん神経節のさらに詳細な微小組織変化

の観察を行う。続いて外側壁線維細胞の免疫組織学的解析を行うため、4%パラホルムアルデヒドにて固定した蝸牛を3-NP 投与後経時的に採取、連続凍結切片を作成し、各種外側壁線維細胞 subtype の染色を行う。

続いて、経時的な蝸牛内電位 (endocochlear potential:EP) の測定を行う。始めに、3-NP を正円窓窩に投与し、ABRにて閾値の上昇・改善を確認した後、全身麻酔下に再度中耳骨胞を露出・開窓し、蝸牛基底回転部側壁を手術用顕微鏡下に明視下に置く。マウスでは中央階に存在する血管条が暗色部として蝸牛骨壁から透見できるため、基底回転中央階の部位を中耳から確認できるため、同部位にマイクロドリルおよび微小針を用いて蝸牛骨壁に小開窓を行う。蝸牛中央階が開窓されたら、直ちにKCl水溶液を充填した微小ガラスピペット電極を挿入し、顎二腹筋部に基準電極を挿入しEPを測定する。EP測定は3-NP投与前、投与1日後、2週間後、1ヶ月後、および2ヶ月後に行うが、2ヶ月後以降もABRでさらなる閾値改善が認められるようであれば、適宜測定を追加し ABR 閾値との相関を検討する。

4. 研究成果

まず、従来我々の施設でS-Dラットを使用して作成していた3-nitropropionic acid(3-NP)による急性内耳エネルギー不全モデルをCBA/CaJマウスを用いて作成した。方法はこれまでの報告と同様(Mizutari et al. J Neurosci Res, 2007, Hoya et al. Neuroreport, 2004)、全身麻酔下に耳後部切開をおき、中耳骨胞を露出。中耳骨胞にマイクロドリルで小開窓を行い手術顕微鏡下に正円窓窩を明視下に置く。500mMの3-NPを正円窓窩にマイクロポンプと微小チューブを用いて局所投与した。その結果マウスにおいてラットにおいて観察された3-NP投与後のABR閾値上昇が同様に認められた。さ

らに組織学的な検討を行ったところ、内耳局所的なミトコンドリア機能障害により高度の聴性脳幹誘発反応(ABR)閾値上昇が認められ(Hoya et al. Neuroreport, 2004)、その原因が蝸牛外側壁線維細胞に特異的に生じるアポトーシスによるものであることを光学顕微鏡下に確認した。この3-NPモデルマウスを3-NP投与後2ヶ月まで経過観察すると、低音域から中音域までのABR閾値に有意な改善が認められた。組織学的には外側壁線維細胞、特にI型、IV型において細胞分裂を伴う自発的な再生が認められ、再生した線維細胞は能動的イオンリサイクリングの主体を担うNa⁺/K⁺/ATPase -1を発現していることが明らかとなった。これらの結果より、従来ラットで用いていた急性内耳エネルギー不全モデルが、マウスでも使用可能となった。さらに、蝸牛内電位(endocochlear potential)を測定したところ、3-NP投与によって低下した電位が改善していることが明らかとなった。以上により、自発的な蝸牛外側壁線維細胞の再生は蝸牛内電位の回復により聴力の改善を来していることが明らかとなった。

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 4件)

Mizutari K, Michikawa T, Saito H, Okamoto Y, Enomoto C, Takebayashi T, Ogawa K, Nishiwaki Y.
Age-Related Hearing Loss and the Factors Determining Continued Usage of Hearing Aids among Elderly Community-Dwelling Residents.
PLoS One. 2013 Sep 23;8(9):e73622.

Michikawa T, Nishiwaki Y, Saito H, Mizutari K, Takebayashi T.

Tinnitus preceded depressive symptoms in community-dwelling older Japanese: A prospective cohort study.
Prev Med. 2013;56(5):333-6.

Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge AS.
Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma.
Neuron. 2013;77(1):58-69.

Fujinami Y, Mutai H, Mizutari K, Nakagawa S, Matsunaga T.
A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea.
J Pharmacol Sci. 2012;118(3):363-72.

〔学会発表〕(計 7件)

水足邦雄、藤岡正人、細谷誠、小川郁
Notch 情報伝達系阻害による蝸牛有毛細胞の機能的再生
第23回日本耳科学会総会・学術講演会、
インストラクションコース3、宮崎、2013年11月24日

Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, , Okano HJ, Okano H, Edge AS.
Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma.
The 29th Politzer Society Meeting,
Antalya, Turkey, 2013年11月14日
・Politzer Award受賞
平成25年10月24日、第58回日本聴覚医学会総会・学術講演会(松本)

「HbA1c と加齢性難聴の関連に関する横断・縦断的検討：倉淵高齢者コーホート」

水足邦雄、西脇祐司、斉藤秀行、小川郁
平成25年5月18日、日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(札幌)

「CDH23 遺伝子変異による遺伝西南緒の臨床像」

水足邦雄，仲野敦子，有本友季子，増田
佐和子，阪本浩一，守本倫子，瀧口哲也，
小河原昇，加我君孝，松永達雄

平成25年2月18日 36st ARO Midwinter
Meeting (Baltimore, MD, USA)

Intracochlear Tamoxifen Distribution

Visualized by a Cre-Lox System

Kunio Mizutari, Sewell WF, Edge AS.

平成24年10月11日、日本聴覚医学会
学術講演会（京都）

「地域在住高齢者における耳鳴と抑うつ傾
向との関連 倉渕高齢者コーホート」

水足邦雄，西脇祐司，齊藤秀行，小川郁

平成24年10月5日、日本耳科学会学術
講演会（名古屋）

「内耳の発生・再生に関する最新知見 レポ
ーターマウスを用いた内耳ドラッグデリバ
リーの新規研究法」

水足邦雄

〔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

http://www.kankakuki.go.jp/lab_c-1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水足 邦雄 (MIZUTARI, Kunio)

独立行政法人国立病院機構東京医療セン
ター・臨床研究センター(感覚器センター)・
研究員

研究者番号：40338140

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：