

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82643
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24791819
 研究課題名(和文) OTOF欠損マウスを用いたAuditory Neuropathyの障害モデルの構築

 研究課題名(英文) Spiral ganglion degeneration in a mouse model of auditory neuropathy spectrum disorder

 研究代表者
 難波 一徳 (Namba, Kazunori)

 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：60425684

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オーディトリー・ニューロパシー(ANSD)とは、外有毛細胞は正常だが聴性脳幹反応がない難聴の総称である。本研究では、ANSDの特徴を示すOTOF遺伝子欠損マウス(OTOF^{-/-})の蝸牛神経節において免疫染色による細胞種別の数の統計を行い、正常マウスとの比較を行った。OTOF^{-/-}の求心性の1型神経細胞は、正常マウスと比べて生後7日以降のアポトーシスによる顕著な減少が観られ、12週齢では50%以上まで減少したが、遠心性の2型神経細胞では減少が観られなかった。外有毛細胞は主に遠心性神経の投射を受けていることから、本研究成果はANSDの定義に則し、ANSDの病態モデルとして有用であることが解った。

研究成果の概要(英文)：Auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD) is a hearing disorder in which sound enters the inner ear normally but the transmission of signals from the inner ear to the brain is impaired. In this study, we compared the number of spiral ganglion (SG) neurons between otoferlin deficient (OTOF^{-/-}) and normal mice in developmental stage. Comparing to normal SG, the number of afferent type-1 neuron for OTOF^{-/-} was apoptically decreased from post-natal day 7, and it over 50% in 12 weeks of age. However, a decrease was not seen in efferent type-II neuron. Because the outer hair cell is mainly projected by efferent nerve, these data suit the definition of ANSD, and it is useful as the animal model of disease of ANSD.

研究分野：耳科学

キーワード：OTOF Otoferlin Auditory Neuropathy ANSD 蝸牛神経節 Spiral Ganglion 神経細胞 neurodegeneration

1. 研究開始当初の背景

Otoferlin は OTOF 遺伝子の産物であり、内耳有毛細胞のリボンシナプスにおいて、小胞分泌に必須である。それ故 OTOF 遺伝子欠損マウス(*OTOF^{-/-}*)は、外有毛細胞は正常だが聴性脳幹反応がないという Auditory Neuropathy Spectrum Disorder (ANSD)の病徴を呈する。本研究室で生後 3 ヶ月の *OTOF^{-/-}*の蝸牛神経節(SG)のカウンター染色により形態解析を行ったところ、正常マウス(*OTOF^{+/+}*)に比べて SG の神経細胞(SGN)が著しく減少していることを発見した。しかし、SG に含まれるどの細胞体が減少し ANSD の発症に至るかその病態は未知であった。

2. 研究の目的

現在の ANSD における SG の病態についてはよく解っていない。ANSD の視覚的な内耳の形態異常の発症メカニズムが解析されることにより、そのメカニズムに基づいた ANSD の理論的な治療開発に繋がると考えられる。

そこで本研究では、シナプスの伝達が阻害されたことにより、*OTOF^{-/-}*の SGN の減少が引き起こされるという仮説に基づき、発達段階において *OTOF^{-/-}*の SGN のどのような細胞が減少するか、また細胞死によるものかなど、*OTOF^{+/+}*と比較することによりその病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

胎生 16 日～19.5 日、生後 0 日～10 日、2 週、4 週、12 週齢の *OTOF^{-/-}*および同腹の *OTOF^{+/+}*のそれぞれ C57B6N マウスを深麻酔下において 4%PFA による灌流固定を行い、両側内耳の摘出を行った。

一晩の浸漬固定後、パラフィンによる包埋を行った。

5 μm 厚の切片を作成し、スライドグラスにマウントし、蝸牛の中回転位置の SG が確認できる切片を染色に用いた。

同時期の *OTOF^{-/-}*および同腹の *OTOF^{+/+}*の免疫染色では、神経細胞のマーカである抗 NeuN マウス抗体と 2 型神経細胞(遠心性神経)のマーカである、抗 Peripherin ウサギ抗体の二重染色を行った。

次に、それぞれの一次抗体に対応するマウス Alexa488 抗体、rabbit Alexa568 抗体の二次抗体による染色を行い、核を染色するための DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡 (DM 2500 Leica) による観察を行った。

備え付けカメラ (DFC500 Leica) により撮影を行い、赤、緑、DAPI の蛍光フィルターを通して撮影した電子ファイルを、Photoshop CS2 画像処理ソフトにより重ね合わせを行い、それぞれのマーカーのシグナルを一つの画像にした。

SG 内の 1 型神経細胞(求心性神経)と 1 型神経細胞をそれぞれ細胞種別のカウントを行い、統計を行った。

SGN のカウントにおいては、50 μm² の枠を用いて SG 内に納まるようランダムに 3 回カウントし、その平均をとる事によって行った。

の免疫染色データと同じ時期の同切片を用いて、それぞれ TUNEL 染色を行い、細胞死を起こしている細胞のカウントを行った。測定法は の と同じ。

4. 研究成果

1 型神経細胞と 2 型神経細胞を染色する NeuN、および 2 型神経を染色する Peripherin の 2 種類のマーカーを用いて、各発達段階の SGN の免疫染色を行ったところ、鮮明に両神経細胞を区別することに成功した(図 1)。

*OTOF^{-/-}*の求心性 1 型神経細胞の数を正常マウスと比較したところ、生後 7 日以降に数の減少が観られ、12 週齢では 50%以上の減少が観られたが、*OTOF^{-/-}*の遠心性 2 型神経細胞では、正常マウスと比べて減少は観られなかった(図 2)。

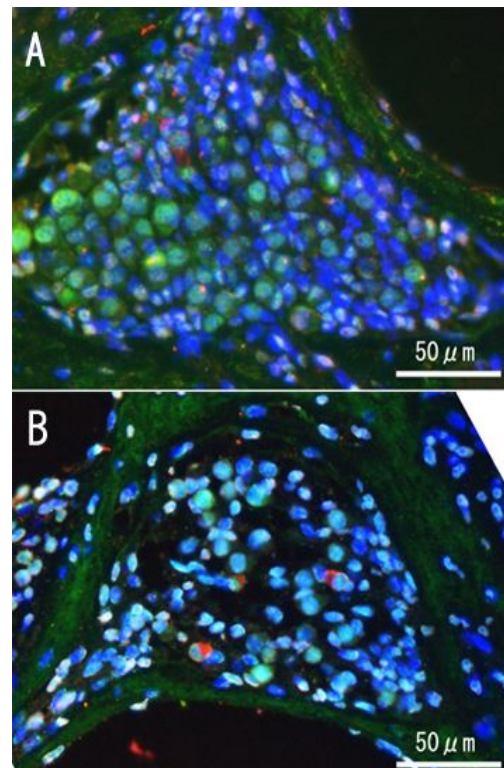


図 1

図1 各神経マーカーによる SG の免疫組織染色イメージ

A : *OTOF*^{+/+} (P18)、B : *OTOF*^{-/-} (P18)、緑 : NeuN (両神経細胞)、赤 : Peripherin (2型神経細胞)、青 : DAPI (細胞核) 水色 (NeuN と DAPI が重なった部分)。この時期では、正常 SG に比べて明らかに *OTOF*^{-/-} は、細胞が減少している。

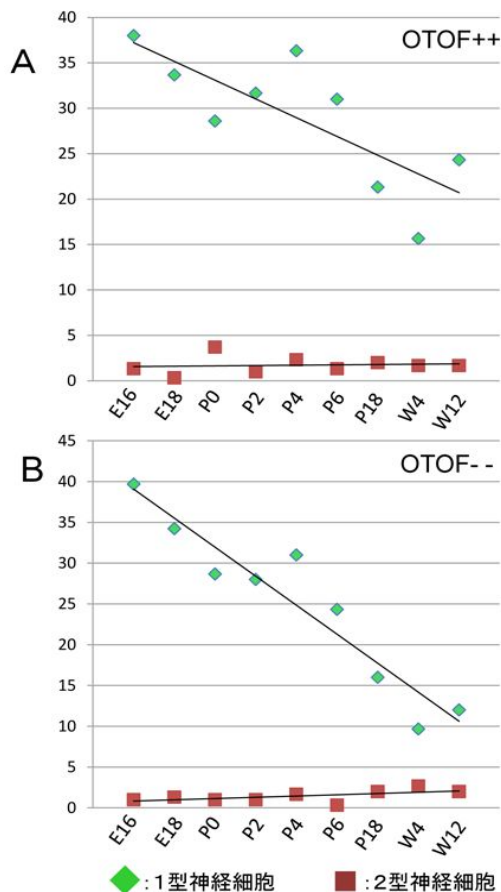


図2 発達段階における SGN の近似グラフ *OTOF*^{+/+} では 1 型神経細胞が緩やかに減少するが、*OTOF*^{-/-} では多く減少する。2 型神経細胞では両マウスとも減少は観られず、また特徴的な差異は観られなかった。

また、二重染色に用いた連続切片を用いて TUNEL 染色を行ったところ、発達段階を通じて 1 型神経細胞が細胞死を起こしていることが確認できた。*OTOF*^{-/-} と *OTOF*^{+/+} の間に特に顕著な差異は認められなかった。

以上まとめると、発達段階の SG において、*OTOF*^{-/-} は正常マウスに比べて 1 型神経細胞が顕著に減少し、その減少は細胞死によるものであることが解った。*OTOF*^{-/-} の 2 型神経細胞の数は正常マウスと比べて差異は認められなかった。つまり、外有毛細胞は主に遠心性神経の投射を受けていることから、本研

究成果は ANSD の定義に則しており、ANSD の組織病態モデルとして有用であることが解った。

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 件)

[学会発表](計 1 件)

難波一徳、藤井正人、加我君孝、松永達雄

(国立病院機構東京医療センター感覚器センター)

「Auditory Neuropathy の特徴を示す *OTOF* 遺伝子欠損マウスを用いた蝸牛神経低形成の新規モデル」

(Novel phenotype of hypoplasia in spiral ganglion neuron of *OTOF* knock out mouse)

第 86 回日本生化学会大会 パシフィコ横浜
2013 年 9 月 11-13 日

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

難波 一徳 (Kazunori Namba)
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：60425684

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：